

Comparação de Diferentes Métodos para Medida do Tamanho do Infarto Experimental Crônico em Ratos

Comparison of Different Methods to Measure Experimental Chronic Infarction Size in the Rat Model

Marcos F. Minicucci, Paula S. Azevedo, Daniella R. Duarte, Beatriz B. Matsubara, Luiz S. Matsubara, Álvaro O. Campana, Sergio A. R. Paiva, Leonardo A. M. Zornoff

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - Botucatu, SP - Brasil

Resumo

Objetivo: Avaliar as diferenças entre três métodos para medida do infarto experimental em ratos, em relação ao método tradicional.

Métodos: A área infartada por histologia (AREA), o perímetro interno da cavidade infartada por histologia (PER) e o perímetro interno por ecocardiograma (ECO) foram comparados ao método tradicional (análise histológica das circunferências epicárdicas e endocárdicas da região infartada – CIR). Utilizaram-se ANOVA de medidas repetidas, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, o método de concordância de Bland & Altman e o teste de correlação de Spearman. A significância foi $p < 0,05$.

Resultados: Foram analisados dados de 122 animais, após 3 a 6 meses do infarto. Houve diferença na avaliação do tamanho do infarto entre CIR e os outros três métodos ($p < 0,001$): CIR = 42,4% (35,9-48,8), PER = 50,3% (39,1-57,0), AREA = 27,3% (20,2-34,3), ECO = 46,1% (39,9-52,6). Assim, a medida por área resultou em subestimação de 15% do tamanho do infarto, enquanto as medidas por ecocardiograma e pelo perímetro interno por meio de histologia resultaram em superestimação do tamanho do infarto de 4% e 5%, respectivamente. Em relação ao ECO e PER, apesar de a diferença entre os métodos ser de apenas 1,27%, o intervalo de concordância variou de 24,1% a -26,7%, sugerindo baixa concordância entre os métodos. Em relação às associações, houve correlações estatisticamente significativas entre: CIR e PER ($r = 0,88$ e $p < 0,0001$); CIR e AREA ($r = 0,87$ e $p < 0,0001$) e CIR e ECO ($r = 0,42$ e $p < 0,0001$).

Conclusão: Na determinação do tamanho do infarto, apesar da alta correlação, houve baixa concordância entre os métodos. (Arq Bras Cardiol 2007;89(2):93-98)

Palavras-chave: Infarto do miocárdio/fisiopatologia, ratos.

Summary

Objective: To evaluate the differences between three methods for the measurement of experimental infarction in rats in comparison to the traditional method.

Methods: Histological analysis of the infarction area (AREA), histological analysis of the internal cavity perimeter (PER) and echocardiogram analysis of the internal perimeter (ECHO) were compared to the traditional method (histological analysis of the epicardial and endocardial circumferences of the infarction region - CIR). Repeated ANOVA measurements were used in conjunction with the Dunn multiple comparison test, the Bland and Altman concordance method and the Spearman correlation test. Significance was established as $p < 0.05$.

Results: The data of 122 animals were analyzed, 3 to 6 months after the infarction. Infarction size assessments revealed differences between CIR and the other three methods ($p < 0.001$): CIR = 42.4% (35.9-48.8), PER = 50.3% (39.1-57.0), AREA = 27.3% (20.2-34.3), ECHO = 46.1% (39.9-52.6). Therefore, measurement by area underestimated the infarct size by 15%, whereas the echocardiogram and histological internal perimeter measurements overestimated the infarct size by 4% and 5%, respectively. In relation to ECHO and PER, even though the difference between the methods was only 1.27%, the concordance interval ranged from 24.1% to -26.7%, suggesting a low level of concordance between the methods. In relation to associations, statistically significant correlations were found between: CIR and PER ($r = 0.88$ and $p < 0.0001$); CIR and AREA ($r = 0.87$ and $p < 0.0001$) and CIR and ECHO ($r = 0.42$ and $p < 0.0001$).

Conclusion: Despite the high level of correlation, there was a low level of concordance between the methods to define infarct size. (Arq Bras Cardiol 2007;89(2):83-87)

Key words: Myocardial infarction/physiopatology; rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Leonardo A. M. Zornoff •

Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP - 18618-000 - Botucatu, SP - Brasil

E-mail: lzornoff@cardiol.br

Artigo recebido em 05/12/06; revisado recebido em 16/02/07; aceito em 26/06/07.

