

Caracterização Funcional da Hipertrofia Miocárdica Induzida pelo Isoproterenol e de sua Regressão

Neif Murad, Marcelo Fabiano de Franco, Paulo J. F. Tucci

São Paulo, SP

Objetivo - Analisar as disfunções da hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol e de sua regressão. Corações isolados hipertrofiados por isoproterenol (ISO) (8 dias) e após 22 dias de sua suspensão (regressão) foram distendidos.

Métodos - Até pressão de repouso (P_r) de 60mmHg, analisaram-se: pressão desenvolvida máxima ($PD_{máx}$); estresse sistólico ($S_{máx}$); inclinação da reta estresses/deformações; constante de relaxamento; rigidez da câmara e rigidez miocárdica.

Resultados - Nos corações hipertrofiados (H) as variações de volume (DV) necessárias para $P_r=60$ mmHg foram heterogêneas. Em alguns (H_1 ; $n=10$) DV equivaleu à dos controle (C) enquanto em outros (H_2 ; $n=10$) foi inferior, e também diferiram quanto ao peso seco, complacência ventricular, rigidez miocárdica, constante de relaxamento, e $S_{máx}$. $PD_{máx}$ dos grupos H_1 e H_2 foram superiores às de C ($n=8$) e Regressão (R) ($n=8$). Contudo, $S_{máx}$ de H_2 foi menor que C , H_1 e R . O mecanismo de Frank-Starling foi deprimido nos corações hipertrofiados. A constante de relaxamento de H_2 indicou retardo no decaimento da pressão associado a menor complacência ventricular e rigidez miocárdica acentuada.

Conclusão - Hipertrofia miocárdica induzida pelo ISO não é homogênea. Alguns corações têm alterações pouco expressivas; outros têm comprometimento das funções sistólica e diastólica. A hipertrofia miocárdica reduz a capacidade de gerar força e aprimora a capacidade em variar pressão por aumento da relação massa/volume. Há, também, comprometimento da complacência ventricular e da rigidez muscular.

Palavras-chave: hipertrofia miocárdica, isoproterenol, função sistólica, função diastólica.

Laboratório de Fisiologia Cardíaca da Universidade Federal de São Paulo
Correspondência: Paulo J. F. Tucci - Rua Estado de Israel, 181/94 - 04022-000 - São Paulo - SP - E-mail: tucci@fcr.epm.br
Recebido para publicação em 10/8/00
Aceito em 29/11/00

Os estudos de Framingham¹⁻³ conferiram à hipertrofia miocárdica papel de indicador de risco de morbimortalidade cardiovascular de grande relevância, talvez, até maior que os fatores de risco tradicionais, como tabagismo, dislipidemias e hipertensão arterial sistêmica⁴. Essas verificações motivaram o interesse pelas pesquisas em hipertrofia miocárdica e diversos modelos experimentais foram descritos para investigações de sua patogenia e fisiopatologia, inclusive, o modelo que utiliza o isoproterenol para promoção do crescimento celular⁵⁻⁹. Neste modelo, a literatura é controversa quanto às repercussões funcionais que são induzidas. Para Beznak¹⁰, Beznak¹¹, Lin¹² e Baldwin e cols.¹³, que estudaram a capacidade de bombeamento cardíaco, ocorre depressão da função ejetante. Opinião equivalente, de depressão contrátil, foi divulgada por Tse e cols.¹⁴, Hayes e cols.¹⁵, Vassalo e cols.¹⁶ e Stein e cols.¹⁷, que estudaram a capacidade de gerar força de preparações musculares isoladas. Diversamente, Taylor e Tang¹⁸, Tang e Taylor¹⁹, Jalil e cols.⁶, e Cihák e cols.⁸, trabalhando com coração isolado, relataram hiperatividade contrátil, enquanto Taylor²⁰, Helbing e Churchill (1989), que estudaram músculo papilar, constataram função contrátil normal. Quanto à função de relaxamento do miocárdio, somente o trabalho de Stein e cols.¹⁷ descreveu capacidade de relaxamento rebaixada. Em relação às propriedades elásticas passivas do miocárdio, Jalil e cols.⁶ verificaram exacerbação da rigidez miocárdica. Estas controvérsias em relação às propriedades sistólicas e a exigüidade de informações sobre a função diastólica nos induziram a estudar as alterações estruturais e funcionais, sistólicas e diastólicas, da hipertrofia miocárdica promovida pelo isoproterenol.

Métodos

Foram estudados 66 ratos Wistar-EPM, machos, adultos, pesando entre 250-300g distribuídos, ao acaso, por três grupos experimentais: 1) controle (C ; $n=18$) constituído de animais que receberam óleo de oliva na dose de 1ml/kg/dia - SC durante oito dias; 2) hipertrofia (H ; $n=30$) e 3) regressão (R ; $n=18$) formado de animais submetidos à dose diária de isoproterenol (0,3mg/kg/dia - SC), suspenso em óleo de

oliva, durante oito dias. Ao último grupo administrou-se excitante nos outros 22 dias subsequentes. Realizaram-se análises histológicas e histométrica do miocárdio em 10 animais de cada grupo e utilizaram-se os demais para estudo da função ventricular em preparação de coração isolado.

Após anestesia (uretana: 1,2g/kg, IP) e heparinização (500 UI, IP), os animais eram submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente era canulada e o coração perfundido à pressão de perfusão constante de 100mmHg, segundo a técnica de Langendorff, utilizando-se solução nutriente de Krebs-Henseleit tamponada com bicarbonato, pH de 7,35-7,45, contendo 10 UI de insulina. A solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl - 120; KCl - 5,4; MgSO₄ - 2,5; CaCl₂ - 1,25; NaH₂PO₄ - 2,0; NaHCO₃ - 27; glicose - 11; acrescida de manitol - 4mM e EDTA 60mg) era oxigenada continuamente com mistura de O₂ 95% + CO₂ 5%, (pO_{2s} > 480mmHg) e aquecida a 37°C. Em seguida, realizava-se incisão do átrio esquerdo, o ápice do ventrículo esquerdo era puncionado para drenagem de solução que chegava ao interior do ventrículo esquerdo pela circulação de Thebesius e um pequeno balão de látex colapsado era colocado na câmara ventricular esquerda através da incisão no átrio esquerdo. O balão era conectado a cateter de duplo lume, que permitia que uma das vias fosse ligada a transdutor de pressão (Stathan P23dB) para avaliações da pressão ventricular e a outra possibilitava que se procedessem as variações do volume ventricular.

Extirpava-se a musculatura atrial direita de modo a se retirar o nó sino-atrial e, em seguida, escarificava-se a porção baixa do septo interatrial com agulha hipodérmica promovendo-se bloqueio atrioventricular total. A colocação de eletrodos de marcapasso artificial no miocárdio do ventrículo direito assegurava a manutenção da frequência cardíaca em 180bpm.

