

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ECODOPPLERCARDIOGRÁFICA DE CAMUNDONGOS  
MAS-KO SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA TORÁCICA

MARCOS BARROUIN MELO

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS  
BELO HORIZONTE

2017

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ECODOPPLERCARDIOGRÁFICA DE CAMUNDONGOS  
MAS-KO SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA TORÁCICA

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas – Ênfase em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. S. Santos

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS  
BELO HORIZONTE

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão Arterial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação do Professor Dr. Robson Augusto Souza Santos e na vigência de auxílios concedidos pelo INCT e pela CAPES.

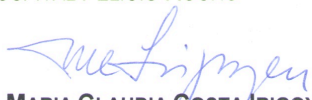
**"AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ECODOPPLERCARDIOGRÁFICA  
DE CAMUNDONGOS MAS KO SUBMETIDOS A COARCTAÇÃO  
DA AORTA TORÁCICA"**

**MARCOS BARROUIN MELO**

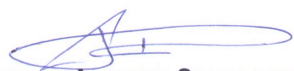
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 26 de outubro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. JOSÉ LUIZ BARROS PENA**  
HOSPITAL FELÍCIO ROCHO

  
**PROFA. DR.ª MARIA CLAUDIA COSTA IRIGOYEN**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

  
**PROFA. DR.ª RAFAELA FERNANDES DA SILVA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 26 de outubro de 2017**

Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais, Paulo Manoel Farias Melo (*in memoriam*) e Lúcia Barrouin Melo!

Às minhas queridas filhas, luzes da minha vida, Isabela e Mariana!

Aos meus queridos irmãos, Stella, Valéria e Leonardo!!!

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Robson pela oportunidade a mim concedida, pela ímpar dedicação à ciência, pelos ensinamentos e pelos valiosos conselhos científicos e vivenciais ao longo de todo o meu trajeto de trabalho no laboratório!

À Profa. Andrea Haibara pela oportunidade de ingressar no laboratório, pelos inestimáveis ensinamentos sobre regulação neural da pressão arterial e pelas conversas sobre a vida!

A Raquel Mini pelo apoio!

Às colegas Aline Oliveira e Daisy Motta, pela amizade e pela essencial ajuda na realização deste trabalho!

Ao colega Luiz Gonzaga por todo o apoio intelectual e de amizade durante minha jornada!

Agradeço especialmente aos colegas Giovani e Rodrigo pela ajuda na realização dos ecos!

Ao Leandro pela inestimável ajuda na realização das cirurgias!!

A todos os colegas do laboratório que participaram direta ou indiretamente para a realização do trabalho.

Ao José Roberto pelos ensinamentos práticos desde meu primeiro dia de laboratório e por toda ajuda prestada durante minha caminhada!

Aos professores do departamento que permitiram com certeza um imenso aprendizado em fisiologia e farmacologia, e a certeza maior de que tenho muito ainda a aprender!

À secretaria do departamento por todo auxílio prestado, e a Stephanie pela paciência e ajuda em todos os momentos de necessidade!

À Profa. Margaret Sleeper da UPENN por ter sido e ainda ser minha referência em cardiologia clínica, e principalmente pelos ensinamentos em ecocardiografia!!

A Deus e irmãos espirituais, pela luz, nos bons momentos e principalmente nos difíceis!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)





## Resumo

O heptapeptídeo angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) exerce seus efeitos via interação com o receptor Mas. Como resultado dessa interação, é deflagrada uma resposta contra-regulatória essencial da Ang-(1-7) sobre os efeitos constritores e remodelantes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), provocados pelo eixo Angiotensina II/receptor AT1. A hiperatividade do SRAA é descrita como determinante nos processos fisiopatológicos das doenças cardiovasculares, levando ao aumento da pressão arterial, remodelamento cardíaco e vascular. Além disso, induz atividade inflamatória importante em todo o organismo. Neste estudo avaliamos o papel do receptor Mas no remodelamento cardíaco provocado por sobrecarga pressórica induzida por coarctação da aorta torácica (CAT) em camundongos Mas-KO. A CAT experimental foi realizada na aorta transversa, entre as artérias inominada e carótida esquerda. A oclusão produzida foi de grau leve, aproximadamente 40% do lúmen da aorta. Foi realizado exame ecocardiográfico antes (tempo 0), 7 dias (tempo 1) e 30 dias (tempo 2) após a CAT. Análise ecocardiográfica convencional e análise de deformação miocárdica por *speckle tracking* (ST) foram realizados *off-line*. Ao fim do período de 30 dias os camundongos foram eutanasiados e os corações foram excisados e fragmentos utilizados para avaliação da expressão de mRNA, de genes relacionados a disfunção e remodelamento cardíaco. No tempo 0 ficou evidente ao ecocardiograma, as características de disfunção sistólica causada pela deleção do receptor Mas, verificada por redução dos parâmetros de função sistólica como fração de encurtamento ( $24,36 \pm 3,53$  versus  $39,44 \pm 3,26\%$ ,  $P < 0,0001$ ), fração de ejeção ( $49,00 \pm 5,94$  versus  $70,57 \pm 4,12\%$ ,  $P < 0,0001$ ), débito cardíaco ( $14,03 \pm 2,35$  versus  $18,01 \pm 3,63$  ul/min,  $P < 0,0001$ ), volume sistólico ( $30,11 \pm 4,54$  versus  $42,33 \pm 6,85$  ul,  $P < 0,0001$ ), e adaptação morfológica das paredes e câmara cardíaca ventricular esquerda. Na CAT não houve alteração observável ao ecocardiograma convencional para os animais WT. Os camundongos Mas-KO demonstraram incremento compensatório da função representado por aumento de fração de encurtamento ( $29,85 \pm 5,53$  versus  $38,34 \pm 4,19\%$ ,  $P < 0,01$ ) e fração de ejeção ( $57,42 \pm 8,35$  versus  $68,91 \pm 5,49\%$ ,  $P < 0,01$ ). A análise de deformação por ST no tempo 0 não demonstrou alterações para a maior parte dos parâmetros, mas revelou assincronia entre paredes para deslocamento e strain longitudinal endocárdicos no Mas-KO. Trinta dias após a indução da CAT, embora a avaliação por ST não tenha demonstrado mudança significativa para a maior parte dos parâmetros, tanto para os animais Mas-KO como para WT, houve redução importante de *Strain* e *Strain Rate* circunferenciais epicárdicos, sugerindo que o processo inicial do remodelamento funcional a sobrecarga de pressão pode iniciar-se nesse componente mecânico epicárdico. Houve indução de assincronia nos

camundongos WT e intensificação da assincronia entre os segmentos miocárdicos nos camundongos Mas-KO. Houve aumento da intensidade da assincronia nos deslocamentos longitudinais endo e epicárdicos, no *strain* e *strain* rate longitudinais epicárdicos e no eixo curto para o deslocamento radial epicárdico. De forma não esperada, a análise bioquímica de mRNA demonstrou aumento de expressão para ANP, BNP e MHCβ somente nos camundongos WT, embora a avaliação de espessura relativa da parede e índice de massa do ventrículo esquerdo tenham demonstrado que ambos evoluem para desenvolvimento de hipertrofia concêntrica. TGFβ e colágeno III apresentaram aumento para WT e Mas-KO após a CAT. Conclui-se que os camundongos Mas-KO apresentam maior sensibilidade no processo de adaptação funcional à CAT, observada pela ecocardiografia como incremento de função sistólica, embora alguns resultados bioquímicos determinantes desse remodelamento tenham sido inesperados.

Palavras-chave: SRA – Ang-(1-7)/Receptor Mas – ecocardiografia – coactação aórtica - camundongo

## Abstract

The heptapeptide angiotensin  $-(1-7)$  (Ang  $-(1-7)$ ) exerts its effects through interaction with Mas receptor. As a result of this interaction, an essential contra regulatory role of Ang  $-(1-7)$  against the constrictor and remodeling effects of the renin angiotensin system (RAS), represented by angiotensin II (Ang II)/AT1 receptor axis is achieved. Hyperactivity of RAS is a well-known determinant in physiopathology of cardiovascular diseases, leading to increased blood pressure and remodeling of the heart and vessels. Besides it stimulates inflammatory pathways everywhere in the organism. In this study, we evaluated the role of Mas receptor on cardiac remodeling in a pressure overload model induced by thoracic aortic constriction (TAC) in Mas-KO mice. TAC was induced in the transverse aorta, between innominate and left carotid arteries. The occlusion was considered mild, occupying approximately 40% of aortic lumen. Echocardiographic evaluation was performed before (time 0), 7 days (time 1) and 30 days (time 2) after TAC procedure. Conventional echocardiographic analysis and deformation analysis using Speckle Tracking echocardiography were accomplished offline. The mice were euthanized and their hearts excised. Fragments of the left ventricle (LV) were used for biochemical analysis of mRNA gene expression related to cardiac dysfunction and remodeling. The echocardiographic data of control showed clearly the systolic dysfunction developed by Mas-KO mice. Low fractional shortening (FS) ( $24,36 \pm 3,53$  versus  $39,44 \pm 3,26\%$ ,  $P < 0,0001$ ), ejection fraction (EF) ( $49,00 \pm 5,94$  versus  $70,57 \pm 4,12\%$ ,  $P < 0,0001$ ), cardiac output ( $14,03 \pm 2,35$  versus  $18,01 \pm 3,63$  ul/min,  $P < 0,0001$ ) and systolic volume ( $30,11 \pm 4,54$  versus  $42,33 \pm 6,85$  ul,  $P < 0,0001$ ), besides left ventricular chamber and walls morphological adaptations when compared to WT mice. Conventional echocardiographic data did not show any changing in WT mice 30 days after the mild TAC, but Mas-KO mice had a compensatory changing in heart function observed as increasing of FS ( $29,85 \pm 5,53$  versus  $38,34 \pm 4,19\%$ ,  $P < 0,01$ ) and EF ( $57,42 \pm 8,35$  versus  $68,91 \pm 5,49\%$ ,  $P < 0,01$ ) along with morphological changings. There were not many significant alterations in the deformation analysis in the control time, but it could be seen already that Mas-KO depicts asynchrony of endocardial longitudinal displacement and strain. Thirty days after TAC WT and Mas-KO mice developed a significant reduction of epicardial circumferential strain and strain rate values, what could mean that the first adaptations of heart mechanics to pressure overload in the model applied occurs in this component. There was an increasing asynchrony activity between walls after TAC in both animals, that was further worsened in Mas-KO mice. It was observed important asynchrony in endocardial and epicardial longitudinal displacement, epicardial longitudinal strain and strain rate, along with short axis epicardial radial displacement.

Unexpectedly biochemical analysis of mRNA showed increased expression of ANP, BNP and MHCβ only in WT mice, although evaluation of LV relative wall thickness and LV myocardial index mass demonstrated that both had tendency to concentric hypertrophy development. Collagen III and TGFβ mRNA increased in WT and Mas-KO mice. The results indicate that the Mas-KO mice are more sensitive in developing functional adaptation when submitted to a model of mild pressure overload, observed through echocardiographic evaluation as increased FS and EF and morphological modifications, although some biochemical results to support these changes were unexpected.

Keywords: RAS – Ang-(1-7)/Mas receptor – echocardiography – aortic banding - mice

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Visão atual do SRA e seus novos componentes e vias de interação.....	04
<b>Figura 2.</b> Imagem representativa do corte em eixo curto do ventrículo esquerdo.....	11
<b>Figura 3.</b> Imagem representativa do modo Motion em camundongo.....	12
<b>Figura 4.</b> Imagens de espectro Doppler de fluxo laminar (aorta) e turbulento (artéria uterina).....	13
<b>Figura 5.</b> Imagens de doppler colorido de fluxo aórtico laminar e turbulento.....	14
<b>Figura 6.</b> Imagem de peça anatômica da banda miocárdica e esquema mostrando sua divisão em segmentos.....	16
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica do sentido da torsão basal e apical em sentidos opostos na sístole e diástole.....	17
<b>Figura 8.</b> Representação dos movimentos passíveis de detecção pela análise de deformação miocárdica pelo Speckle Tracking.....	19
<b>Figura 9.</b> Posicionamento do camundongo e local da incisão (segundo espaço intercostal) para realização da coarctação torácica da aorta.....	23
<b>Figura 10.</b> Localização da coarctação na aorta torácica.....	23
<b>Figura 11.</b> Equipamento de ecocardiografia de alta resolução VisualSonics VEVO 2100 e transdutores utilizados na experimentação.....	24
<b>Figura 12.</b> Características da câmara ventricular esquerda de camundongos FVBN WT e Mas-KO, demonstradas pelo Modo M.....	28
<b>Figura 13.</b> Representação da aorta normal e coarctada.....	38
<b>Figura 14.</b> Espectro Doppler normal do fluxo na aorta transversa em camundongo WT SHAM.....	39
<b>Figura 15.</b> Espectro Doppler do fluxo da aorta transversa coarctada, do fluxo turbulento e de alta velocidade em camundongo WT.....	40
<b>Figura 16.</b> Imagem da divisão do eixo longo em seis segmentos com suas respectivas cores e denominações.....	56
<b>Figura 17.</b> Imagem da divisão do eixo curto em seis segmentos com suas respectivas cores e denominações.....	56
<b>Figura 18.</b> Curvas de deslocamento radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO no tempo 0.....	57
<b>Figura 19.</b> Curvas de deslocamento radial epicárdico no eixo curto em camundongos WT e Mas-KO no tempo 0.....	57

<b>Figura 20.</b> Curvas de assincronia no deslocamento longitudinal endocárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.....	58
<b>Figura 21.</b> Curvas de assincronia no <i>strain</i> radial endocárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.....	58
<b>Figura 22.</b> Curvas de assincronia no <i>strain</i> longitudinal endocárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.....	59
<b>Figura 23.</b> Curvas de assincronia no <i>strain</i> radial epicárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.....	59
<b>Figura 24.</b> Curvas de deslocamento radial endocárdico no eixo curto em camundongos WT SHAM e Mas-KO SHAM (30 dias).....	60
<b>Figura 25.</b> Curvas de assincronia no <i>strain</i> radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT SHAM e Mas-KO SHAM (30 dias).....	60
<b>Figura 26.</b> Curvas de alteração da intensidade do deslocamento radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	61
<b>Figura 27.</b> Curvas de alteração da intensidade e assincronia do deslocamento longitudinal endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	61
<b>Figura 28.</b> Curvas de alteração da intensidade do deslocamento radial epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	62
<b>Figura 29.</b> Curvas de alteração da intensidade e assincronia do deslocamento longitudinal epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	62
<b>Figura 30.</b> Curvas de assincronia significativa no <i>strain</i> longitudinal epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	63
<b>Figura 31.</b> Curvas de assincronia significativa no <i>strain rate</i> radial epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias).....	63
<b>Figura 32.</b> Curvas de assincronia significativa no deslocamento radial epicárdico no eixo curto em camundongos Mas-KO submetidos a CAT, quando comparados aos WT (30 dias).....	64
<b>Figura 33.</b> Curva de dissociação gapdh.....	88
<b>Figura 34.</b> Curva de dissociação para Colágeno III.....	88
<b>Figura 35.</b> Curva de dissociação TGFβ.....	89
<b>Figura 36.</b> Fórmulas para os cálculos ecocardiográficos.....	90

## Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Valores de fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC), e volume sistólico (VS) de animais FVBN WT e Mas-KO.....	29
<b>Gráfico 2.</b> Volume ventricular e dimensões da câmara ventricular esquerda em sístole e diástole, em animais FVBN WT e Mas-KO.....	30
<b>Gráfico 3.</b> Espessura da parede posterior (EPP) e do septo interventricular (SIV) do VE em sístole e diástole, em animais FVBN WT e Mas-KO.....	30
<b>Gráfico 4.</b> Massa do VE, massa corrigida do VE, frequência cardíaca e espessura relativa da parede, em animais FVBN WT e Mas-KO.....	31
<b>Gráfico 5.</b> Tempo de ejeção (TE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), Ondas E e A ....	32
<b>Gráfico 6.</b> Relação E/A, pico de velocidade do fluxo aórtica, tempo de contração isovolumétrico TCIV) e índice de performance do miocárdio (IPM).....	32
<b>Gráfico 7.</b> Deslocamento radial e longitudinal endocárdicos globais, e tempo para o pico, de animais WT e Mas-KO no tempo controle.....	37
<b>Gráfico 8.</b> <i>Strain</i> e <i>Strain Rate</i> radial endocárdicos globais, e tempo para o pico (TPK), de animais WT e Mas-KO no tempo controle.....	37
<b>Gráfico 9.</b> <i>Strain Rate</i> longitudinal e tempo para o pico; e velocidade circunferencial e tempo para o pico (TPK) epicárdicos globais, de animais WT e Mas-KO no tempo controle.....	38
<b>Gráfico 10.</b> Fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC) e volume sistólico (VS) em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica.....	41
<b>Gráfico 11.</b> Volumes e dimensões sistólicos e diastólicos finais, da câmara ventricular esquerda, em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica.....	42
<b>Gráfico 12.</b> Espessura de parede posterior e septo interventricular em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica.....	43
<b>Gráfico 13.</b> Valores de massa ventricular e gradiente pressórico na aorta transversa e frequência cardíaca de camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica.....	44
<b>Gráfico 14.</b> Valores de espessura relativa da parede em comparação entre WT e WT CAT 30, Mas-KO e Mas-KO CAT 30 e comparação entre WT e Mas-KO O, e WT CAT 30 e Mas-KO CAT 30.....	45
<b>Gráfico 15.</b> Pico de velocidade do fluxo aórtico (valvar), tempo de ejeção e tempos de relaxamento e contração isovolumétricos em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica....	46

<b>Gráfico 16.</b> Valores de índice de performance do miocárdio, onda E do influxo mitral, relação E/A e relação E/TRIV em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica.....	47
<b>Gráfico 17.</b> Razão E/E' de camundongos WT e Mas-KO aos 30 dias pós procedimento (SHAM e CAT).....	48
<b>Gráfico 18.</b> Índice de massa do ventrículo esquerdo de camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT.....	49
<b>Gráfico 19.</b> <i>Strain</i> e <i>strain rate</i> circunferencial epicárdicos do eixo curto cardíaco, de camundongos WT SHAM e submetidos a CAT.....	51
<b>Gráfico 20.</b> Velocidade e deslocamento radial epicárdicos do eixo curto cardíaco, em animais WT após coarctação.....	52
<b>Gráfico 21.</b> <i>Strain</i> e <i>strain rate</i> circunferenciais epicárdicos do eixo curto cardíaco, de camundongos Mas-KO SHAM e submetidos a CAT.....	52
<b>Gráfico 22.</b> <i>Strain</i> e <i>strain rate</i> circunferencial epicárdicos, fração de ejeção, fração de encurtamento, débito cardíaco e volume sistólico de camundongos WT submetidos a CAT.....	53
<b>Gráfico 23.</b> <i>Strain</i> e <i>strain rate</i> circunferencial epicárdicos, fração de ejeção, fração de encurtamento, débito cardíaco e volume sistólico de camundongos Mas-KO submetidos a CAT...	54
<b>Gráfico 24.</b> mRNA para ANP em camundongos WT e Mas-KO SHAM e coarctado.....	65
<b>Gráfico 25.</b> mRNA para BNP em camundongos WT Mas-KO SHAM e coarctado.....	65
<b>Gráfico 26.</b> mRNA para MCH $\beta$ em camundongos WT e Mas-KO SHAM e coarctado.....	65
<b>Gráfico 27.</b> mRNA para Col 3 e TGF $\beta$ em camundongos WT e Mas-KO SHAM e coarctado.....	66
<b>Gráfico 28.</b> mRNA para TGF $\beta$ em camundongos WT e Mas-KO SHAM e coarctado.....	66



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Lista e sequência dos <i>primers</i> utilizados para a qPCR.....	27
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros morfofuncionais ecocardiográficos do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca de camundongos FVBN WT e Mas-KO (tempo 0).....	33
<b>Tabela 3.</b> Valores globais de deformação miocárdica endocárdica dos eixos longo e curto do coração, em camundongos FVBN WT e Mas-KO (tempo 0).....	35
<b>Tabela 4.</b> Valores globais de deformação miocárdica epicárdica dos eixos longo e curto do coração, em camundongos FVBN WT e Mas-KO (tempo 0).....	36
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros morfofuncionais ecocardiográficos do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca de camundongos FVBN WT e Mas-KO após 30 dias da CAT.....	50
<b>Tabela 6.</b> Valores médios de strain endocárdico longitudinal e circunferencial de animais WT SHAM e coarctado, e Mas-KO SHAM e coarctado aos 30 dias.....	55
<b>Tabela 7.</b> Valores médios de strain epicárdico longitudinal e circunferencial de animais WT Controle e coarctado; e Mas-KO Controle e coarctado (30 dias).....	55
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros ecocardiográficos para camundongos WT e Mas-KO nos tempos 0, SHAM 30 e CAT 30.....	87

## Lista de abreviaturas

Ang I – Angiotensina I  
Ang II – Angiotensina II  
Ang – (1-7) – Angiotensina –(1-7)  
ANP – atrial natriuretic peptide  
ASC – área de superfície corporal  
AT1 – Receptor do subtipo 1 de Ang II  
AT2 – Receptor do subtipo 2 de Ang II  
BNP – brain natriuretic peptide  
BPM – batimentos por minuto  
CAT – coarctação da aorta torácica  
CMLV – células musculares lisas vasculares  
Col I – colágeno I  
Col III – colágeno III  
DC – débito cardíaco  
DVED – dimensão do ventrículo esquerdo em diástole  
DVEs – dimensão do ventrículo esquerdo em sístole  
EC – eixo curto  
ECA 1 – Enzima Conversora de Angiotensina 1  
ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina II  
EL – eixo longo  
EPPd – espessura da parede posterior em diástole  
EPPs – espessura da parede posterior em sístole  
ERK – extracellular signal-regulated kinases  
ERP – espessura relativa da parede  
E/TRIV – relação onda E do enchimento mitral e tempo de relaxamento isovolumétrico  
FE – fração de encurtamento  
FEj – fração de ejeção  
IMVE – índice de massa do ventrículo esquerdo  
IP<sub>3</sub> – inositol trifosfato  
IPM – índice de performance do miocárdio

Mas-KO – camundongo knockout para receptor MAS da Ang – (1-7)

MAPKs – Mitogen- activated protein kinases

MEC – matriz extracelular

MHC $\beta$  – myosin heavy chain  $\beta$

MHz – megahertz

Modo B – modo bidimensional

Modo M – modo motion

NFAT – nuclear factor of activated T cells

SIVd – espessura do septo interventricular em diástole

SIVs – espessura do septo interventricular em diástole

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

ST – Speckle Tracking

TCIV – tempo de contração isovolumétrico

TE – tempo de ejeção

TGF –  $\beta$  – fator de crescimento transformador beta

TRIV – tempo de relaxamento isovolumétrico

VDF – volume diastólico final

VE – ventrículo esquerdo

VS – volume sistólico

VSF – volume sistólico final

WT – wild type

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 SRAA e remodelamento cardíaco.....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Remodelamento cardíaco.....	23
2.2.2 Eixo Ang II/AT1 e remodelamento.....	25
2.2.3 Eixo Ang-(1-7)/Mas e remodelamento.....	27
<b>2.3 Ecodopplercardiografia.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Modo Bidimensional (Modo B).....	29
2.3.2 Modo M (Motion).....	31
2.3.3 Doppler espectral e Doppler colorido.....	31
2.3.4 Doppler tecidual.....	33
2.3.5 Speckle Tracking (ST) e Deformação cardíaca.....	33
2.3.5.1 Estrutura e deformação do miocárdio.....	34
2.3.5.2 Análise da deformação miocárdica pelo ST.....	37
<b>2.4 Modelos de sobrecarga de pressão.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Animais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Delineamento experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Coarctação da aorta torácica.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Ecodopplercardiografia.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Avaliação da expressão gênica.....</b>	<b>44</b>
4.5.1 Extração do RNA total.....	44
4.5.2 Tratamento do RNA total com DNase.....	45
4.5.3 Retrotranscrição e PCR em tempo real.....	45
<b>5. Análise de dados.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Ecocardiografia convencional WT x Mas-KO (controle) .....</b>	<b>46</b>

6.2 Ecocardiografia por Speckle Tracking WT x Mas-KO (controle) .....	53
6.3 Ecocardiografia convencional WT x Mas-KO (CAT) .....	57
6.4 Ecocardiografia por Speckle Tracking WT x Mas-KO (CAT) .....	67
6.4.1 Análise de assincronia.....	71
6.5 Análise da expressão gênica.....	79
7. Discussão.....	82
7.1 Ecocardiografia convencional WT x Mas-KO (controle).....	83
7.2 Ecocardiografia por Speckle Tracking WT x Mas-KO (controle) .....	85
7.3 Ecocardiografia convencional WT x Mas-KO (CAT) .....	86
7.4 Ecocardiografia por Speckle Tracking WT x Mas-KO (CAT) .....	91
7.5 Expressão gênica.....	92
8. Conclusão.....	93
9. Referências Bibliográficas.....	94
10. Anexos.....	101

## **1. Introdução**

As doenças cardiovasculares são consideradas a primeira causa de óbito no mundo, levando a aproximadamente 17 milhões de mortes ao ano, com previsão de atingir 24 milhões de óbitos/ano em 2030. Em 2013, estudos epidemiológicos apontavam em torno de 23 milhões de pessoas acometidas por insuficiência cardíaca no mundo, sendo o diagnóstico precoce a forma mais importante de tentativa de controle (Marques et al., 2012; Laslett et al., 2012; Roger, 2013). A ecocardiografia é considerada o padrão ouro para avaliação de função cardíaca e, o desenvolvimento de novas técnicas para quantificação da função, permite o acesso a detalhamento morfofuncional de modelos de doença cardiovascular que simulam os processos patológicos desenvolvidos pelo ser humano (Gorcsan and Tanaka, 2011; Bauer et al., 2011; Ram et al., 2011).

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona**

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) tem papel primordial no controle da pressão arterial e do equilíbrio hidro-eletrolítico, contribuindo de forma essencial para a homeostase corporal (Ferreira et al., 2011). Nos últimos anos várias técnicas fisiofarmacológicas associadas à genômica moderna e métodos de detecção proteica permitiram a identificação de novos componentes do SRAA (Ferreira and Santos, 2005; Ribeiro-Oliveira et al., 2008).

A descrição do SRAA iniciou-se em 1898, quando Tigerstedt e Bergmann descreveram a descoberta de uma substância lábil ao calor, extraída da córtex renal de coelhos, cujo nome proposto foi renina. Em 1934, Goldblatt e colaboradores descreveram a indução de hipertensão em modelo de isquemia renal causada por constrição da artéria renal em ratos. Posteriormente foi realizada a descrição de que os efeitos pressores da renina eram indiretos, dependendo de outra substância, resistente ao calor, que foi identificada como o angiotensinogênio, seu substrato. (Atlas, 2007). Dois grupos distintos de pesquisadores, determinaram que a atividade proteolítica da renina é que levava a produção do componente pressor. Braun-Menendez e colaboradores (Argentina), e Page e colaboradores (Estados Unidos), nomearam esse componente pressor como angiotensina, termo cunhado a partir dos termos angiotonina e hipertensina. Foram descritas duas formas de angiotensinas (Skeggs et al., 1954). Trabalhos posteriores relataram que uma enzima presente no plasma, denominada enzima conversora de angiotensina (ECA), era capaz de clivar Ang I a Ang II. Vários pesquisadores descreveram também que a Ang II é capaz de induzir a liberação pela córtex

da adrenal, da aldosterona, hormônio também essencial na regulação do balanço hidroeletrólítico (Skeggs et al., 1976; Piepho and Beal, 2000; Atlas, 2007).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada nas células justaglomerulares da parede da arteríola aferente do glomérulo renal (Ganten et al., 1970). Sua produção decorre de três estímulos principais: redução da perfusão sanguínea renal; estimulação da inervação adrenérgica simpática renal; detecção pela mácula densa, da diminuição da concentração de cloreto de sódio no conteúdo tubular distal. Essa enzima cliva o angiotensinogênio, seu substrato, que é produzido no fígado e secretado na circulação sistêmica. Uma vez clivado, gera a formação da Ang I, um decapeptídeo. A clivagem da Ang I pela enzima conversora de angiotensina do tipo I (ECA 1), forma a Ang II (ver Persson, 2003; ver Fournier et al., 2012).

A angiotensina II é um octapeptídeo, sendo considerada o principal componente do SRAA. Seus efeitos fisiológicos, exercidos via ligação ao receptor AT1 incluem, potente ação vasoconstritora arteriolar, estímulo à secreção de aldosterona, indução a reabsorção de sódio nos túbulos contorcidos proximais, estímulo central a secreção do hormônio adrenocorticotrófico e a liberação da vasopressina, efeito dipsogênico e apresenta importantes efeitos pró-inflamatórios e proliferativos. Suas ações, quando exacerbadas, favorecem o surgimento, desenvolvimento, manutenção e agravamento de doenças cardiovasculares. Dentre elas podem ser citadas: exacerbada vasoconstrição periférica, aumento da atividade simpática, atividade arritmogênica cardíaca, ativação de mecanismos pró-fibróticos e inflamatórios cardíacos e vasculares, estímulo ao remodelamento cardíaco (proliferação celular) e favorece mecanismos trombóticos (Ferreira and Santos, 2005; Sampaio et al., 2007b; Ferreira et al., 2011).

A Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) é um componente essencial do SRAA, que tem sido estudado de forma extensa nas últimas duas décadas. Ela é um heptapeptídeo, formado pela clivagem da Ang II pela enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA 2). A clivagem de Ang II por prolilcarboxipeptidases e prolilendopeptidases também leva a formação de Ang-(1-7). Além disso ela pode ser formada a partir da Ang I pela ação de endopeptidases neutras e prolilendopeptidase (Ferreira and Santos, 2005; Keidar et al., 2007; Marques et al., 2012; Domenig et al., 2015).

A identificação da ECA 2 como importante enzima formadora de Ang-(1-7) e do receptor da Ang-(1-7) ligado a proteína G, receptor Mas, contribuíram de forma essencial para caracterizar o papel funcional desse peptídeo, e adicionou novos elementos ao eixo do SRAA. O conhecimento da atividade desse eixo, embora em ampla expansão, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas ainda é limitado (Santos et al., 2003; Danilczyk and Penninger, 2006; Keidar

et al., 2007; Santos, 2014).

A ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas induz ações antagônicas àquelas demonstradas para a Ang II. Efeitos antiarritmogênicos, antifibróticos/antiproliferativos e antitrombóticos já foram demonstrados (Santos, 2014). Os efeitos benéficos do eixo ECA 2/Ang-(1-7) em insuficiência cardíaca já foram relatados (ver Patel et al., 2016). Recentemente foram descritas as ações da Ang-(1-7) na atenuação da hipertrofia miocárdica e redução da produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por infusão de Ang II (Guo et al., 2017).

Diversos trabalhos demonstram a importância da Ang-(1-7) para a manutenção da ultraestrutura e função cardiovasculares em modelos de doença cardiovascular em animais intactos e animais knockout para o receptor Mas (Loot et al., 2002; Tallant et al., 2005; Castro et al., 2006; Rabelo et al., 2008; de Moura et al., 2010).

A administração de Ang-(1-7) antagoniza a vasoconstrição induzida por Ang II. Supõe-se que os mecanismos pelos quais a Ang-(1-7) exerça este efeito sejam: antagonismo de receptores AT1; liberação de óxido nítrico ou outros fatores relaxantes como por exemplo prostaciclina; efeito sobre outros peptídeos biologicamente ativos como a bradicinina (Sampaio et al., 2007a). Outros estudos demonstram que a Ang-(1-7) aumenta o débito cardíaco em ratos. Além disso no infarto produzido por ligadura de coronária há perda de imunoreatividade para Ang-(1-7) na área infartada e aumento importante na borda da área lesada. Também já foi demonstrada que a deleção genética do receptor Mas leva a remodelamento e disfunção cardíaca (Ferreira et al., 2011; Zhang et al., 2012)

Recentemente, nosso laboratório identificou um novo peptídeo do SRAA, a alamandina, e seu receptor, Mrgd (Mas-related G-protein-coupled receptor, member D). Estes novos componentes parecem apresentar ações complementares àquelas demonstradas para a Ang – (1-7), mas ainda por ser esclarecidas (Lautner et al., 2013).



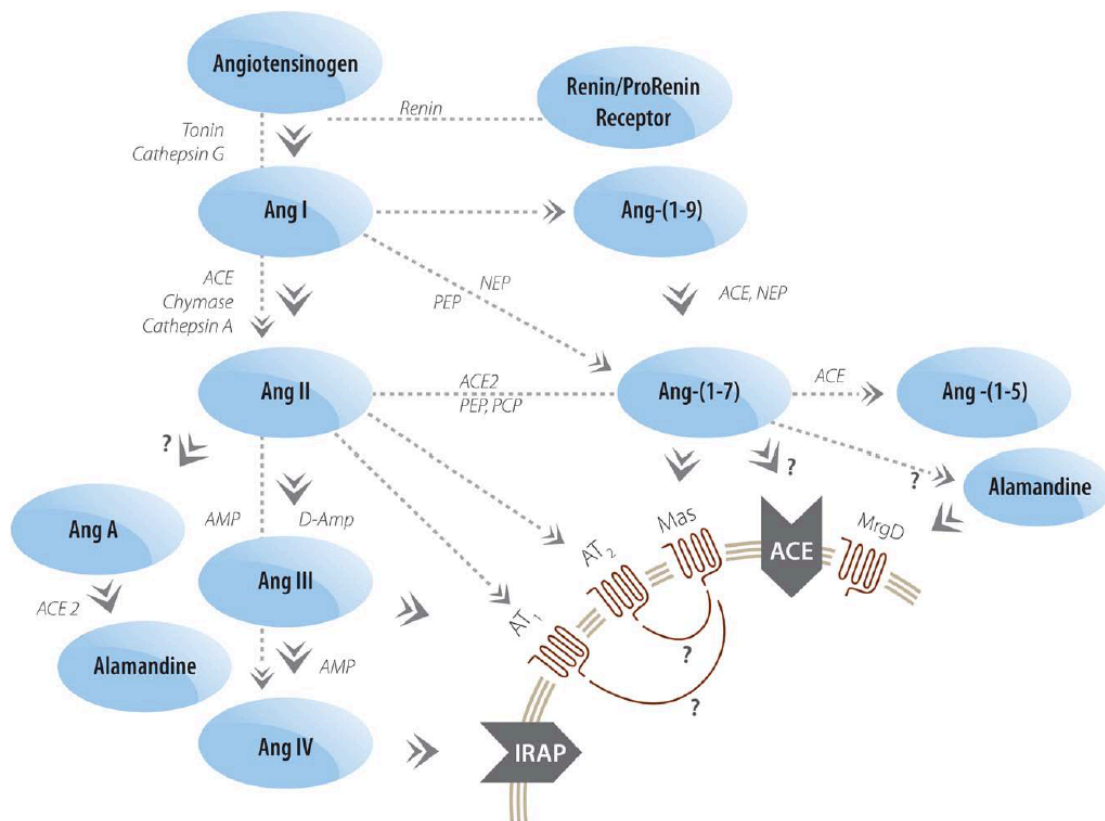


Figura 1. Visão atual do SRA e seus novos componentes e vias de interação (Santos, 2014).