Introdução

O modelo do infarto agudo do miocárdio experimental vem sendo amplamente usado, há alguns anos, para o estudo das alterações fisiopatológicas que ocorrem durante e após o infarto isquêmico.

Dentre os vários modelos existentes, destaca-se o infarto experimental em ratos. Esse fato ocorre pela praticidade, pelo custo relativamente baixo em comparação com outros animais, mas, principalmente, pela reprodutibilidade dos resultados em relação aos estudos clínicos realizados posteriormente^{1,2}.

Um dos aspectos mais relevantes desse modelo refere-se ao tamanho do infarto. Aceita-se que as conseqüências hemodinâmicas agudas da oclusão coronariana guardam estreita relação com o tamanho do infarto³⁻⁶. Cronicamente, podem ocorrer alterações na composição, na massa, no volume e na geometria cardíaca, as quais são chamadas coletivamente de remodelação cardíaca⁷⁻⁹. O grau de remodelação ventricular está diretamente associado a pior prognóstico, em razão da maior incidência na formação de aneurismas, ruptura ventricular, arritmias e da associação com a progressão da disfunção ventricular. De maneira similar ao que ocorre com as alterações agudas, o tamanho do infarto é o principal determinante da presença e intensidade da remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio (IAM)⁷⁻⁹. Desse modo, a determinação do tamanho do infarto é ponto crítico no estudo das repercussões morfológicas e funcionais após o infarto.

Em estudos experimentais, o tamanho do infarto vem sendo avaliado preferencialmente por quatro diferentes métodos: 1) determinação da área infartada em relação à área do ventrículo esquerdo, determinada por histologia ou por planimetria (nesse último, a área infartada e o montante total do miocárdio são avaliados com auxílio de transiluminação); 2) histologia com a determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade; 3) histologia com a determinação das circunferências epicárdicas e endocárdicas dos segmentos infartados e não-infartados e 4) ecocardiograma com a determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade. A potencial limitação ao emprego dessas quatro diferentes técnicas é que o tamanho do infarto pode variar, o que dependerá do método utilizado. No entanto, o exato grau de variabilidade de cada técnica permanece por ser determinado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar as diferenças na estimativa dos tamanhos de infarto pelos quatro diferentes métodos.

Métodos

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal de nossa instituição, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Infarto experimental - Foram utilizados ratos Wistar machos que pesavam entre 200 e 250 gramas. O infarto agudo foi produzido de acordo com método já descrito previamente^{10,11}. Em resumo, os ratos foram anestesiados

com éter e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mononáilon 5.00 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração retornou ao tórax, os pulmões foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por suturas com algodão 10.

Os animais foram mantidos em gaiolas para recuperação, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, com controle de luz – ciclos de 12 horas, temperatura de aproximadamente 25° C e umidade controlada.

Estudo ecocardiográfico - Após período de observação de 3 a 6 meses, os animais sobreviventes (n = 122) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intramuscular, para o estudo ecocardiográfico¹¹. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em canaleta especialmente projetada, a qual permite leve rotação lateral esquerda para realização do exame, utilizando-se equipamento da Philips (modelo TDI 5500) dotado de transdutor eletrônico multifrequencial até 12 MHz. As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas nas imagens monodimensionais, obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. Todas as medidas foram efetuadas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography¹² e já validadas no modelo de ratos infartados¹³. O tamanho do infarto foi estimado pela determinação do perímetro interno da região infartada (segmento hipocinético/acinético) em relação ao perímetro total da cavidade (ECO). Esses valores foram medidos no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo longo e eixo menor, avaliados no plano medial.

Estudo morfométrico - Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram sacrificados e os corações retirados e dissecados, separando-se os ventrículos direito e esquerdo, incluindo o septo interventricular. Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol a 10% por um período de 48 horas, segundo método já descrito^{14,15}.

Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução Hematoxilina-Eosina (HE) e Masson para aferição do tecido infartado, empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens *Image Pro-plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

O tamanho do infarto foi determinado em cortes entre 5 e 6 mm do ápice, pelo fato de os valores dessa região corresponderem à média dos valores obtidos de cortes de todo coração^{16,17}. Para estimativa do tamanho do infarto por meio de análise histológica, foram utilizadas três técnicas: determinação da área infartada em relação à área total do ventrículo esquerdo (AREA), determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade (PER) e determinação das circunferências epicárdicas e endocárdicas dos segmentos infartados e não-infartados (CIR). O tamanho do infarto determinado pelo ecocardiograma e por histologia é expresso como porcentual

das medidas da circunferência ventricular.

Análise estatística - Utilizou-se como referência para a determinação do tamanho do infarto o método CIR, considerado o mais confiável para a estimativa da região infartada⁶. Assim, para a comparação das técnicas, utilizaram-se, como referência, os valores obtidos pelo método CIR; dessa maneira, compararam-se CIR x AREA, CIR x PER e CIR x ECO. Os procedimentos estatísticos adotados foram análise de variância de medidas repetidas, com comparação entre as medianas, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn; a significância foi estabelecida em $p < 0,05$; o teste de correlação de Spearman e o método de concordância de Bland & Altman, que permitiu estabelecer os intervalos de concordância entre os resultados relacionados ao tamanho de infarto, obtidos por duas técnicas diferentes.

O método de Bland & Altman é procedimento estatístico e gráfico para comparação de dois métodos, usados para mensuração de variáveis clínicas. O procedimento é o seguinte: calcula-se a diferença entre as medidas obtidas pelos dois métodos e a média e o desvio padrão dessas diferenças. Se os valores das diferenças têm distribuição normal, é esperado que 95% dos valores da diferença fiquem entre a média ± 2 SD. Esse intervalo é chamado de "limite de concordância". Se a faixa de variação desse intervalo for grande, conclui-se não haver concordância entre os dois métodos. Com o exame visual do gráfico, observa-se a grande dispersão dos dados. Se os dois métodos fossem concordantes, os valores da diferença entre os dois iriam se situar próximos ao valor zero.

Para as equações de correção, utilizamos a análise de regressão linear. Foram dados valores de "0" ao tamanho do infarto categorizado como pequeno, quando o valor da % de infarto encontrada era menor do que 40% nos diferentes métodos e dado o valor "1" e considerado como infarto de tamanho grande, quando o valor da % do infarto era maior ou igual a 40%. Dessa maneira, foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade dos métodos AREA, PER e ECO em relação ao método CIR.

Resultados

Analisamos os dados de 122 animais. Em relação ao tamanho do infarto obtido pelas diferentes técnicas, os dados estão apresentados em mediana e intervalos interquartis. Houve diferença estatisticamente significativa entre CIR e os outros três métodos (fig. 1). Assim, em relação ao grau de diferença entre os métodos, a medida por área resultou em subestimação de 15% do tamanho do infarto. Por sua vez, as medidas por ecocardiograma e pelo perímetro interno por meio de histologia resultaram em superestimação do tamanho do infarto de 4% e 5%, respectivamente.

A comparação entre métodos também mostrou diferenças entre AREA e os outros dois métodos ($p < 0,001$). Em relação ao ECO e PER, não foram encontradas diferenças. Desse modo, a próxima etapa foi analisar o intervalo de concordância dos dois métodos. Apesar de a diferença entre os métodos ser de apenas 1,27%, o intervalo de concordância variou de 24,11% a -26,65%, sugerindo baixa concordância entre eles (fig. 2).

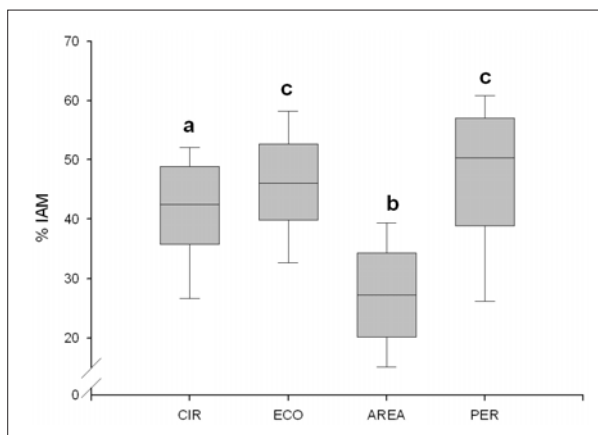


Fig. 1 - Diferenças na determinação do tamanho de infarto pelos diferentes métodos. CIR - circunferências endocárdicas e epicárdicas do segmento infartado avaliadas por histologia; PER - perímetro interno do segmento infartado avaliado por histologia; AREA - área do segmento infartado avaliado por histologia; ECO - perímetro interno do segmento infartado avaliado por ecocardiograma. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