Realizaram-se 10 distensões do ventrículo esquerdo variando, rapidamente, a pressão diastólica e, em seguida, manteve-se a pressão diastólica em 20mmHg por 30min, para a preparação alcançar estabilidade funcional. Findo o tempo, a quantidade de líquido no balão era ajustada para que a pressão diastólica do ventrículo esquerdo fosse de zero mmHg (V₀) e realizava-se o primeiro registro das variáveis. Eram promovidos incrementos sucessivos de 10μl de solução salina, por meio de seringa de Hamilton, até que a pressão diastólica alcançasse 60mmHg. A cada adição de solução salina, aguardava-se 1min para que o coração isolado alcançasse equilíbrio funcional e procedia-se ao registro das variáveis: pressão intraventricular e sua primeira derivada temporal. Terminadas as avaliações funcionais os corações eram retirados da cânula e preparados para aferição do peso do ventrículo esquerdo (parede livre e septo interventricular).

Foram analisados os valores da pressão desenvolvida (DP: pressão sistólica menos pressão diastólica) e da primeira derivada temporal das pressões ventriculares (dP/dt). O estresse circunferencial foi calculado de acordo com Bing e cols.²¹. O estresse circunferencial foi estimado valendo-se dos dados de pressão, do volume da cavidade ventricular esquerda e do peso do miocárdio ventricular. Foi admitido

para o ventrículo esquerdo a forma de uma esfera de parede espessa, na qual o raio da cavidade ventricular (R_i), que é uma função do volume da cavidade (V_{cav}), pode ser estimado a partir da equação que define o volume da esfera: $V_{cav} = 4/3 \pi R_i^3$. O valor de R_i pode ser calculado por: $R_i = [V_{cav}/(4/3 \pi)]^{1/3}$. O volume da cavidade ventricular é igual ao volume da solução salina introduzido na cavidade (V_s) acrescido do volume do plástico que formava o balão (V_p), isto é: $V_{cav} = V_s + V_p$. Os volumes de salina introduzidos no balão eram sempre conhecidos e o volume do material plástico que compunha o balão era determinado levando-se em conta o seu peso (P_p) e a sua densidade (D_p): $V_p = P_p/D_p$. O peso do plástico constituinte do balão era determinado sempre que ele era desprezado e, admitindo informações do fornecedor*, D_p foi considerado como sendo 0,936.

Os valores do estresse (σ) foram estimados pela fórmula proposta por Mirsky²²: $\sigma = (PR_i^2/h) / (2R_i + h)$ onde h é a espessura da parede, cujos valores foram calculados considerando-se que, para uma esfera, h é a diferença entre o raio externo (R_e) e o raio interno (R_i) da esfera ventricular: $h = R_e - R_i$. O raio externo (R_e) da esfera formada pelo coração pode ser definido pela equação $R_e = [V_{cor}/(4/3 \pi)]^{1/3}$, onde V_{cor} é o volume cardíaco. Substituindo na equação de h temos: $h = [V_{cor}/(4/3 \pi)]^{1/3} - [V_{cav}/(4/3 \pi)]^{1/3}$ onde V_{cor} é o volume do ventrículo esquerdo formado por V_{cav} acrescido do volume da massa miocárdica que o cerca (V_{mio}), isto é: $V_{cor} = V_{cav} + V_{mio}$. O volume da massa miocárdica, admitida como homogeneamente distribuída em torno da cavidade, foi estimado, em cada coração, determinando-se as massas miocárdicas dos ventrículos esquerdos (M_{mio}) e relacionando-os com a densidade do músculo (D_{mio}), isto é: $V_{mio} = M_{mio}/D_{mio}$. Sendo D_{mio} = 1,05, teremos: $V_{mio} = M_{mio}/1,05$.

Curvas de Frank-Starling foram construídas plotando-se os estresses desenvolvidos como função das respectivas deformações ventriculares (ε), calculadas como as modificações de volume (ΔV) que ocorriam a partir do volume ventricular e expressas em relação à pressão diastólica de zero (V₀), isto é: $\epsilon = \Delta V/V_0$.

O relaxamento miocárdico foi avaliado considerando-se os valores negativos máximos da dP/dt (-dP/dt) e a constante de relaxamento miocárdico (τ). Para o cálculo de τ adotou-se o método proposto por Weiss, Frederiksen e Weisfeldt²³. Admite-se que a partir do valor negativo máximo da dP/dt, a pressão ventricular (P) se reduz segundo uma função exponencial do tempo, com ajuste possível pela equação: $P = Ae^{Bt}$, onde A e B são constantes da curva e τ o tempo decorrido a partir do momento de inscrição de -dP/dt. A constante τ é a recíproca negativa de B, isto é: $\tau = -1/B$.

As propriedades passivas da câmara ventricular foram avaliadas determinando-se a complacência da cavidade ventricular pelas relações pressões diastólicas (P_d)/deformações (ε) e as propriedades passivas do miocárdio pela estimativa da rigidez miocárdica, calculada por meio das relações estresses diastólicos (σ_d)/deformações (ε). As curvas P_d/V e σ_d/ε foram ajustadas pela equação: $y = A[e^{(Bx)} - 1]$, onde A e B são constantes das curvas. Para definir a complacência ventricular e a rigidez miocárdica, as tangen-

* Johnson & Johnson Indústria e Comércio Ltda

tes às curvas foram estimadas para os pontos de pressão diastólica de 15mmHg e de estresses diastólicos de 15g/cm² pela equação $dy/dx = k(y + A)$.

As análises ponderais dos corações submetidos à perfusão constaram de peso úmido (PU) e peso seco (PS) do ventrículo esquerdo. Para tanto, os mesmos eram submetidos à retirada do tecido remanescente da aorta, da pulmonar e dos átrios, assim como a parede livre do ventrículo direito. A avaliação do PU e PS foi realizada em balança analítica Mettler AE 50: a primeira depois de retirada do excesso de líquido aderente ao miocárdio e a segunda após manter a musculatura do ventrículo esquerdo em estufa (Fanem) regulada para 70°C por 48h.

Análise histológica e cariométrica foram realizadas em 10 animais de cada grupo. Findo o período de tratamento dos animais, sob anestesia com éter, o coração era retirado e fragmentos da porção média da parede livre do ventrículo esquerdo eram retirados e processados para serem corados por hematoxilina-eosina (HE) e *picrosirius*. Para determinação dos volumes nucleares dos cardiomiócitos, utilizou-se uma ocular de medição com tambor rotativo modelo K8x da marca Carl Zeiss adaptada a microscópio de luz com objetiva ampliadora de 100x. Após focalização do campo da ocular sobre as fibras musculares cardíacas cortadas longitudinalmente, os diâmetros longitudinal e transversal dos núcleos dos cardiomiócitos eram medidos e o volume do núcleo era calculado segundo a fórmula utilizada por Salvatore²⁴, a saber: $V = (A^2 \times B)/1,91$, onde V = volume nuclear; A o menor diâmetro e B o maior diâmetro nuclear. Assim, mediram-se 25 núcleos de cada animal, calculando-se os volumes nucleares para cada coração pela média das medidas.