Dada a importância da Ang-(1-7) na manutenção da função cardíaca normal, a avaliação morfofuncional com a ecoDopplercardiografia de alta resolução e a avaliação bioquímica em modelo de sobrecarga de pressão em camundongo Mas-KO, podem ampliar os conhecimentos dos mecanismos mecânicos e celulares envolvidos na piora da função cardíaca nesses modelos.

## 2.2. SRAA e remodelamento cardíaco

### 2.2.1 Remodelamento cardíaco

Em resposta a aumento persistente da carga de trabalho, o coração passa por transformações morfofuncionais que recebem o nome de remodelamento cardíaco. A expressão básica do remodelamento é a hipertrofia. A hipertrofia decorre de uma discrepância entre performance como bomba e demanda metabólica sistêmica. O aumento da pós-carga de forma crônica por exemplo, leva a aumento de tensão parietal, podendo culminar com dano tecidual irreversível. Os estímulos

ao remodelamento podem ter origens fisiológicas ou patológicas. Dentre as causas fisiológicas são considerados o exercício físico, a gestação e o crescimento pós-natal. Por outro lado, várias causas patológicas são reconhecidas: ativação neuro-humoral, hipertensão arterial, doenças valvares, causas genéticas de cardiomiopatias e hipóxia miocárdica (infarto). Essas condições podem precipitar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, arritmias e culminar com o óbito do paciente (Hill and Olson, 2008; Cikes et al., 2010).

O crescimento hipertrófico é o mecanismo primário pelo qual o coração tenta normalizar o estresse da parede ventricular de um coração submetido a sobrecarga de trabalho. Esse crescimento envolve remodelamento celular e molecular, que fazem parte das fases adaptativas e compensatórias ao processo deflagrador. Crescimento de miócitos (sem proliferação significativa), re-expressão de genes fetais, mudanças na expressão de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração e modificação no estado energético e metabólico dos cardiomiócitos são eventos essenciais ao remodelamento. Aumento na síntese proteica, e no tamanho e organização dos sarcômeros têm papel fundamental (Hill and Olson, 2008). Desvio do metabolismo para vias glicolíticas, modificações na regulação do cálcio intracelular, perda de miócitos, alterações da matriz extracelular e substituição por tecido fibroso, remodelamento elétrico e alterações contráteis ocorrem frequentemente em condições de doença. Outra característica frequentemente relatada em remodelamento hipertrófico é redução da densidade capilar levando a condições de hipóxia e áreas de micro-isquemia, que contribuem de forma adicional ao processo (Hill and Olson, 2008; Kehat and Molkentin, 2010)

A visão clássica do remodelamento reconhece três padrões morfológicos distintos: remodelamento concêntrico fisiológico, com aumento da espessura das paredes ventriculares mas sem aumento de massa cardíaca; hipertrofia concêntrica, secundária a sobrecarga pressórica (hipertensão, estenose aórtica ou pulmonar), com aumento da espessura das paredes ventriculares com adição de sarcômeros em paralelo, e conseqüentemente da massa, culminando com redução do tamanho das câmaras ventriculares; e hipertrofia excêntrica, secundária a sobrecarga de volume (insuficiência valvar, infarto do miocárdio), com aumento de massa cardíaca acompanhado de aumento no tamanho das câmaras ventriculares, devido a adição de sarcômeros em série, no âmbito longitudinal (Hill and Olson, 2008).

Adicionalmente aos distúrbios de proliferação e hipertrofia de cardiomiócitos, o aumento da deposição de colágeno representa fator fundamental na modificação da mecânica de contração, sendo grandemente responsável pelo enrijecimento e aumento da tensão parietal. Os fibroblastos cardíacos que representam em torno de 70% dos tipos celulares do coração, possuem estrutura organizada paralelamente às fibras musculares, mantendo a continuidade entre as células das

diversas camadas que formam o miocárdio. Sua função mais importante é a manutenção da integridade estrutural do coração via proliferação controlada e reposição de matriz extracelular (MEC). A organização adequada e coesa da MEC contribui também para a atividade mecânica do coração evitando perda da transmissão de força entre cardiomiócitos e seu estiramento excessivo. Participa ativamente no recolhimento elástico diastólico e permite a transdução de contratilidade de um único miócito em atividade sincicial ventricular. Além disso possui papel essencial na interação dinâmica e coordenada entre as células, respondendo a estímulos mecânicos, elétricos e químicos, contribuindo para a manutenção da função cardíaca (Porter and Turner, 2009; Kehat and Molkentin, 2010; Takawale et al., 2015). Dois tipos de colágeno estruturam a MEC cardíaca, aqueles formadores de fibrilas, os colágenos I e III que são predominantes e aqueles não formadores de fibrilas: o colágeno IV, que forma a estrutura da membrana basal em torno dos cardiomiócitos e o colágeno VI, que apresenta função importante no desenvolvimento do coração e na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Colágeno I determina resistência a tensão parietal e o colágeno III determina distensibilidade, e é importante para a formação da estrutura fibrilar do colágeno I (Takawale et al., 2015). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos tem papel crítico no remodelamento miocárdico adverso, que culmina com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Fibroblastos cardíacos, na presença de concentrações aumentadas de substâncias como hormônios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, tornam-se altamente proliferativos e invasivos, modificando de forma intensa o interstício miocárdico, pelo aumento de metaloproteinases que promovem degradação da MEC e aumentam a deposição de colágeno. Metaloproteinases tem participação decisiva nas alterações do interstício miocárdico em modelos de sobrecarga pressórica (Porter and Turner, 2009; Kehat and Molkentin, 2010).

O desenvolvimento de formas precoces de diagnóstico de disfunção miocárdica seria importante para a tentativa de instituição de tratamentos com o objetivo de prevenir a ocorrência de fibrose, e conseqüentemente o remodelamento que culminaria com degeneração irreversível de miócitos (Cikes et al., 2010).

### **2.2.2 Eixo Ang II/AT1 e remodelamento**

O SRAA tem função crítica na regulação do sistema cardiovascular, permitindo adaptação a variações na dinâmica funcional, com papel fundamental nos processos de adequação do trabalho mecânico cardíaco a condições diversas. Na fisiopatologia cardiovascular, essas condições diversas

exigem uma interferência de longo prazo em um nível supra-fisiológico do SRAA, levando a modificações morfofuncionais. O mais importante componente desse sistema relacionado ao remodelamento cardíaco é a Ang II. A ligação da Ang II ao seu receptor, AT1, induz seus efeitos fisiológicos e fisiopatológicos, sendo expressa de forma predominante nas células do sistema cardiovascular como as células musculares lisas vasculares (CMLVs). Via este receptor, a Ang II ativa diversas vias de sinalização intracelular relacionadas a hipertrofia, hiperplasia e migração de CMLVs. Os efeitos tróficos da Ang II no miocárdio envolvem hipertrofia dos miócitos e proliferação de fibroblastos (Higuchi et al., 2007). Promove também ativação dos fibroblastos, aumentando a deposição de matriz extracelular no miocárdio. Importante salientar que, devido à geração de todos os componentes do SRAA no miocárdio, tanto os níveis de Ang II quanto a densidade de receptores AT1 no coração em processo de remodelamento estão aumentados. A sinalização via receptor AT1 induz o aumento intracelular de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) via PKC (proteína quinase C), desencadeando a liberação dos estoques de cálcio (Ca<sup>++</sup>) do retículo sarcoplasmático. O aumento de Ca<sup>++</sup> no citosol ativa sinalização para hipertrofia por estimulação de diversas vias (Heineke and Molkentin, 2006; McCollum et al., 2012).

Uma importante atividade promovida pela Ang II via AT1, é a indução da sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF-  $\beta_1$ ). O TGF-  $\beta_1$  é uma citocina produzida localmente, que atua na manutenção da homeostase, reparação e influencia nas respostas imunológica e inflamatória teciduais. Entretanto, no processo fisiopatológico cardiovascular, ele é relacionado diretamente ao desenvolvimento de remodelamento cardíaco, induzindo aumento da deposição de matriz extracelular, alterando o conteúdo de colágeno e fibronectina do miocárdio. Em humanos e em modelos animais de doença cardíaca, o aumento dos níveis de Ang II e TGF-  $\beta$  relacionam-se com o grau de fibrose em sobrecarga de pressão (Rosenkranz, 2004; Murphy et al., 2015). Além disso, a ativação da sinalização da TGF-  $\beta$ , estimula proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que adicionalmente participam nos processos de diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose celulares (Murphy et al., 2015).

A hiperatividade do SRAA também interfere nas funções da titina, a maior molécula que compõe o sarcômero, e confere aos miócitos cardíacos a capacidade de geração de tensão passiva. Ancorada na banda Z, a titina possui três segmentos que compõe sua estrutura: grupos de imunoglobulinas, a região em mola PEVK (Prolina-Ac.glutâmico, Valina e Lisina), e o elemento elástico N2B (N2BA, N2B e Titina cardíaca fetal). Tanto PEVK como os elementos N2B sofrem fosforilação por diversas proteínas quinases, que regulam sua capacidade de gerar tensão passiva. Atividade adrenérgica via receptores  $\beta_1$ , assim como atividade do SRAA promovem fosforilação

dessas regiões (LeWinter and Granzier, 2014). Foi descrito em ratos mRen2 que o aumento da Angiotensina II promove a transição da titina para predominância do elemento N2B sobre N2BA. O elemento N2B é menor e mais rígido, e seu aumento responderia pelo menos parcialmente, pelo incremento da tensão passiva de forma patológica em processo hipertensivo dependente de Ang II que culminaria com a deflagração da disfunção diastólica (Kovács et al., 2016).

### **2.2.3 Eixo Ang-(1-7)/Mas e remodelamento**

Inversamente ao observado para a Ang II, a Ang-(1-7) tem demonstrado importante atividade moduladora do processo de remodelamento cardíaco. Desde a descrição de seu receptor (Santos et al., 2003), os efeitos benéficos da Ang-(1-7) têm sido amplamente estudados e caracterizados. Em estudo avaliando seus efeitos sobre o crescimento celular, foi descrito que ela é capaz de inibir a hipertrofia de cardiomiócitos pela ativação do receptor Mas (Tallant et al., 2005). Em modelo utilizando co-infusão de Ang II e Ang-(1-7) foi observada a ação anti-remodelante da Ang-(1-7) e determinou-se que esse efeito não é mediado por redução de pressão arterial nem por influência em receptores AT1 e AT2 (Grobe et al., 2007). Além disso, camundongos transgênicos que apresentam maior produção tecidual de Ang-(1-7) desenvolvem menor deposição de colágeno e hipertrofia ventricular quando submetidos a modelo de indução de hipertensão (Mercure et al., 2008).

O modelo de deleção genética do receptor Mas é importante ferramenta para avaliar as consequências da perda dos seus efeitos no sistema cardiovascular. Em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por exercício físico, observou-se que a deposição de colágeno I e III no coração de camundongos Mas-KO foi intensa, diferentemente do observado em animais WT (Guimarães et al., 2012). A Ang-(1-7) tem demonstrado, em vários trabalhos, possuir papel chave em contrabalançar os efeitos adversos da atividade aumentada de Ang II. Infusão de Ang-(1-7) ou agonistas do receptor Mas (AVE0991) demonstram efeitos antitróficos/remodelantes, reduzindo a deposição de colágeno, e reduzindo a proliferação e hipertrofia de miócitos. Corroborando esses efeitos benéficos, tanto a utilização de bloqueio farmacológico do receptor Mas com A779, como a criação de modelo de deleção genética do receptor demonstram influência negativa sobre a estrutura do miocárdio, levando a piora da função cardíaca (ver Santos, 2014). Estudo do nosso laboratório, utilizando avaliação bioquímica e ecoDopplercardiografia de alta resolução, demonstrou os efeitos benéficos da administração oral da Ang-(1-7) em ratos submetidos a infarto miocárdico, em experimento crônico (Marques et al., 2012; Marques, F. D., 2012). Em forma de administração

semelhante, outro trabalho relata que a administração do composto de inclusão Hidroxi-propil-betaciclodextrina/Ang-(1-7) em tratamento crônico reduziu a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos (Bertagnolli et al., 2014). A administração da Ang-(1-7) via implantação de microbombas osmóticas também demonstrou eficácia reduzindo hipertrofia e fibrose cardíacas, além de normalizar a função diastólica em camundongos db/db apresentando cardiomiopatia diabética (Mori et al., 2014). Já foi relatada sua eficácia em modelo de indução de disfunção diastólica com DOCA sal, e que esse efeito é independente da redução da pressão arterial (de Almeida et al., 2015). Em modelo de hipertrofia miocárdica por infusão de angiotensina II, a utilização de Ang-(1-7) atenua o processo fibrótico e reduz a produção de radicais livres via ativação de Sirt3 (Guo et al., 2017).

Apenas um estudo demonstra os possíveis efeitos da redução da Ang-(1-7) em modelo de sobrecarga pressórica, mas foi realizado com camundongos transgênicos com deleção genética da ECA 2, demonstrando efeitos deletérios do modelo de forma importante (Yamamoto et al., 2006). Não existem estudos da aplicação do modelo de coarctação aórtica em camundongos Mas-KO.

## **2.3 EcoDopplercardiografia**

A história da ultrassonografia remonta ao ano de 1794, quando Lazzaro Spallanzani sugeriu que a emissão de ultrassons fosse a base para a localização e deslocamento dos morcegos, naquela época considerados cegos. A partir de 1880, com a descrição do efeito piezoelétrico pelos irmãos Curie, postulando que a estimulação elétrica de certos cristais seria capaz de gerar ondas sonoras, os estudos sobre o assunto tomaram grande impulso, até que, em 1941 o neurologista e psiquiatra austríaco Karl Dussik fez pela primeira vez utilização da eco-transmissão, técnica semelhante a ultrassonografia, na tentativa de delineamento dos ventrículos cerebrais. Em 1950, German Keidel, também utilizando eco-transmissão realizou a primeira avaliação cardíaca tentando medir o débito cardíaco (Roelandt, 2000).

Edler e Hertz, em 1953 na Suécia foram os primeiros pesquisadores a utilizar a eco-reflexão ultrassônica para exame cardíaco, avaliando em Modo-M, a valva mitral. Deste ponto em diante enorme avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de equipamentos que produzem imagens com grande detalhamento morfofuncional, o que tornou a ecocardiografia uma técnica ímpar para diagnóstico de doenças cardiovasculares (Roelandt, 2000).

A ecocardiografia transtorácica é o teste de diagnóstico por imagem mais utilizado na cardiologia, permitindo acesso a informações qualitativas e quantitativas, que colaboram para o

estabelecimento de diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares. A técnica contribui também para a otimização da terapêutica de pacientes cardiopatas, melhorando a compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da disfunção cardíaca. Várias são as vantagens da utilização desta técnica, incluindo baixo risco de efeitos biológicos (não-invasivo), excelente custo-benefício, aquisição de imagens com boa resolução temporal, versatilidade e padronização de parâmetros (Boyd et al., 2015).

Atualmente o cardiologista ecocardiografista conta com diversas técnicas de realização de imagens e análise do sistema cardiovascular. Modo-M (motion), modo B (bidimensional), Doppler, Doppler colorido, Doppler tecidual e a técnica de análise da deformação miocárdica (Strain) são utilizadas amplamente (Roelandt, 2000; Otto, 2010; Di Franco et al., 2017).

### **2.3.1 Modo Bidimensional (Modo B)**

No modo bidimensional é gerada uma imagem planar, produzida a partir de escaneamentos seriados do órgão em avaliação, possibilitando análise anatomo-fisiológica, essencial na cardiologia. É possível a aquisição de imagens em vários planos tomográficos, fornecendo visões detalhadas das estruturas cardíacas. A validação de parâmetros ecocardiográficos é bem estabelecida, o que torna a técnica confiável e reproduzível. Os equipamentos disponíveis atualmente permitem a diferenciação de até 256 tons de cinza.

O que determina o aspecto ultrassonográfico de um tecido é sua densidade. Quanto mais denso o tecido, maior a formação de ecos de retorno e conseqüentemente mais clara (branca) a característica da imagem. Da mesma forma quanto menos densa, mais escura se torna a imagem observada. Esta característica é dependente do fator atenuação da energia das ondas sonoras. Líquidos não promovem atenuação significativa da energia das ondas, formando imagem negativa (escura). Já os tecidos com maiores densidades promovem atenuação significativa, gerando imagens com tonalidades diferenciadas de cinza. No caso dos ossos, a atenuação é total, gerando em sua superfície uma imagem totalmente branca, mas na região posterior a eles observa-se imagem negativa a qual se dá o nome de sombreamento acústico, ou região livre de ecos. Como resultado tem-se região sem imagem ultrassonográfica. Esse evento pode limitar ou dificultar a aquisição de imagens, tornando essencial o conhecimento anatômico para contorná-lo (Otto, 2010; Di Franco et al., 2017). A figura 2 mostra um exemplo de imagem bidimensional.

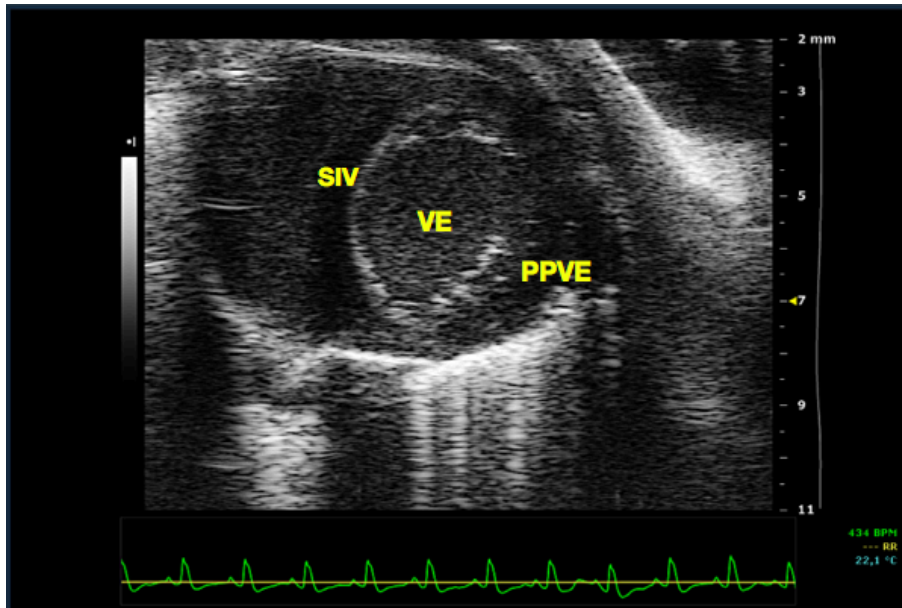


Figura 2. Imagem representativa de corte em eixo curto do ventrículo esquerdo; SIV septo interventricular; VE ventrículo esquerdo; PPVE parede posterior do VE.

Outro fator de importância é a frequência de operação do transdutor. A profundidade de alcance de avaliação de um transdutor é inversamente proporcional à sua frequência de operação. Para avaliações mais profundas são utilizados transdutores que operam em frequências mais baixas. Para avaliações mais superficiais utiliza-se transdutor de frequência mais alta. Este fato interfere de forma direta no transdutor a ser utilizado para camundongos ou ratos. Para ratos frequentemente são utilizados transdutores com frequência de operação acima de 9 MHz, mas preferencialmente entre 15 e 21 Mhz. Para camundongos a transdução deve ser acima de 25 MHz para aquisição de imagens de boa qualidade. A taxa de amostragem no modo bidimensional deve ser superior a 30 quadros por segundo para que seja possível visibilização adequada do movimento cardíaco. Com a apresentação de imagens de alta resolução é possível a quantificação do tamanho das câmaras e função. Importante destacar que a experiência do examinador reduz a variabilidade dos parâmetros avaliados, tornando os resultados mais confiáveis (Roelandt, 2000; Otto, 2010; Boyd et al., 2015). Para a avaliação em âmbito de pesquisa, a taxa de amostragem deve ser maior que 200 quadros por segundo, devido à alta frequência cardíaca dos animais (ratos e camundongos) com os quais são realizadas as experimentações. A frequência cardíaca desses animais varia entre 300 e 840 batimentos por minuto (BPM). Em ratos a variação é de 300 a 500 BPM e, em camundongos de 310 a 840 BPM em condições fisiológicas. As fontes de variação mais importantes são, condições de saúde, luminosidade, sazonalidade, higiene e manejo alimentar (Coatney, 2001; Otto, 2010; National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory



Animals, 2011; Farraj et al., 2011; Bauer et al., 2011).

### 2.3.2 Modo Motion (Modo M)

O modo *motion* utiliza-se de um único feixe sonoro, em uma única “linha de visão”, analisada em função do tempo, permitindo análise temporal da movimentação cardíaca. O modo M utiliza como substrato a imagem bidimensional do coração em movimento. A imagem bidimensional possibilita a orientação adequada do feixe sonoro, assegurando angulação correta na aquisição da imagem. A taxa de amostragem do modo M é elevada, e fornece avaliação precisa do movimento do coração, que é mostrada em função do tempo (Roelandt, 2000; Otto, 2010; Boyd et al., 2015). A partir da imagem em modo M são realizadas as mensurações de espessura de paredes e dimensões da câmara ventricular em sístole e diástole, sendo uma das formas de cálculo dos parâmetros de função cardíaca (Otto, 2010). A figura 3 mostra um exemplo de Modo M realizado em camundongo.

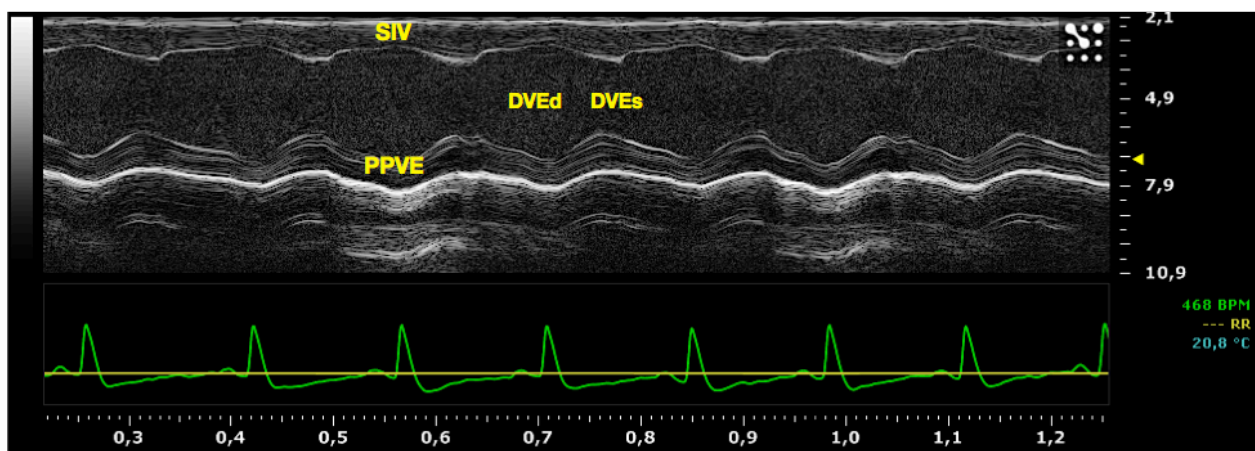


Figura 3. Imagem representativa do modo Motion em camundongo; DVEd dimensão diastólica do ventrículo esquerdo; DVEs dimensão sistólica do ventrículo esquerdo; SIV septo interventricular; PPVE parede posterior do ventrículo esquerdo.

### 2.3.3 Doppler espectral e Doppler colorido

A ecocardiografia por Doppler espectral ou Doppler colorido, é uma técnica não-invasiva de extrema importância para quantificação de função hemodinâmica. É fortemente dependente da experiência do operador devido à necessidade de alinhamento adequado do feixe sonoro com o fluxo sanguíneo avaliado. O Doppler utiliza como base o “Doppler Shift”, ou seja, a variação da frequência do sinal que sofreu dispersão retrógrada a partir das hemácias em movimento. A captação

deste sinal permite determinar direção e velocidade do fluxo sanguíneo, e ainda estimar o gradiente pressórico. Como exemplo, é possível a avaliação por Doppler da disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, pela análise do influxo mitral. É dado o nome de espectro Doppler ao aspecto visual observado na tela do equipamento. Um fluxo sanguíneo que se afasta do transdutor é observado com aspecto negativo ou abaixo da linha de base. O fluxo sanguíneo que se aproxima do transdutor, apresenta aspecto positivo ou acima da linha de base. As características do espectro Doppler, permitem determinar se um determinado fluxo é normal ou patológico. O espectro Doppler de um fluxo normal ou laminar tem aspecto denominado “envelopado”, com delineamento do fluxo com seu interior escuro; o espectro Doppler do fluxo com características patológicas apresenta aspecto turbilhonado, branco em seu interior, como observado na figura 4. Alguns vasos podem apresentar fluxo com características turbulentas em condições normais (Quiñones et al., 2002; Otto, 2010).

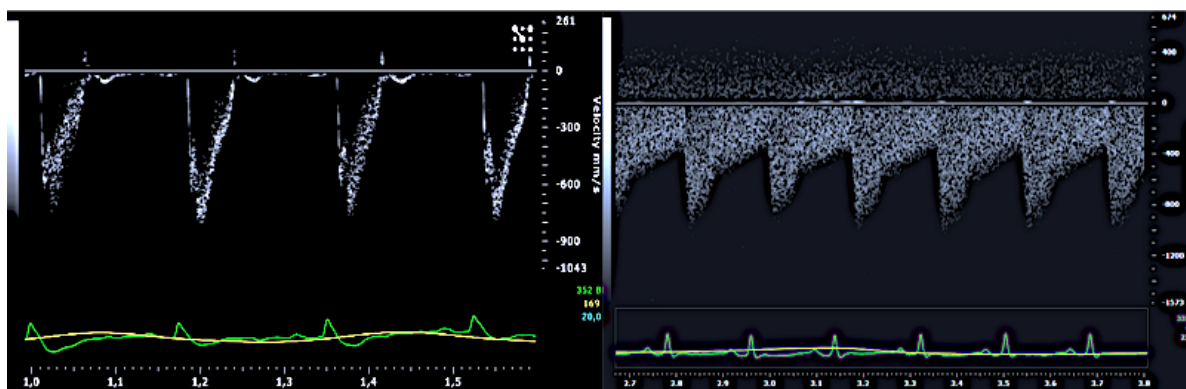


Figura 4. Imagens de espectro Doppler de fluxo laminar (aórtico) e turbulento (artéria uterina)

O Doppler colorido utiliza as mesmas características físicas das ondas sonoras que o espectro Doppler, mas com uma codificação de cores que é de opção pessoal, mas convencionou-se que, o fluxo codificado em cor vermelha, representa o que flui na direção do transdutor e aquele codificado na cor azul o que flui em direção oposta ao mesmo em condições normais, ou seja, na presença de fluxo laminar. O Doppler colorido apresenta características evidentes nos fluxos turbilhonados, onde ocorre a formação do chamado “mosaico” com a mistura de várias cores do espectro, variando do azul e vermelho ao verde e amarelo, demonstrando fluxos em direções e velocidades diversas, o que sugere a presença de anormalidade no fluxo sanguíneo. O fluxo em “mosaico” ocorre frequentemente em estenoses ou insuficiências valvares ou defeitos estruturais de septo interatrial ou septo interventricular. Importante também ressaltar que nas bifurcações de vasos arteriais de grande e médio calibre é normal a presença de turbilhonamento, sem a caracterização de

anormalidade (Coatney, 2001; Quiñones et al., 2002; Otto, 2010; Boyd et al., 2015). A figura 5 mostra características de fluxo laminar e turbilhonado ao doppler colorido.

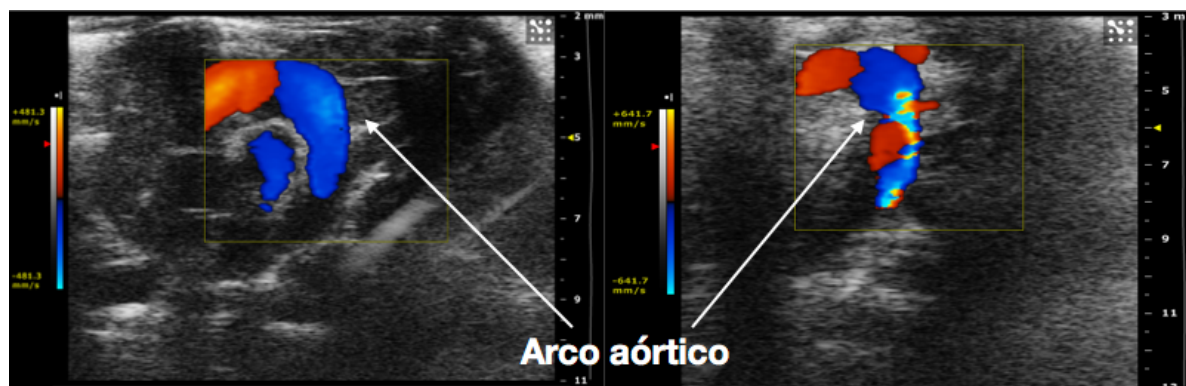


Figura 5. Imagem à esquerda de fluxo aórtico laminar; à direita fluxo aórtico turbulento

### 2.3.4 Doppler Tecidual

O Doppler tecidual é uma técnica robusta, sensível e confiável na avaliação da velocidade de movimentação do miocárdio. Diferentemente do Doppler para avaliação de fluxo sanguíneo, que detecta sinais de alta frequência e baixa amplitude das hemácias em movimento rápido, o Doppler tecidual detecta sinais de baixa frequência e alta amplitude gerados pela movimentação do miocárdio. A técnica permitiu o desenvolvimento de nova abordagem para análise de função sistólica e diastólica. Ela depende de altas taxas de amostragem, e é ângulo-dependente, havendo grande influência da experiência do operador, o que pode ser um fator de restrição. Outro fator limitante é a influência de “tethering”, em que a região analisada pode mover-se por influência de outra, produzindo resultado inconsistente para o ponto avaliado. As mensurações de velocidade sistólica do miocárdio demonstram boa correlação com fração de ejeção, sendo útil na detecção precoce de disfunção sistólica em diversos estados patológicos. O Doppler tecidual tornou-se uma técnica essencial também, na avaliação da função diastólica, permitindo a quantificação do relaxamento do ventrículo esquerdo de forma independente da pré-carga (Boyd et al., 2015).

### 2.3.5 Speckle tracking (ST) e deformação cardíaca

O passo seguinte da evolução da ultrassonografia foi a emergência da técnica de avaliação da deformação miocárdica. O termo deformação, do inglês “strain” foi descrito pela primeira vez para avaliação de função cardíaca, por Mirsky and Parmley em 1973 e refere-se a deformação tecidual ocorrida em função de uma força aplicada (Mirsky and Parmley, 1973). A necessidade de

desenvolvimento de técnicas que permitissem diagnóstico precoce de disfunção miocárdica levou à intensificação dos estudos sobre deformação miocárdica. A avaliação planar a partir das imagens bidimensionais da ecocardiografia convencional não permite categorizar de forma segmentar a função contrátil do coração e apresenta limitações importantes na detecção precoce de disfunção miocárdica. O movimento de contração cardíaca é complexo e, para seu melhor entendimento é necessário que seja decomposto (Castillo et al., 2010).

### **2.3.5.1 Estrutura e deformação do miocárdio**

A estrutura anatômica do músculo cardíaco é formada por arranjo em espiral da banda miocárdica, possuindo fibras dispostas em 3 direções, longitudinais, circulares e oblíquas, de forma que a combinação dos efeitos de contração dessas bandas culmine com o movimento de aproximação da base ao ápice ao mesmo tempo em que ocorre movimento rotacional, por isso a denominação de torção miocárdica para descrever a mecânica da contração (Castillo et al., 2010). Estudos utilizando ressonância magnética demonstraram a complexidade da contração cardíaca, sugerindo padrão divergente daquele considerado para a sequência de ativação elétrica conhecida, septo/ápice/paredes ventriculares/base ventricular. Foi então estabelecida teoria sugerindo que a contração seguiria uma ativação base/ápice. A estrutura definida de que o miocárdio ventricular é formado por uma única banda muscular, cujas fibras se estendem da artéria pulmonar a aorta, configurando um “loop” duplo, formando uma estrutura helicoidal (fig. 6) forneceu subsídios para a consideração de condução anisotrópica da atividade elétrica miocárdica, que ocorreria no sentido longitudinal das miofibrilas. Essa estrutura helicoidal é formada por dois segmentos musculares, chamados de descendente e ascendente (Torrent-Guasp et al., 2001; Kocica et al., 2006).

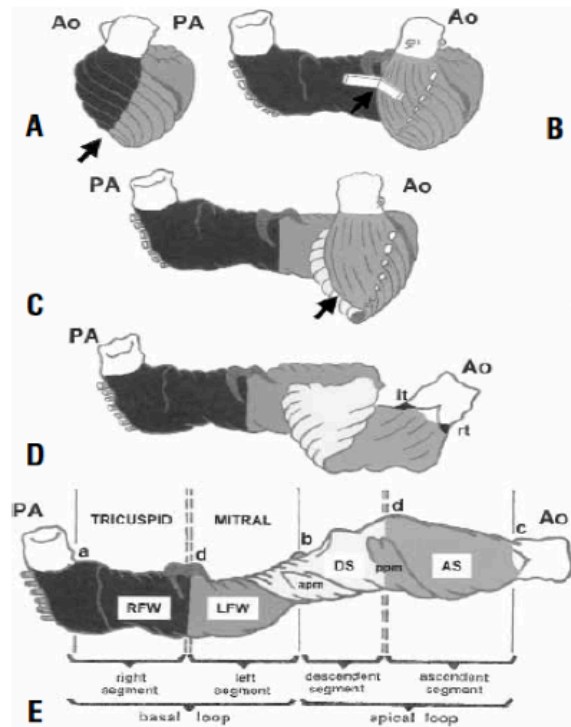


Figura 6. Imagem de peça anatômica da banda miocárdica e esquema mostrando sua divisão em segmentos (Torrent Guasp, 2001; Torrent-Guasp et al., 2001)

Baseado então nas informações obtidas pela ressonância magnética e com os estudos morfofuncionais detalhados do miocárdio, foi sugerido inicialmente um novo padrão contrátil que envolveria os seguintes passos, na ordem descrita (Ballester-Rodés et al., 2006):

1. A partir do início da ativação elétrica ventricular, no início da sístole ocorre um movimento inicial no sentido horário, da base e do ápice do coração, seguido por um movimento anti-horário contínuo da base, mantendo-se movimento horário contínuo do ápice. Este evento ativa o segmento descendente que leva ao deslocamento da base no sentido do ápice, resultando em encurtamento da cavidade ventricular esquerda que, associado ao espessamento das paredes, culmina com a ejeção ventricular. O movimento gerado é de um processo de torção.
2. A contração dos segmentos descendentes provoca configuração curvilínea dos segmentos ascendentes, que quando entram em contração, desfazem a configuração, permitindo súbito movimento para cima, da base do coração, resultando em expansão, geração de pressão negativa e conseqüentemente enchimento da cavidade ventricular. Esse movimento inverte o processo de torção. A figura 7 mostra a representação gráfica do processo de torção.



Figura 7. Representação gráfica da torção basal e apical em sentidos opostos na sístole (meio) e diástole (direita) (Coghlan and Hoffman, 2006).