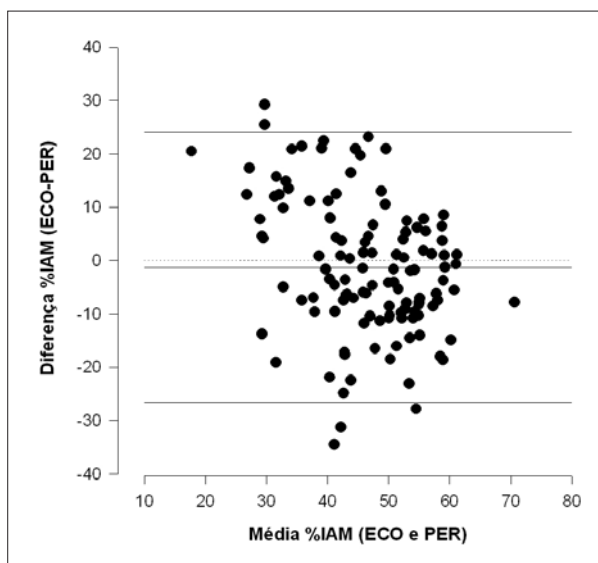
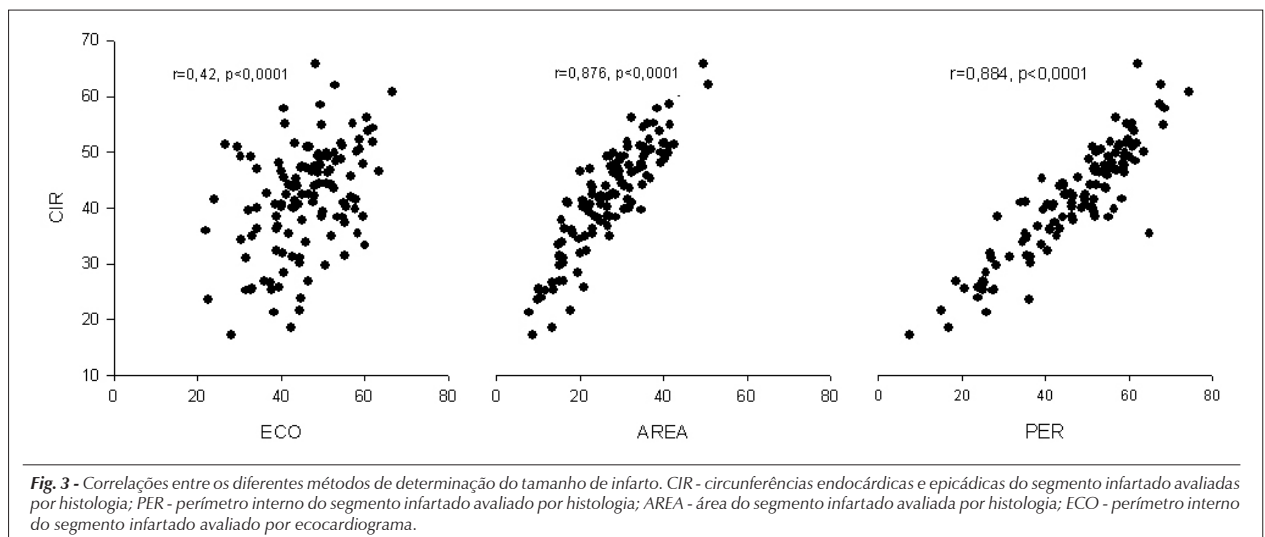


Fig. 2 - Intervalo de concordância entre os métodos PER (perímetro interno do segmento infartado avaliado por histologia) e ECO (perímetro interno do segmento infartado avaliado por ecocardiograma). Estão projetados, no eixo y, os valores da diferença entre os dois métodos usados para obter o tamanho do infarto (PER e ECO), e, no eixo x, os valores das médias dos resultados obtidos pelos dois métodos. Foram traçados os limites de concordância, ou seja, os valores da média das diferenças + 2 SD e a média das diferenças - 2SD. Além disso, foram traçadas as linhas correspondentes a zero e a linha correspondente ao viés (a média das diferenças entre os métodos).