Para a estimativa do teor de colágeno do miocárdio procedeu-se a coloração das lâminas pelo *picrosirius*. Em seguida, as lâminas foram analisadas sob observação de luz polarizada. As imagens obtidas foram processadas por meio de computador Pentium 100, utilizando software Optimas 4.10 e placa digitalizadora de imagens Oculus TCK-Coreco Inc. Após congelar as imagens, o analisador detecta tons de cinza que oscilam de 0 a 255 tons. Foi selecionada a faixa na qual se obtinham os tons do colágeno e as estimativas foram realizadas utilizando-se objetiva que ampliava as imagens em 10 vezes. Os resultados são expressos em porcentagem.

Os valores obtidos são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados pelos seguintes testes, conforme recomendável para cada comparação: a) teste "t" de Student; b) análise de variância a um critério²⁵ complementado pelo teste de Tukey ou pelo teste de Scheffé; c) análise de variância por postos de Kruskal-Wallis²⁶, complementado pelo teste de comparações múltiplas²⁷. Em todos os testes fixou-se em 5% ($p < 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Análise preliminar dos resultados permitiu caracterizar que os corações do grupo H comportaram-se heterogeneamente em relação às variações de volume ventricular (ΔV)

necessárias para atingir a pressão diastólica (P_d) de 60mmHg (fig. 1C). Alguns corações hipertrofiados alcançaram P_d de 60mmHg com ΔV equivalentes às dos animais controle; outros atingiram 60mmHg de P_d com ΔV claramente inferiores. As variações de volume ventricular dos animais do grupo C ($209 \pm 12,3 \mu l$) foram tomadas como referência para compor dois subgrupos. Um deles (subgrupo H_1) com variações de volume ventricular equivalentes ou superiores ($214 \pm 9,2 \mu l$) aos controles, e outro (subgrupo H_2) incluiu aqueles que necessitaram de volumes ventriculares inferiores ($143 \pm 5,8 \mu l$) ao da média dos controles subtraída de um desvio padrão para alcançar o valor limite da pressão diastólica. A essa diferença verificada entre os corações hipertrofiados associaram-se outras (teste t de Student para amostras independentes) relacionadas com: a) peso seco dos corações (H_1 : $180 \pm 2,9$ g; H_2 : $168 \pm 3,4$ g; $p = 0,02$); b) complacência ventricular (H_1 : $2,33 \pm 0,21$ mmHg/ μl ; H_2 : $3,02 \pm 0,24$ mmHg/ μl ; $p = 0,006$); c) rigidez miocárdica (H_1 : $2,78 \pm 0,22$ g/cm²; H_2 : $3,54 \pm 0,25$ g/cm²; $p = 0,0367$); d) constante de relaxamento H_1 : $28 \pm 1,9$ ms; H_2 : $43 \pm 3,5$ ms; $p = 0,0019$; e) estresse desenvolvido máximo ($137 \pm 6,0$ g/cm²; H_2 : $110 \pm 4,2$ g/cm²; $p = 0,0034$). Tais diferenças caracterizaram que ratos tratados com mesmas doses de isoproterenol desenvolvem hipertrofias miocárdicas com características funcionais distintas. Por esta razão, as demais comparações foram concretizadas considerando os dois subgrupos em separado.

Entre os dados ponderais verificou-se que o PU dos corações hipertrofiados (H_1 : 886 ± 15 mg; H_2 : 830 ± 19 mg) foram maiores (análise de variância a um critério) do que os dos controles (622 ± 15 mg) e os dos corações do grupo R (732 ± 24 mg). Constatou-se, ainda, que a massa miocárdica dos corações do grupo R foi maior que os do grupo C. As relações peso seco do coração/peso corpóreo (PS/PC) dos animais dos subgrupos H_1 ($0,61 \pm 0,01$ mg/g) e H_2 ($0,593 \pm 0,02$ mg/g) foram mais elevadas do que as dos animais dos grupos C ($0,463 \pm 0,001$ mg/g) e R ($0,455 \pm 0,001$ mg/g). Os dois últimos grupos não apresentaram diferença entre si.

Os valores dos V_0 (fig. 1A) dos corações dos animais do grupo R ($189 \pm 6,6 \mu l$) foram maiores (análise de variância a um critério) que os dos demais grupos (C: $150 \pm 7,6 \mu l$; H_1 : $156 \pm 10,1 \mu l$; H_2 : $142 \pm 11,9 \mu l$), enquanto a relação massa/volume (PU/V_0 - fig. 1B) foi maior (análise de variância por postos) nos subgrupos H_1 ($5,93 \pm 0,42$ mg/ μl) e H_2 ($6,15 \pm 0,36$ mg/ μl) do que nos grupos C ($4,23 \pm 0,28$ mg/ μl) e R ($3,9 \pm 0,19$ mg/ μl), que não foram diferentes entre si.

A análise dos resultados referentes à função sistólica permitiu caracterizar discrepância entre as informações dos dados referentes às pressões ventriculares e aos estresses parietais. As PD_{max} (fig. 2A) dos corações do grupo H_1 ($190 \pm 5,4$ mmHg) foram superiores (análise de variância a um critério) aos valores verificados em C ($155 \pm 4,4$ mmHg) e R ($144 \pm 4,0$ mmHg), e iguais aos de H_2 ($174 \pm 4,4$ mmHg). Resultados equivalentes (fig. 2B) foram verificados para a $+dP/dt$ (H_1 : $5,046 \pm 322$ mmHg/s = H_2 : $5,018 \pm 258$ mmHg/s > C: $3,852 \pm 229$ mmHg/s = R: $3,842 \pm 185$ mmHg). A interpretação destes resultados nos levaria a concluir que a hipertrofia induzida pelo isoproterenol resulta em aprimoramento da capacidade contrátil. Contudo, os dados relativos aos es-