Entretanto, outro trabalho utilizando ressonância magnética (RM) demonstrou que a rotação da base é no sentido horário, e o ápice apresenta rotação em sentido anti-horário (Codreanu et al., 2010). Codreanu et al., 2010 descrevem a contração da seguinte forma:

1. Ao início da sístole, todos os segmentos miocárdicos do ventrículo esquerdo apresentam rotação no sentido anti-horário, atingindo pico de velocidade no início da fase de ejeção; a partir do meio da fase de ejeção, ocorre reversão para os segmentos basais e *mid*-ventriculares, que passam a apresentar movimento no sentido horário, com pico de velocidade ao fim da fase. A região apical mantém movimento no sentido anti-horário, até que ocorra a repolarização ventricular. Esse movimento aproxima a base do ápice.
2. A repolarização ventricular é associada a uma mudança súbita na direção do movimento dos segmentos apical e *mid*-ventriculares. Ao fim do relaxamento isovolumétrico todo o VE apresenta movimento anti-horário, desfazendo a conformação inicial levando ao movimento que afasta ápice e base.

O conjunto desses movimentos, associado ao espessamento das paredes pode ser descrito como deformação miocárdica. O espessamento parietal apresenta efeito funcional importante para o mecanismo de ejeção, sendo sensível de forma significativa a modificações na perfusão local e metabolismo dos miócitos. Além disso, observa-se que a orientação das fibras da região basal é diferente daquela da região apical, tornando a relação de forças locais geradas conseqüentemente distinta. O espessamento parietal portanto, é resultado da soma do movimento das lâminas de

fibras musculares, distribuídas nas três angulações descritas, em três planos: extensão/encurtamento, espessamento e deslizamento (Coppola and Omens, 2008).

### 2.3.5.2 Análise da deformação miocárdica pelo ST

A técnica do *speckle tracking* (ST) para avaliação da deformação miocárdica é realizado a partir da imagem ultrassonográfica bidimensional, e foi introduzida recentemente, mas os estudos fundamentais foram iniciados a partir do fim dos anos 90 (Heimdal et al., 1998). A adaptação do ST ao modo bidimensional foi realizado posteriormente (Amundsen et al., 2006). O ST pode ser definido como rastreamento de marcas acústicas digitais, ou seja, dos pontos que formam a imagem bidimensional. Essas marcas são identificadas, marcadas e rastreadas ao longo do seu movimento durante o ciclo cardíaco, formando um “loop”, que demonstra suas mudanças instantâneas de direção e velocidade. Essas mudanças são representadas por vetores que mostram magnitude e direção (Bauer et al., 2011; Castillo et al., 2012). O deslocamento das marcas acústicas pode ser analisado em função do tempo, gerando um gráfico característico, cujas curvas fornecidas recebem a designação de “Strain Rate” (SR), a taxa de deformação (1/s) e “Strain” (S), a deformação (%), calculada a partir da integral do SR. O ST é baseado na teoria de deformação finita de tensores Lagrangianos e Eulerianos. Estas teorias descrevem o movimento de partículas (deslocamento) relacionado a estresse mecânico sofrido por uma estrutura ou tecido. As características viscoelásticas conferem ao tecido cardíaco capacidade de deslocamento entre partículas, onde há mudança de forma e tamanho. O tensor Lagrangiano mede o objeto a partir de uma configuração morfológica inicial até o ponto máximo de deslocamento; o tensor Euleriano refere-se à configuração deformada ou momentânea. A partir dessas teorias descreveu-se o “Strain” como a mudança no comprimento de um segmento dividido pelo seu comprimento original como observado na fórmula abaixo:

$$S = \frac{L_i - L_0}{L_0} \quad \text{onde,}$$

S= strain;  $L_i$  comprimento induzido;  $L_0$  comprimento original

E o “Strain Rate” é a taxa da deformação descrita como  $(L_i - L_0) / L_0 \times s^{-1}$ . Na realização das imagens ultrassonográficas do coração, ocorre captura do movimento tecidual de forma segmentar, em múltiplos planos e eixos durante o ciclo cardíaco como observado na figura 8. É possível realizar avaliação de deformação longitudinal, radial e circunferencial do miocárdio (Bauer et al., 2011).

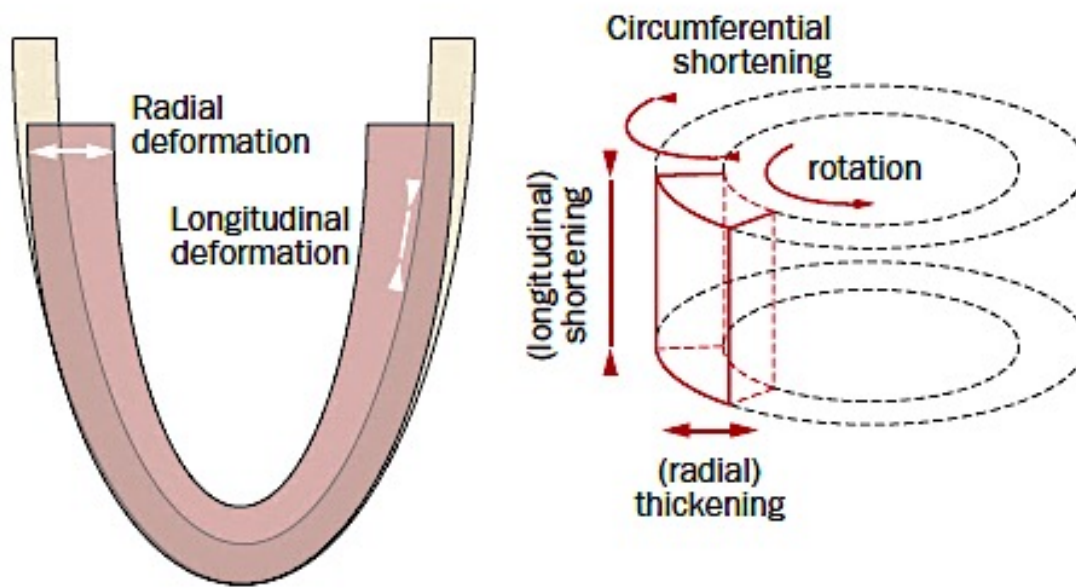


Figura 8. Representação dos movimentos passíveis de detecção pela análise de deformação miocárdica pelo *ST* (Cikes et al., 2010)

A análise da deformação fornece informações detalhadas de disfunções globais ou regionais do ventrículo esquerdo de maneira sensível e específica (Bauer et al., 2011; Banks et al., 2011). A realização do *ST* independe do ângulo de insonação, o que torna sua utilização menos dependente da perícia do examinador, entretanto há necessidade do entendimento do movimento complexo que é a contração, para adquirir informações clinicamente relevantes. Importante destacar que a taxa de amostragem para a realização desta técnica deve ser acima de 200 quadros por segundo (Castillo et al., 2010; Castillo et al., 2012).

## 2.4 Modelos de sobrecarga de pressão

A alta prevalência de doença hipertensiva determinou o desenvolvimento de modelos de hipertensão arterial sistêmica para elucidação de seus mecanismos. Atualmente a ciência dispõe de vários modelos: genético (ratos espontaneamente hipertensos), animais transgênicos (TGR (mREN2)27), ratos sensíveis ao sal (Dahl), hipertensão renovascular (Goldblatt), redução de parênquima renal, hipertensão endócrina (DOCA), ambiental e neurogênica (estresse), induzida por dieta (sal, lipídeos ou açúcar), infusão de angiotensina II, outras abordagens farmacológicas ( $\beta$ -adrenérgicos), redução crônica de óxido nítrico (Dornas and Silva, 2011) e modelos cirúrgicos de



sobrecarga de pressão como a constrição aórtica (Barrick et al., 2007).

Os modelos cirúrgicos de sobrecarga pressórica são amplamente utilizados em pesquisa para avaliação do processo de hipertrofia cardíaca. Existem atualmente 5 modelos relacionados a técnica: coarctação da aorta transversa, com alta taxa de sobrevivência e permitindo o estudo da hipertrofia ventricular; constrição da aorta ascendente, que simula a estenose aórtica; constrição da aorta abdominal, de processo fisiopatológico mais lento, induzindo processo de insuficiência cardíaca; a constrição da artéria pulmonar, que leva a insuficiência ventricular esquerda e direita; e a constrição transversal da aorta associada a ligadura da coronária distal anterior esquerda, na associação de hipertrofia com desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Tarnavski et al., 2004; Rai et al., 2017).

A constrição ou coarctação da aorta torácica (CAT) é provavelmente o modelo de sobrecarga pressórica mais utilizado em camundongos, e foi descrito pela primeira vez por Rockman e colaboradores (Rockman et al., 1991). A ligadura é realizada entre as artérias inominada e carótida esquerda como observado na figura 10. Esta técnica causa sobrecarga crônica de pressão no ventrículo esquerdo, hipertrofia ventricular progressiva culminando com desenvolvimento de insuficiência cardíaca, simulando a resposta cardiovascular a hipertensão arterial do ser humano (Barrick et al., 2007; deAlmeida et al., 2010; Cumbermack et al., 2011). Uma das grandes vantagens da técnica é a possibilidade de quantificação do gradiente de pressão gerado pela coarctação e estratificação do grau de hipertrofia. A técnica requer grande habilidade cirúrgica e é considerada excelente modelo para intervenções farmacológicas e moleculares potencialmente atenuadoras de hipertrofia. É importante citar que há variabilidade entre linhagens diferentes de camundongos, em relação aos efeitos produzidos (Patten and Hall-Porter, 2009). Barrick et al (2007) descrevem as diferenças observadas em camundongos C57BL/6J e camundongos 129S1/SvImJ, verificando que 5 semanas após a realização da CAT, os camundongos C57BL/6J desenvolveram dilatação ventricular esquerda com características de hipertrofia excêntrica e redução da função sistólica, ao passo que os animais 129S1/SvImJ desenvolvem hipertrofia concêntrica com redução significativa da câmara ventricular esquerda, com aumento dos valores de função sistólica avaliados pelo ecocardiograma.

A hipertrofia concêntrica causada pela CAT pode levar a dilatação da câmara ventricular associada com insuficiência sistólica, embora a evolução do processo inicial para a insuficiência seja motivo de discussão, com caracterização ainda deficiente. Essa característica demonstra a importância na diferenciação das vias responsáveis pela evolução do estágio de crescimento hipertrófico compensado para o estágio de dilatação e descompensação do remodelamento grave (Kehat and Molkentin, 2010; Dias-Peixoto et al., 2008).

Uma via de sinalização frequentemente relacionada a remodelamento hipertrófico concêntrico, é a induzida pela ativação da ERK1/2, que é deflagrada pela ativação na membrana de uma proteína G denominada Ras, que recruta a MAP3K Raf1 levando a fosforilação de ERK1/2. Essa via tem sido descrita em processo compensado de remodelamento. A via Calcineurina/NFAT por sua vez tem sido descrita em processos de remodelamento ventricular de características patológicas, sendo considerada via importante que determina aspectos de cardiomiopatia. O aumento da calcineurina tem relação com aumentos sustentados do cálcio intracelular. Essa via relaciona-se de forma importante a aumento de deposição de colágeno no miocárdio. Além disso, relata-se que em modelos de sobrecarga pressórica em camundongos, a via  $Ca^{++}$ /Calmodulina quinase do tipo II tem sua atividade aumentada de forma significativa, com desenvolvimento subsequente, de forma intensa, de crescimento de cardiomiócitos, dilatação cardíaca, fibrose e redução da função (Kehat and Molkenin, 2010).

A maioria dos estudos relacionados ao efeito cardioprotetor da Ang-(1-7)/Mas no coração foi feita utilizando infarto do miocárdio e tratamento com agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Não existem informações na literatura sobre o papel do eixo cardioprotetor na cardiomiopatia induzida por sobrecarga pressórica. Considerando a diversidade de características morfofuncionais nos diferentes modelos, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel do receptor Mas no remodelamento miocárdico induzido por coarctação de aorta torácica. Utilizamos para tal, camundongos com deleção genética do receptor Mas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliação dos efeitos da coarctação aórtica sobre parâmetros ecodopplercardiográficos convencionais e de *speckle tracking* relacionados ao remodelamento cardíaco de camundongos MAS-KO.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Avaliação da função cardíaca em camundongos FVB/N Mas-KO utilizando sistema de ultrassonografia de alta resolução: avaliação da função sistólica e diastólica utilizando parâmetros convencionais e da técnica de *speckle tracking* (*Strain*); avaliação da função diastólica pelos métodos convencionais e da técnica do Doppler Tecidual em camundongos submetidos à coarctação aórtica

- Caracterização da função cardíaca de camundongos FVB/N Mas-KO, comparados com seus congêneres normais.
- Avaliação pelo *speckle tracking* de velocidade, deslocamento, deformação e taxa de deformação miocárdica; verificação da sensibilidade do ST em detectar alterações funcionais precocemente, em condições normais e nos camundongos FVB/N Mas-KO submetidos à coarctação da aorta torácica.
- Quantificar a expressão gênica para colágeno III, TGF $\beta$ , MHC $\beta$ , BNP e ANP em camundongos submetidos à coarctação aórtica.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos FVB/N *wild type* e FVBN Mas-KO machos pesando entre 20 e 30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em biotério apropriado, com ração e água *ad libitum*. A experimentação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o Protocolo n. 59/2016.

### **4.2 Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo FVBN SHAM; grupo FVBN Coarctado; grupo FVBN Mas-KO SHAM; e grupo FVBN Mas-KO coarctado. Os animais foram submetidos a avaliação ecoDopplercardiográfica no tempo 0 – 7 dias antes do procedimento cirúrgico; no tempo 1 – 7 dias após o procedimento cirúrgico; e no tempo 2 - 30 dias após o procedimento cirúrgico.

### **4.3 Coarctação Torácica da Aorta**

Os animais foram submetidos a cirurgia de coarctação da aorta torácica. A coarctação transversal da aorta torácica em camundongos causa sobrecarga de pressão crônica no ventrículo esquerdo, remodelamento ventricular progressivo, culminando com insuficiência cardíaca. É considerado um modelo experimental que simula as respostas cardiovasculares humanas à hipertensão sistêmica (Barrick et al., 2007).

Os animais foram anestesiados com aplicação intraperitoneal da associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg), e posicionados em decúbito lateral direito, como demonstrado na figura 9, em uma placa aquecida para controle da temperatura corporal. Os animais foram intubados

e mantidos no ventilador a uma taxa de 120 respirações por minuto (Martin et al., 2012). Uma incisão na pele, no primeiro espaço intercostal do lado esquerdo, próximo à região axilar, foi realizada para acesso ao foco cirúrgico. A aorta transversa foi ligada utilizando um mandril de tamanho 25,5 x 6 mm com fio de sutura algodão 4.0. O objetivo foi criar uma redução de aproximadamente 40% do lúmen da aorta transversa. A incisão da pele foi fechada com fio de sutura 6.0.

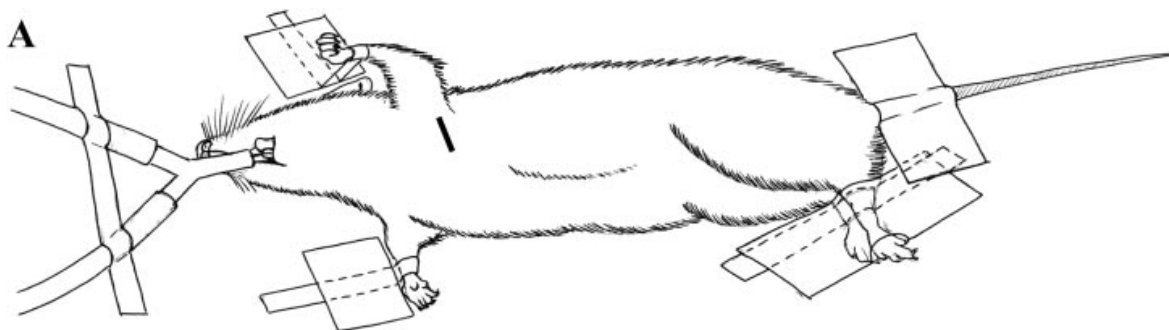


Figura 9. Posicionamento do camundongo e local da incisão (segundo espaço intercostal) para realização da coarctação torácica da aorta (Tarnavski et al., 2004).

A figura 10 mostra a localização da coarctação entre as artérias inominada e carótida esquerda.



Figura 10. Localização da coarctação na aorta torácica (Hu et al., 2003).

#### 4.4 EcoDopplercardiografia

Morfologia e função cardíaca dos animais foram avaliadas *in vivo* de forma não invasiva, utilizando um sistema de ecocardiografia transtorácica de alta resolução equipado com transdutores bifrequenciais de 24 a 30 MHz e de 32 a 40 MHz (VEVO 2100 VisualSonics, Toronto, Canadá – Figura 11) em três diferentes momentos: 7 dias antes, 7 dias após e 30 dias após intervenção cirúrgica.

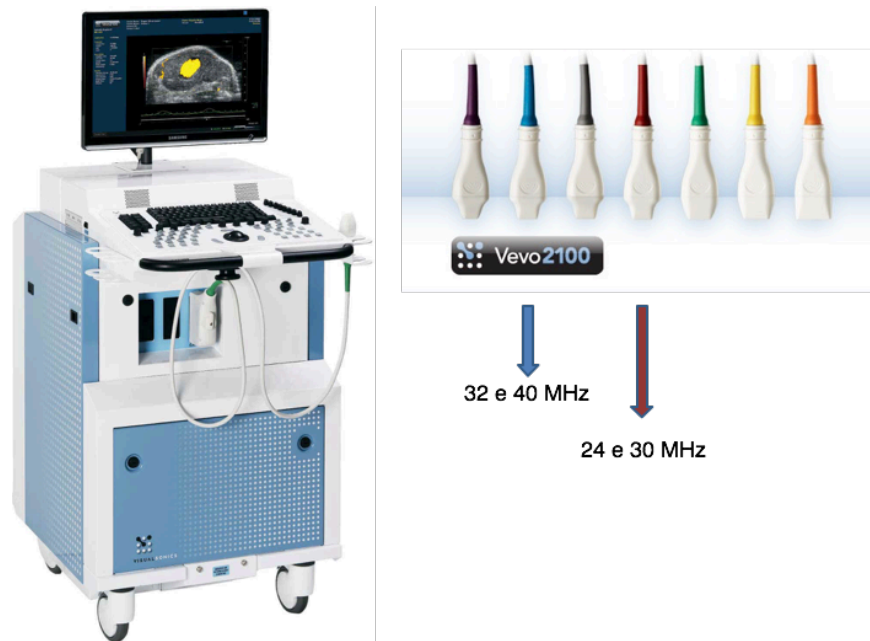


Figura 11. Equipamento de ecocardiografia de alta resolução VisualSonics VEVO 2100 e transdutores utilizados na experimentação.

Após indução anestésica com isoflurano na concentração de 5% por um minuto, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma placa aquecida, equipada com eletrodos para registro de eletrocardiograma que permite monitoramento constante da frequência cardíaca, e manutenção da temperatura corporal em 37°C. A manutenção anestésica foi realizada com uma concentração de isoflurano entre 1 e 1,25% utilizando cone nasal. Procedeu-se então à tricotomia da região ventral do tórax com creme depilatório para permitir acesso ultrassonográfico. Para o exame foi utilizado gel específico para ultrassonografia. Imagens de alta resolução foram obtidas a partir das janelas ultrassonográficas paraesternal direita e esquerda, eixos curto e longo, além da visão apical. Imagens padrão do coração no modo bidimensional (Modo B) e imagens do influxo na valva mitral pelo Doppler também foram registradas. As dimensões da câmara ventricular

esquerda (VE) bem como a espessura de suas paredes foram medidas no nível dos músculos papilares utilizando o Modo M nos eixos curto e longo, em acesso paraesternal direito, ao final da sístole e da diástole, permitindo as seguintes mensurações: dimensões internas do VE (DVEd e DVEs); espessura da parede posterior do VE (EPPd e EPPs) e espessura do septo interventricular (SIVd e SIVs). Baseado nestes parâmetros, os volumes diastólico e sistólico finais (VDF e VSF), fração de encurtamento (FE), fração de ejeção (FEj), volume sistólico (VS) e débito cardíaco (DC) foram calculados de forma automática pelo software do equipamento. Foram também avaliados com a utilização do Doppler colorido e Doppler pulsátil o fluxo na valva aórtica e o fluxo no ponto onde foi realizada a coarctação para determinação do gradiente pressórico.

“Loops” de dois cortes bidimensionais, um do eixo longo e outro do eixo curto do VE, capturados em taxa de amostragem de 230 quadros por segundo, com profundidade de 11 mm, foram gravadas digitalmente para análise *off-line*, pelo software Vevostrain (versão 1.4.0). O registro dessas imagens foi realizada de forma que fosse obtido o melhor delineamento do endocárdio e do epicárdio. Tanto para o eixo longo como para o eixo curto, o software Vevostrain produz automaticamente divisão em seis segmentos anatômicos de cada corte, para avaliação regional pelo ST. Após a aquisição das imagens, utiliza-se o software de determinação e marcação das bordas endocárdicas e epicárdicas, totalizando entre 8 e 12 pontos. Análise de velocidade, deslocamento, deformação e taxa de deformação do miocárdio foi realizada.

Todas as medidas e cálculos ecodopplercardiográficos foram feitos de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Quiñones et al., 2002; Mor-Avi et al., 2011). Todas as fórmulas utilizadas para os cálculos ecocardiográficos estão agrupadas no item Anexos.

#### **4.5 Avaliação da expressão gênica**

Após o experimento os animais foram eutanasiados por decapitação. Fragmentos da parede posterior, septo e parede livre do ventrículo esquerdo foram coletados, separados, armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente em temperatura -80 até a extração do RNA

##### **4.5.1 Extração do RNA total**

A extração de RNA total dos ventrículos dos camundongos foi realizada através da homogeneização desses órgãos em presença de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) na proporção de 1 ml para cada 50 - 100 mg de tecido, conforme especificação do fabricante. As amostras foram homogeneizadas utilizando-se um homogeneizador automático e kit CK28 (Precellys, Bertin Instruments - França).

#### **4.5.2 Tratamento do RNA total com DNase**

A leitura da concentração e pureza do RNA foi obtida no aparelho Nanodrop 2000. A razão 260/280 das amostras foi igual ou superior a 1.8. As amostras do RNA total foram tratadas com DNase I Amplification Grade (AMP-D1 Sigma) para eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico.

#### **4.5.3 Transcrição reversa e PCR em tempo real**

Para a reação de transcriptase reversa (RT-PCR) foi utilizada enzima MMLV (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo as especificações do fabricante. O PCR quantitativo (qPCR) foi realizado no aparelho ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), com SYBR Green Quantitect (Qiagen, Hilden, Alemanha) em triplicatas e com volume final de 5ul. Para todos os genes avaliados foi realizada a curva de dissociação ("melting curve"). Os resultados obtidos demonstraram apenas um pico na curva de dissociação (Anexos).

O método para análise do qPCR foi realizado através do delta ct (Pffal, 2004) por meio do software (Quantstudio Real Time v1.3 Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As sequências dos oligos utilizados foram verificadas no Blast e estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Lista e sequência dos *primers* utilizados para a qPCR.

Gene	Sequence
GAPDH_FW GAPDH_RV	ACCCAGAAGACTGTGGATGG ACACATTGGGGGTAGGAACA
BNP_FW BNP_RV	CACCGCTGGGAGGTCACT GTGAGGCCTTGGTCCTTCAAGGTCACT
ANP_FW ANP_RV	TTCTTCCTCGTCTTGGCCTTT GACCTCATCTTCTACCGGCATCT
Col3_FW Col3_RV	GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC
TGF $\beta$ _FW TGF $\beta$ _RV	AGTTTGTCAAGGCCAAGATCGT GTCTTGCCATTCTCCGTCTCA
MHC $\beta$ _FW MHC $\beta$ _RV	AGTTTGTCAAGGCCAAGATCGT GTCTTGCCATTCTCCGTCTCA

## 5. Análise de dados

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prisma versão 6.0c. Foi utilizado teste T não pareado para análise comparativa da função cardíaca entre FVBN WT e FVBN Mas-KO. Para análise entre grupos após CAT foi utilizado *Two Way* ANOVA (pós teste de Bonferroni para múltiplas comparações). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

## 6. Resultados

### 6.1 Ecocardiografia convencional WT X MAS-KO (controle)

A primeira abordagem realizada foi a comparação da função cardíaca, utilizando ecocardiografia convencional, entre animais FVBN Mas-KO (n=32) e seus respectivos controles, animais FVBN WT (n=31). A figura 12 mostra as características, ao Modo M, da câmara ventricular esquerda, de ambos os camundongos. É possível observar que em frequência cardíaca similar, a dinâmica de movimentação do ventrículo esquerdo no Mas-KO é reduzida, com aumento visual da câmara ventricular em diástole e em sístole.



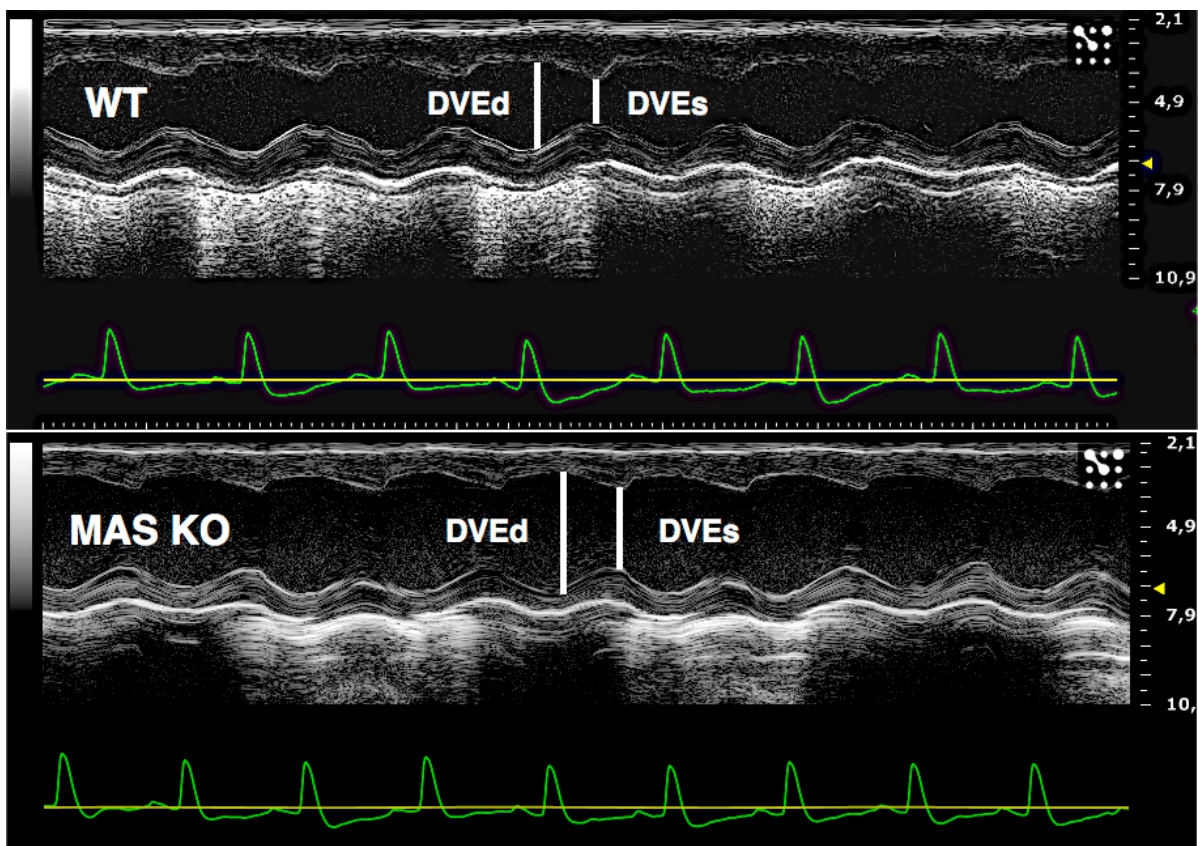


Figura 12. Características da câmara ventricular esquerda de camundongos FVBN WT e Mas-KO, demonstradas pelo Modo M. (DVEd: dimensão diastólica do ventrículo esquerdo; DVEs: dimensão sistólica do ventrículo esquerdo).

Observamos nos animais Mas-KO redução importante dos valores dos parâmetros de função sistólica como observado nos gráficos abaixo. Os quatro parâmetros representados no (Gráfico 1) fração de ejeção, fração de encurtamento, débito cardíaco e volume sistólico, apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos animais WT.

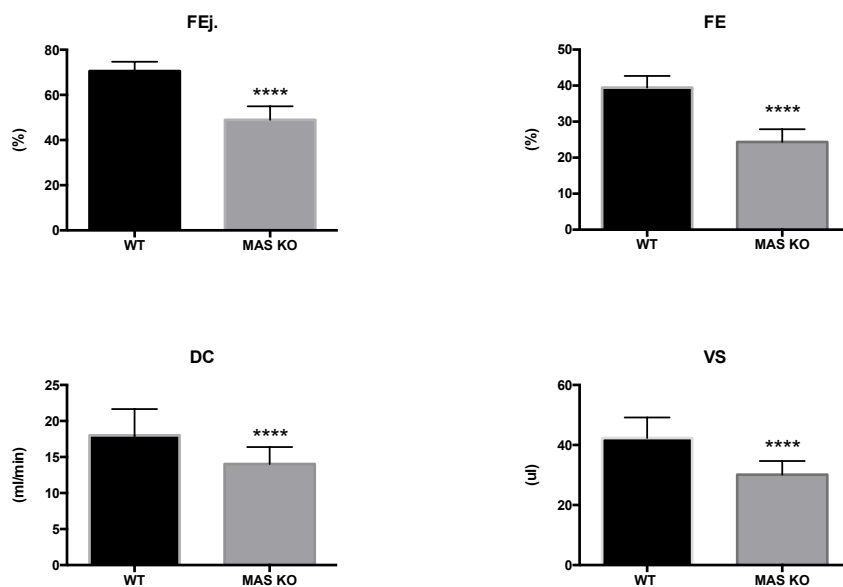


Gráfico 1. Valores de fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC), e volume sistólico (VS) de animais FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) (\*\*\*\* p < 0,0001; teste T não pareado).

A redução dos valores dos parâmetros de função sistólica é corroborada pelas características morfológicas da câmara ventricular esquerda, como pode ser observado nos animais Mas-KO, demonstrando aumento do volume sistólico final (VSF) e aumento da dimensão sistólica da câmara ventricular esquerda (Gráfico 2).

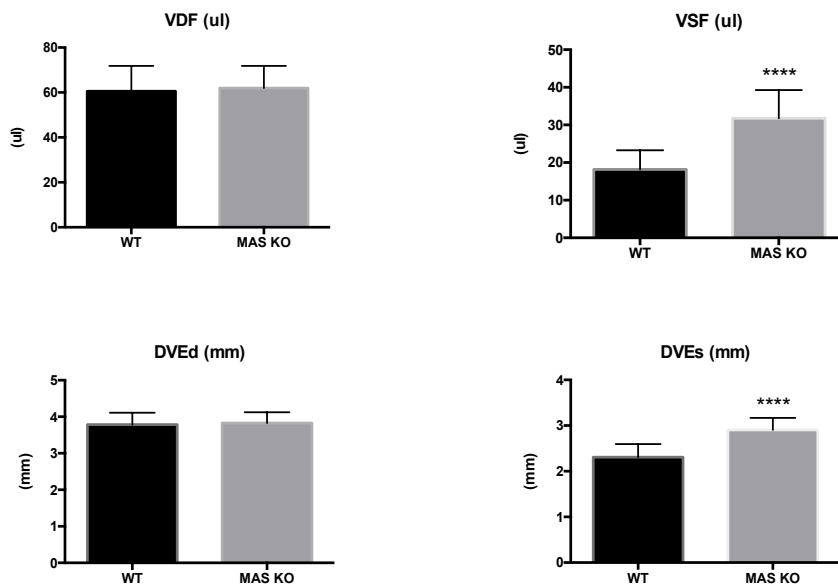


Gráfico 2. Volume ventricular e dimensões da câmara ventricular esquerda em sístole e diástole, em animais FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32); VDF volume diastólico final; VSF volume sistólico final; DVEd: dimensão diastólica do VE; DVEs dimensão sistólica do VE (\*\*\*\* p< 0,0001, teste T não pareado).

A disfunção sistólica dos camundongos Mas-KO é também caracterizada pelo espessamento sistólico deficiente das paredes livre e septo interventricular (Gráfico 3)

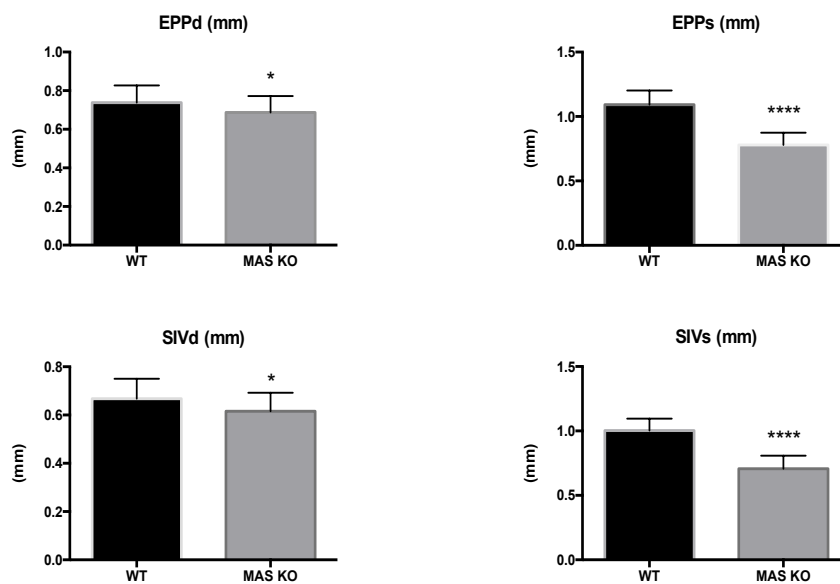


Gráfico 3. Espessura da parede posterior (EPP) e do septo interventricular (SIV) do VE em sístole e diástole, em animais FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) (\*\*\*\* p< 0,0001 e \*p< 0,05, teste T não pareado).

A massa ventricular (padrão e corrigida) é reduzida no camundongo Mas-KO. Não houve diferença estatística no valor da espessura relativa da parede entre os animais. Observa-se também aumento da FC nos animais Mas-KO (Gráfico 4). A espessura relativa da parede demonstrou tendência a redução no Mas-KO, compatível com a redução de massa indicada.