Em relação às associações entre os métodos, houve correlações estatisticamente significativas entre: CIR e PER, com coeficiente de correlação de 0,88 e $p < 0,0001$; CIR e AREA, com coeficiente de correlação de 0,87 e $p < 0,0001$; e CIR e ECO, com coeficiente de correlação de 0,42 e $p < 0,0001$ (fig. 3). Além disso, avaliamos a influência do tamanho do infarto nas correlações CIR versus a razão dos outros métodos/CIR. Na comparação entre CIR e ECO/CIR,



houve forte correlação negativa ($r = 0,66$) entre os métodos e o tamanho do infarto. Assim, a análise mostrou maiores porcentagens de variação, ou maiores discrepâncias, entre os métodos nos infartos pequenos (<30%), sugerindo que o tamanho do infarto possa interferir na comparação entre os diferentes métodos (fig. 4). Para os outros métodos, os valores dos coeficientes de correlação foram: PER/CIR ($r = 0,28$) e AREA/CIR ($r = 0,44$).

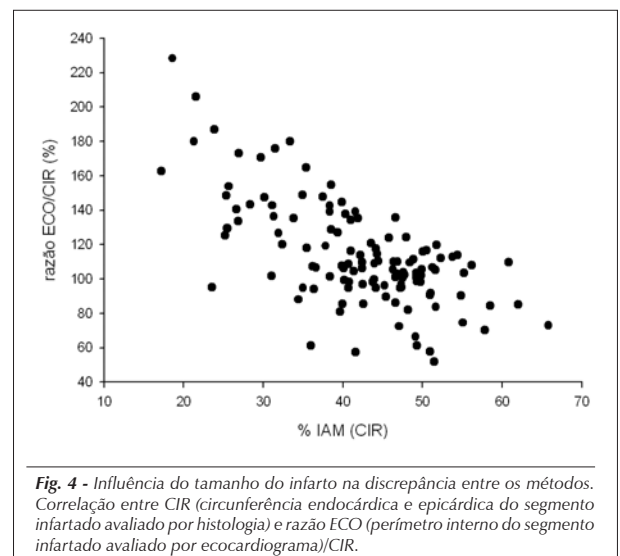
A análise de regressão linear possibilitou a elaboração de equações, cujo objetivo foi corrigir os valores obtidos na determinação do tamanho do infarto pelos diferentes métodos em função do método CIR. Para o tamanho do infarto estimado pelo perímetro interno, obtivemos a equação: $CIR = 10,69 + (0,662 \times PER)$, com coeficiente de determinação de 82%. Para o tamanho do infarto estimado pelo ecocardiograma, obtivemos a equação: $CIR = 21,81 + (0,437 \times ECO)$, com coeficiente de determinação de 17%; e para o tamanho do infarto estimado pela área, obtivemos a equação: $16,80 + (0,929 \times AREA)$, com coeficiente de determinação de 78%.

Na análise de sensibilidade e especificidade em comparação com CIR, os valores encontrados foram, respectivamente: ECO (87%, 46%), PER (96%, 65%) e AREA (14%, 100%).

Discussão

O nosso trabalho teve por objetivo comparar diferentes métodos para determinação do tamanho do infarto na fase crônica, no modelo experimental do rato. Nossos resultados sugerem que, a despeito de boa correlação, não existe concordância entre os diferentes métodos.