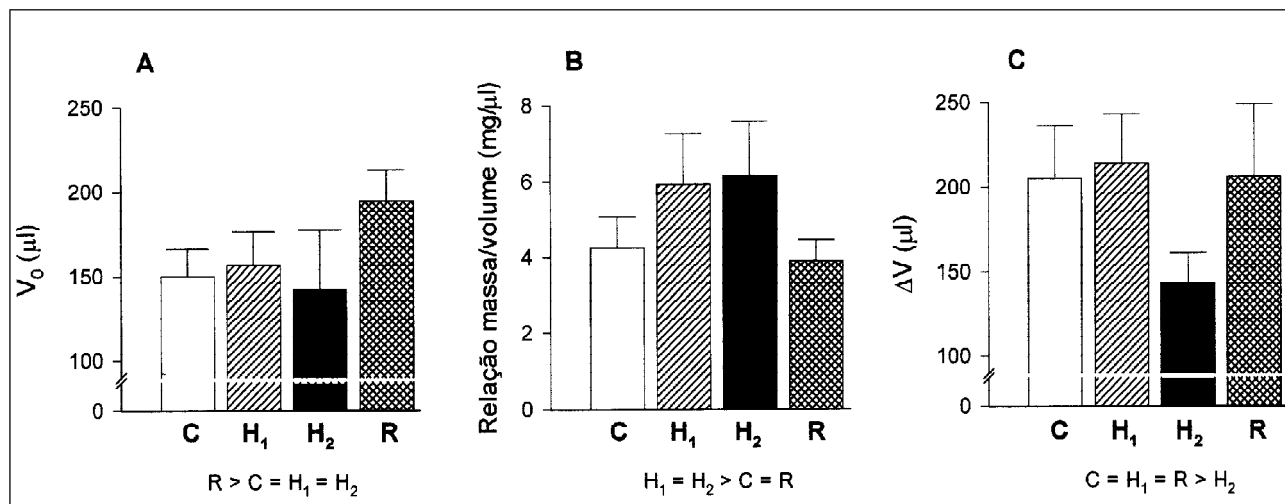


Fig. 1 - Painel A - Médias e erros padrão das médias dos volumes ventriculares correspondentes às pressões diastólicas de zero (V_0), expressos em microlitros (μl), dos corações dos grupos controle (C), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2) e do grupo regressão (R). Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura. Painel B - Médias e erros padrão das médias das relações massa/volume dos corações dos grupos C, H_1 , H_2 e R. Os resultados das análises estatísticas (análise de variância por postos) são indicados abaixo da figura. Painel C - Médias e erros padrão das médias das variações de volume necessárias para que as pressões diastólicas ventriculares atingissem 60mmHg, a partir de V_0 , dos corações dos grupos C, H_1 , H_2 e R. Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura.

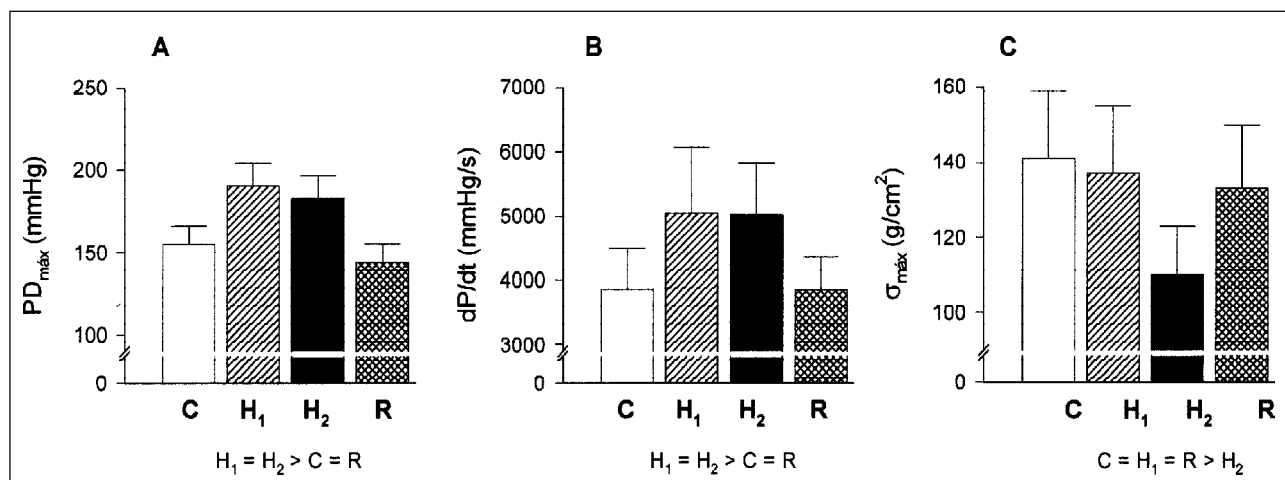


Fig. 2 - Painel A - Médias e erros padrão das médias da pressão desenvolvida máxima ($PD_{\text{máx}}$) dos corações dos grupos controle (C), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2) e do grupo regressão (R). Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura. Painel B - Médias e erros padrão das médias dos valores positivos máximos ($+dP/dt$) dos corações dos grupos C, H_1 , H_2 e R. Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura. Painel C - Médias e erros padrão das médias dos valores máximos do estresse circunferencial ($\sigma_{\text{máx}}$) dos corações dos grupos C, H_1 , H_2 e R. Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura.

tresses parietais (fig. 2C) foram contrários a esta suposição. A comparação dos valores de $\sigma_{\text{máx}}$ (análise de variância a um critério) caracterizou que os corações dos grupos C ($145 \pm 9,2 \text{g}/\text{cm}^2$), R ($133 \pm 6,0 \text{g}/\text{cm}^2$) e H_1 ($137 \pm 6,0 \text{g}/\text{cm}^2$) não diferiram em relação à capacidade máxima miocárdica em desenvolver força e todos tiveram valores superiores aos verificados para H_2 ($110 \pm 4,1 \text{g}/\text{cm}^2$).

A análise dos estresses desenvolvidos em função dos diferentes graus de distensões ventriculares (fig. 3) possibilitou avaliar a sensibilidade miocárdica ao estiramento. Os coeficientes angulares das retas formadas pelos estresses parietais e as deformações ventriculares foram

mais elevados (análise de variância a um critério) nos grupos C ($93 \pm 7,4 \text{g}/\text{cm}^2$) e R ($93 \pm 7,0 \text{g}/\text{cm}^2$) do que nos grupos com hipertrofia (H_1 : $75 \pm 6,0 \text{g}/\text{cm}^2$; H_2 : $68 \pm 5,1 \text{g}/\text{cm}^2$), caracterizando que nos corações hipertrofiados pelo tratamento com isoproterenol há prejuízo para o mecanismo de Frank-Starling. H_1 e H_2 não diferiram em relação a esta variável.