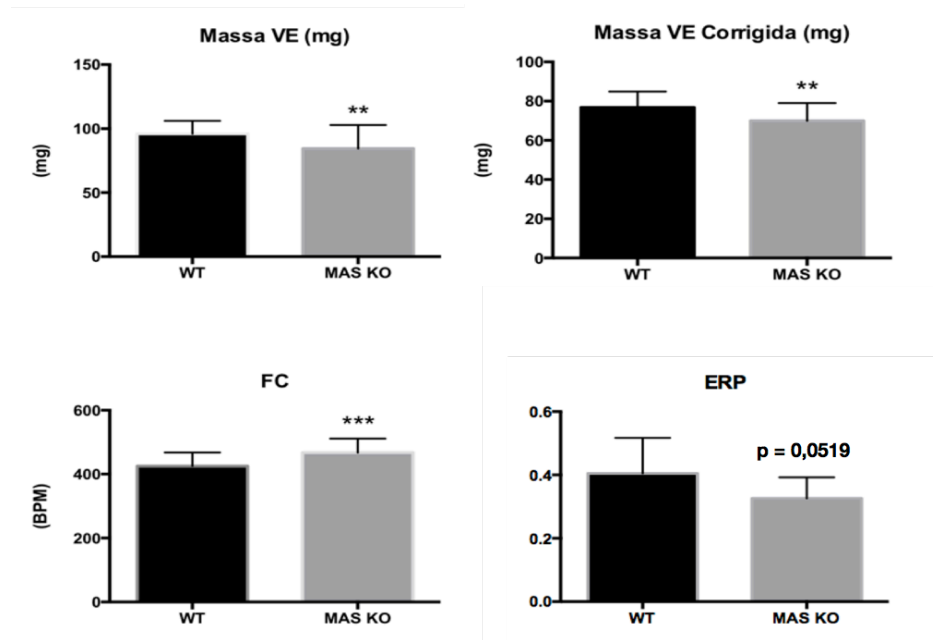


Gráfico 4. Massa do VE, massa corrigida do VE, frequência cardíaca (FC) e espessura relativa da parede (ERP), em animais FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) (\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$ , teste T não pareado).

Tempo de ejeção aórtico, as ondas E e A do enchimento ventricular esquerdo e sua relação (E/A), tempo de contração isovolumétrico e índice de performance do miocárdio não apresentaram diferença entre os grupos. O tempo de relaxamento isovolumétrico apresentou aumento significativamente estatístico nos camundongos Mas-KO em relação aos FVBN WT. (Gráficos 5 e 6)

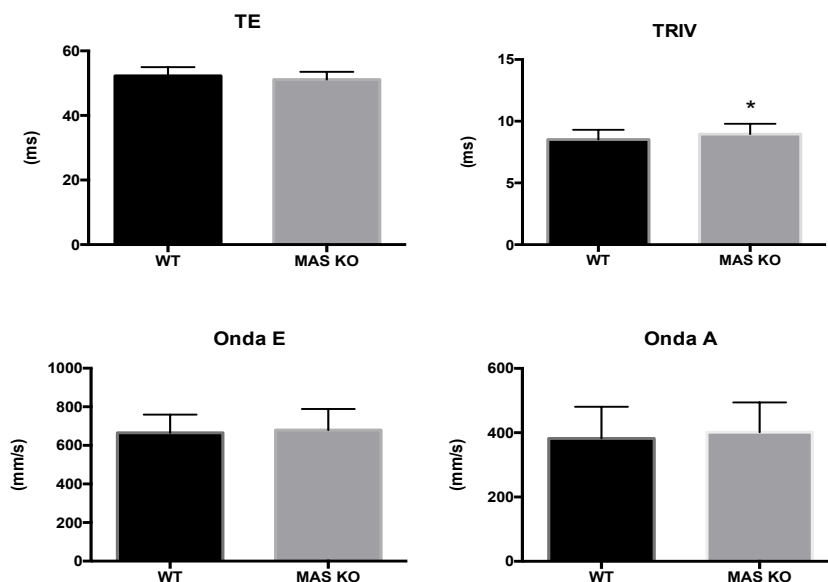


Gráfico 5. Tempo de ejeção (TE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), Ondas E e A do enchimento ventricular esquerdo em camundongos FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) (Teste T não pareado,  $p < 0,05$ ).

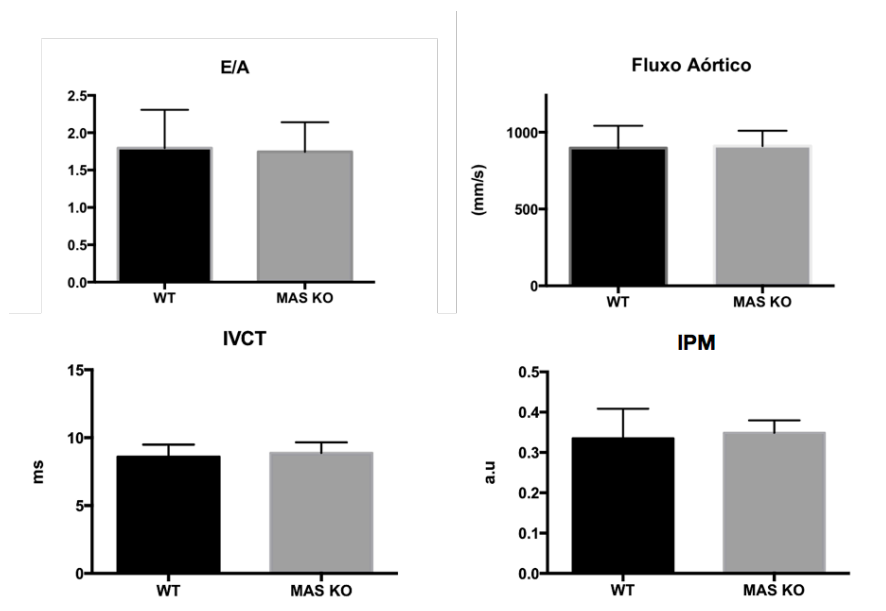


Gráfico 6. Relação E/A, pico de velocidade do fluxo aórtica, tempo de contração isovolumétrico (IVCT) e índice de performance do miocárdio (IPM) em camundongos FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) (Teste T não pareado,  $p < 0,05$ ).

O sumário destes resultados pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros morfofuncionais ecocardiográficos do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca de camundongos FVBN WT e Mas-KO (Valores média ± erro padrão; teste T não pareado p<0,05).

	FVBN WT (n=31)	FVBN Mas-KO (n=32)
FEj. (%)	70,57 ± 4,12	49,00 ± 5,94****
FE (%)	39,44 ± 3,26	24,36 ± 3,53****
DC (ul/min)	18,01 ± 3,63	14,03 ± 2,35****
VS (ul)	42,33 ± 6,85	30,11 ± 4,54****
VDF (ul)	60,54 ± 11,30	61,95 ± 9,86
VSF (ul)	18,17 ± 5,08	31,78 ± 7,48****
DVEd (mm)	3,79 ± 0,32	3,82 ± 0,29
DVEs (mm)	2,31 ± 0,29	2,90 ± 0,26****
EPPd (mm)	0,73 ± 0,09	0,68 ± 0,09*
EPPs (mm)	1,09 ± 0,11	0,78 ± 0,09****
SIVd (mm)	0,67 ± 0,08	0,62 ± 0,07*
SIVs (mm)	1,00 ± 0,09	0,71 ± 0,10****
Massa VE (mg)	95,94 ± 10,09	84,38 ± 18,46**
Massa VE (Corr) (mm)	76,78 ± 8,11	69,96 ± 9,11**
FC (bpm)	425,3 ± 42,48	467,4 ± 43,85****
TE (ms)	52,26 ± 2,70	51,15 ± 2,38
TRIV (ms)	8,52 ± 0,78	8,95 ± 0,83*
TCIV (ms)	8,60 ± 0,89	8,80 ± 0,78
Onda E (mm/seg)	665,1 ± 94,37	679,5 ± 109,6
Onda A (mm/seg)	382,1 ± 98,37	401,5 ± 92,72
E/A	1,79 ± 0,51	1,75 ± 0,39
Fluxo Aórtico (mm/seg)	897,8 ± 144,1	909,7 ± 99,89
IPM	0,335 ± 0,07	0,348 ± 0,03
E/TRIV	78,50 ± 12,63	76,70 ± 15,01
ERP	0,40 ± 0,11	0,33 ± 0,06

FEj. Fração de ejeção; FE fração de encurtamento; DC débito cardíaco; VS volume sistólico; VDF volume diastólico final; VSF volume sistólico final; DVEd e DVEs dimensão do ventrículo esquerdo em diástole e sístole; EPPd e EPPs espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole e sístole; SIVd e SIVs espessura do septo interventricular na diástole e na sístole; FC frequência cardíaca; TE tempo de ejeção aórtico; TRIV tempo de relaxamento isovolumétrico; TCIV tempo de contração isovolumétrico; Onda E do influxo mitral; Onda A do influxo mitral; E/A razão onda E/Onda A; IPM índice de performance do miocárdio; E/TRIV relação onda E/tempo de relaxamento isovolumétrico; ERP espessura relativa da parede

## 6.2 Ecocardiografia por *Speckle Tracking* WT X MAS-KO (controle)

Foi avaliada de forma concomitante e comparativa entre WT e Mas-KO, a deformação miocárdica no tempo 0, utilizando o software VEVOSTRAIN (Versão 1.4.0). As tabelas 3 e 4 mostram valores de deformação (*strain*) endocárdico e epicárdico respectivamente, contemplando os quatro parâmetros, velocidade, deslocamento, *strain* e *strain rate*, avaliados tanto no eixo longo quanto no eixo curto cardíaco.

Os valores observados nas tabelas 3 e 4 mostram que o camundongo Mas-KO na deformação endocárdica do eixo longo cardíaco apresenta redução do tempo para o pico do deslocamento radial, acompanhado de aumento da deformação (*strain*) radial e da taxa de deformação (*strain rate*) radial do eixo curto, em relação ao FVBN WT. E em relação à deformação epicárdica observa-se no Mas-KO redução no tempo para o pico do deslocamento longitudinal, acompanhado de aumento da taxa de deformação e redução do tempo para o pico da taxa de deformação longitudinal. Além disso observa-se redução no tempo para o pico da velocidade circunferencial epicárdica no eixo curto.

Strain radial endocárdico e epicárdico no eixo curto apresentam os mesmos valores, tendo sido analisado estatisticamente o endocárdico. Logo espera-se que a variação da análise seja a mesma.

Tabela 3. Valores globais de deformação miocárdica endocárdica dos eixos longo e curto do coração, em camundongos FVBN WT e Mas-KO no tempo 0. (\*p<0,05 e \*\* p<0,01, teste T não pareado)

				WT (n=31)	Mas-KO (n=32)	
				X ± EPM	X ± EPM	P
Eixo Longo	Radial	Velocidade	cm/seg	1,26 ± 0,17	1,24 ± 0,17	0,6311
			TPk ms	26,97 ± 7,35	28,01 ± 39,76	0,7415
		Deslocamento	mm	0,4580 ± 0,060	0,4444 ± 0,0644	0,3923
			TPk ms	<b>58,70 ± 4,91</b>	<b>56,13 ± 4,56*</b>	<b>0,0363</b>
		Strain	Pk%	28,70 ± 7,12	27,90 ± 6,57	0,6492
			TPk ms	59,97 ± 8,99	59,06 ± 7,51	0,6681
	Longitudinal	Strain Rate	Pk 1/s	7,74 ± 1,19	7,53 ± 0,93	0,4438
			TPk ms	33,23 ± 14,19	32,34 ± 11,92	0,7897
		Velocidade	cm/s	0,9503 ± 0,1710	1,0740 ± 0,2545	0,0865
			TPk ms	34,12 ± 9,89	41,50 ± 16,98	0,0587
		Deslocamento	mm	0,2615 ± 0,08	0,2724 ± 0,11	0,6595
			TPk ms	63,67 ± 11,28	58,25 ± 13,19	0,0884
Strain	Pk%	-17,94 ± 3,13	-18,29 ± 3,96	0,6976		
	TPk ms	59,90 ± 9,53	58,13 ± 8,25	0,4353		
	Strain Rate	Pk 1/s	-7,58 ± 1,33	-7,45 ± 1,33	0,7176	
		TPk ms	40,23 ± 13,91	37,50 ± 12,32	0,4153	
Eixo Curto	Radial	Velocidade	cm/s	1,26 ± 0,16	1,23 ± 0,13	0,4631
			TPk ms	23,97 ± 4,34	24,81 ± 3,91	0,4227
		Deslocamento	mm	0,4619 ± 0,07	0,4518 ± 0,06	0,5383
			TPk ms	59,53 ± 4,78	59,06 ± 4,01	0,6752
		Strain	Pk%	<b>24,53 ± 5,29</b>	<b>28,53 ± 6,45**</b>	<b>0,009</b>
			TPk ms	57,80 ± 6,31	56,59 ± 6,58	0,4645
	Strain Rate	Pk 1/s	<b>6,92 ± 1,23</b>	<b>7,91 ± 1,39**</b>	<b>0,0045</b>	
		TPk ms	32,43 ± 15,03	32,56 ± 12,58	0,9708	
	Circunferencial	Rate	Deg/s	191,3 ± 48,4	198,9 ± 65,43	0,6076
			TPk ms	68,70 ± 31,32	61,47 ± 30,13	0,3572
		Deslocamento	Pk Deg	2,82 ± 1,56	2,99 ± 1,65	0,6777
			TPk ms	48,40 ± 17,42	51,41 ± 19,80	0,5291
		Strain	Pk%	-23,38 ± 3,83	-22,79 ± 3,46	0,5300
			TPk ms	59,23 ± 4,52	57,97 ± 4,03	0,2490
	Strain Rate	Pk 1/s	-8,23 ± 1,19	-8,06 ± 1,38	0,6089	
		TPk ms	32,67 ± 7,73	32,19 ± 7,95	0,8109	

TPk – time to peak; ms – milissegundos; Deg – graus; cm – centímetros



Tabela 4. Valores globais de deformação miocárdica epicárdica dos eixos longo e curto do coração, em camundongos FVBN WT e Mas-KO no tempo 0 (\*p<0,05 e \*\* p<0,01, teste T não pareado).

				WT (n=31)	Mas-KO (n=32)	P
				X ± EPM	X ± EPM	
Eixo Longo	Radial	Velocidade	cm/seg	0,8604 ± 0,13	0,8635 ± 0,14	0,9298
			TPk ms	34,30 ± 12,26	35,91 ± 13,44	0,6254
		Deslocamento	mm	0,2870 ± 0,05	0,2741 ± 0,05	0,3224
			TPk ms	58,13 ± 5,24	55,91 ± 4,91	0,0892
		Strain	Pk%	28,70 ± 7,12	27,90 ± 6,57	0,6492
			TPk ms	59,97 ± 8,99	59,06 ± 7,51	0,6681
	Strain Rate	Pk 1/s	7,74 ± 1,19	7,53 ± 0,93	0,4438	
		TPk ms	33,23 ± 14,19	32,34 ± 11,92	0,7897	
	Longitudinal	Velocidade	cm/s	0,7714 ± 0,1528	0,8514 ± 03148	0,2129
			TPk ms	51,07 ± 18,43	47,73 ± 17,99	0,4882
		Deslocamento	mm	0,1830 ± 0,07	0,1991 ± 0,09	0,4423
			TPk ms	<b>72,70 ± 17,52</b>	<b>62,97 ± 12,82*</b>	<b>0,0149</b>
Strain		Pk%	-10,95 ± 2,18	-11,95 ± 2,59	0,1049	
		TPk ms	56,97 ± 7,79	56,47 ± 4,47	0,7568	
Strain Rate	Pk 1/s	<b>-4,65 ± 0,73</b>	<b>-5,16 ± 1,18*</b>	<b>0,0447</b>		
	TPk ms	<b>49,23 ± 19,97</b>	<b>39,53 ± 13,89*</b>	<b>0,0293</b>		
Eixo Curto	Radial	Velocidade	cm/s	0,7483 ± 0,1327	0,7365 ± 0,08	0,6788
			TPk ms	26,07 ± 6,55	25,31 ± 7,55	0,6769
		Deslocamento	mm	0,2522 ± 0,05	0,2436 ± 0,04	0,4538
			TPk ms	62,93 ± 5,12	62,00 ± 5,27	0,4827
		Strain	Pk%	<b>24,53 ± 5,29</b>	<b>28,53 ± 6,45**</b>	<b>0,009</b>
			TPk ms	57,80 ± 6,31	56,59 ± 6,58	0,4645
	Strain Rate	Pk 1/s	<b>6,92 ± 1,23</b>	<b>7,91 ± 1,39**</b>	<b>0,0045</b>	
		TPk ms	32,43 ± 15,03	32,56 ± 12,58	0,9708	
	Circunferencial	Rate	Deg/s	112,2 ± 27,32	118,3 ± 46,16	0,5309
			TPk ms	<b>82,07 ± 27,64</b>	<b>66,09 ± 26,49*</b>	<b>0,0236</b>
		Deslocamento	Pk Deg	1,43 ± 0,91	1,39 ± 0,91	0,8622
			TPk ms	53,00 ± 20,96	52,00 ± 23,33	0,8600
		Strain	Pk%	-8,89 ± 1,49	-8,84 ± 1,73	0,9060
			TPk ms	66,83 ± 9,11	64,13 ± 7,10	0,1952
	Strain Rate	Pk 1/s	-3,61 ± 0,55	-3,79 ± 0,63	0,2174	
		TPk ms	40,87 ± 16,23	39,53 ± 12,32	0,7154	

TPk – time to peak; ms – milissegundos; Deg – graus; cm – centímetros

As diferenças nos parâmetros relatados nas tabelas 3 e 4 podem ser observadas nos gráficos 7, 8 e 9.

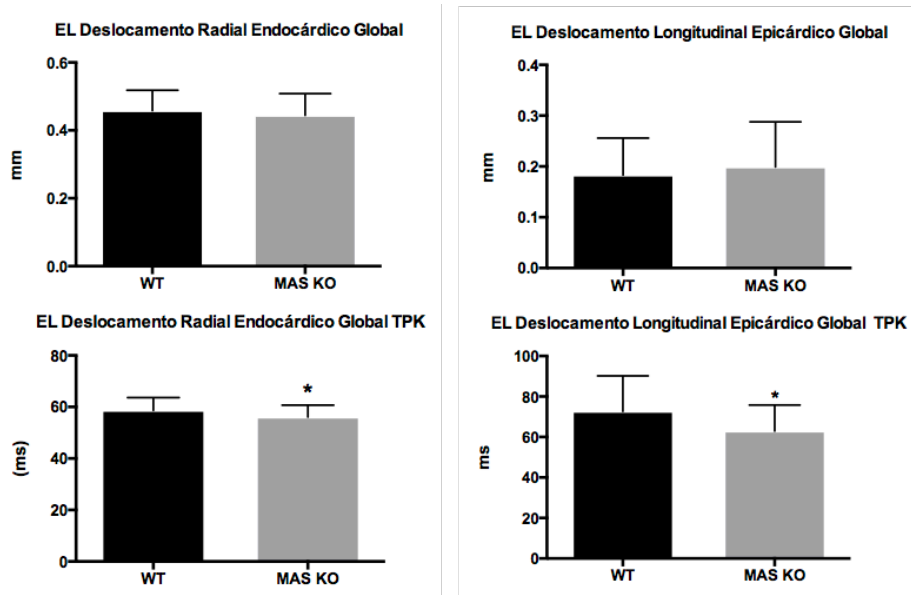


Gráfico 7. Deslocamento radial endocárdico e longitudinal epicárdico globais, e tempo para o pico, de camundongos FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) no tempo controle (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

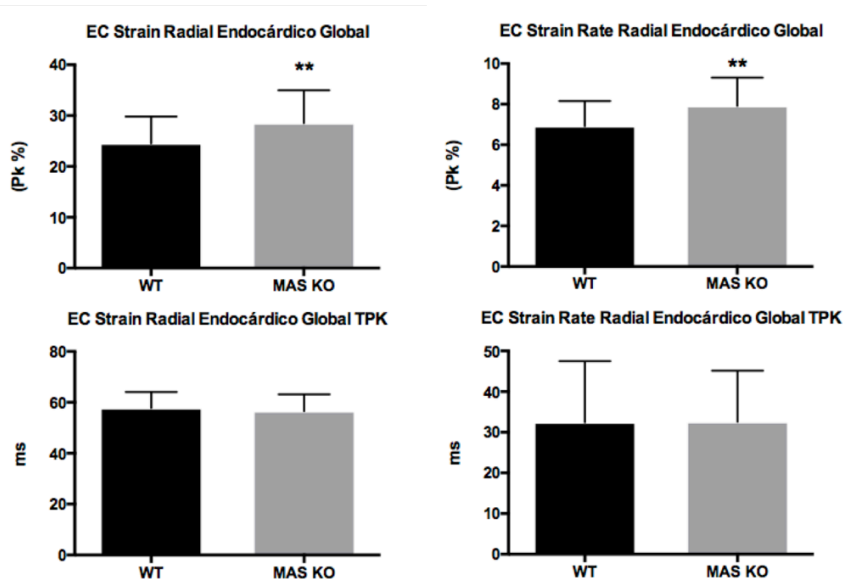


Gráfico 8. *Strain* e *Strain Rate* radial endocárdicos globais, e tempo para o pico (TPK), de camundongos FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) no tempo controle (\*\* $p < 0,01$ , teste T não pareado).

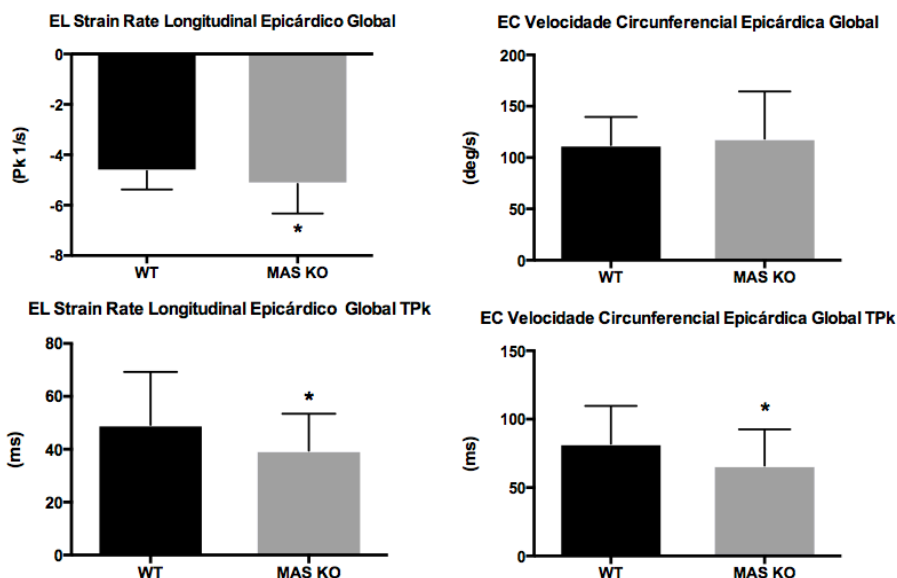


Gráfico 9. *Strain Rate* longitudinal e tempo para o pico; e velocidade circunferencial e tempo para o pico (TPK) epicárdicos globais, de camundongos FVBN WT (n=31) e Mas-KO (n=32) no tempo controle (\*p<0,05, teste T não pareado)

### 6.3 Ecocardiografia convencional WT X MAS-KO (Coarctação – 30 dias)

A abordagem seguinte foi a comparação, pela ecocardiografia convencional, entre os animais FVBN WT e FVBN MAS-KO antes e 30 dias após a coarctação (Grupo FVBN WT SHAM n=9; grupo FVBN WT CAT n=9; grupo Mas-KO SHAM n=13; grupo Mas-KO CAT n=13). A figura 13 mostra a localização da coarctação na aorta transversa e sua comparação com camundongo SHAM. A coarctação realizada produz uma redução da área da aorta torácica em torno de 40%.

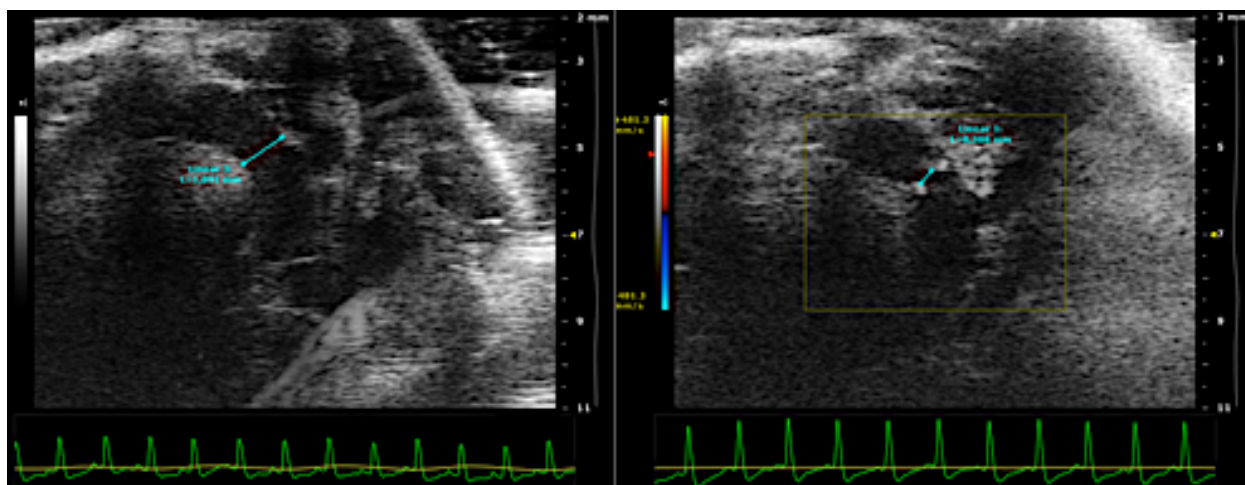


Figura 13. Aorta normal (esquerda) demonstrando lúmen livre e coarctada (direita) demonstrando redução em seu diâmetro.

O fluxo na aorta transversa apresenta aspecto laminar (Figura 14), com padrão característico de aceleração rápida e desaceleração gradual. A realização da coarctação modifica de forma importante o perfil do espectro Doppler no local de estreitamento, como pode ser observado na figura 15, gerando um aumento expressivo do gradiente pressórico. Fluxo turbulento caracteriza o espectro Doppler na região onde é realizada a coarctação. O espectro Doppler, tanto em camundongos WT como Mas-KO permanece similar tanto em condição de normalidade como após a coarctação.

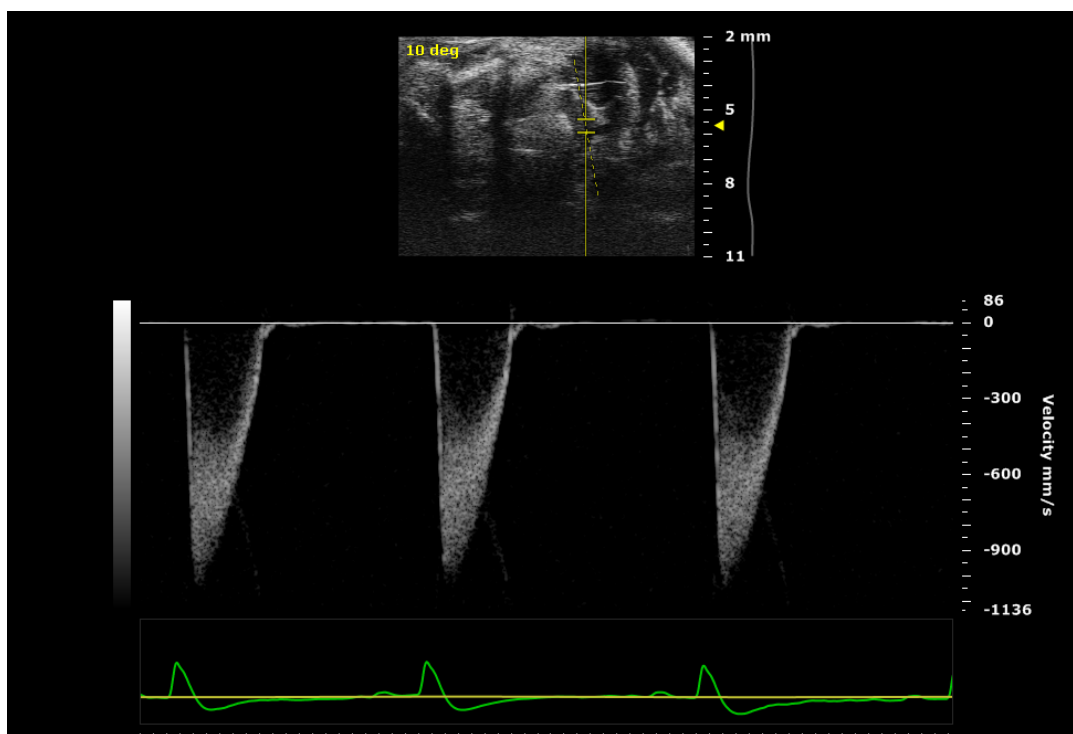


Figura 14. Espectro Doppler normal do fluxo na aorta transversa em camundongo WT SHAM.

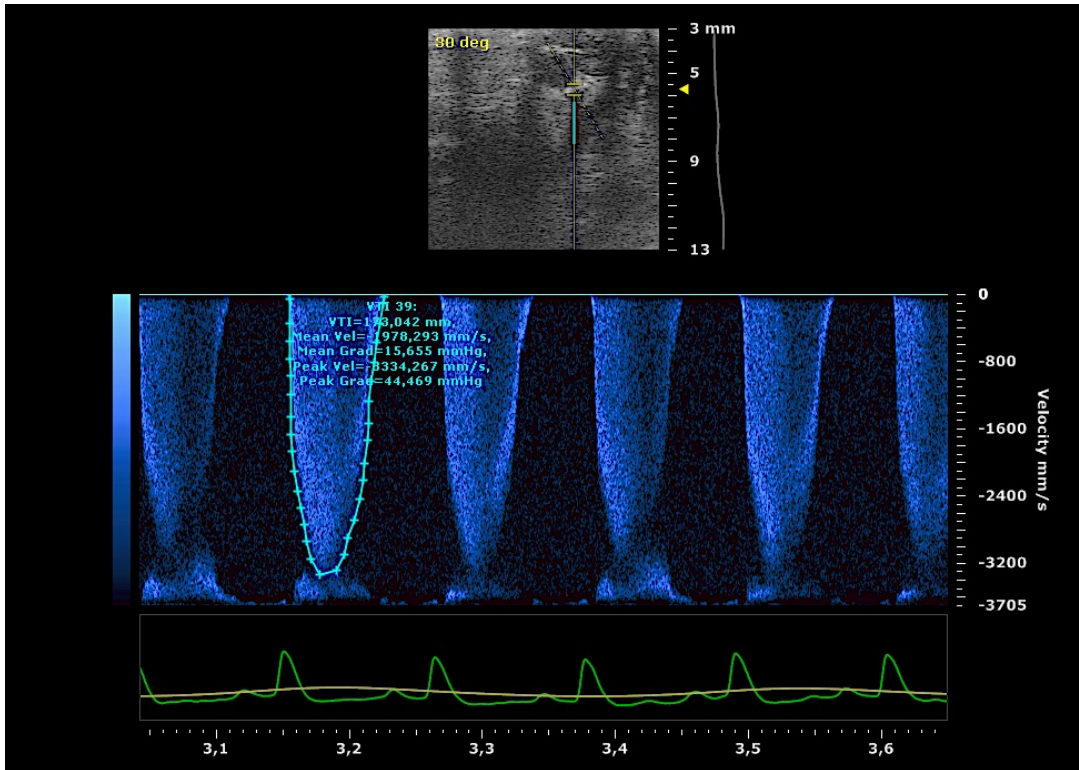


Figura 15. Espectro Doppler do fluxo da aorta transversa coarctada, mostrando fluxo turbulento e de alta velocidade em camundongo WT.

Como pode ser observado no gráfico 10, houve adaptação funcional observada pela ecocardiografia convencional, em resposta à coarctação, apenas no camundongo Mas-KO, demonstrada pelo aumento de Fej., FE e VS.

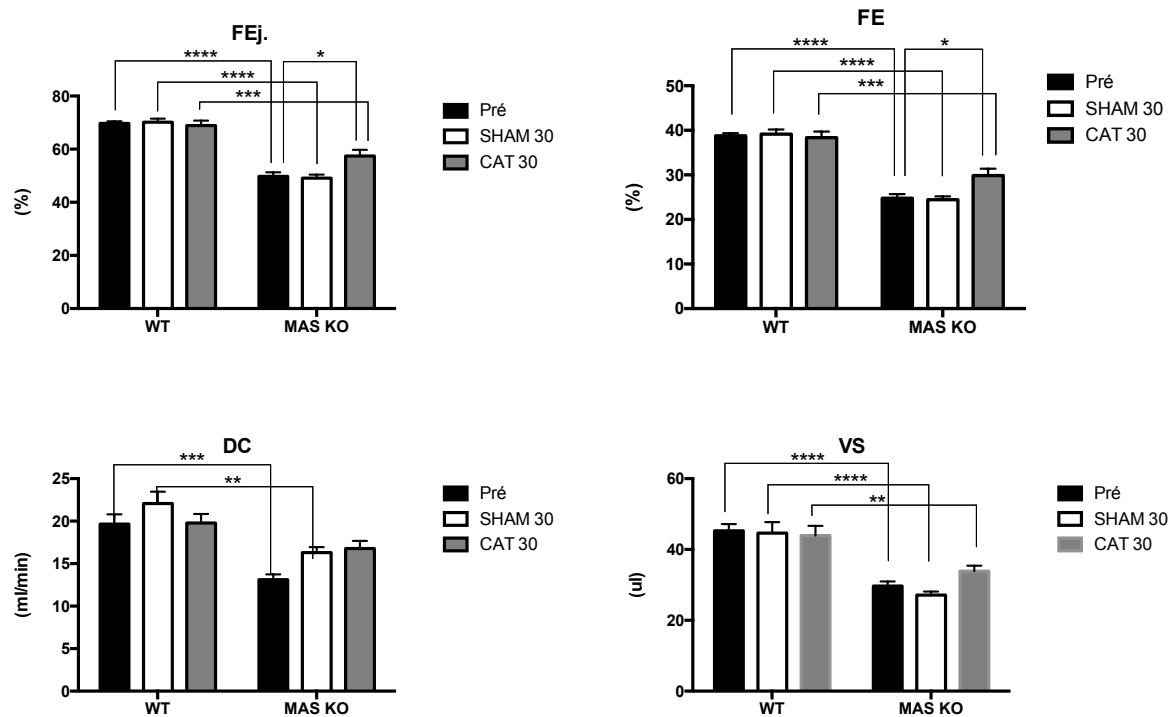


Gráfico 10. Fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC) e volume sistólico (VS) em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , Two Way ANOVA – pós teste de Bonferroni). (WT Pré  $n = 31$ , SHAM  $n = 9$ , CAT  $n = 9$ ; Mas-KO Pré  $n = 32$ , SHAM  $n = 13$ , CAT  $n = 13$ )

O gráfico 11 demonstra essa adaptação, caracterizada pela redução do volume sistólico final e da dimensão sistólica da câmara ventricular esquerda.