Um dos métodos utilizados para a determinação do tamanho do infarto no modelo do rato foi a análise da área infartada, em relação à área total do ventrículo esquerdo. Devemos considerar, entretanto, que após o infarto ocorrem alterações dinâmicas tanto no segmento infartado como na região não-infartada. Na região infartada, o tecido necrótico é substituído por tecido fibroso de cicatrização. Nesse processo, que no rato dura 21 dias, ocorre reabsorção do



tecido necrótico e deposição de colágeno. Nas fases mais tardias da cicatrização, ocorre contração da área fibrótica¹⁸. Na área não-infartada do ventrículo esquerdo, ocorrem diferentes graus de hipertrofia cardíaca, como adaptação à perda dos miócitos. Por causa dessas alterações, prevalece o conceito de que a determinação do tamanho do infarto por volume ou área pode resultar em erro. De fato, a reabsorção e retração da área infartada, somadas à hipertrofia da área não-infartada, poderiam resultar em subestimação do tamanho do infarto em relação à área infartada original⁶. Nossos dados estão em consonância com esse conceito, já que, por área, houve diferença, para menos, de 15% em relação ao tamanho do infarto avaliado pelas circunferências endocárdicas e epicárdicas.

Outro método utilizado para a determinação do tamanho do infarto foi a medida do perímetro interno do segmento infartado, em relação ao perímetro total da cavidade ventricular. Essa análise pode ser feita por dois métodos:

ecocardiograma e histologia. No entanto, a exemplo da estimativa por área, esses métodos podem apresentar importantes limitações. Simultaneamente à necrose das miofibrilas, há desintegração do colágeno interfibrilar. Esse fato ocasiona perda do tecido de sustentação, o que torna a região mais distensível e, conseqüentemente, mais suscetível a deformações. Assim, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada. Como resultado, há afilamento da região e dilatação do segmento infartado. Essa dilatação aguda, caracterizada por adelgaçamento e distensão da região infartada, é denominada expansão do infarto¹⁹. Um aspecto a ser considerado é que, secundário à expansão, a determinação do tamanho do infarto pelos perímetros internos pode superestimar o tamanho do infarto⁶. Outro achado interessante de nosso estudo foi que, para o ecocardiograma, tamanhos pequenos de infarto apresentaram maiores discrepâncias nos valores do tamanho do infarto, quando comparados ao método CIR. Além disso, em relação ao ecocardiograma, o procedimento cirúrgico pode resultar em alguns artefatos, principalmente aderências, o que causaria a identificação de segmentos com hipocinesia, mas não relacionados ao infarto.

Em concordância com esse conceito, nossos resultados mostraram que houve superestimação do tamanho do infarto tanto pelo ecocardiograma como pela histologia. Um dado interessante foi que a superestimação do tamanho do infarto pelos perímetros (ecocardiograma 4% e histologia 5%) foi menos pronunciada que a subestimação do tamanho do infarto pela área (15%).

Outro aspecto a ser considerado refere-se ao fato de que, na comparação de métodos, a presença de correlações estatisticamente significativas e com alto grau de coeficientes de correlação não assegura concordância entre os métodos. Como exemplo, poderíamos citar as comparações entre CIR e AREA. Nosso trabalho encontrou alto grau de coeficientes de correlação entre os métodos ($r = 0,87$), com alto grau de significância ($p < 0,0001$). Poderíamos interpretar que essas técnicas apresentaram o mesmo comportamento, no entanto não podemos inferir que os métodos são similares, já que não houve concordância entre os valores obtidos pelos diferentes métodos.

Finalmente, devemos considerar que, nesse modelo, o tamanho do infarto pode variar de 5% a 60%, dificultando a interpretação das repercussões do infarto. Utilizando o método das circunferências, Pfeffer e cols.⁶ relacionaram o tamanho do infarto com a presença de remodelação cardíaca e disfunção ventricular. Para infartos menores que 20%, os animais não apresentaram remodelação ou evidências de disfunção ventricular. Os animais com infartos moderados, entre 20% e 40%, apresentaram graus diversos de remodelação e disfunção ventricular, mas sem presença de sinais clínicos de insuficiência cardíaca. Os animais com grandes infartos apresentaram importante remodelação e disfunção ventricular, com sinais clínicos de insuficiência cardíaca. Por essa razão, autores, quando estudam esse modelo, usualmente separam os ratos em grupos com infartos pequenos (<40%) ou grandes ($\geq 40\%$). Em nosso estudo, o método que apresentou melhor capacidade de distinguir

infartos menores ou maiores que 40%, quando comparado ao método tradicional, foi o PER, que apresentou sensibilidade de 96% e especificidade de 65%.