A análise dos indicadores do relaxamento miocárdico diferiu conforme se considera a constante de relaxamento ou a $-dP/dt$. A constante de relaxamento miocárdico (fig. 4A) indicou existir comprometido da fase final do relaxamento (análise de variância a um critério) nos corações do grupo H_2 ($43 \pm 3,5 \text{ms}$) em relação ao grupo H_1 ($28 \pm 1,9 \text{ms}$). As

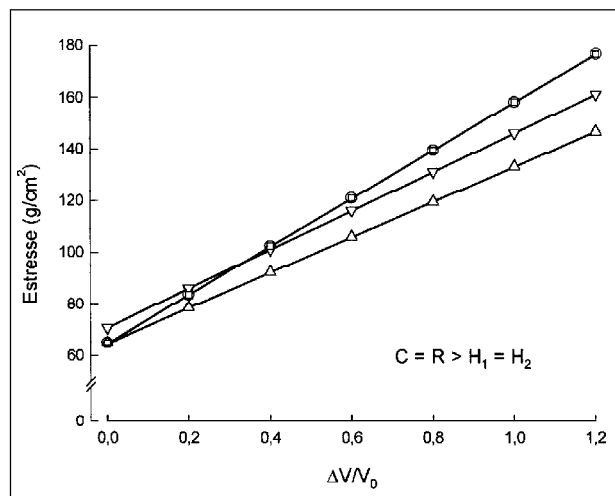


Fig. 3 - Relações estresses desenvolvidos/deformações ventriculares ($\Delta V/V_0$) dos corações dos grupos Controle (círculos), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1 - triângulos) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2 - triângulos invertidos) e do grupo regressão (R - quadrados). Notar que as retas dos grupos C e R se superpõem e têm inclinações mais acentuadas (análise de variância a um critério) dos que as dos grupos H_1 e H_2 . Os erros padrão e as equações das retas foram omitidos para efeito de clareza da figura.

médias de C ($34 \pm 3,2$ ms) e R ($33 \pm 1,3$ ms) não diferiram dos dois grupos hipertrofiados. Não foram estas as indicações dos resultados (análise de variância a um critério) da $-dP/dt$ (fig. 4B), que analisa a fase inicial do relaxamento: H_1 : 2.303 ± 120 mmHg/s = H_2 : 2.143 ± 103 mmHg/s > C: 1.776 ± 107 mmHg/s = R: 1.648 ± 68 mmHg/s.

As propriedades passivas da câmara ventricular: complacência da cavidade (fig. 5A) e rigidez miocárdica (fig. 5B), analisadas por meio das relações P_d /deformações (ϵ) e σ_r /deformações (ϵ), respectivamente, caracterizaram menor complacência ventricular (H_2 : $3,023 \pm 0,764$ mmHg/ μ l = R: $3,198 \pm 1,082$ mmHg/ μ l > C: $2,509 \pm 0,67$ mmHg/ μ l = H_1 : $2,331 \pm 0,687$ mmHg/ μ l) e rigidez miocárdica mais acentuada (H_2 : $3,546 \pm 0,791$ g/cm² = R: $3,771 \pm 1,122$ g/cm² > C: $3,086 \pm 0,637$ g/cm² = H_1 : $2,787 \pm 0,71$ g/cm²) nos grupos H_2 e R.

O quadro histológico do grupo hipertrofiado evidenciou focos localizados de necrose, preferencialmente subendocárdicos, acompanhados de fibrose miocárdica, com infiltrado inflamatório linfomononuclear. Nos animais do grupo R observaram-se cicatrizes fibrosas densas, subendocárdicas, envolvendo células miocárdicas atroficas. Os volumes nucleares médios dos corações hipertrofiados ($564 \pm 19,7$ mm³) foram maiores do que os do grupo R ($445 \pm 16,4$ mm³) e C ($336 \pm 10,2$ mm³). Entre estes dois últimos também foi identificada diferença. O teor de colágeno dos grupos H ($17,5 \pm 0,9\%$) e R ($20,2 \pm 0,34\%$) não diferiu e foi mais elevado que o do grupo C ($3,1 \pm 0,18\%$).

Discussão

A hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol ficou bem caracterizada pelo aumento da massa miocárdica,

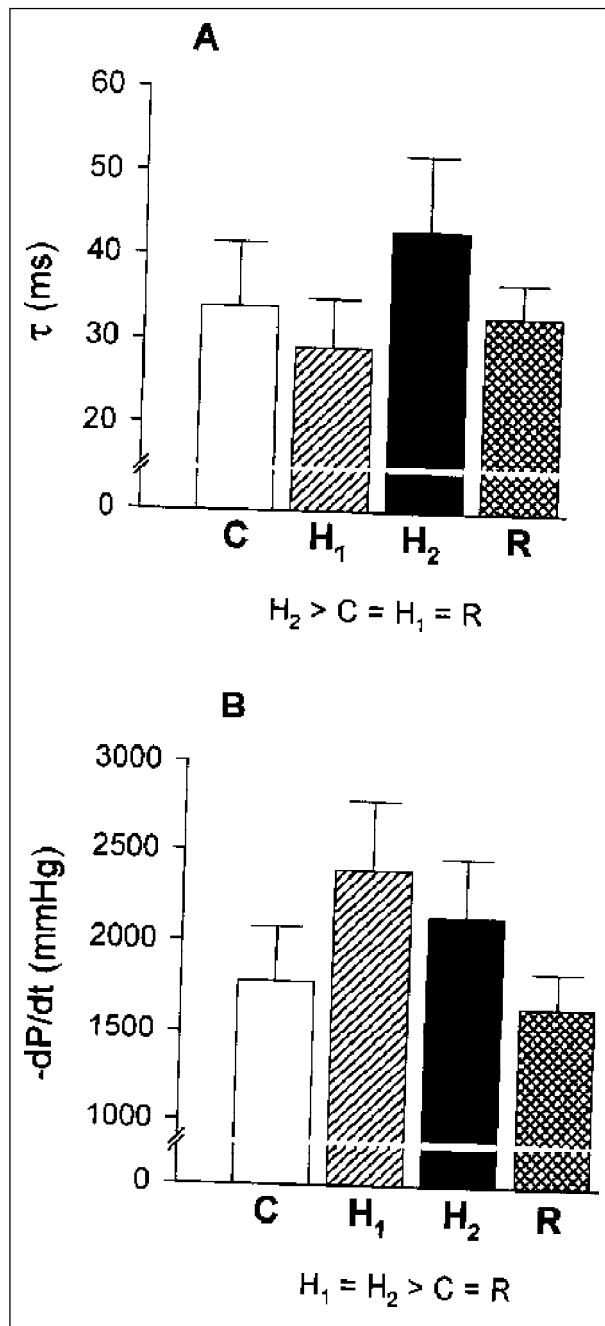


Fig. 4 - PAINEL A - Médias e erros padrão das médias da constante de relaxamento (τ) dos corações dos grupos controle (C), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2) e do grupo regressão (R). Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura. PAINEL B - Médias e erros padrão das médias dos valores negativos máximos ($-dP/dt$) dos corações dos grupos C, H_1 , H_2 e R. Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo da figura.

da relação massa/volume do ventrículo esquerdo e do volume nuclear nos subgrupos H_1 e H_2 . A maior massa miocárdica dos animais do grupo R, quando cotejada com a dos animais grupo C, deve-se ao crescimento ponderal ocorrido durante o período de observação mais prolongado, de três semanas, a que esses ratos foram submetidos. Esta inferên-