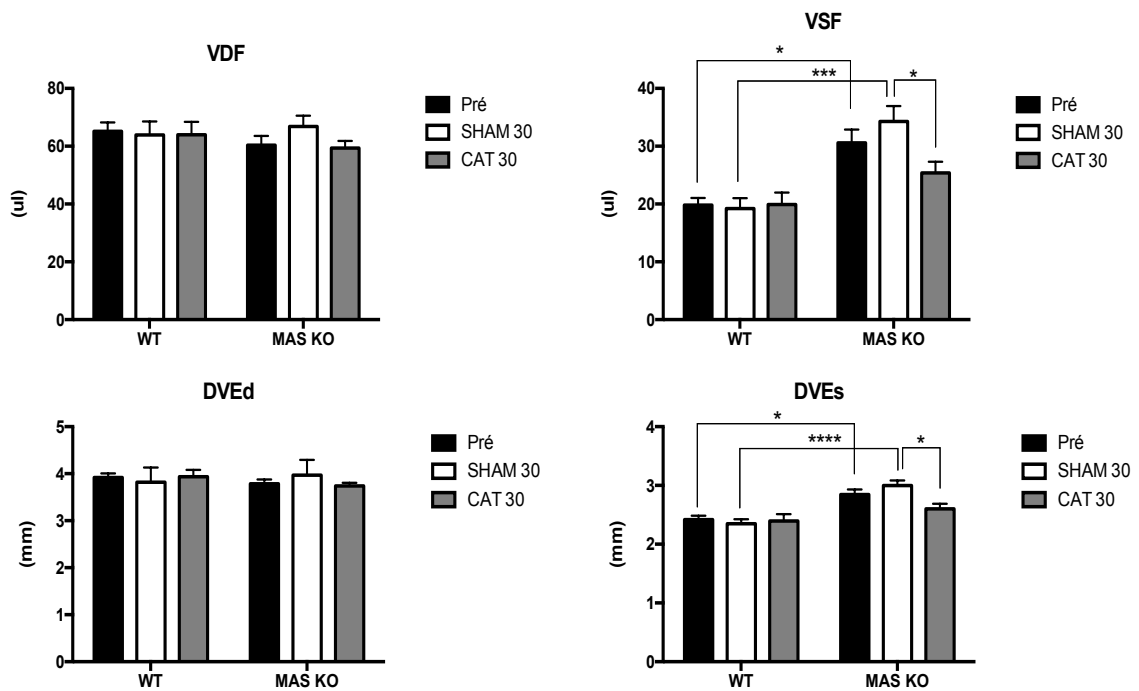


Gráfico 11. Volumes e dimensões sistólicas e diastólicas finais, da câmara ventricular esquerda, em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\*\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , Two Way ANOVA– pós teste de Bonferroni). (WT Pré  $n=31$ , SHAM  $n=9$ , CAT  $n=9$ ; Mas-KO Pré  $n=32$ , SHAM  $n=13$ , CAT  $n=13$ )

O mesmo processo adaptativo pode ser observado pelo aumento do espessamento da parede posterior e do septo interventricular no camundongo Mas-KO (Gráfico 12).

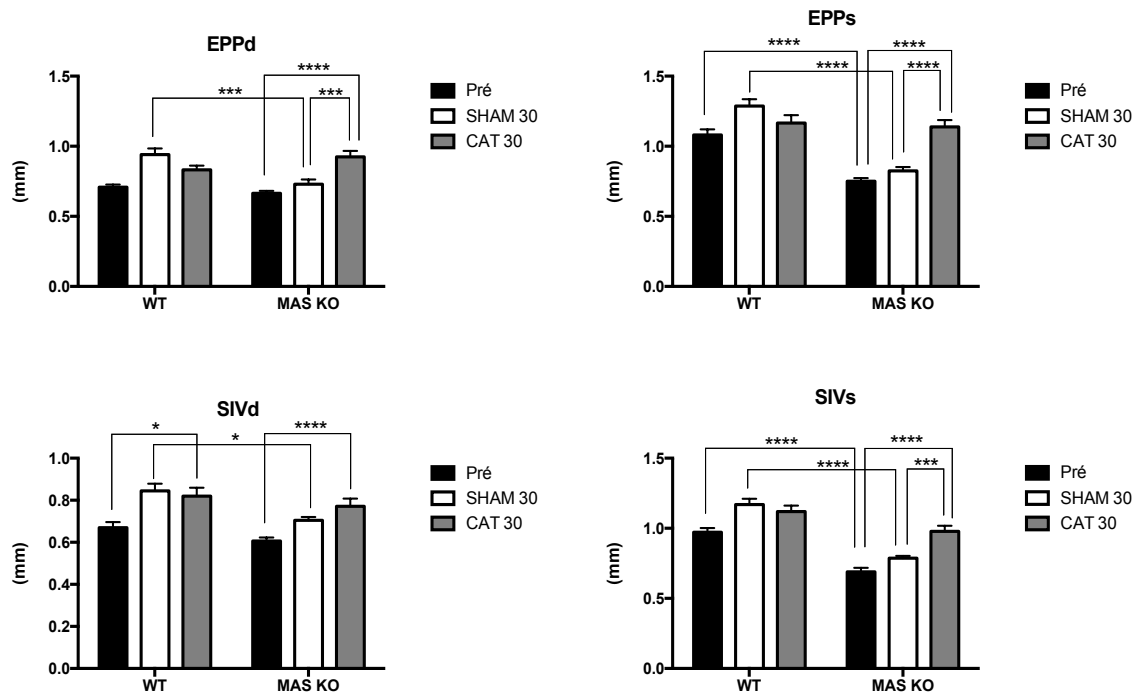


Gráfico 12. Espessura de parede posterior em sístole (EPPs) e diástole (EPPd) e septo interventricular em sístole (SIVs) e diástole (SIVd) em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , Two Way ANOVA– pós teste de Bonferroni) (WT Pré  $n = 31$ , SHAM  $n = 9$ , CAT  $n = 9$ ; Mas-KO Pré  $n = 32$ , SHAM  $n = 13$ , CAT  $n = 13$ ).

Tanto camundongos WT quanto Mas-KO, apresentaram aumento de massa ventricular mensurada pela ecocardiografia, ao fim dos 30 dias do coarctação, como pode ser observado no gráfico 13. No mesmo gráfico é possível observar o aumento significativo do gradiente pressórico no ponto de coarctação na aorta. A FC apresentou aumento no WT SHAM, mas foi acompanhado de aumento do débito cardíaco. No Mas-KO não houve alteração de FC. O aumento da massa demonstra também o processo adaptativo ocorrido pela indução da sobrecarga de pressão. O aumento do gradiente pressórico pode ser considerado como o fator determinante para deflagrar essa adaptação morfofuncional.



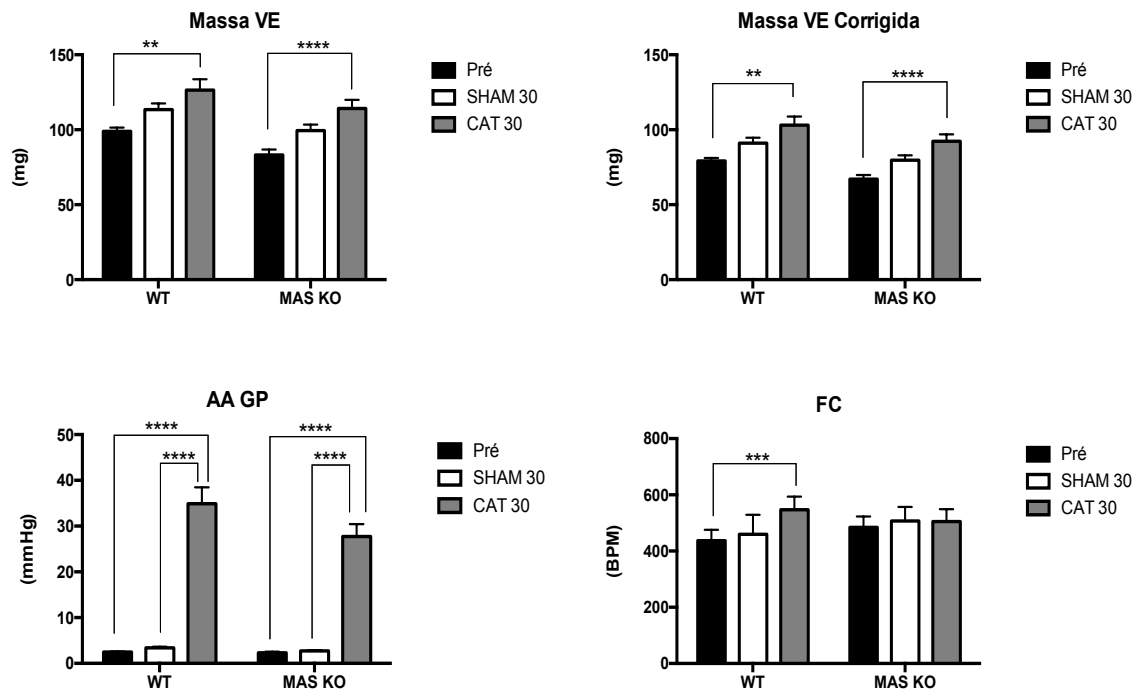


Gráfico 13. Valores de massa ventricular esquerda padrão (Massa VE) e corrigida (Massa VE Corrigida), gradiente pressórico na aorta transversa (AAGP) e frequência cardíaca (FC) de camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ , Two Way ANOVA– pós teste de Bonferroni). (WT Pré  $n=31$ , SHAM  $n=9$ , CAT  $n=9$ ; Mas-KO Pré  $n=32$ , SHAM  $n=13$ , CAT  $n=13$ ).

No gráfico 14 observamos aumento significativo da espessura relativa da parede no MAS-KO.

## ERP - Espessura Relativa da Parede

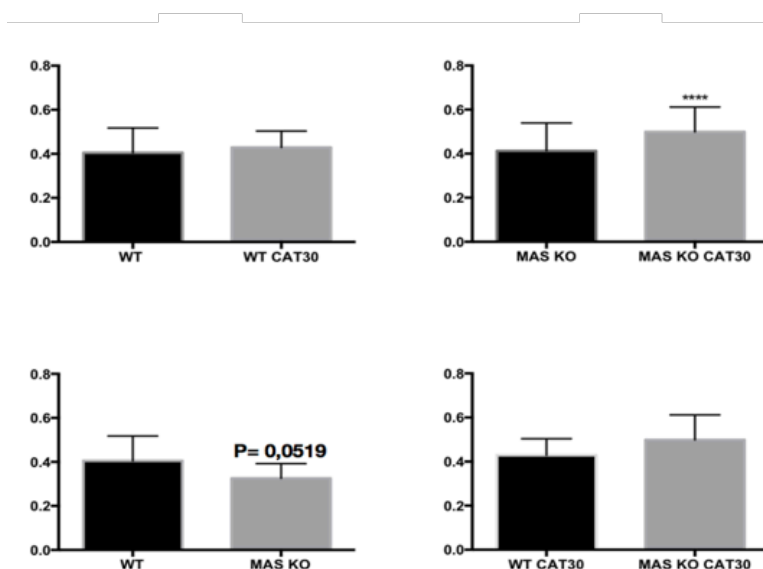


Gráfico 14. Valores de espessura relativa da parede em comparação entre WT e WT CAT 30, Mas-KO e Mas-KO CAT 30, WT e Mas-KO e, WT CAT 30 e Mas-KO CAT 30 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ , teste T não pareado). (WT Pré  $n=31$ , SHAM  $n=9$ , CAT  $n=9$ ; Mas-KO Pré  $n=32$ , SHAM  $n=13$ , CAT  $n=13$ ).

Houve alteração estatisticamente significativa nos tempos de relaxamento isovolumétrico e contração isovolumétrica apenas nos camundongos Mas-KO, sugerindo que houve adaptação da função diastólica à sobrecarga de pressão (Gráfico 15)

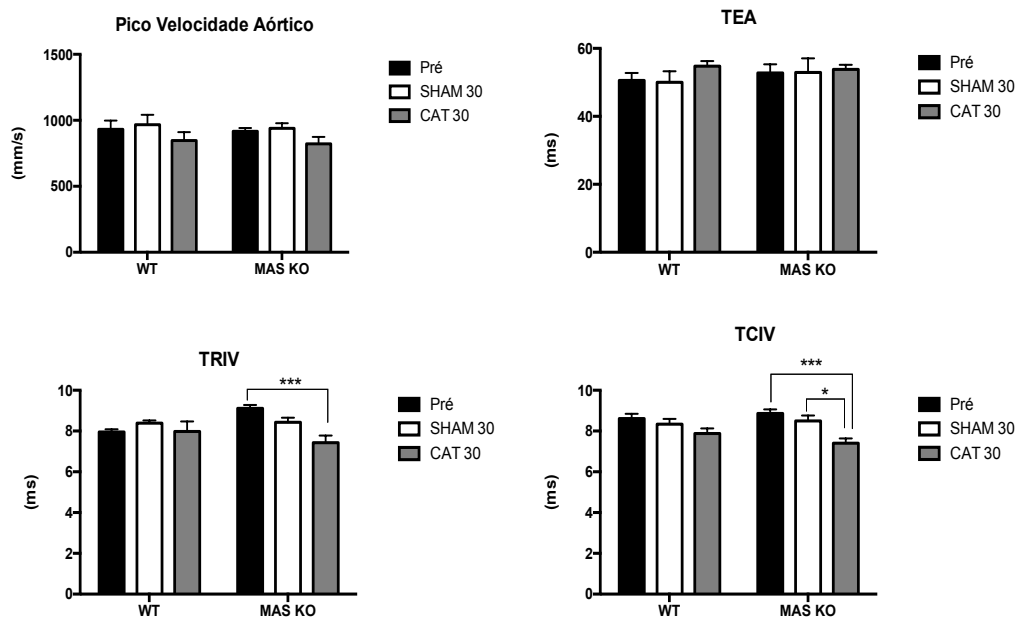


Gráfico 15. Pico de velocidade do fluxo aórtico (valvar), tempo de ejeção (TEA) e tempos de relaxamento (TRIV) e contração isovolumétricos (TCIV) em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ , Two Way ANOVA– pós teste de Bonferroni). (WT Pré  $n=31$ , SHAM  $n=9$ , CAT  $n=9$ ; Mas-KO Pré  $n=32$ , SHAM  $n=13$ , CAT  $n=13$ ).

O aumento da relação E/TRIV também indica alteração da função diastólica, tendo sido estatisticamente significativa somente para os camundongos Mas-KO. O valor de E/TRIV apresentou tendência de aumento nos camundongos WT mas sem relevância estatística. A relação E/A apresentou aumento em seus valores tanto para camundongos WT como Mas-KO, mas não houve significância estatística. Houve melhora do índice de performance do miocárdio nos camundongos Mas-KO, demonstrando mais uma vez o processo de adaptação funcional à sobrecarga de pressão (Gráfico 16).

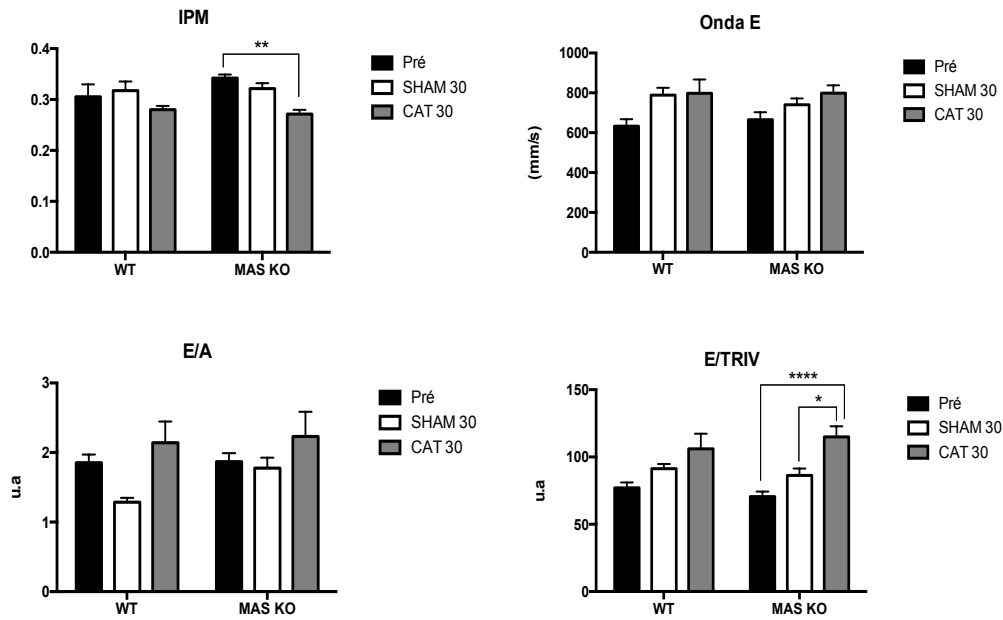


Gráfico 16. Valores de índice de performance do miocárdio (IPM), onda E do influxo mitral, relação E/A e relação E/TRIV em camundongos WT e Mas-KO submetidos a coarctação aórtica (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , Two Way ANOVA– pós teste de Bonferroni). (WT Pré  $n = 31$ , SHAM  $n = 9$ , CAT  $n = 9$ ; Mas-KO Pré  $n = 32$ , SHAM  $n = 13$ , CAT  $n = 13$ ).

A avaliação da relação  $E/E'$  também foi realizada e demonstrou alteração significativa nos camundongos Mas-KO submetidos a CAT, mas não nos camundongos WT (Gráfico 17).

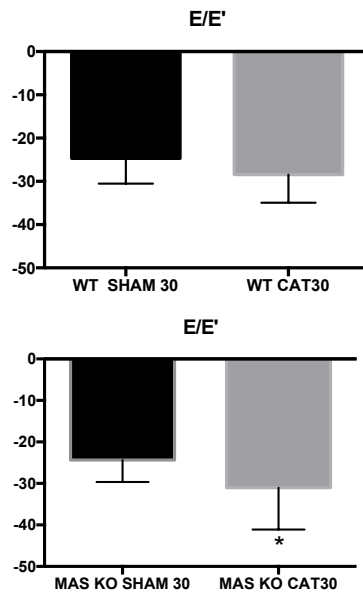


Gráfico 17. Razão E/E' de camundongos WT e Mas-KO aos 30 dias pós CAT (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado). (WT SHAM30  $n=9$  e CAT30  $n=9$ ; Mas-KO SHAM30  $n=13$  e CAT30  $n=13$ )

O índice de massa do ventrículo esquerdo também foi avaliado e apresentou diferença estatística significativa tanto nos animais WT como nos Mas-KO submetidos a CAT (Gráfico 18).

## IMVE - Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo

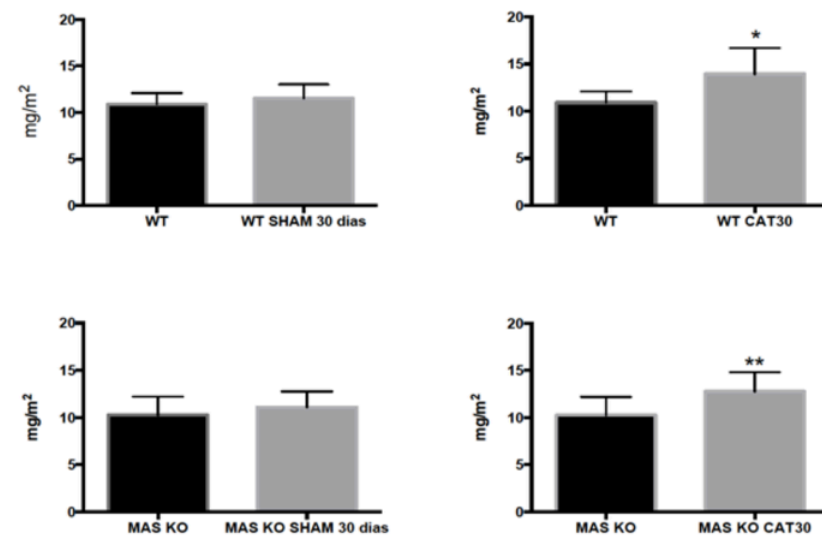


Gráfico 18. Índice de massa do ventrículo esquerdo de camundongos (IMVE) WT e Mas-KO submetidos a CAT (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , teste T não pareado) (WT SHAM30  $n=9$  e CAT30  $n=9$ ; Mas-KO SHAM30  $n=13$  e CAT30  $n=13$ )

A tabela 5 relaciona os valores morfofuncionais entre camundongos WT e Mas-KO, 30 dias após a coarctação da aorta.

Tabela 5. Parâmetros morfofuncionais ecocardiográficos do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca de camundongos FVBN WT e Mas-KO após 30 dias da CAT (Valores média ± erro padrão; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05, teste T não pareado).

	WT CAT 30 (n=9)	Mas-KO CAT 30 (n=13)
FEj. (%)	68,91 ± 5,49	57,42 ± 8,35**
FE (%)	38,34 ± 4,19	29,85 ± 5,53***
DC (ul/min)	19,77 ± 3,23	16,14 ± 3,39*
VS (ul)	43,92 ± 8,27	33,86 ± 5,70**
VDF (ul)	63,97 ± 13,41	59,35 ± 8,89
VSF (ul)	19,92 ± 6,21	25,39 ± 6,93
DVEd (mm)	3,93 ± 0,45	3,74 ± 0,0,24
DVEs (mm)	2,39 ± 0,35	2,60 ± 0,32
EPPd (mm)	0,83 ± 0,09	0,92 ± 0,16
EPPs (mm)	1,17 ± 0,17	1,14 ± 0,18
SIVd (mm)	0,82 ± 0,12	0,77 ± 0,13
SIVs (mm)	1,18 ± 0,13	0,97 ± 0,14
Mass VE (mg)	126,4 ± 21,72	114,2 ± 20,81
Massa VE (Corr.)(mg)	103,3 ± 17,47	92,33 ± 16,80
FC (bpm)	459,4 ± 69,37	497,2 ± 51,00
TE (ms)	54,80 ± 4,37	53,81 ± 4,97
TRIV (ms)	7,98 ± 1,47	7,43 ± 1,26
TCIV (ms)	7,88 ± 0,74	7,40 ± 0,86
Onda E (mm/seg)	798,1 ± 208,1	798,4 ± 142,7
Onda A (mm/seg)	446,6 ± 144,8	431,5 ± 185,2
E/A	2,14 ± 0,91	2,23 ± 1,29
Fluxo Aórtico (mm/seg)	846,3 ± 194,3	821,7 ± 191,4
IPM	0,280 ± 0,023	0,271 ± 0,03
E/TRIV	103,2 ± 30,75	111,1 ± 29,61
ERP	0,43 ± 0,07	0,49 ± 0,11

FEj. Fração de ejeção; FE fração de encurtamento; DC débito cardíaco; VS volume sistólico; VDF volume diastólico final; VSF volume sistólico final; DVEd e DVEs dimensão do ventrículo esquerdo em diástole e sístole; EPPd e EPPs espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole e sístole; SIVd e SIVs espessura do septo interventricular na diástole e na sístole; FC frequência cardíaca; TE tempo de ejeção aórtico; TRIV tempo de relaxamento isovolumétrico; TCIV tempo de contração isovolumétrico; Onda E do influxo mitral; Onda A do influxo mitral; E/A razão onda E/Onda A; IPM índice de performance do miocárdio; E/TRIV relação onda E/tempo de relaxamento isovolumétrico; ERP espessura relativa da parede

## 6.4 Ecocardiografia por Speckle Tracking WT X MAS-KO (Coarctação – 30 dias)

A análise da deformação miocárdica demonstrou poucas diferenças na maioria dos parâmetros calculados entre controle e coarctado, apresentando estabilidade em termos de valores, mas observa-se modificações importantes em relação a assincronia entre segmentos do miocárdio.

Essa análise revelou um padrão diferenciado de modificação funcional frente à CAT para WT e Mas-KO. Como pode ser observado nas figuras 19 e 21, houve alteração estatisticamente significativa no *strain* circunferencial epicárdico global tanto no camundongo WT como no camundongo Mas-KO. Adicionalmente, nos camundongos WT observou-se 30 dias após a coarctação da aorta, modificação também da velocidade e do deslocamento radial epicárdicos, como observado gráfico 20. Estas alterações não foram observadas nos camundongos Mas-KO.

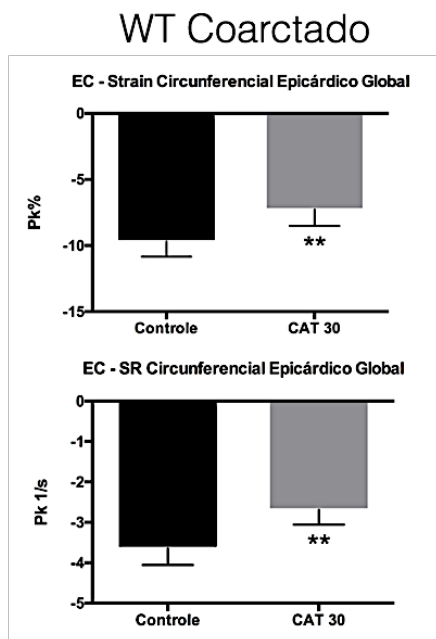


Gráfico 19. *Strain* e *strain rate* circunferencial epicárdicos do eixo curto cardíaco, de camundongos WT submetidos a CAT (\*\*  $p < 0,01$ , teste T não pareado).



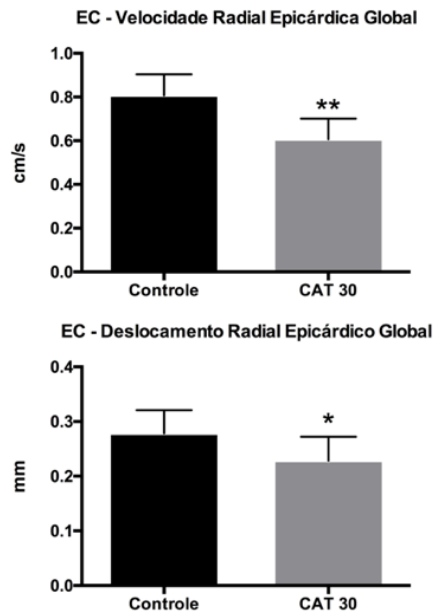


Gráfico 20. Velocidade e deslocamento radial epicárdicos do eixo curto cardíaco, em animais WT após coarctação (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , teste T pareado).

### MAS KO Coarctado

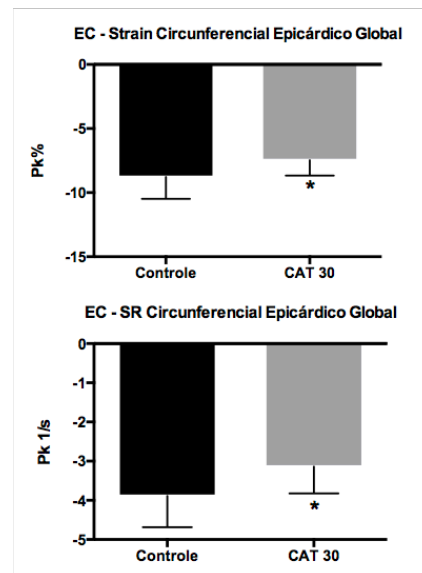


Gráfico 21. *Strain* e *strain rate* circunferenciais epicárdicos do eixo curto cardíaco, de camundongos Mas-KO submetidos a CAT. (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

Uma observação da comparação do comportamento da deformação em relação aos índices de função sistólica, em resposta à coarctação é demonstrada pelo gráfico 22 nos camundongos WT. Observa-se que a modificação do strain circunferencial ocorre de forma independente das variações

dos parâmetros de função sistólica da ecocardiografia convencional, fração de ejeção, fração de encurtamento, débito cardíaco e volume sistólico.

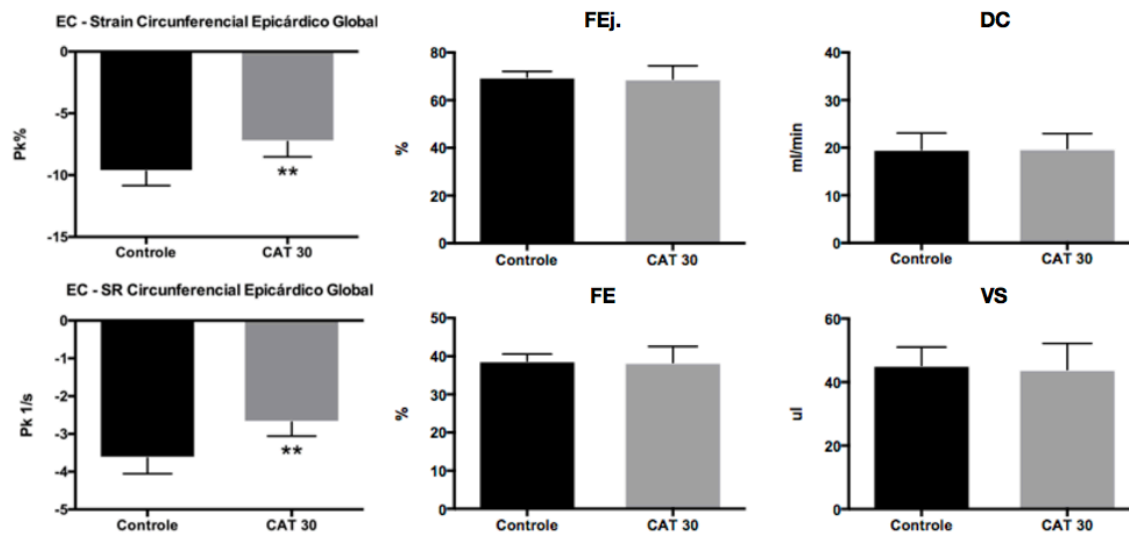


Gráfico 22. *Strain* e *strain rate* circunferencial epicárdicos (EC- eixo curto), fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC) e volume sistólico (VS) de camundongos WT submetidos a CAT. (\*\*  $p < 0,01$ , teste T não pareado)

Ocorrência similar foi observada nos camundongos MAS-KO submetidos a CAT, para débito cardíaco e volume sistólico, mas ocorreu aumento de fração de ejeção e fração de encurtamento, como demonstrado no gráfico 23, embora observe-se redução do *strain* circunferencial.

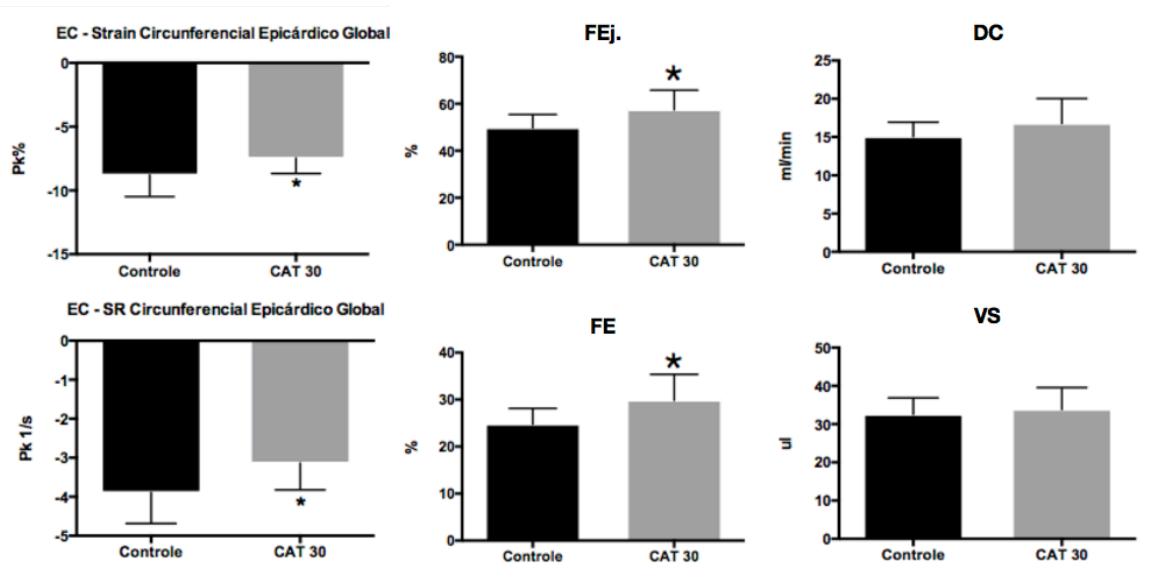


Gráfico 23. *Strain* e *strain rate* circunferencial epicárdicos, (EC- eixo curto), fração de ejeção (FEj.), fração de encurtamento (FE), débito cardíaco (DC) e volume sistólico (VS) de camundongos Mas-KO submetidos a CAT. (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

A tabela 6 mostra os valores médios de strain endocárdico no tempo controle e 30 dias após o procedimento de coarctação para camundongos WT e Mas-KO.

Tabela 6. Valores médios de strain endocárdico longitudinal e circunferencial de animais WT SHAM e coarctado, e Mas-KO SHAM e coarctado aos 30 dias (\*\* p< 0,01; \* p<0,05, teste T não pareado)

Strain Endocárdico		WT X±EPM		Mas-KO X±EPM	
		Controle	CAT (30)	Controle	CAT (30)
<b>Longitudinal</b>	Strain (Pk%)	-17,94 ± 3,13	-19,01 ± 2,48	-18,29 ± 3,96	-18,86 ± 4,12
	Strain Rate (PK1/s)	-7,58 ± 1,33	-7,26 ± 1,11	-7,45 ± 1,33	-7,64 ± 1,90
<b>Long. Radial</b>	Strain (Pk%)	28,70 ± 7,12	28,98 ± 6,17	27,90 ± 6,57	28,82 ± 7,56
	Strain Rate (PK1/s)	7,74 ± 1,19	7,98 ± 0,93	7,53 ± 0,93	7,78 ± 1,18
<b>Circunferencial</b>	Strain (Pk%)	-23,38 ± 3,83	-23,11 ± 3,69	-22,79 ± 3,46	21,98 ± 3,90
	Strain Rate (PK1/s)	-8,23 ± 1,19	-7,38 ± 1,09	-8,06 ± 1,38	-7,59 ± 1,62
<b>Circ. Radial</b>	Strain (Pk%)	<b>24,53 ± 5,29</b>	28,13 ± 8,05	<b>28,53 ± 6,45**</b>	26,25 ± 6,26
	Strain Rate (PK1/s)	<b>6,92 ± 1,23</b>	6,83 ± 1,35	<b>7,91 ± 1,39**</b>	6,69 ± 1,05

A tabela 7 mostra os valores médios de strain epicárdico no tempo controle e 30 dias após o procedimento de coarctação para camundongos WT e Mas-KO.

Tabela 7. Valores médios de strain epicárdico longitudinal e circunferencial de animais WT Controle e coarctado; e Mas-KO Controle e coarctado (30 dias) (\*\* p<0,01; \* p<0,05, teste T não pareado).

Strain Epicárdico		WT		Mas-KO	
		Controle	CAT (30)	Controle	CAT (30)
<b>Longitudinal</b>	Strain (Pk%)	-10,95 ± 2,18	-11,00 ± 3,22	-11,95 ± 2,59	-9,84 ± 1,59
	Strain Rate (PK1/s)	<b>-4,65 ± 1,08</b>	-4,52 ± 1,03	<b>-5,16 ± 1,39*</b>	-4,99 ± 1,13
<b>Circunferencial</b>	Strain (Pk%)	<b>-8,89 ± 1,49</b>	<b>-7,28 ± 1,24 **</b>	<b>-8,84 ± 1,73</b>	<b>-7,47 ± 1,20 *</b>
	Strain Rate (PK1/s)	<b>-3,61 ± 0,55</b>	<b>-2,69 ± 0,37 **</b>	<b>-3,80 ± 0,63</b>	<b>3,14 ± 0,68 *</b>

### 6.4.1 Análise de assincronia

Para a análise de assincronia e função segmentar, o software delimita seis segmentos caracterizados por diferentes cores como mostram as figuras 15 (Eixo longo) e 16 (Eixo curto). Cada cor refere-se a um dos seis segmentos representados nas curvas dos gráficos.