Outros estudos compararam a estimativa do tamanho do infarto avaliado por dois métodos (ecocardiograma e por métodos histológicos). Em trabalho pioneiro, Litwin e cols.²⁰ não encontraram diferenças no tamanho do infarto avaliado por ecocardiograma e por histologia. No modelo de camundongos, a exemplo do nosso estudo, foi encontrada alta correlação entre os tamanhos de infarto avaliados por histologia e ecocardiograma²¹. Recentemente, Nozawa e cols.²², no modelo do rato, encontraram alta correlação entre os métodos ecocardiográfico e histológico para a estimativa do tamanho do infarto ($r = 0,88$). Entretanto, a exemplo de nosso estudo, a análise de Bland-Altman mostrou baixa concordância entre os dois métodos, com intervalo de concordância variando de - 51,4% a +42,9%²². Portanto, as evidências até o momento sugerem que, apesar de "altas" correlações, não foi identificada concordância entre os dois métodos. Outro aspecto a ser considerado é que não encontramos estudos anteriores que fizessem a comparação entre os quatro diferentes métodos avaliados no presente trabalho.

Os nossos resultados devem ser interpretados considerando-se potenciais limitações. A primeira particularidade refere-se às possíveis diferenças entre medidas realizadas *post-mortem* e *in vivo*. As medidas no animal intacto sofrem influência da pressão de distensão ventricular resultante de pressão diastólica e pressão de perfusão coronariana. Outra particularidade é o potencial efeito da fixação nos métodos morfométricos, já que a retração da cicatriz pode ser distinta do músculo normal e distorcer a área avaliada. Esses problemas poderiam ser superados com algum grau de estiramento miocárdico antes da fixação do coração, entretanto isso não foi feito no presente estudo. Além disso, não dispomos de dados sobre a variabilidade intra e interobservada ao ecocardiograma.

Pelo exposto, os valores do tamanho do infarto apresentam pouca concordância entre os diferentes métodos. Esse fato deve ser considerado na interpretação de estudos que façam associações entre as alterações morfológicas e funcionais após a lesão isquêmica e o tamanho infarto.

Em suma, na determinação do tamanho do infarto no modelo experimental do rato, apesar da alta correlação, encontramos baixa concordância entre os métodos.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação desse estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Litwin SE. The rat model of postinfarction heart failure. *Heart Fail.* 1995; 11: 82-95.
2. Pfeffer MA, Frohlich ED. Improvements in clinical outcomes with the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors: cross-fertilization between clinical and basic investigation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H2021-5.
3. Litwin SE, Raya TE, Anderson PG, Litwin CM, Goldman S. Induction of myocardial hypertrophy after ligation in rats decreases ventricular dilatation and improves systolic function. *Circulation.* 1991; 84: 1819-27.
4. Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction: effects on systolic function. *Circ Res.* 1981; 49: 618-26.
5. Raya TE, Gay RG, Lancaster L, Aguirre M, Moffett C, Goldman S. Serial changes in left ventricular relaxation and chamber stiffness after large myocardial infarction in rats. *Circulation.* 1988; 77: 1424-31.
6. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 503-12.
7. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81: 1161-72.
8. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 1985; 57: 84-95.
9. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-82.
10. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95: 208-14.
11. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana, AO, et al. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 276-82.
12. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-83.
13. Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail.* 1999; 5: 213-23.
14. Zornoff LAM, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Spadaro J. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2000; 5: 203-9.
15. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H1534-9.
16. Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104: 179-83.
17. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross Junior J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation.* 1993; 87: 598-607.
18. Fishbein MC, Maclean MB, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol.* 1978; 90: 55-70.
19. Matsubara BB, Zornoff LAM. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. *Arq Bras Cardiol.* 1995; 64: 559-63.
20. Litwin SE, Katz SE, Morgan PG, Douglas OS. Serial echocardiographic assessment of the ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994; 89: 345-54.
21. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, et al. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002; 15: 601-9.
22. Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39: 687-95.