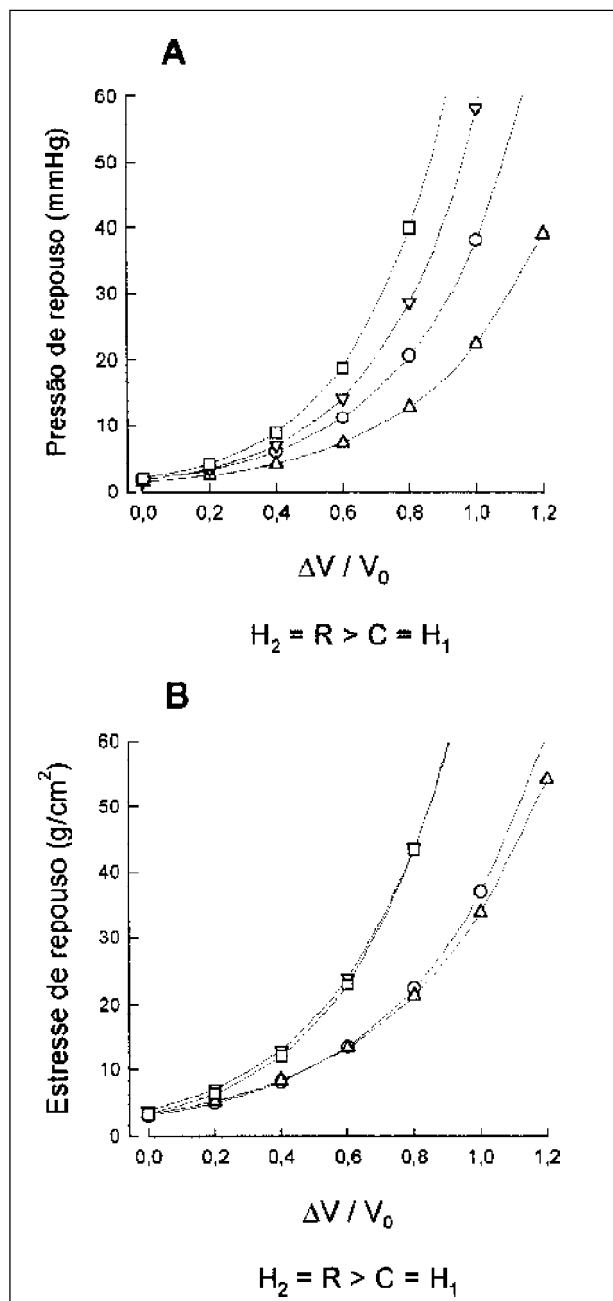


Fig. 5 - Painel A - Complacência ventricular (relações pressão de repouso/deformação ventricular) dos corações dos grupos controle (C - círculos), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1 - triângulos) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2 - triângulos invertidos) e do grupo regressão (R - quadrados). Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo das figuras. Painel B: Rigidez miocárdica (relações estresse de repouso/deformação ventricular) dos corações dos grupos controle (C - círculos), hipertrofiados com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg (ver texto) similar aos controles (H_1 - triângulos) ou com variação de volume necessária para pressão de repouso igual a 60mmHg menor que a média menos um desvio padrão dos controles (H_2 - triângulos invertidos) e do grupo regressão (R - quadrados). Os resultados das análises estatísticas (análise de variância a um critério) são indicados abaixo das figuras.

cia é possibilitada pela verificação de que a normalização do peso cardíaco pelo peso corpóreo não mostrou diferenças entre os grupos C e R. Por outro lado, a relação massa mio-

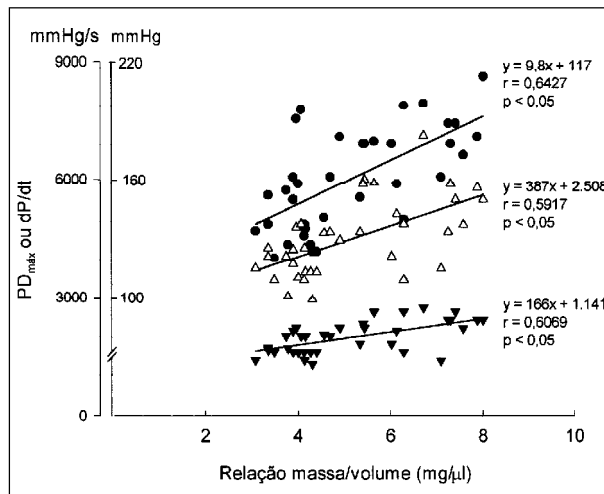


Fig. 6 - Valores das pressões desenvolvidas máximas (PD_{max} - círculos cheios) e valores absolutos positivos (triângulos vazios) e negativos (triângulos invertidos) máximos da primeira derivada temporal da pressão ventricular (dP/dt) projetados em função das respectivas relações massa/volume. Para as três variáveis foi verificado existir associação positiva estatisticamente significativa com a relação massa/volume, indicando que elas aumentam conforme se eleva a relação massa/volume. São apresentados, também, os resultados das correlações lineares para cada variável e as respectivas retas de regressão.

cárdica/volume ventricular permitiu identificar que os animais dos subgrupos hipertrofiados tiveram esse índice superior aos dos grupos C e R, caracterizando que estes ratos evoluíram com hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica. Em situações em que a hipertrofia cardíaca é acompanhada de necrose miocárdica, como ocorre com o isoproterenol, os valores da massa miocárdica analisados isoladamente não expressam a intensidade do processo de crescimento miocárdico com correção. Nestas circunstâncias, a variação volumétrica do núcleo dos cardiomiócitos auxilia na avaliação do processo hipertrofico²⁴. Os resultados indicaram expressivo crescimento nuclear nos ratos com hipertrofia miocárdica e, após suspensão do isoproterenol, houve regressão do tamanho do núcleo.

Evidenciou-se nos animais com hipertrofia miocárdica a existência de acentuada proliferação do tecido colágeno, que é achado comum neste modelo de hipertrofia^{5,9,12,27-34} como processo reparativo à necrose muscular induzida pela droga. Em adição, a concentração exacerbada do colágeno nos ratos do grupo regressão decorreu da ação pouca expressiva da collagenase miocárdica, que torna lento o retorno à normalidade da estrutura muscular³⁵⁻³⁷.