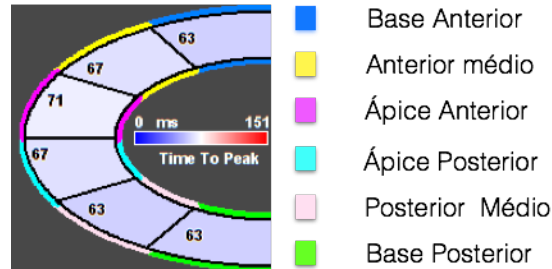


Figura 15. Imagem representando a divisão do eixo longo em seis segmentos com suas respectivas cores e denominações.

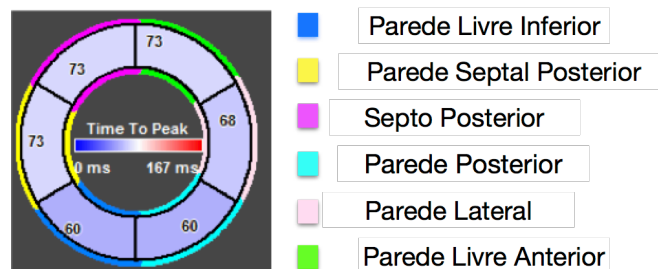


Figura 16. Imagem representando a divisão do eixo curto em seis segmentos com suas respectivas cores e denominações.

A avaliação das curvas geradas na análise de deformação permite a detecção de assincronias e representa também as modificações funcionais sofridas por determinado segmento ao longo de um ciclo cardíaco. As curvas de deslocamento radial endocárdico no eixo longo e epicárdico no eixo curto não demonstram diferença entre os camundongos WT e Mas-KO (Figs 18 e 19) no tempo 0, mas as curvas de deslocamento longitudinal endocárdico (Fig. 20), strain radial e longitudinal endocárdicos (Figs 21 e 22), e strain radial epicárdico (Fig. 23) demonstram que o camundongo Mas-KO apresenta aspecto mais assincrônico entre os segmentos em relação ao WT. Abaixo observa-se curvas de deformação miocárdica em camundongos WT e Mas-KO no tempo 0.

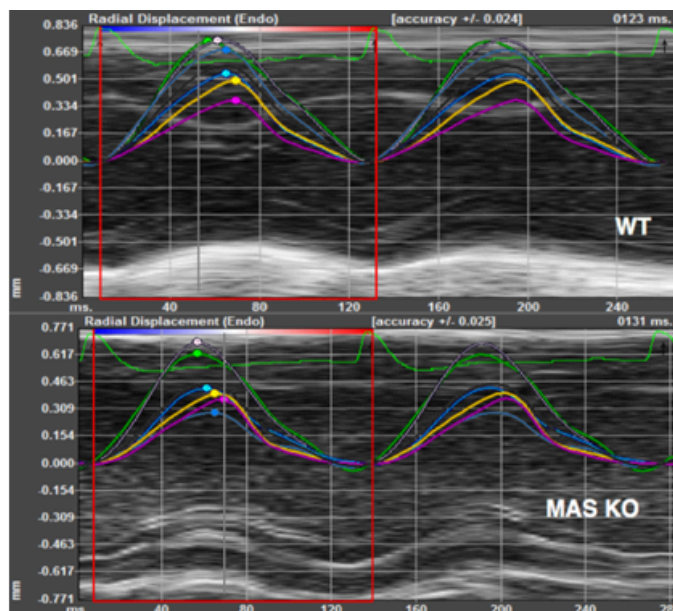
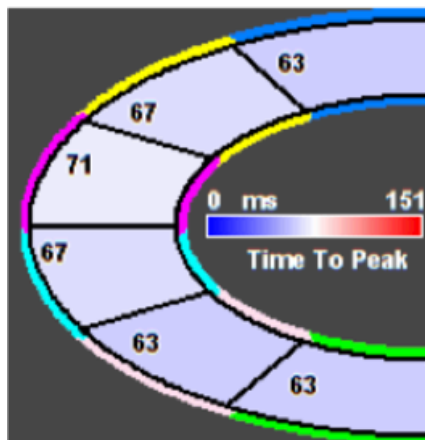


Figura 18. Curvas de deslocamento radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO no tempo 0.

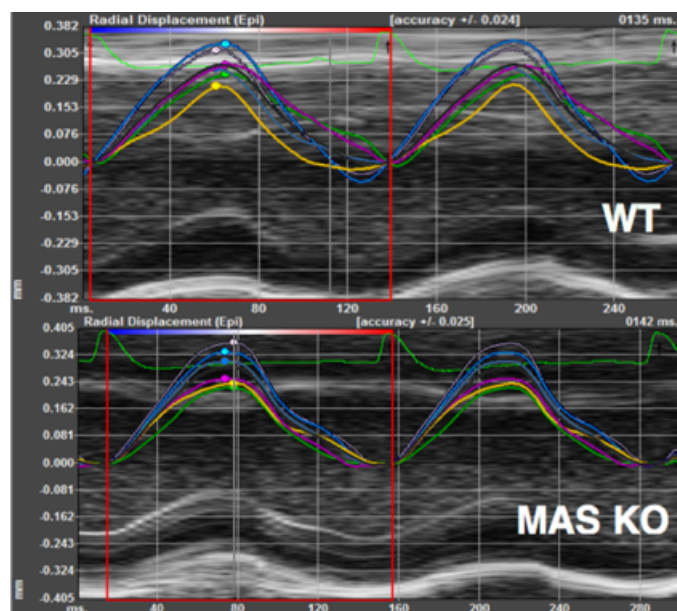
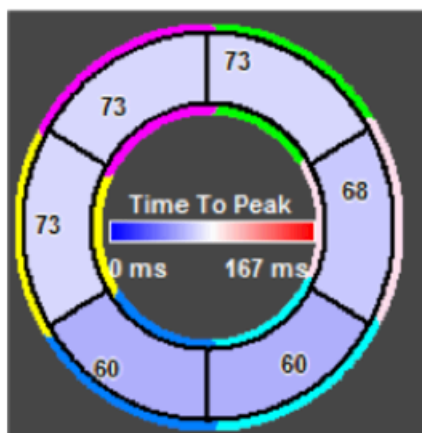


Figura 19. Curvas de deslocamento radial epicárdico no eixo curto em camundongos WT e Mas-KO no tempo 0.

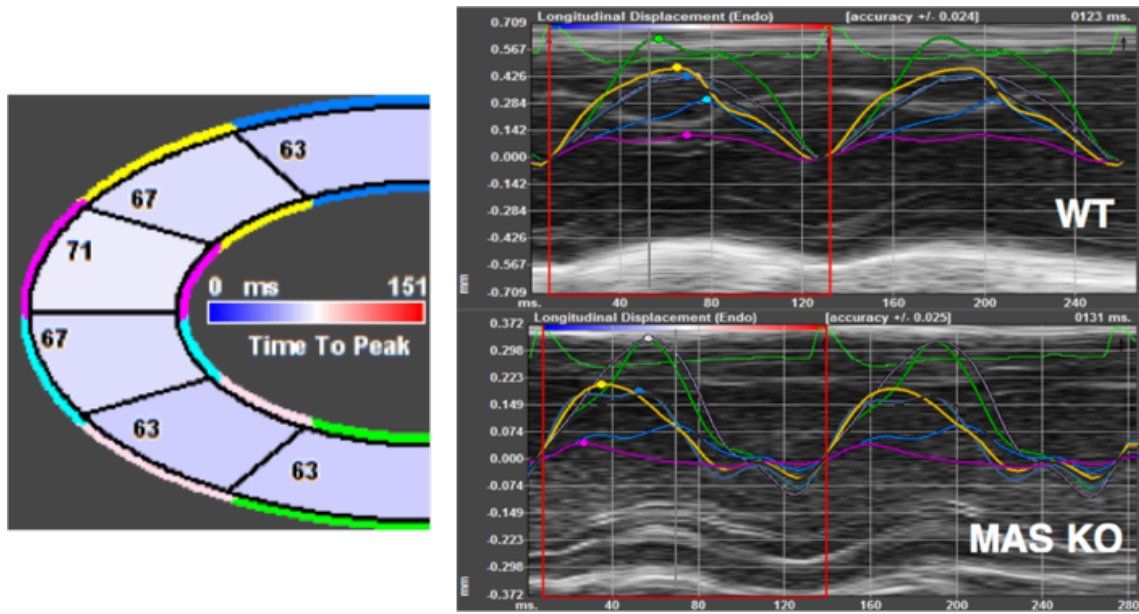


Figura 20. Curvas de assincronia no deslocamento longitudinal endocárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.

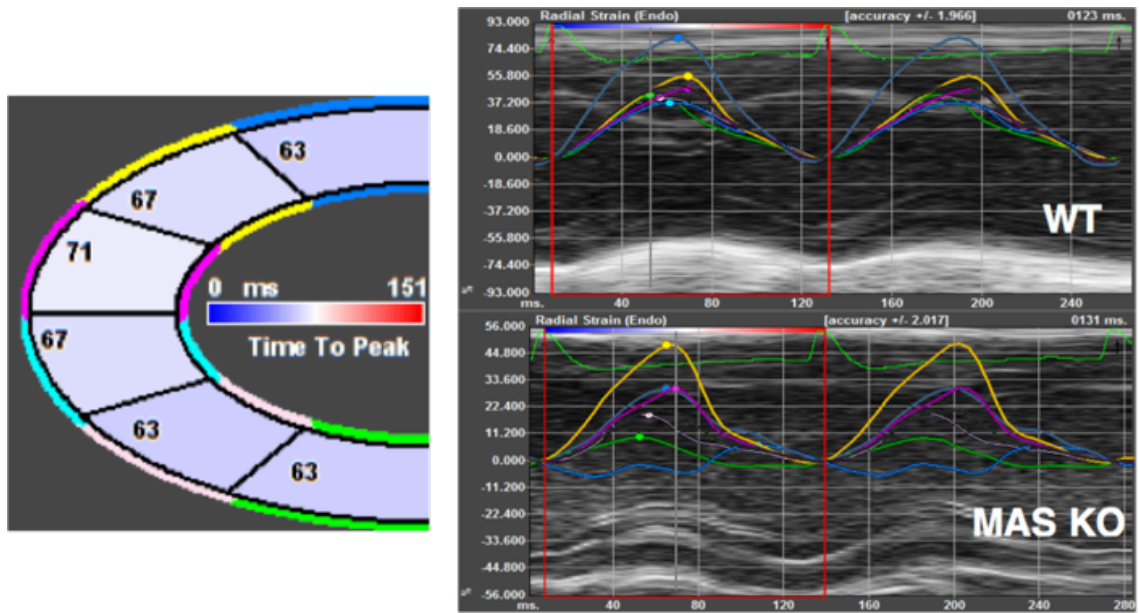


Figura 21. Curvas de assincronia no *strain* radial endocárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.

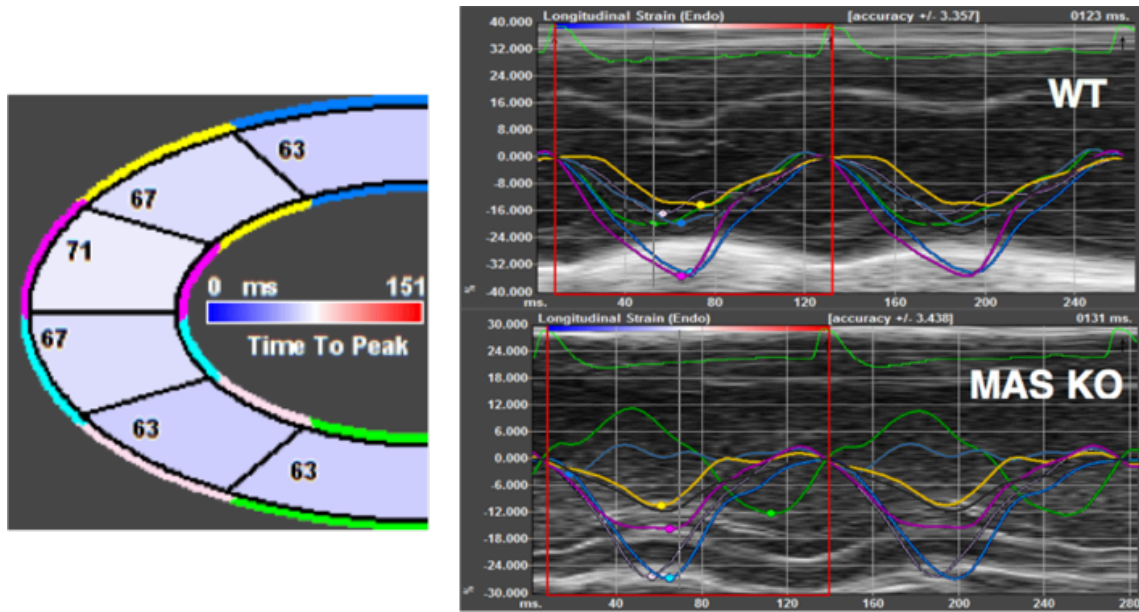


Figura 22. Curvas de assincronia no *strain* longitudinal endocárdico em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.

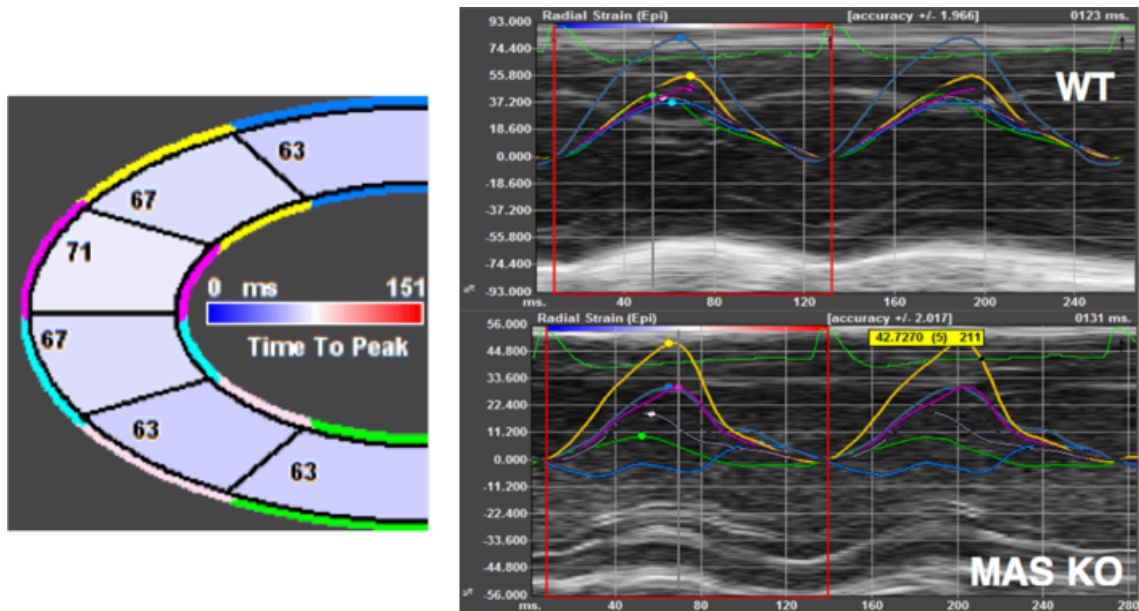


Figura 23. Curvas de assincronia no *strain* radial epicárdico no eixo longo em camundongos Mas-KO comparados com WT no tempo 0.

Os gráficos abaixo mostram comparação de animais WT SHAM e Mas-KO SHAM (30 dias). Importante observar que não houve alteração significativa nas curvas de deslocamento radial endocárdico do eixo curto (Fig. 24). No eixo longo é possível observar assincronia entre os



segmentos no strain radial endocárdico mais perceptível nos camundongos Mas-KO como verificado também no tempo 0 (Fig. 25).

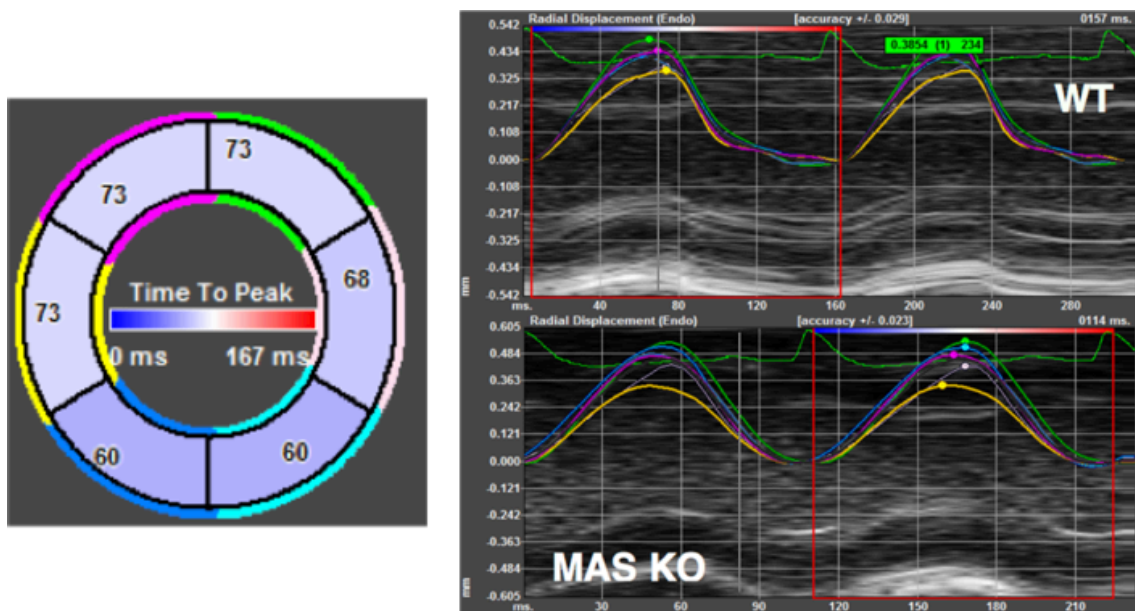


Figura 24. Curvas de deslocamento radial endocárdico no eixo curto em camundongos WT SHAM e Mas-KO SHAM (30 dias)

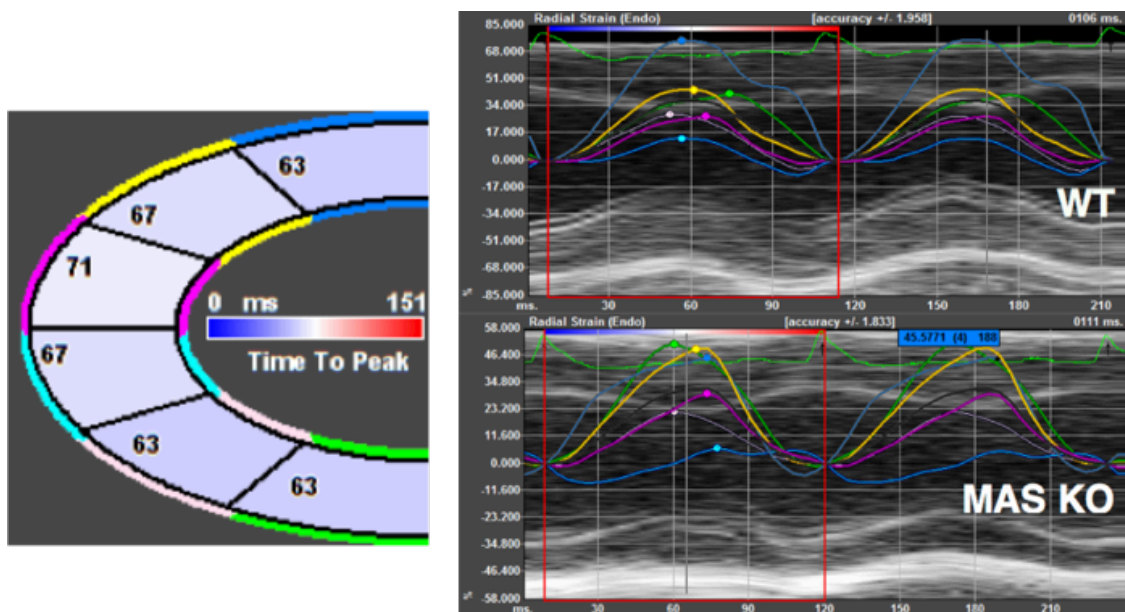


Figura 25. Curvas de assincronia no *strain* radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT SHAM e Mas-KO SHAM (30 dias).

As curvas dos gráficos abaixo demonstram características de assincronia e/ou modificações na intensidade da flutuação das curvas nos camundongos Mas-KO e WT após a indução da sobrecarga de pressão de baixa intensidade com a CAT. Alterações podem ser observados nas curvas de deslocamento endocárdico e epicárdico (Figs 26, 27, 28 e 29), *strain* longitudinal epicárdico (Fig 30) e *strain rate* radial epicárdico no eixo longo (Fig 31). Há também assincronia nas curvas de deslocamento radial epicárdico no eixo curto em animais Mas-KO (Fig 32)

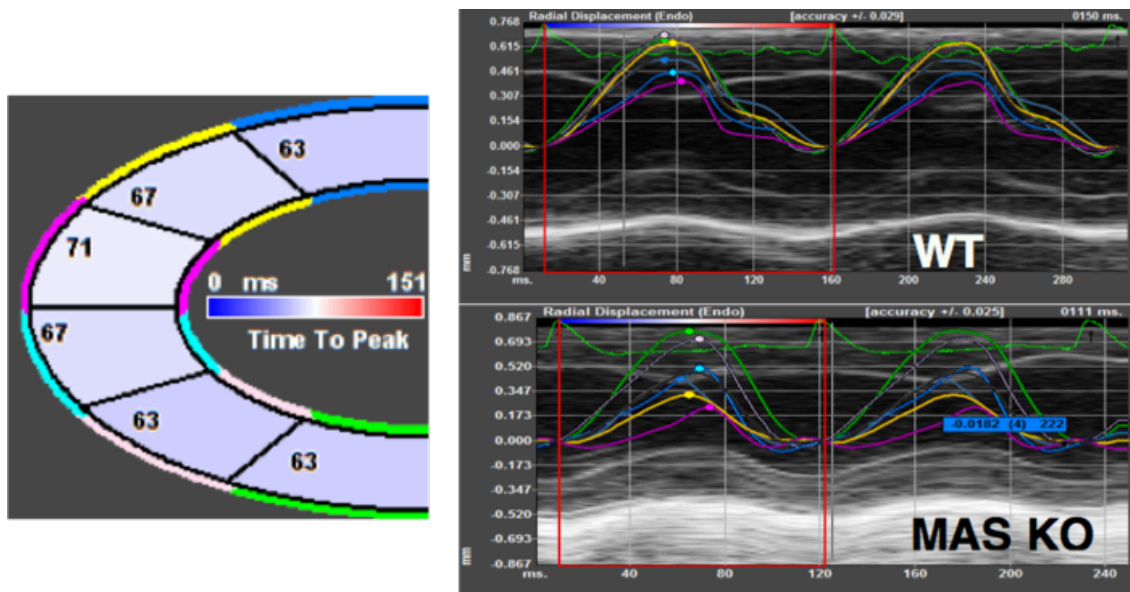


Figura 26. Curvas de alteração da intensidade do deslocamento radial endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

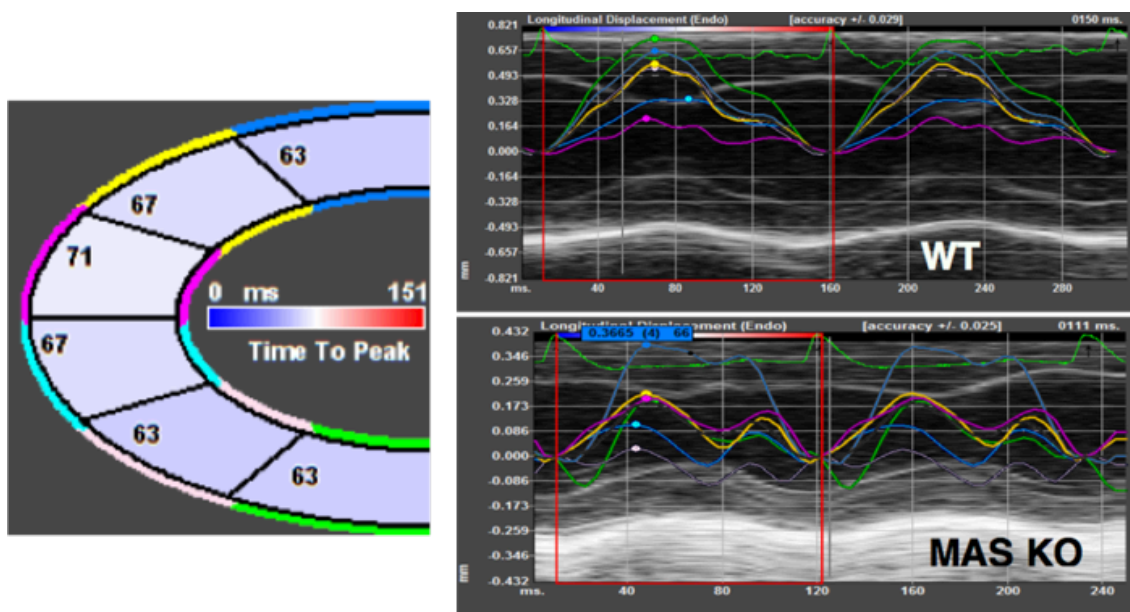


Figura 27. Curvas de alteração da intensidade e assincronia do deslocamento longitudinal endocárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

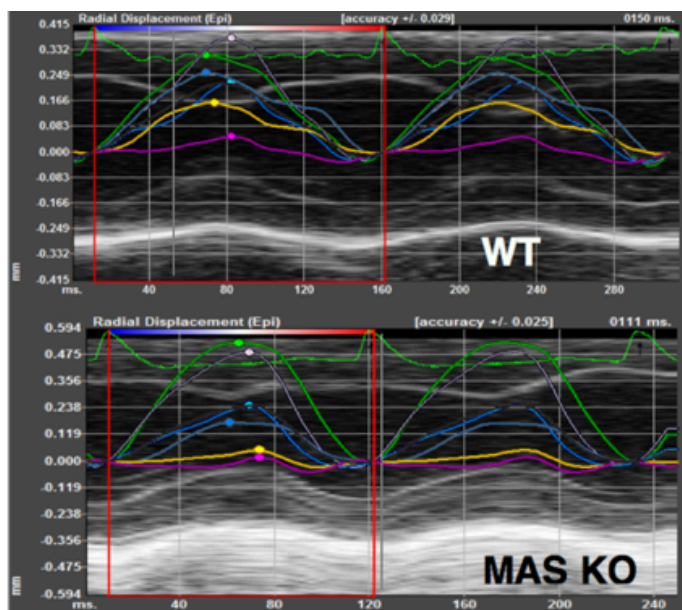
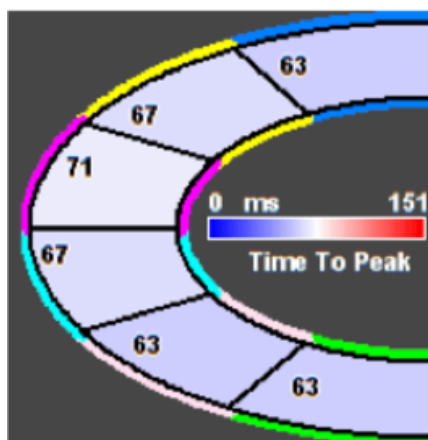


Figura 28. Curvas de alteração da intensidade do deslocamento radial epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

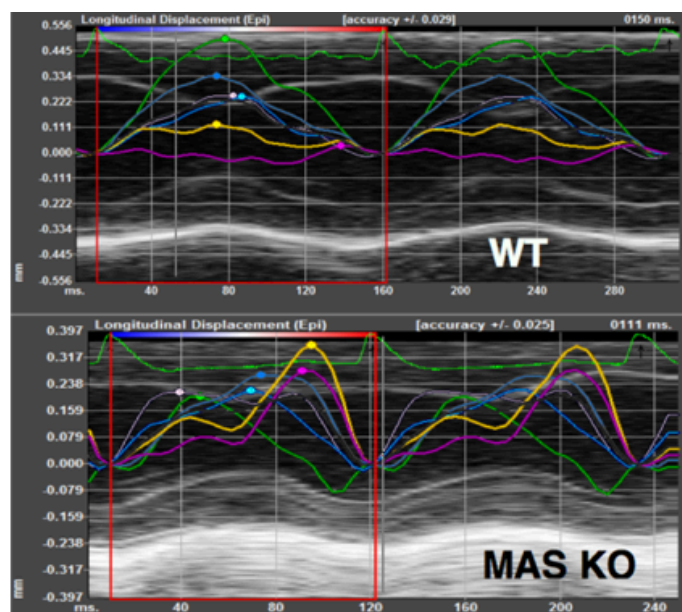
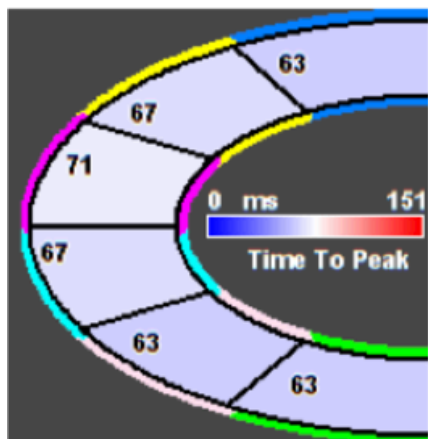


Figura 29. Curvas de alteração da intensidade e assincronia do deslocamento longitudinal epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

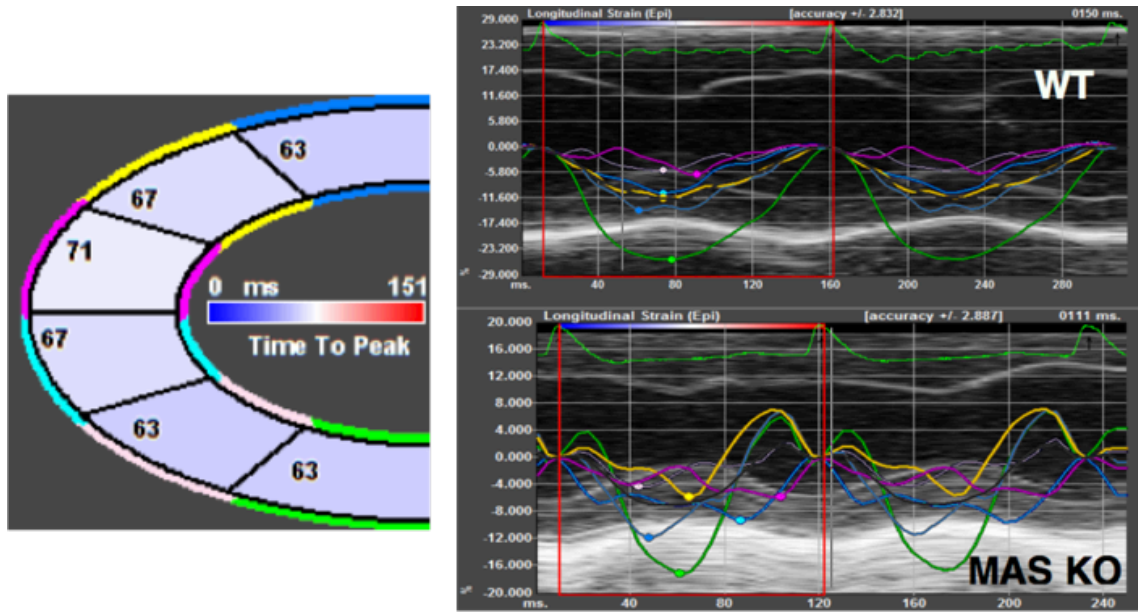


Figura 30. Curvas de assincronia significativa no *strain* longitudinal epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

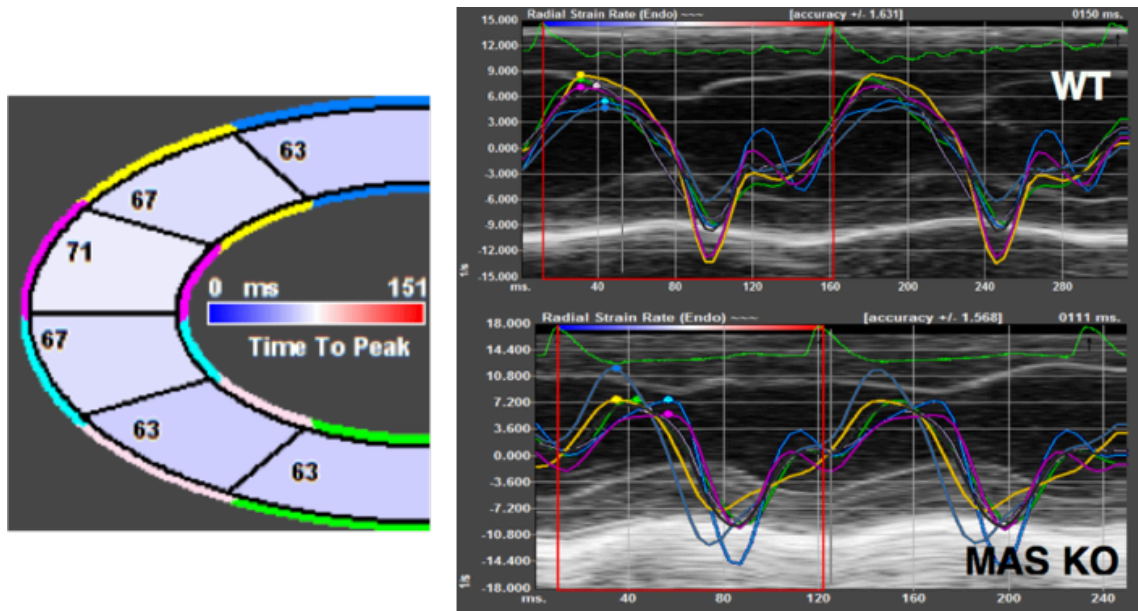


Figura 31. Curvas de assincronia significativa no *strain rate* radial epicárdico no eixo longo em camundongos WT e Mas-KO submetidos a CAT (30 dias)

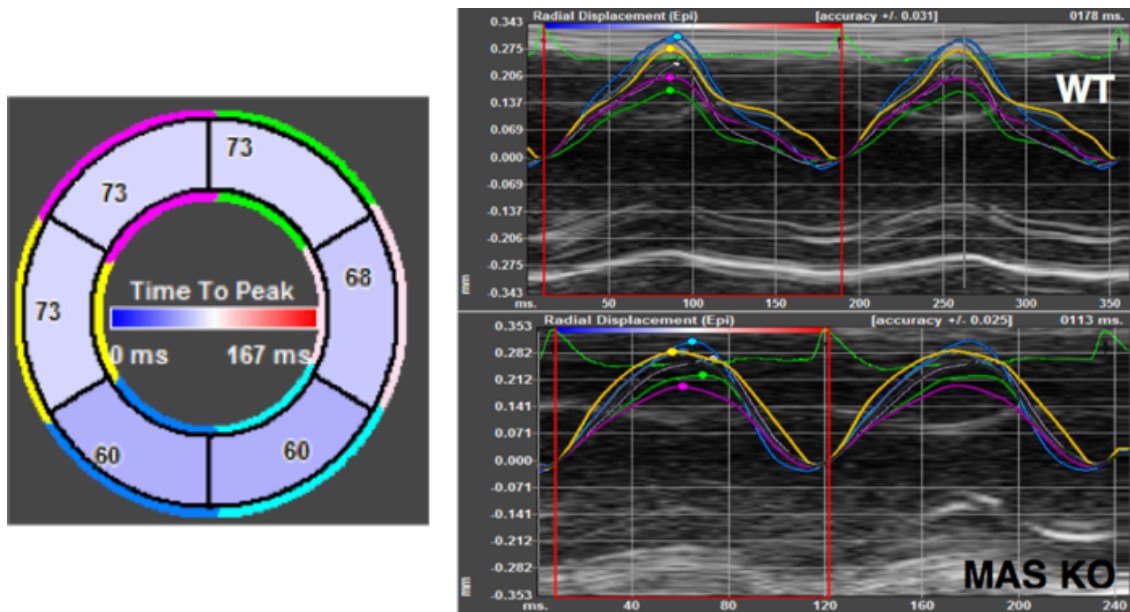


Figura 32. Curvas de assincronia significativa no deslocamento radial epicárdico no eixo curto em camundongos Mas-KO submetidos a CAT, quando comparados aos WT (30 dias)

## 6.5 Análise da expressão gênica

Por tratar-se de modelo que envolve sobrecarga de pressão, foram realizadas quantificações de mRNA para as seguintes substâncias potencialmente relacionadas a disfunção e remodelamento cardíaco: peptídeo natriurético atrial (ANP); peptídeo natriurético cerebral (BNP); cadeia pesada de miosina tipo  $\beta$  (MHC $\beta$ ), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e colágeno III.