A informação mais destacada em nossos resultados, quando comparados aos dados da literatura, foi a verificação que animais submetidos ao mesmo esquema de tratamento com isoproterenol podem exteriorizar padrões de hipertrofia miocárdica distintos. Efetivamente, a literatura aborda a hipertrofia miocárdica decorrente da administração prolongada de isoproterenol como um processo que se instala de maneira uniforme nos animais, sendo inédita a descrição de que ratos tratados com isoproterenol possam ser associados em dois grupos distintos, atentando-se para as características estruturais e funcionais do coração. Ficou caracte-

zados nos animais tratados com isoproterenol que, em alguns (subgrupo H₂), os desvios da normalidade são marcadamente mais acentuados que em outros (subgrupo H₁), que têm peculiaridades funcionais muito próximas de ratos normais. Foi chamativo nos animais do grupo H₂ o conjunto: menor volume ventricular, menor massa miocárdica, comprometimento mais acentuado das propriedades diastólicas e sistólicas do ventrículo esquerdo. A conjugação destas anormalidades nos corações desse subgrupo é sugestiva de que, nesses casos, a ação de necrose miocárdica do isoproterenol foi mais acentuada, decorrendo perda muscular e fibrose reparativa mais intensas. Embora não existam informações para se assegurar que esta foi a patogenia conducente à diversidade morfofuncional dos dois subgrupos, é certo que esta interpretação concilia as discrepâncias verificadas entre os animais submetidos a estímulo beta-adrenérgico. A necrose miocárdica mais intensa permite compreender o menor peso cardíaco e o comprometimento da função contrátil, correndo por conta da fibrose intersticial exacerbada o acometimento das propriedades diastólicas.

Outro aspecto a merecer destaque nos resultados relaciona-se com as informações relativas à função sistólica. A se julgar pelos valores do estresse máximo, que seria o indicador mais recomendável entre os disponíveis para se avaliar a capacidade contrátil, a hipertrofia promovida pelo isoproterenol induz à depressão do estado contrátil. Não obstante, identificou-se que os corações hipertrofiados tiveram PD_{máx} mais acentuadas que os controle. A compressão deste aparente paradoxo pode ser entendido pelo rearranjo da expressão mais simples da lei de Laplace ($\sigma = PR/2h$): $P = 2\sigma \times h/R$

A equação nos indica que, para uma mesma força gerada pelo miocárdio, a pressão desenvolvida no interior da cavidade será diretamente proporcional à relação entre a espessura da parede e o raio da cavidade. Sendo a razão espessura da parede/raio da cavidade refletida adequadamente pela relação massa/volume, compreende-se que, para uma mesma força gerada durante a contração, a pressão será tanto maior quanto mais elevada for a relação massa/volume. A hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol configurou-se com aumento da relação massa/volume e, portanto, para um mesmo estresse sistólico, foi possível a ocorrência de pressões desenvolvidas mais elevadas do que nos corações normais. A associação entre habilidade em variar pressão e relação massa/volume fica bem caracterizada em nossos dados pela observação da figura 6. Os resultados relativos às pressões ventriculares (valores máximos de PD, +dP/dt e -dP/dt) foram correlacionados com as respectivas relações peso úmido/volume de cada coração e verificou-se existir associação significativa entre esses dados. Essa verificação, que, no limite, indica a maior facilidade para variar pressão em ventrículos com cavidades reduzidas, permite compreender o caráter benéfico das hipertrofias concêntricas no que diz respeito à função ejetante do ventrículo esquerdo. Dado que a pressão é a variável que rege os fluxos de líquidos, depreende-se que, embora possa haver função contrátil miocárdica deprimida, os ajustes de conformação da câmara podem propiciar melhor desenvolvimento de pressão, facilitando, portanto, o esvaziamento ventricular.

É oportuno assinalar a possibilidade desta peculiaridade de a conformação da câmara condicionar comportamentos distintos para a força gerada pelo miocárdio e para as pressões desenvolvidas no interior da câmara poder justificar conclusões discrepantes entre os autores que avaliaram a função sistólica no modelo. Aqueles que se valeram de valores pressóricos para analisar a capacidade contrátil foram levados a concluir que a hipertrofia promovida pelo isoproterenol conduz à acentuação da capacidade contrátil^{18,19}, enquanto os que analisaram a capacidade em gerar força identificaram a depressão da contração¹⁴⁻¹⁷.

Em adição à depressão da capacidade contrátil máxima dos corações hipertrofiados, a análise do mecanismo de Frank-Starling (estresses desenvolvidos/deformações) mostrou que as distensões ventriculares acentuam mais a capacidade contrátil dos corações do grupo C e R que dos subgrupos H₁ e H₂. Esses resultados são indicativos de que a administração prolongada do isoproterenol acarreta depressão do mecanismo de Frank-Starling.

Por outro lado, os resultados verificados para os animais do grupo R indicaram que 22 dias após a suspensão do isoproterenol houve restauração completa das propriedades sistólicas, tanto da capacidade contrátil máxima quanto da sensibilidade dos miofilamentos ao estiramento.

Nos diversos grupos experimentais, os valores da constante de relaxamento (τ) foram mais elevados nos ratos do subgrupo H₂, denotando comprometimento do relaxamento miocárdico, nestes animais. É comum a alteração das propriedades lusitrópicas na hipertrofia miocárdica^{38,39} em função de prejuízo da recaptação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático, por alterações na expressão da cálcio ATPase desta estrutura subcelular^{17,40,41}.

A restrição ao enchimento ventricular identificada pela redução da complacência ventricular e aumento da rigidez miocárdica nos corações dos animais do subgrupo H2 e naqueles do grupo R estão de acordo com a literatura, que é concorde em apontar as hipertrofias miocárdicas que evoluem com aumento da relação massa/volume e/ou com fibrose miocárdica como passíveis de terem limitado o enchimento ventricular^{5,6,9,18,29,31,32,34,42}.

Em síntese, foi possível caracterizar os ajustes funcionais decorrentes da hipertrofia miocárdica promovida pela administração do isoproterenol. No que tange à função sistólica, a acentuação da síntese protéica despertou modificações passíveis de se enquadrarem como prejudiciais à função contrátil, dado que a capacidade de gerar força esteve reduzida. Essas mesmas modificações, no entanto, promoveram redução relativa da cavidade ventricular, devido a aumento da relação massa/volume, e aprimorou a capacidade do ventrículo esquerdo em variar a pressão, supondo-se, portanto, que haja benefício da função ejetante do coração. Por outro lado, as modificações estruturais do miocárdio resultaram em alterações da complacência ventricular e da rigidez miocárdica que se constituíram em fatores limitantes do enchimento ventricular. Há, também, retardo no relaxamento miocárdico. Neste modelo de hipertrofia miocárdica, a análise dos dados relativos às funções sistólica e diastólica permitiu discriminar, de maneira inédita, dois subgrupos

de animais. Em um deles agruparam-se resultados que caracterizaram corações com menor peso cardíaco, menor capacidade em gerar força, lentificação do relaxamento, restrição da complacência ventricular e elevação da rigidez miocárdica, enquanto outro tem variáveis morfofuncionais pouco desviadas dos valores normais. Foi suposto que, nos primeiros, a necrose miocárdica despertada pelo isoproterenol ocorre de forma mais intensa, resultando maior perda de massa miocárdica e fibrose reparativa mais exube-

rante, que permitem compreender as divergências entre os dois subgrupos identificados.

Agradecimentos

À FAPESP (Processo 99/04533-4) e CNPq (Processo 300.692/80-3NV) e ao Sr. Airton Andrade Santos pela participação técnica, durante a realização das cirurgias necessárias para a realização deste trabalho.

Referências

1. Kannel WB, Gordon T, Offutt D. Left ventricular hypertension by electrocardiogram: prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann Intern Med* 1969; 71:89-105.
2. Kannel WB, Levy D, Cupples LA. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1978; 10: 135-40.
3. Kannel WB. Prevalence and natural history of electrocardiographic ventricular hypertrophy. *Am J Med* 1983; 26(suppl. 3A): 4-11.
4. Braunwald E. ACE inhibitors - A cornerstone of the treatment of heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 351-3.
5. Benjamin EJ, Jalil JEE, Tan, L.B.; CHO, K.; WEBER, K.T.; CLARK, W.A. - Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 1989; 54: 373-91.
6. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardium stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989; 64: 1041-50.
7. Allard MF, Deveny MF, Doss LK, Grizzle WE, Bishop SP. Alterations in dietary sodium affect isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 1135-45.
8. Cihák R, Kolár F, Pelouch V, Procházka J, Ostádal B, Widimsky J. Functional changes in the right and left ventricle during development of cardiac hypertrophy and after its regression. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 845-50.
9. Tang L, Taylor PB. Altered contractile function in isoproterenol-induced hypertrophy rat heart. *J Hypertens* 1996; 14: 751-57.
10. Beznak M. Hemodynamics during the acute phase of myocardial damage caused by isoproterenol. *Can J Biochem Physiol* 1962; 40: 25-30.
11. Beznak M, Hacker P. Hemodynamics during the chronic stage of myocardial damage caused by isoproterenol. *Can J Biochem Physiol* 1964; 42: 269-74.
12. Lin YC. Hemodynamics in the rat with isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1973; 6: 213-20.
13. Baldwin KM, Ernst SB, Mullin WJ, Schrader LF, Herrick RE. Exercise capacity and cardiac function of rats with drug-induced cardiac enlargement. *J Appl Physiol. Respirat Environ Exercise Physiol* 1982; 52: 591-95.
14. Tse J, Brackett ML, Kuo JF. Alterations in activities of cyclic nucleotide systems and in B-adrenergic receptor-mediated activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during progression and regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Acta* 1978; 542: 399-411.
15. Hayes JC, Wyss VL, Schenck RS, Cohen ML. Effects of prolonged isoproterenol infusion on cardiac and vascular responses to adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237: 757-63.
16. Vassalo DV, Vasquez EC, Cabral AM. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. *Pharmacol Res Commun* 1988; 20: 61-72.
17. Stein B, Bartel S, Kirchhefer H, et al. Relation between contractile function and regulatory cardiac proteins in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 1996; 270: H2021-H8.
18. Taylor PB, Tang Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62: 384-9.
19. Tang Q, Taylor PB, Helbing RK. Catecholamine induced cardiac hypertrophy. *Can J Cardiol* 1987; 3: 311-16.
20. Taylor PB, Helbing RK, Rourke S, Churchill D. Effects of catecholamine-induced cardiac hypertrophy on the force-interval relationship. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67: 40-6.
21. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 283-90.
22. Mirsky I. Elastic properties of the myocardium. A quantitative approach with physiological and clinical applications. In: Berne RM, Spereckakis N, Gerger SR. *Handbook of Physiology. The Heart*. Baltimore: Williams and Wwilkins, 1979; Vol. 1: 479-531.
23. Weiss JL, Frederiksen JL, Weisfeldt ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fail in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 1976; 58: 751-60.
24. Salvatore CA. Sobre a natureza da hipertrofia nuclear das células musculares uterinas durante a gravidez. *Na Bras Gin* 1948; 5: 454-62.
25. Sokal RR, Rohlf FJ, Biometry WA. (eds). San Francisco: Freedman and Company, 1969: 776.
26. Siegel S. *Estadística no Paramétrica Aplicadas a las Ciências de la Conducta*. México: Ed. Trillas, 1975: 346.
27. Hollander M, Wolfe DA. *Non Parametric Statistical Methods* (eds). New York: John Wiley & Sons, 1977: 503.
28. Chappel CI, Rona G, Gaudry R. Relationship between. Thyroid function and cardiotoxic properties of isoproterenol. *Endocrinology* 1959; 65: 208-15.
29. Stanton HC, Bowman Z. Studies on isoproterenol: induced cardiomegaly in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 1967; 10: 87-9.
30. Wexler BC. Serum creatine phosphokinase activity following isoproterenol-induced myocardial infarction in male and female rats with and without arteriosclerosis. *Am Heart J* 1970; 79: 69-79.
31. Alderman EL, Harrinson DC. Myocardial hypertrophy resulting from low dosage isoproterenol administration in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 268-70.
32. Deshaies Y, Heblanc J, Willemot J. Studies on protein metabolism during isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. In: Roy PG, Harris P. (Ed). *The Cardiac Sarcoplasm*. Baltimore: University Park Press, 1975; vol. 8: 387-85..
33. Collins P, Billings CG, Barer GR, Doly JJ. A quantitation of isoprenaline-induced changes in the ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 1975; 9: 787-806.
34. Taylor PB, Swanson CT, Draisey TF. Quantitative histological changes in isoproterenol induced cardiac growth. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977; 17: 341-44.
35. Knufman NMJ, Van Der Laarse A, Vlieggen HW, Brinkman CJJ. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. *Res Commun Chem* 1987; 57: 15-32.
36. Chakraborty A, Eghbaldi M. Collagenase activity in normal rat myocardium: an immunohistochemical method. *Histochemistry* 1989; 92: 391-6.
37. Tyagi SC, Reddy HK, Voelker DJ, Tjahja IE, Weber KT. Myocardial collagenase in failing human heart. *Clin Res* 1993; 41: 681 A.
38. Reddy HK, Tyagi SC, Tjahja IE, Voelker DJ, Campell SE, Weber KT. Activated myocardial collagenase in idiopathic dilated cardiomyopathy: a marker of dilatation remodeling. *Circ Res* 1993; 41: 660 A.
39. LeCarpentier Y, Waldenström A, Clergue M, et al. Major alterations in relaxation during cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis in guinea pig. *Cir Res* 1987; 61: 107-116.
40. Cory CR, Grange RW, Houston ME. Role of sarcoplasmic reticulum in loss of load sensitive relaxation in pressure over load cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1994; 266: H68-H78.
41. Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, et al. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *Am J Physiol* 1995; 269: H638-H47.
42. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 341-8.