Os camundongos Mas-KO SHAM apresentaram BNP significativamente aumentado em relação aos animais WT SHAM aos 30 dias. De forma interessante, o ANP, BNP e MHC $\beta$  apresentaram aumento no camundongo WT após a CAT, avaliados pelo teste de T não pareado, o que não ocorreu para os camundongos Mas-KO (Gráficos 24, 25 e 26).

Colágeno 3 e TGF $\beta$  apresentaram aumento em ambos os camundongos após a CAT, pela avaliação do teste de T (Gráfico 27). Os valores de TGF $\beta$  nos animais Mas-KO SHAM estão significativamente reduzidos em relação ao WT SHAM.

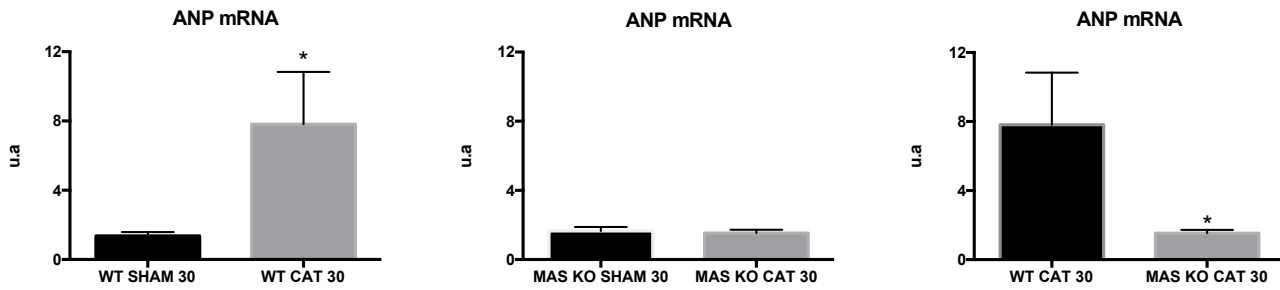


Gráfico 24. mRNA para ANP em camundongos WT SHAM (n=9) e coarctado (n=8) e Mas-KO SHAM (n=13) e coarctado (n=11) (30 dias) (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

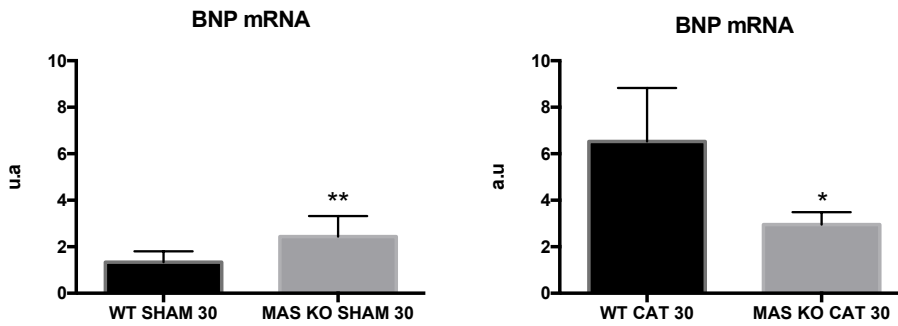


Gráfico 25. mRNA para BNP em camundongos WT SHAM (n=9) e coarctado (n=8) e Mas-KO SHAM (n=13) e coarctado (n=11) (30 dias) (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

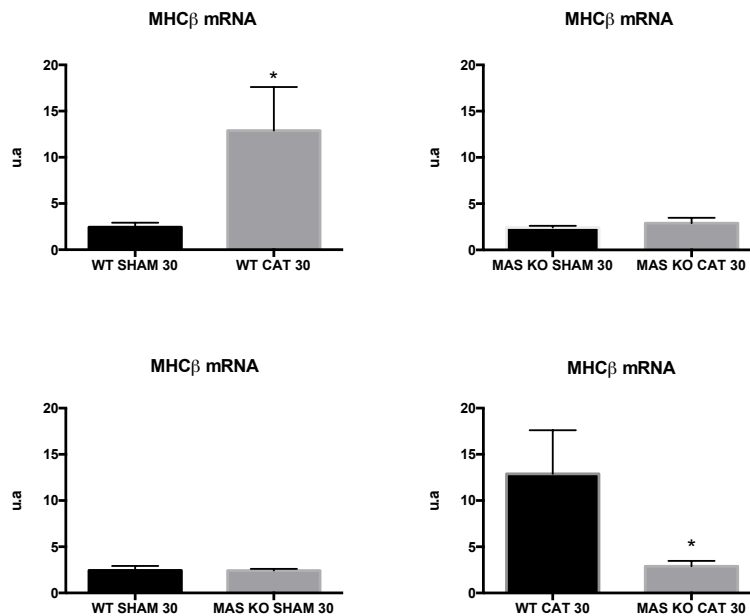


Gráfico 26. mRNA para MHCβ em camundongos WT SHAM (n=9) e coarctado (n=8) e Mas-KO SHAM (n=13) e coarctado (n=11) (30 dias) (\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado)

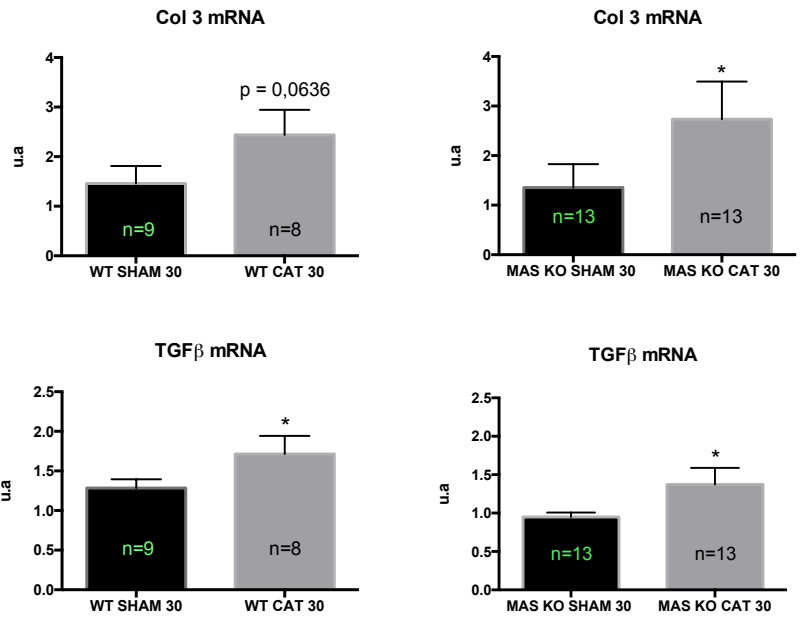


Gráfico 27. mRNA para Col 3 e TGFβ em camundongos WT SHAM e coarctado e Mas-KO SHAM e coarctado (30 dias) (\* p<0,05, teste T não pareado)

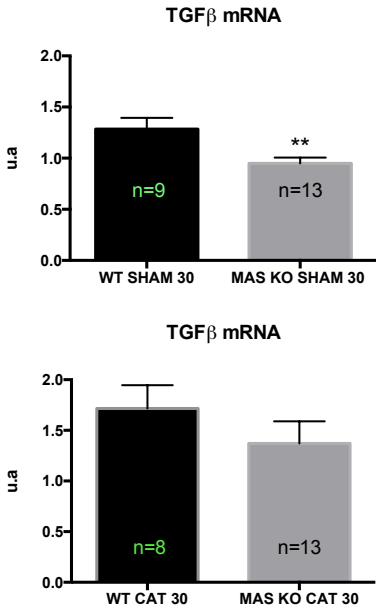


Gráfico 28. mRNA para TGFβ em camundongos WT SHAM e coarctado e Mas-KO SHAM e coarctado (30 dias) (\*\* p<0,01, teste T não pareado)

## 7. Discussão

O propósito deste estudo foi avaliar as alterações ecodopplercardiográficas e bioquímicas em camundongos FVBN Mas-KO submetidos a coarctação da aorta torácica. Para esse fim foram utilizadas técnicas convencionais de ecocardiografia, aliadas a avaliação por *Speckle Tracking*, para realização de análise da deformação do miocárdio, buscando verificar também a sensibilidade da técnica na detecção precoce de disfunção miocárdica. A avaliação bioquímica consistiu de análise da expressão de genes relacionados ao remodelamento cardíaco. Não existem estudos na literatura, baseados em ecocardiografia, comparando camundongos Mas-KO com seus controles em condições normais e submetidos a modelos de disfunção cardíaca, envolvendo a técnica de ST.

Doppler tecidual e *Speckle Tracking* têm revelado padrões de disfunção segmentar sistólica em condições de doença cardiovascular subclínica. Cada etiologia que dispara o processo de remodelamento, levando a hipertrofia regional, apresenta uma assinatura específica de modificação da deformação miocárdica (Cikes et al., 2010). Este trabalho buscou, além de caracterizar a função cardíaca de camundongos Mas-KO, demonstrar a sensibilidade de detecção de disfunção miocárdica pelo ST em modelo de sobrecarga de pressão de baixa intensidade.

Neste experimento verificamos que os animais Mas-KO apresentam importante disfunção sistólica no tempo 0, observados como aumento do VSF, redução de FE, FEj, DC e VS. Notamos também que o espessamento parietal é deficiente nesses animais em relação aos seus controles. A técnica do ST revelou poucas diferenças entre os animais Mas-KO e WT no tempo 0. Os camundongos Mas-KO apresentaram aumento significativo de strain e strain rate circunferencial radial epicárdicos, e considera-se que seja provavelmente relacionado a processo inicial de compensação mecânica em resposta a disfunção causada pela deleção do receptor Mas.

Após a indução da CAT de grau leve, houve incremento compensatório da função sistólica nos animais Knockout para o receptor Mas, mas com características de desenvolvimento de disfunção diastólica detectada pelo ecocardiograma convencional. Os animais WT embora tenham apresentado aumento de massa, avaliado pelo ecocardiograma convencional, não apresentaram aspecto de compensação funcional como os animais WT. Interessantemente o ST revelou disfunção de strain e strain rate circunferencial epicárdicos para as duas linhagens de animais. Apesar de não ter havido maiores alterações em outros segmentos do ST, observa-se desenvolvimento significativo



de assincronia entre paredes após a CAT tanto em WT como Mas-KO, mas nestes últimos a intensidade da assincronia entre as paredes é mais intensa.

Observou-se que em relação aos parâmetros moleculares, camundongos Mas-KO SHAM apresentaram valores de BNP aumentados em relação aos WT SHAM. Essa análise revelou também aumento de ANP, BNP e MHC $\beta$  apenas nos animais WT e não nos animais Mas-KO após a CAT. Colágeno III e TGF $\beta$  apresentaram aumento significativo em ambas as linhagens após a indução da CAT.

### **7.1 Função cardíaca de camundongos FVBN WT e FVBN Mas-KO avaliada pela ecocardiografia convencional**

Os modelos de disfunção miocárdica em camundongos são essenciais no progresso das pesquisas para elucidação do mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de cardiopatias. O comportamento desses processos em animais de linhagens diferentes, entretanto, apresenta variações importantes (Barrick et al., 2007).

O modelo de deleção genética do receptor Mas da Ang-(1-7) produzido no camundongo C57Bl6 tem descrição realizada por Santos e colaboradores (2006), mostrando redução estatisticamente significativa de fração de encurtamento (FE), embora os valores encontrados para WT e Mas-KO tenham ficado mais reduzidos e próximos ( $22,9 \pm 0,25$  e  $19,01 \pm 0,71$  respectivamente). No presente trabalho, realizado com a linhagem FVBN foi observada diferença significativamente maior na fração de encurtamento entre WT e Mas-KO ( $39,44 \pm 3,26$  e  $24,36 \pm 3,53$  respectivamente) como pode ser observada na tabela 2.

Espessura da parede posterior apresentou característica similar nos dois trabalhos, entretanto, observa-se que tanto em diástole como em sístole os valores apresentados neste trabalho foram superiores para WT e Mas-KO. O mesmo ocorreu para a dimensão sistólica do ventrículo esquerdo, com a diferença de que neste estudo os valores foram menores. Uma possível explicação para essas discrepâncias reside nos efeitos cardiovasculares produzidos por halotano e isoflurano que apresentam padrões diferenciados como descrito por Palmisano e colaboradores (Palmisano et al., 1994). De acordo com esses autores o halotano provoca efeito depressor do miocárdio mais intenso que o isoflurano em concentrações semelhantes em coelhos. É possível sugerir que os efeitos do halotano podem ter causado a elevação dos valores de índice de performance do miocárdio (IPM), tanto para os animais WT como para os animais Mas-KO no estudo de Santos e colaboradores (2006), fato que não ocorreu neste estudo.

O valor de IPM permaneceu normal em ambos os grupos. Também são bem reconhecidos os efeitos do halotano na sensibilização do miocárdio às catecolaminas circulantes, podendo levar a redução da capacidade contrátil e gerar arritmias de importância clínica (Price and Ohnishi, 1980). Pode-se considerar outros fatores determinantes dessas diferenças entre os trabalhos, além do tipo de anestésico utilizado, como por exemplo a linhagem de camundongos, equipamento empregado e técnica aplicada pelo operador. O presente trabalho acrescenta à descrição de disfunção sistólica demonstrada pelos camundongos submetidos a deleção genética do receptor Mas, pela demonstração de alteração em outros parâmetros funcionais ecocardiográficos, como observado na tabela 2.

O estudo de Bauer e colaboradores (Bauer et al., 2011) realizou avaliação ecocardiográfica de camundongos C57BL/6J e interessantemente, embora alguns parâmetros tenham apresentado similaridade com este estudo, como por exemplo fração de encurtamento e espessura da parede posterior em diástole, outros parâmetros demonstraram diferenças importantes. A frequência cardíaca neste estudo apresentou valores menores que o estudo citado, entretanto, a fração de ejeção dos camundongos utilizados neste trabalho apresentou valores maiores. Há diferença observável no tamanho da câmara ventricular esquerda entre as linhagens, com o FVBN apresentando uma câmara ventricular maior, o que pode explicar, pelo menos parcialmente a diferença. Considerando que os protocolos anestésicos utilizados foram similares, podemos sugerir que a diferença nas linhagens apresenta fator importante nos diferentes achados em estudos diversos utilizando modelos de disfunção miocárdica. Outro fator que corrobora as diferenças entre os estudos é a utilização no estudo citado, das medidas de fração de ejeção, realizadas no modo bidimensional 2D, pelas mensurações no eixo longo paraesternal esquerdo. No presente estudo, foi utilizada a metodologia no Modo M proposta pela ASE (*American Society of Echocardiography*).

Um parâmetro que demonstra de forma importante a limitação funcional cardíaca do camundongo Mas-KO é o espessamento sistólico reduzido tanto da parede posterior como do septo interventricular. A descrição da importância do espessamento sistólico refere-se à interação de lâminas de fibras musculares nas três orientações já descritas, longitudinais, oblíquas e circulares. O espessamento das paredes é decorrente de um efeito somado dos 3 movimentos das fibras, em orientações distintas: extensão, espessamento e deslizamento dos feixes musculares (Coppola and Omens, 2008). Embora não possamos afirmar quais os tipos de deficiências ou modificações estruturais que o coração dos camundongos Mas-KO apresenta do ponto de vista ultraestrutural, é possível sugerir que a relação anatômica das diferentes angulações das fibras miocárdicas esteja provavelmente alterada nos animais, culminando potencialmente para um espessamento deficiente.

Outro fator diretamente relacionado à angulação, que pode também causar interferência direta na capacidade de reduzir espessamento parietal, é o estado metabólico dos miócitos cardíacos do Mas-KO, que poderia estar também, pelo menos em parte, comprometido.

Os cálculos de massa do VE realizados com a ecocardiografia baseiam-se na diferença entre o volume epicárdico delimitado e o volume interno da câmara ventricular esquerda, multiplicada por estimativa de densidade do miocárdio (1,05) (Foppa et al., 2005). De acordo com Foppa e colaboradores, a fórmula atualmente mais aceita é a proposta pela ASE (*American Society of Echocardiography*):

$$LV_{mass} = 0,8(1,04([DVEd + EPPd + SIVd]^3 - [DVEd]^3) + 0,6 \text{ gramas}$$

A proposta inclui na realização da imagem a partir do Modo M, as bordas externas e internas das paredes, metodologia que foi aplicada na realização deste estudo.

Foi avaliada a espessura relativa da parede, que no caso do estudo não demonstrou diferença estatística entre os dois grupos no tempo 0, embora observe-se tendência do camundongo Mas-KO de apresentar valores abaixo daqueles demonstrados para os camundongos WT. Entretanto, a quantificação ecocardiográfica da massa ventricular esquerda mostrou que o camundongo Mas-KO possui massa reduzida em relação ao WT, o que é corroborado pelos valores mais baixos da ERP. A redução de massa miocárdica do VE não implica necessariamente em disfunção miocárdica a partir do momento em que a redução seja acompanhada de normalização do estresse parietal e, durante o processo, a proporcionalidade anatômica permaneça normal (St John Sutton et al., 1985). Partindo deste pressuposto pode-se inferir que no caso de adaptação morfológica diversa, a redução da massa pode estar relacionada a redução da performance ventricular esquerda no Mas-KO, já que observa-se modificação das características morfofisiológicas das paredes posterior e septal neste trabalho tanto durante a diástole como na sístole na avaliação do tempo 0.

Observa-se importantes diferenças entre os valores de massa miocárdica verificados nesse trabalho e no estudo de Bauer e colaboradores (2011). Os valores de massa observados no estudo de Bauer e colaboradores foram significativamente maiores que os observados no presente estudo. A discrepância pode ser explicada em parte devido às diferentes linhagens de camundongos utilizada, e pela fórmula de cálculo de massa ventricular empregada, que foi diferente.

## **7.2 Função cardíaca FVBN WT X FVBN Mas-KO avaliada pelo Speckle Tracking**

Como observado nos valores das tabelas 3 (Strain endocárdico) e 4 (Strain epicárdico), a maioria dos parâmetros da avaliação por ST entre WT e Mas-KO no tempo 0 não apresentou

diferença. Interessantemente, strain e strain rate radial circunferenciais endocárdicos, e strain rate longitudinal epicárdico apresentaram diferenças entre os camundongos estando aumentados no Mas-KO. Supõe-se que a disfunção sistólica causada pela deleção do receptor Mas leve a processo compensatório de movimentação mecânica das bandas miocárdicas responsáveis pelo encurtamento radial no eixo curto endocárdico e longitudinal no eixo longo epicárdico na tentativa de gerar uma compensação funcional. Soma-se a essa hipótese uma possível compensação pelo sistema renina-angiotensina aldosterona, induzindo adaptações de volume circulante e aumento de resistência periférica. E, apesar dessa característica compensatória, o espessamento parietal permanece deficiente, culminando com valor de função sistólica abaixo do encontrado para animais WT. Os valores globais basais apresentados para o ST endocárdico neste experimento foram similares aos encontrados por Bauer e colaboradores (2011), embora algumas variações sejam notórias. Os autores citados utilizaram equipamento similar ao deste estudo, mas em animais C57Bl/6J e as diferenças observadas podem ter forte relação com características inerentes às linhagens, mas não é possível excluir influência da diferença de particularidades na realização do exame. Os animais C57Bl/6J apresentaram strain e strain rate circunferencial e radial maiores que os animais FVBN deste estudo. Os animais FVBN deste estudo apresentaram strain radial longitudinal maior que os animais C57Bl/6J do estudo de Bauer e colaboradores. O strain longitudinal foi similar. De forma geral, os valores demonstram estabilidade, sugerindo que a utilização de valores de referência é passível de aplicação em avaliação, mas guardadas as devidas características próprias de cada linhagem. Essa observação é corroborada pelos resultados do trabalho de Barrick e colaboradores (2007), que demonstraram diferenças importantes nos efeitos cardiovasculares em duas linhagens de camundongos submetidas a coarctação da aorta torácica. Orientação diferenciada das fibras miocárdicas pode ser sugerida como uma possível causa das variações na resposta deste experimento. Dessa forma o conhecimento de características basais da deformação miocárdica entre as linhagens de camundongos poderia contribuir para a escolha correta de determinado padrão de experimentação ou escolha de modelo de doença cardíaca.

### **7.3 Função cardíaca de camundongos FVBN WT e FVBN Mas-KO submetidos a CAT, avaliada pela ecocardiografia convencional**

A coarctação de aorta torácica é modelo amplamente utilizado nos estudos fisiopatológicos que simulam adaptação cardíaca a sobrecarga de pressão. O grau de constrição da aorta determina a velocidade e gravidade com que é instalado o processo de disfunção e remodelamento ventricular.

Neste trabalho, um dos objetivos foi determinar a sensibilidade da técnica de ecocardiografia em estabelecer diferenças em um nível de coarctação de menor gravidade, tanto para a técnica convencional como para a técnica do *speckle tracking*, utilizando camundongos FVBN WT e Mas-KO. Em um estudo prévio (Mohammed et al., 2012), relata-se que a ecocardiografia permite uma estimativa fidedigna do gradiente pressórico desenvolvido após a coarctação, sendo que os valores de gradiente avaliados pela técnica correlacionam bem com valores medidos por técnicas invasivas. A constrição induzida na aorta transversa dos camundongos deste trabalho foi de aproximadamente 40%, gerando um gradiente, no ponto de coarctação, em média de 35 mmHg para os camundongos WT, e 28 mmHg para os camundongos Mas-KO. Outros autores (Bauer et al., 2013), demonstram o modelo de CAT severa, com obstrução de 75% do lúmen aórtico, induzindo um aumento significativo do gradiente pressórico no ponto de constrição, de valor citado de aproximadamente 51 mmHg. Uma descrição anterior (Peng et al., 2009), cita que utilizando a mesma técnica e mesma metodologia, ter atingido um gradiente de pelo menos 64 mmHg. Ambos utilizaram camundongos da linhagem C57Bl/6.

Embora o gradiente desenvolvido no ponto de coarctação tenha sido menor que nos trabalhos citados, foi possível observar adaptações da função sistólica na avaliação ecoDopplercardiográfica convencional nos camundongos Mas-KO de forma clara, o que não ocorreu nos animais WT. Outro fator importante na consideração do grau de coarctação observado, é a resistência da linhagem FVBN no desenvolvimento de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca após CAT, que já é bem descrito na literatura. Zhao e colaboradores (2011) relatam que a linhagem FVBN é mais resistente que a linhagem C57Bl6 no desenvolvimento de disfunção e remodelamento após indução da CAT (Zhao et al., 2011). Portanto, torna-se importante também a consideração de que a deleção do receptor MAS possivelmente deflagra uma maior sensibilidade da linhagem ao processo de remodelamento e disfunção cardíaca produzida pela técnica da CAT.

Varios parâmetros morfofuncionais demonstraram a sensibilidade do camundongo Mas-KO em resposta à CAT. Essa variação não ocorreu no WT. O padrão de resposta observado é de hipertrofia concêntrica, embora morfológicamente a ecocardiografia convencional não tenha demonstrado as características clássicas como relatado na literatura. Em estudo recente (Wang et al., 2015) são demonstradas as características clássicas de hipertrofia concêntrica desenvolvidas no coração de camundongos submetidos à CAT, com aumento de espessura das paredes livre e septal e redução da dimensão da câmara ventricular esquerda. Os camundongos Mas-KO apresentaram aumento significativo do espessamento sistólico das paredes, corroborando o aumento de massa ventricular observado. Esse fato culminou com aumento dos valores de função sistólica, sem

entretanto atingir os valores observados nos animais WT. O tempo máximo de avaliação, que foi de 30 dias após indução da CAT de grau leve não permitiu, portanto, a observação direta da hipertrofia concêntrica, nem tampouco processo de insuficiência cardíaca. A importância dessa informação reside na compreensão da forma insidiosa com que processos hipertensivos acometem o sistema cardiovascular em humanos e outros animais, e pode contribuir para o entendimento do processo fisiopatológico inicial da resposta cardiovascular à sobrecarga de pressão.

Tanto animais WT como Mas-KO apresentaram remodelamento avaliado pelo aumento de massa ventricular calculada pela ecocardiografia e pelo cálculo da espessura relativa da parede. O aumento observado foi em torno de 35% da massa calculada no exame controle para os animais WT. O aumento observado para os camundongos Mas-KO foi similar, em torno de 37% do basal. Os valores observados são compatíveis com aqueles citados em literatura, sugerindo que o aumento de massa na terceira semana pós CAT varia de 28 a 130% (Mohammed et al., 2012).

Embora padrões de hipertrofia concêntrica características da resposta à CAT não tenham sido observadas de forma evidente ao ecocardiograma, na tentativa de quantificar e estabelecer o tipo de hipertrofia que os dados ecocardiográficos forneceram, foi utilizada a relação entre espessura relativa da parede e o índice de massa do ventrículo esquerdo. Esta relação tem sido aplicada na medicina humana e permite a categorização do tipo de hipertrofia, relacionada às características morfológicas da câmara ventricular esquerda (Lang et al., 2015). A partir das informações do trabalho de Lang e colaboradores, e utilizando a informação de superfície de área corporal (ASC) para camundongos, demonstrada em trabalho anterior (Freireich et al., 1966), realizamos os cálculos adaptados para as informações obtidas pelas avaliações ecocardiográficas deste estudo.

O índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) é descrito como um fator preditor de morbidade e mortalidade em virtude de hipertrofia ventricular esquerda no ser humano (Minamino-Muta et al., 2017). Entretanto esse índice não é aplicado em estudos utilizando animais experimentais como os camundongos. Como pode ser observado no gráfico 18, houve aumento significativo do IMVE tanto em animais WT como Mas-KO após indução da CAT. O índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) é determinada por massa do ventrículo esquerdo e área de superfície corporal, sendo representado pela fórmula:

$$IVME = \text{Massa do VE (g)} / \text{ASC (m}^2\text{)}$$

onde ASC = área de superfície corporal

A partir do resultado inicial do IVME, decidiu-se por realizar a adaptação da relação entre IMVE e ERP na tentativa de qualificar o tipo de modificação morfológica ventricular observado. Considerando que a ASC do camundongo de 20 gramas é 0,0066 m<sup>2</sup> (Freireich et al., 1966), foram

realizados os cálculos para cada animal, e, relacionando o IMVE e os valores encontrados para ERP (Tabelas 2 e 5), foram sugeridos os seguintes parâmetros:

ERP > 0,42	Remodelamento Cêntrico	Hipertrofia Concêntrica
ERP ≤ 0,42	Geometria Normal	Hipertrofia Excêntrica

IMVE ≤ 12,09 mg/m<sup>2</sup>      IMVE >12,09 mg/m<sup>2</sup>

Os valores de corte para o IMVE foram calculados a partir das médias dos valores encontrados dos grupos WT/WT CAT, Mas-KO / Mas-KO CAT, considerando o estado de normalidade dos valores medidos no primeiro ecocardiograma e os valores 30 dias após a coarctação. Os animais WT (controle) apresentaram IMVE de 10,97 e ERP de 0,40, sendo enquadrados em animais apresentando geometria normal. Com uma valor de ERP de 0,33 e IMVE de 10,71, os camundongos Mas-KO controle foram classificados também em geometria normal. Embora a morfologia observada à ecocardiografia não tenha sido de hipertrofia clássica, os animais WT CAT 30 apresentaram valor de ERP de 0,43 e IMVE de 13,92, sendo classificados em hipertrofia concêntrica, assim como os animais Mas-KO que apresentaram ERP de 0,49 e IMVE de 12,76. Os cálculos realizados, ainda que sejam uma aproximação da metodologia aplicada em humanos, demonstrou de forma interessante a forte tendência de remodelamento hipertrófico característico da sobrecarga de pressão, embora a tipificação da hipertrofia pela ecocardiografia não tenha sido evidente, provavelmente pelo menor nível de gravidade da coarctação, pela resistência já conhecida do camundongo FVBN e pelo tempo avaliado (30 dias).

De acordo com a literatura, ocorre aumento da pressão diastólica final em camundongos submetidos a CAT, já na segunda semana após a cirurgia (Zhou et al., 2015). Com o intuito de verificar se a ecocardiografia convencional forneceria sinais sugestivos de disfunção diastólica, foram realizadas mensurações de parâmetros relacionados. O remodelamento gerado pela CAT leva, de forma frequente, a hipertrofia das paredes, culminando com redução da câmara ventricular esquerda, impactando diretamente seu enchimento, em momento de adaptação que precede o

desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Weinheimer et al., 2015; Rai et al., 2017). No caso deste trabalho o intuito foi avaliar mecanismos precoces de adaptação, na tentativa de simular a forma insidiosa e silenciosa de desenvolvimento de sobrecarga de pressão do paciente hipertenso, que sejam passíveis de detecção, o que poderia permitir abordagens de tratamento em momento de doença onde não houvesse comprometimento definitivo da estrutura e consequentemente da função cardíaca. Portanto não houve camundongos que, nos 30 dias de duração da CAT, tenham desenvolvido insuficiência cardíaca, levando em consideração os parâmetros de função sistólica observados. Mas alguns parâmetros de função diastólica demonstraram processo de adaptação à sobrecarga de pressão de forma significativa. De acordo com Schober et. al (2008), a razão E/TRIV poderia ser um parâmetro que permitiria a estimativa, de forma não invasiva, das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (Schober et al., 2008). A utilização desse parâmetro não tem sido realizada em camundongos. No presente experimento os valores de E/TRIV foram significativamente maiores nos camundongos Mas-KO, mas não em animais WT, o que pode significar maior sensibilidade para desenvolvimento de disfunção diastólica ao modelo utilizado, quando é induzida a deleção do receptor Mas. Apesar de não ter demonstrado diferença estatisticamente apreciável, a relação E/A também tendeu a aumento, o que pode ser observado como um potencial desenvolvimento de disfunção diastólica importante. Aumento da velocidade da onda E, aumento da relação E/A e redução do TRIV são indicativos de disfunção diastólica significativa (Otto, 2010). A avaliação da razão E/E', entre a onda E do enchimento passivo ventricular medido pelo doppler e a onda E' do movimento do anel mitral medido pelo doppler tecidual é considerada importante parâmetro de estimativa das pressões de enchimento ventricular, apresentando correlação com dados de hemodinâmica invasiva (Almeida et al., 2009; Park and Marwick, 2011). Os valores de E/E' observados neste trabalho são mais altos do que aqueles observados para humanos, e pode estar relacionado a questão específica, ou seja relacionado ao tipo de animal avaliado. A utilização da razão E/E' é discutível em casos onde há estenose aórtica importante, caso em que as medidas poderiam tornar-se não confiáveis. Em virtude do grau de coarctação produzido, decidiu-se verificar sua utilidade para avaliação no modelo proposto. No caso deste estudo a razão E/E' apresentou aumento significativo apenas nos camundongos Mas-KO, supondo que provavelmente as pressões de enchimento ventricular esquerdo estejam altas. As observações realizadas pela avaliação da análise de ERP, IMVE, E/E' e E/TRIV são concordantes em relação a possível disfunção diastólica em progresso nos animais Mas-KO.



#### **7.4 Função cardíaca de camundongos FVBN WT e FVBN Mas-KO submetidos a CAT, avaliada pelo Speckle Tracking**

*Speckle tracking* nunca foi utilizado para avaliação de camundongos Mas-KO e o número de relatos de aplicação da técnica ainda é pequeno, embora haja aumento significativo de seu uso em pesquisas nos últimos anos. De forma geral a literatura cita a capacidade da análise de deformação em demonstrar de forma mais precoce sinais de disfunção ventricular em várias condições de doença (Parsaee et al., 2017; Paraskevaidis et al., 2017), assim como vem sendo utilizada na pesquisa para análise de disfunção, principalmente infarto do miocárdio e coarctação da aorta (Bauer et al., 2011; Marques et al., 2012; Bauer et al., 2013; Wang et al., 2015) ou para avaliação de resposta a tratamentos de cunho experimental (Marques, F. D., 2012). Entretanto a real contribuição da técnica para detecção precoce de disfunção miocárdica ainda não foi demonstrada de forma clara em condições subclínicas do modelo proposto. Neste trabalho procurou-se explorar por meio de modelo de coarctação de grau leve as potenciais vantagens da ultrassonografia por ST em camundongos normais e camundongos Mas-KO. A avaliação da deformação no plano endocárdico, seja longitudinal ou circunferencial, não revelou modificações significativas, entretanto, na análise do strain epicárdico circunferencial, observa-se redução estatisticamente significativa tanto nos animais WT como nos animais Mas-KO. De forma interessante, no animal WT, a alteração observada na análise de deformação não foi detectada pelos parâmetros indicadores de função sistólica como FE, FEj., DC e VS. A disfunção de deformação no Mas-KO, foi acompanhada de incremento dos valores de função sistólica FE e FEj. Assume-se que o incremento funcional do Mas-KO representa maior sensibilidade na resposta ao nível de acometimento funcional induzido pelo modelo utilizado, e seria uma resposta compensatória precoce na adaptação à sobrecarga de pressão. Não é possível relacionar diretamente, até o momento, causa/efeito entre os parâmetros de deformação e os resultados de função sistólica no Mas-KO, mas é possível sugerir que a alteração pode estar relacionada a uma modificação no arranjo das fibras miocárdicas.

O movimento mecânico que determina a ejeção do volume ventricular é descrito como dependente do deslocamento radial endocárdico, que por sua vez é condicionado pelo encurtamento das fibras miocárdicas em dois planos ortogonais, circunferencial e longitudinal, gerando força culminando com a contração (Maciver, 2012). No caso deste estudo detectou-se disfunção de movimentação epicárdica, indicando que teria participação importante na capacidade de geração de tensão parietal que contribua com a ejeção, embora não tenha sido percebida nenhuma diferença no

tempo controle para WT e Mas-KO. É necessário citar que a maioria dos trabalhos não avalia a deformação epicárdica em âmbito experimental, não havendo padrões de referência para fins de comparação. Tee e colaboradores (2015) demonstram a possibilidade da avaliação epicárdica com o mesmo sistema de aquisição de imagem utilizado neste trabalho, mas foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C (Tee et al., 2015). Como anteriormente descrito, a diferença entre as linhagens pode determinar discrepâncias nos resultados, embora alguns valores observados no trabalho citado sejam próximos aos encontrados neste estudo.

A análise de assincronia revelou de forma importante modificações no padrão de movimentação dos segmentos das paredes ventriculares, principalmente nos camundongos Mas-KO, evidenciando a maior sensibilidade dessa linhagem em relação aos camundongos WT, e demonstrando a importância da integridade da via Ang  $-(1-7)$  – Mas como fator essencial na geração de trabalho coordenado do coração. Apesar da característica assincrônica de vários segmentos, não foi observada presença de arritmia cardíaca de importância, pelo menos para o nível de disfunção produzido. Foi observado grau menor de assincronia nos animais WT submetidos a coarctação. Considerando a importância da atividade sincicial e coordenada da musculatura em gerar constantemente força de forma adequada para manter o débito cardíaco na maior parte do tempo, pode-se assumir que assincronia entre segmentos levará potencialmente à redução da sinergia entre as paredes, podendo culminar com necessidade adaptativa para recuperar a perda funcional. Desta forma torna-se necessário remodelamento miocárdico, já que o trabalho gerado não mais se encontra em equilíbrio com as demandas teciduais.

### **7.5 Análise da expressão gênica**

As respostas moleculares induzidas pela TAC em camundongos são bastante variáveis e dependentes do grau de hipertrofia observado, como já descrito na literatura (Mohammed et al., 2012). O nível de coarctação aplicado no trabalho citado foi mais severo do que aquele observado neste trabalho. Neste trabalho observou-se aumento no ANP, BNP e MHC $\beta$  apenas nos camundongos WT após a CAT. Em relação ao ANP, pode-se sugerir a possibilidade de que a ausência do receptor Mas impacta de forma importante sua liberação, considerando que os animais Mas-KO apresentam disfunção sistólica significativa, e seria esperado que houvesse algum grau de aumento em seus valores. Embora os camundongos Mas-KO SHAM tenham apresentado valores basais de BNP aumentados em relação aos camundongos WT SHAM, apenas os animais WT apresentaram aumento em seus valores após a CAT. Podemos sugerir que a deleção do receptor

Mas também teria papel crítico na liberação do BNP, principalmente em condições de aumento de tensão parietal.

É descrito na literatura o aumento de MHC $\beta$  após a indução da CAT. Em estudo avaliando um nível de coarctação moderado a severo, houve elevação significativa de mRNA para MHC $\beta$  28 dias após o procedimento (Xiao et al., 2012). Houve aumento de MHC $\beta$  neste trabalho somente nos animais WT. Sugere-se dessa forma que, assim como para o ANP, a deleção do receptor Mas pode ter papel importante para ativação dessa resposta, pelo menos dentro do período de 30 dias após o procedimento.

Tanto animais Mas-KO como animais WT apresentaram aumento significativo de colágeno III e TGF $\beta$  após a CAT. Esse aumento é compatível com os resultados ecocardiográficos de aumento de massa observados nos camundongos. Estudos já relataram relação da estenose aórtica em humanos com ativação crônica do SRAA e o aumento de TGF $\beta$  e colágeno I e III (Fielitz et al., 2001). Outro trabalho cita a importância do TGF $\beta$  como modulador do metabolismo da matriz extracelular em corações submetidos a sobrecarga pressórica (Dobaczewski et al., 2011).

## 8. Conclusões

Considerando os achados deste estudo, podemos concluir que:

- A deleção genética do receptor Mas induz no camundongo da linhagem FVB/N alteração funcional importante caracterizada por disfunção sistólica.
- A CAT induz resposta compensatória de forma mais intensa no camundongo Mas-KO, ou seja a deleção do receptor Mas torna esses camundongos mais sensíveis ao modelo.
- Tanto a ecocardiografia convencional como o *speckle tracking* foram capazes de demonstrar sinais de adaptação funcional no coração dos camundongos Mas-KO submetidos a CAT
- A técnica do *speckle tracking* demonstrou que a CAT intensifica de forma mais intensa a assincronia dos segmentos miocárdicos nos camundongos Mas-KO que nos camundongos WT
- O CAT induziu aumento de ANP, BNP e MHC $\beta$  somente em animais WT, sugerindo que o receptor Mas provavelmente participa da deflagração dessas respostas.

## 9. Referências

- Almeida ALC de, Andrade Moura Junior J, Paschoalin SRKP, Almeida CER de, Guimarães AC, Paschoalin EL, Muritiba S de OC, Junior B, De J (2009) Valor Prognóstico da relação E/E' em pacientes com insuficiência renal crônica em início de hemodiálise. *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc* 22:12–16.
- Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, Støylen A, Ihlen H, Lima JAC, Smiseth OA, Slørdahl SA (2006) Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 47:789–793.
- Atlas SA (2007) The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm JMCP* 13:9–20.
- Ballester-Rodés M, Flotats A, Torrent-Guasp F, Carrió-Gasset I, Ballester-Alomar M, Carreras F, Ferreira A, Narula J (2006) The sequence of regional ventricular motion. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 29 Suppl 1:S139-144.
- Banks HT, Hu S, Kenz ZR (2011) A Brief Review of Elasticity and Viscoelasticity for Solids. *Adv Appl Math Mech* 3:1–51.
- Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW (2007) Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2119-2130.
- Bauer M, Cheng S, Jain M, Ngoy S, Theodoropoulos C, Trujillo A, Lin F-C, Liao R (2011) Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res* 108:908–916.
- Bauer M, Cheng S, Unno K, Lin F-C, Liao R (2013) Regional Cardiac Dysfunction and Dyssynchrony in a Murine Model of Afterload Stress. *PLoS ONE* 8 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613376/> [Accessed June 13, 2017].
- Bertagnolli M, Casali KR, De Sousa FB, Rigatto K, Becker L, Santos SHS, Dias LD, Pinto G, Dartora DR, Schaan BD, Milan RDS, Irigoyen MC, Santos RAS (2014) An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* 51:65–73.
- Boyd AC, Schiller NB, Thomas L (2015) Principles of transthoracic echocardiographic evaluation. *Nat Rev Cardiol* 12:426–440.
- Castillo D, M J, Herszkowicz N, Ferreira C (2010) Speckle Tracking - a contratilidade miocárdica em sintonia fina. *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc* 23:46–54.
- Castillo D, Maria J, Albuquerque ES de, Silveira CA da M (2012) Rotação, twisting e torção miocárdicas avaliados pela ecocardiografia bidimensional (speckle tracking). *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc* 25:206–213.
- Castro CH, Santos RAS, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP (2006) Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci* 80:264–268.

- Cikes M, Sutherland GR, Anderson LJ, Bijmens BH (2010) The role of echocardiographic deformation imaging in hypertrophic myopathies. *Nat Rev Cardiol* 7:384–396.
- Coatney RW (2001) Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J* 42:233–247.
- Codreanu I, Robson MD, Golding SJ, Jung BA, Clarke K, Holloway CJ (2010) Longitudinally and circumferentially directed movements of the left ventricle studied by cardiovascular magnetic resonance phase contrast velocity mapping. *J Cardiovasc Magn Reson* 12:48.
- Coghlan C, Hoffman J (2006) Leonardo da Vinci's flights of the mind must continue: Cardiac architecture and the fundamental relation of form and function revisited. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 29 Suppl 1:S4-17.
- Coppola BA, Omens JH (2008) Role of tissue structure on ventricular wall mechanics. *Mol Cell Biomech* MCB 5:183–196.
- Cumbermack KM, Cheng J, Nong Y, Mahle WT, Joyner RW, Border WL, Wagner MB, Fyfe DA, Leong T, Wang Y (2011) A juvenile murine heart failure model of pressure overload. *Pediatr Cardiol* 32:145–153.
- Danilczyk U, Penninger JM (2006) Angiotensin-Converting Enzyme II in the Heart and the Kidney. *Circ Res* 98:463–471.
- de Almeida PWM, Melo MB, Lima R de F, Gavioli M, Santiago NM, Greco L, Jesus ICG, Nocchi E, Parreira A, Alves MNM, Mitraud L, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Dos Santos RAS, Guatimosim S (2015) Beneficial effects of angiotensin-(1-7) against deoxycorticosterone acetate-induced diastolic dysfunction occur independently of changes in blood pressure. *Hypertens Dallas Tex* 1979 66:389–395.
- de Moura MM, dos Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Todiras M, Bader M, Alenina N, Haibara AS (2010) Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides* 31:1934–1939.
- deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT (2010) Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp JoVE*.
- Di Franco A, Ohmes LB, Gaudino M, Rong LQ, Girardi LN, Sarullo FM, Salerno Y, Sarullo S, Weinsaft JW, Kim J (2017) Serendipity and innovation: history and evolution of transthoracic echocardiography. *J Thorac Dis* 9:S257–S263.
- Dias-Peixoto MF, Santos RAS, Gomes ERM, Alves MNM, Almeida PWM, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S (2008) Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52:542–548.
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011) Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51:600–606.
- Domenig O, Manzel A, Grobe N, Kaltenecker C, Kovarik J, Stegbauer J, Gurley SB, Antlanger M, Elased K, Saemann M, Linker R, Poglitsch M (2015) 8D.05: THE ROLE OF NEPRILYSIN IN ANGIOTENSIN 1-7 FORMATION IN THE KIDNEY. *J Hypertens* 33 Suppl 1:e114-115.
- Dornas WC, Silva ME (2011) Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 36:731–737.

- Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE (2011) The Utility of the Small Rodent Electrocardiogram in Toxicology. *Toxicol Sci* 121:11–30.
- Ferreira AJ, Santos R a. S (2005) Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al* 38:499–507.
- Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RAS, Katovich MJ, Raizada MK (2011) Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol* 96:287–294.
- Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, Pregla R, Zurbrügg HR, Warnecke C, Schaper J, Fleck E, Regitz-Zagrosek V (2001) Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 37:1443–1449.
- Foppa M, Duncan BB, Rohde LEP (2005) Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound* 3:17.
- Fournier D, Luft FC, Bader M, Ganten D, Andrade-Navarro MA (2012) Emergence and evolution of the renin–angiotensin–aldosterone system. *J Mol Med Berl Ger* 90:495–508.
- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE (1966) Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 50:219–244.
- Ganten D, Hayduk K, Brecht HM, Boucher R, Genest J (1970) Evidence of renin release or production in splanchnic territory. *Nature* 226:551–552.
- Gorcsan J, Tanaka H (2011) Echocardiographic assessment of myocardial strain. *J Am Coll Cardiol* 58:1401–1413.
- Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ (2007) Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 292:H736–H742.
- Guimarães GG, Santos SHS, Oliveira ML, Pimenta-Velloso EP, Motta DF, Martins AS, Alenina N, Bader M, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ (2012) Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides* 38:54–61.
- Guo L, Yin A, Zhang Q, Zhong T, O'Rourke ST, Sun C (2017) Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via a Sirt3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312:H980–H991.
- Heimdahl A, Støylen A, Torp H, Skjaerpe T (1998) Real-time strain rate imaging of the left ventricle by ultrasound. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr* 11:1013–1019.
- Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589–600.
- Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S (2007) Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci Lond Engl* 112:417–428.
- Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358:1370–1380.

- Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE (2003) Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1261-1269.
- Kehat I, Molckentin JD (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122:2727-2735.
- Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A (2007) ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res* 73:463-469.
- Kocica MJ, Corno AF, Carreras-Costa F, Ballester-Rodes M, Moghbel MC, Cueva CNC, Lackovic V, Kanjuh VI, Torrent-Guasp F (2006) The helical ventricular myocardial band: global, three-dimensional, functional architecture of the ventricular myocardium. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 29 Suppl 1:S21-40.
- Kovács Á, Fülöp GÁ, Kovács A, Csípó T, Bódi B, Priksz D, Juhász B, Beke L, Hendrik Z, Méhes G, Granzier HL, Édes I, Fagyas M, Papp Z, Barta J, Tóth A (2016) Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310:H1671-1682.
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt J-U (2015) Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 28:1-39.e14.
- Laslett LJ, Alagona P, Clark BA, Drozda JP, Saldivar F, Wilson SR, Poe C, Hart M (2012) The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 60:S1-49.
- Lautner RQ et al. (2013) Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 112:1104-1111.
- LeWinter MM, Granzier HL (2014) Cardiac Titin and Heart Disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 63:207-212.
- Loot AE, Roks AJM, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJH, Boomsma F, van Gilst WH (2002) Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation* 105:1548-1550.
- Maciver DH (2012) The relative impact of circumferential and longitudinal shortening on left ventricular ejection fraction and stroke volume. *Exp Clin Cardiol* 17:5-11.
- Marques, F. D. (2012) Mecanismos envolvidos no efeito cardioprotetor do composto de inclusão hidroxipropil beta-ciclodextrina/angiotensina-(1-7) em ratos [manuscrito] 2012 - Teses. Available at: <https://catalogobiblioteca.ufmg.br/pergamum/biblioteca/index.php> [Accessed April 25, 2014].
- Marques FD, Melo MB, Souza LE, Irigoyen MCC, Sinisterra RD, de Sousa FB, Savergnini SQ, Braga VBA, Ferreira AJ, Santos RAS (2012) Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of Angiotensin-(1-7) in infarcted rats. *Int J Hypertens* 2012:795452.
- Martin TP, Robinson E, Harvey AP, MacDonald M, Grieve DJ, Paul A, Currie S (2012) Surgical optimization and characterization of a minimally invasive aortic banding procedure to induce cardiac hypertrophy in mice. *Exp Physiol* 97:822-832.

- McCullum LT, Gallagher PE, Ann Tallant E (2012) Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling associated with upregulation of dual-specificity phosphatase 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H801-810.
- Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RAS, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL (2008) Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res* 103:1319–1326.
- Minamino-Muta E et al. (2017) Impact of the left ventricular mass index on the outcomes of severe aortic stenosis. *Heart:heartjnl-2016-311022*.
- Mirsky I, Parmley WW (1973) Assessment of passive elastic stiffness for isolated heart muscle and the intact heart. *Circ Res* 33:233–243.
- Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CS, Simari RD, Burnett JC, Redfield MM (2012) Variable Phenotype in Murine Transverse Aortic Constriction (TAC). *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol* 21:188–198.
- Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, Galderisi M, Marwick T, Nagueh SF, Sengupta PP, Sicari R, Smiseth OA, Smulevitz B, Takeuchi M, Thomas JD, Vannan M, Voigt J-U, Zamorano JL (2011) Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol* 12:167–205.
- Mori J, Patel VB, Abo Alrob O, Basu R, Altamimi T, Desaulniers J, Wagg CS, Kassiri Z, Lopaschuk GD, Oudit GY (2014) Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation. *Circ Heart Fail* 7:327–339.
- Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M (2015) Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 8:7.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> [Accessed February 20, 2017].
- Otto C (2010) *Fundamentos de ecocardiografia clínica 4a edição*. Elsevier Brasil.
- Palmisano BW, Mehner RW, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Kampine JP (1994) Direct myocardial effects of halothane and isoflurane. Comparison between adult and infant rabbits. *Anesthesiology* 81:718–729.
- Paraskevaidis IA, Makavos G, Tsigotis P, Psarogiannakopoulos P, Parissis J, Gkirkas K, Pessach I, Ikonomidis I (2017) Deformation Analysis of Myocardial Layers Detects Early Cardiac Dysfunction after Chemotherapy in Bone Marrow Transplantation Patients: A Continuous and Additive Cardiotoxicity Process. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*.
- Park J-H, Marwick TH (2011) Use and Limitations of E/e' to Assess Left Ventricular Filling Pressure by Echocardiography. *J Cardiovasc Ultrasound* 19:169–173.
- Parsaee M, Saedi S, Joghataei P, Azarkeivan A, Alizadeh Sani Z (2017) Value of speckle tracking echocardiography for detection of clinically silent left ventricular dysfunction in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Hematol Amst Neth* 22:554–558.



- Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY (2016) Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ Res* 118:1313–1326.
- Patten RD, Hall-Porter MR (2009) Small Animal Models of Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2:138–144.
- Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD, Penn MS (2009) Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H811-820.
- Persson PB (2003) Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol* 552:667–671.
- Piepho RW, Beal J (2000) An Overview of Antihypertensive Therapy in the 20th Century. *J Clin Pharmacol* 40:967–977.
- Porter KE, Turner NA (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123:255–278.
- Price HL, Ohnishi ST (1980) Effects of anesthetics on the heart. *Fed Proc* 39:1575–1579.
- Quiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA, Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography (2002) Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr* 15:167–184.
- Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M, Santos RAS, Alenina N (2008) Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens JASH* 2:418–424.
- Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK (2017) Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem* 424:123–145.
- Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC (2011) New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H1765-1780.
- Ribeiro-Oliveira A, Nogueira AI, Pereira RM, Boas WWV, Dos Santos RAS, Simões e Silva AC (2008) The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 4:787–803.
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Chien KR (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8277–8281.
- Roelandt JR (2000) Seeing the invisible: a short history of cardiac ultrasound. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol* 1:8–11.
- Roger VL (2013) Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res* 113:646–659.
- Rosenkranz S (2004) TGF- $\beta$ 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 63:423–432.
- Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RAS, Schiffrin EL, Touyz RM (2007a) Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertens Dallas Tex* 1979 50:1093–1098.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM (2007b) Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 49:185–192.

Santos RA (2014) Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 63:1138–1147.

Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss H-P, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258–8263.

Schober KE, Stern JA, DaCunha DNQT, Pedraza-Toscano AM, Shemanski D, Hamlin RL (2008) Estimation of left ventricular filling pressure by Doppler echocardiography in dogs with pacing-induced heart failure. *J Vet Intern Med* 22:578–585.

Skeggs LT, Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M (1976) The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med* 60:737–748.

Skeggs LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP (1954) THE EXISTENCE OF TWO FORMS OF HYPERTENSIN. *J Exp Med* 99:275–282.

St John Sutton MG, Plappert T, Crosby L, Douglas P, Mullen J, Reichek N (1985) Effects of reduced left ventricular mass on chamber architecture, load, and function: a study of anorexia nervosa. *Circulation* 72:991–1000.

Takawale A, Sakamuri SSVP, Kassiri Z (2015) Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology. *Compr Physiol* 5:687–719.

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE (2005) Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1560-1566.

Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S (2004) Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 16:349–360.

Tee N, Gu Y, Murni null, Shim W (2015) Comparative myocardial deformation in 3 myocardial layers in mice by speckle tracking echocardiography. *BioMed Res Int* 2015:148501.

Torrent Guasp F (2001) La mecánica agonista-antagonista de los segmentos descendente y ascendente de la banda miocárdica ventricular. *Rev Esp Cardiol* 54:1091–1102.

Torrent-Guasp F, Ballester M, Buckberg GD, Carreras F, Flotats A, Carrió I, Ferreira A, Samuels LE, Narula J (2001) Spatial orientation of the ventricular muscle band: physiologic contribution and surgical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122:389–392.

Wang G, Zhang L, Ruan L, Quan X, Yang J, Lv C, Zhang C (2015) Speckle tracking echocardiography assessment of global and regional contraction dysfunction in the mice model of pressure overload. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 35:271–277.

Weinheimer CJ, Lai L, Kelly DP, Kovacs A (2015) A Novel Mouse Model of Left Ventricular Pressure Overload and Infarction Causing Predictable Ventricular Remodelling and Progression to Heart Failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42:33–40.

Xiao J, Jiang H, Zhang R, Fan G, Zhang Y, Jiang D, Li H (2012) Augmented Cardiac Hypertrophy in Response to Pressure Overload in Mice Lacking ELTD1. PLoS ONE 7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350503/> [Accessed September 21, 2017].

Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, Tataru Y, Shiota A, Sugano S, Takeda S, Rakugi H, Ogihara T (2006) Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertens Dallas Tex* 1979 47:718–726.

Zhang T, Li Z, Dang H, Chen R, Liaw C, Tran T-A, Boatman PD, Connolly DT, Adams JW (2012) Inhibition of Mas G-protein signaling improves coronary blood flow, reduces myocardial infarct size, and provides long-term cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H299-311.

Zhao M, Fajardo G, Urashima T, Spin JM, Poorfarahani S, Rajagopalan V, Huynh D, Connolly A, Quertermous T, Bernstein D (2011) Cardiac pressure overload hypertrophy is differentially regulated by  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 301:H1461–H1470.

Zhou Q, Kesteven S, Wu J, Aidery P, Gawaz M, Gramlich M, Feneley MP, Harvey RP (2015) Pressure Overload by Transverse Aortic Constriction Induces Maladaptive Hypertrophy in a Titin-Truncated Mouse Model. *BioMed Res Int* Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/163564/> [Accessed July 12, 2017].

	WT Controle (n=31)	WT SHAM 30 (n=9)	WT CAT 30 (n=9)	MAS KO Controle (n=32)	MAS KO SHAM 30 (n=13)	MAS KO CAT 30 (n=13)
FEI (%)	70,57 ± 4,12	70,20 ± 3,80	68,91 ± 5,49	49,00 ± 5,94****	49,09 ± 4,75	57,42 ± 8,35**
FE (%)	39,44 ± 3,26	39,16 ± 3,10	38,34 ± 4,19	24,36 ± 3,53****	24,72 ± 2,23	29,85 ± 5,53****
DC (ul/min)	18,01 ± 3,63	29,90 ± 5,05	19,77 ± 3,23	14,03 ± 2,35****	16,30 ± 2,35	16,14 ± 3,39*
VS (ul)	42,33 ± 6,85	44,6 ± 9,23	43,92 ± 8,27	30,11 ± 4,54****	27,11 ± 3,67	33,86 ± 5,70**
VDF (ul)	60,54 ± 11,30	63,9 ± 14,01	63,97 ± 13,41	61,95 ± 9,86	66,81 ± 13,46	59,35 ± 8,89
VSF (ul)	18,17 ± 5,08	19,22 ± 5,39	19,92 ± 6,21	31,78 ± 7,48****	34,29 ± 9,58	25,39 ± 6,93
DVEd (mm)	3,79 ± 0,32	3,82 ± 0,31	3,93 ± 0,45	3,82 ± 0,29	3,96 ± 0,33	3,74 ± 0,0,24
DVEs (mm)	2,31 ± 0,29	2,35 ± 0,23	2,39 ± 0,35	2,90 ± 0,26****	2,99 ± 0,31	2,60 ± 0,32
EPPd (mm)	0,73 ± 0,09	0,92 ± 0,12	0,83 ± 0,09	0,68 ± 0,09*	0,73 ± 0,12	0,92 ± 0,16
EPPs (mm)	1,09 ± 0,11	1,28 ± 0,15	1,17 ± 0,17	0,78 ± 0,09****	0,82 ± 0,09	1,14 ± 0,18
SIVd (mm)	0,67 ± 0,08	0,84 ± 0,10	0,82 ± 0,12	0,62 ± 0,07*	0,70 ± 0,06	0,77 ± 0,13
SIVs (mm)	1,00 ± 0,09	1,16 ± 0,13	1,18 ± 0,13	0,71 ± 0,10****	0,78 ± 0,06	0,97 ± 0,14
Massa VE (mg)	95,94 ± 10,09	113,4 ± 12,55	126,4 ± 21,72	84,38 ± 18,46**	99,4 ± 14,69	114,2 ± 20,81
Massa VE (Corr./mg)	76,78 ± 8,11	91,09 ± 10,66	103,3 ± 17,47	69,96 ± 9,11**	79,66 ± 11,69	92,33 ± 16,80
FC (bpm)	425,3 ± 42,48	536,9 ± 63,3	459,4 ± 69,37	467,4 ± 43,85****	506,9 ± 50,26	497,2 ± 51,00
TE (ms)	52,26 ± 2,70	50,03 ± 3,26	54,80 ± 4,37	51,15 ± 2,38	52,91 ± 4,18	53,81 ± 4,97
TRIV (ms)	8,52 ± 0,78	8,39 ± 0,41	7,98 ± 1,47	8,95 ± 0,83*	8,42 ± 0,81	7,43 ± 1,26
TClV (ms)	8,60 ± 0,89	8,33 ± 0,78	7,88 ± 0,74	8,80 ± 0,78	8,33 ± 0,78	7,40 ± 0,86
Onda E (mm/seg)	665,1 ± 94,37	788,9 ± 110,1	798,1 ± 208,1	679,5 ± 109,6	740,4 ± 115,2	798,4 ± 142,7
Onda A (mm/seg)	382,1 ± 98,37	555,2 ± 111,8	446,6 ± 144,8	401,5 ± 92,72	439,6 ± 102,3	431,5 ± 185,2
E/A	1,79 ± 0,51	1,29 ± 0,19	2,14 ± 0,91	1,75 ± 0,39	1,77 ± 0,54	2,23 ± 1,29
Vel. Aórtica (mm/seg)	897,8 ± 144,1	967,1 ± 223,1	846,3 ± 194,3	909,7 ± 99,89	939,8 ± 139,2	821,7 ± 191,4
IPM	0,335 ± 0,07	0,317 ± 0,05	0,280 ± 0,023	0,348 ± 0,03	0,321 ± 0,04	0,271 ± 0,03
E/TRIV	78,50 ± 12,63	93,97 ± 12,25	103,2 ± 30,75	76,70 ± 15,01	89,29 ± 20,06	111,1 ± 29,61
ERP	0,40 ± 0,11	0,40 ± 0,06	0,43 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,37 ± 0,08	0,49 ± 0,11

Tabela 8. Parâmetros ecocardiográficos para camundongos WT e MAS KO nos tempos 0, SHAM 30 e CAT 30

## 10. Anexos

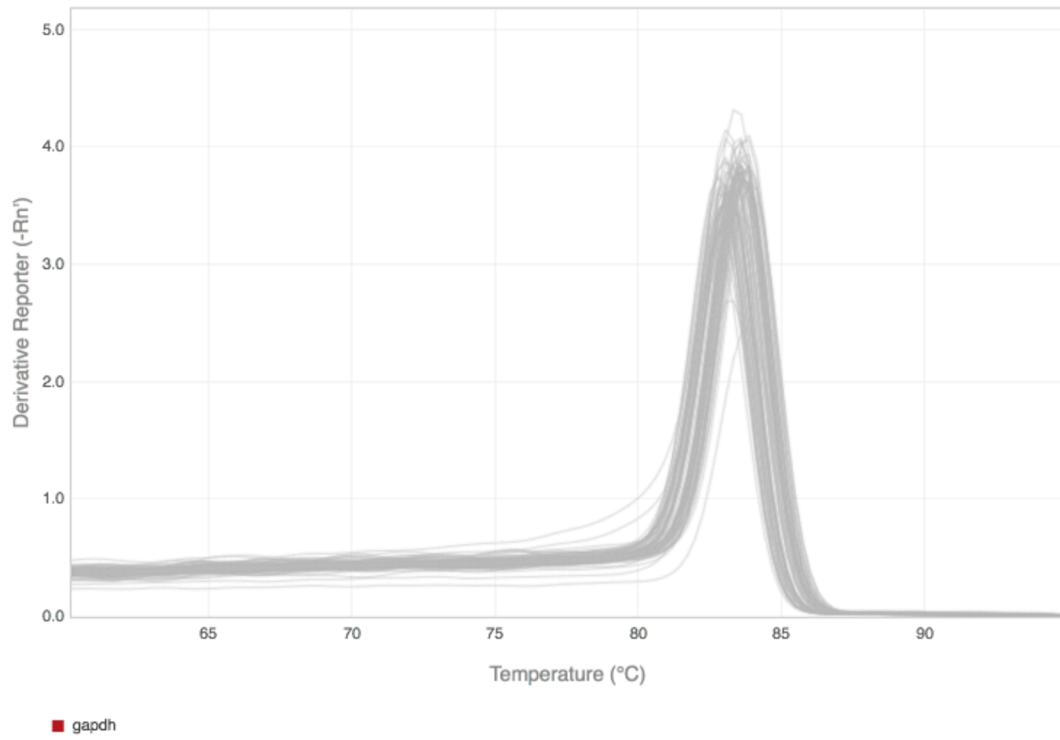


Figura 33. Curva de dissociação gapdh

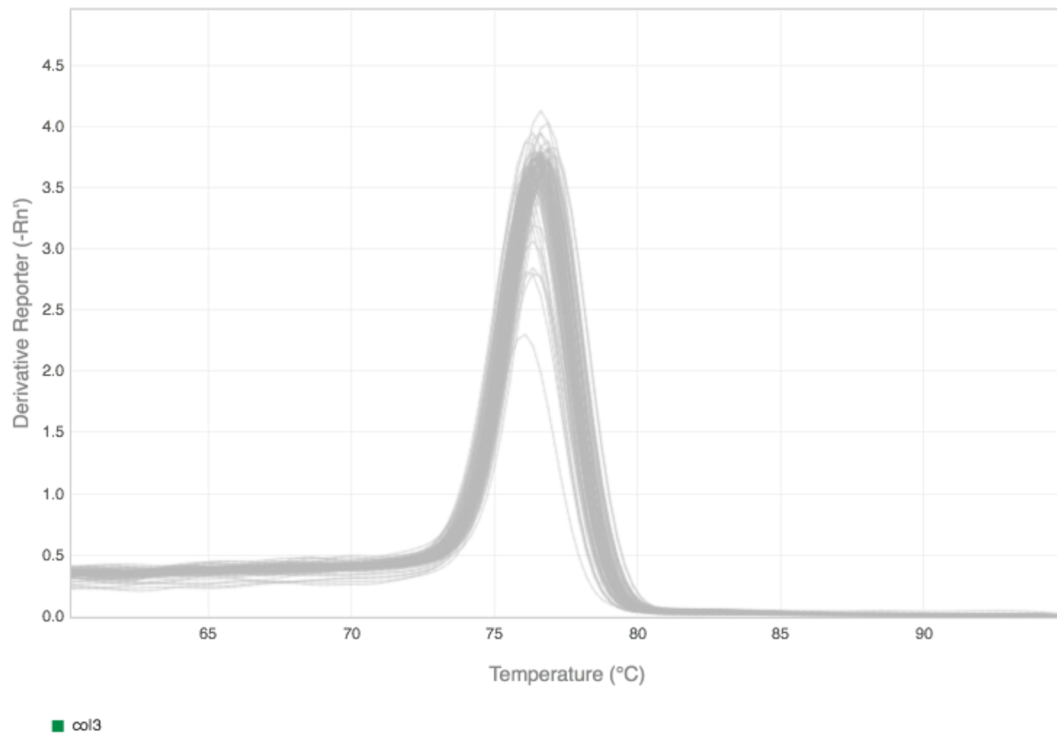


Figura 34. Curva de dissociação para Colágeno III

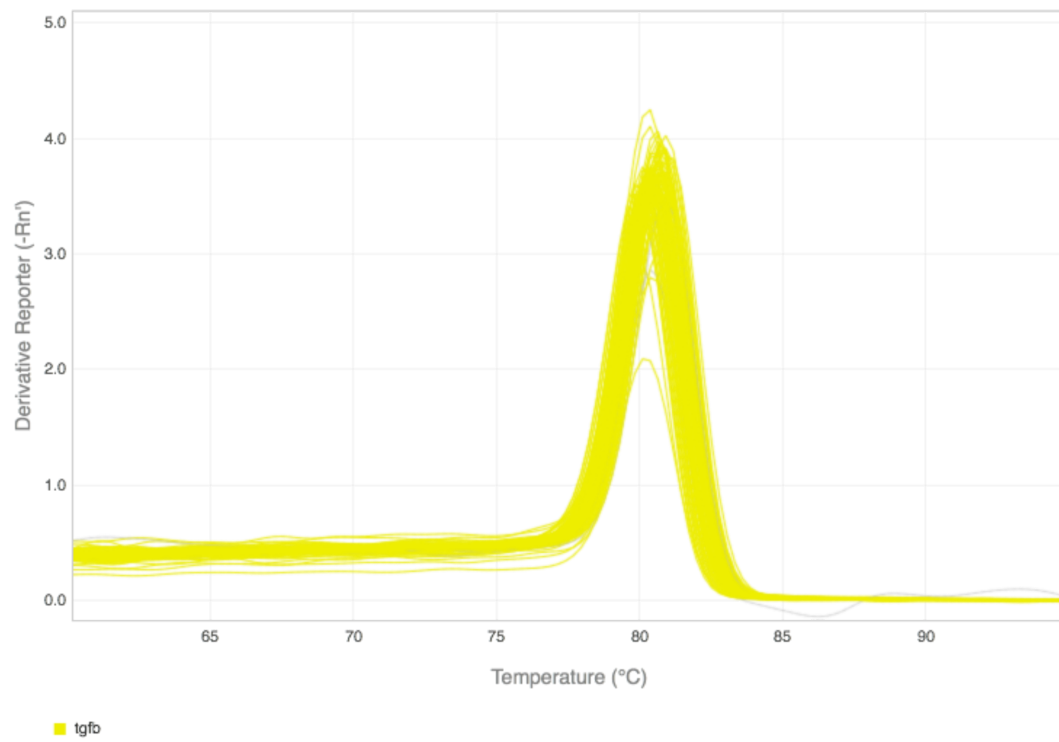


Figura 35. Curva de dissociação TGFβ

### Fração de ejeção (FEj)

EF	LV ejection fraction (M-Mode)	%	$100 * ((LV\ Vol;d - LV\ Vol;s) / LV\ Vol;d)$
----	-------------------------------	---	---

### Fração de encurtamento (FE)

FS	LV fractional shortening (M-Mode)	%	$100 * ((LVID;d - LVID;s) / LVID;d)$
----	-----------------------------------	---	--------------------------------------

### Massa não corrigida

LV Mass	LV mass uncorrected (M-Mode)	mg	$1.053 * ((LVID;d + LVPW;d + IVS;d)^3 - LVID;d^3)$
---------	------------------------------	----	--

### Massa corrigida

LV Mass (Corrected)	LV mass corrected (M-Mode)	mg	$LV\ Mass\ (M-Mode) * 0.8$
---------------------	----------------------------	----	----------------------------

### Volume diastólico final (VDF)

LV Vol;d	Left ventricle volume diastole (M-Mode)	$\mu L$	$7.0 / (2.4 + LVID;d) * LVID;d^3$
----------	---	---------	-----------------------------------

### Volume sistólico final (VSF)

LV Vol;s	Left ventricle volume systole (M-Mode)	$\mu L$	$7.0 / (2.4 + LVID;s) * LVID;s^3$
----------	--	---------	-----------------------------------

### Débito cardíaco (DC)

CO (LV Trace)	Cardiac output volume parameter of LV Mass LV trace (M-Mode and AM-Mode)	mL/min	Stroke Volume * Heart rate (at the first point drawn)/1000 NOTE: Each of the above input values are from the appropriate mode
---------------	--	--------	--

### Volume sistólico (VS)

SV (LV Trace)	Stroke volume parameter of LV Mass LV trace (M-Mode and AM-Mode)	$\mu L$	Diastolic Volume - Systolic Volume NOTE: Each of the above input values are from the appropriate mode
---------------	--	---------	--

Figura 36. Fórmulas para os cálculos ecocardiográficos (rotinas computacionais do equipamento utilizado)