

Eduardo Augusto Victor Rocha

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E NEOANGIOGÊNESE MIOCÁRDICA NO
TREINAMENTO VENTRICULAR DE CABRITOS JOVENS SUBMETIDOS À
SOBRECARGA DE PRESSÃO CONTÍNUA *VERSUS* INTERMITENTE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Renato Samy Assad

Co-orientadora: Profa. Vera D. Aiello

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©Reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Eduardo Augusto Víctor

Avaliação da apoptose e neoangiogênese miocárdica no treinamento ventricular de cabritos jovens submetidos à sobrecarga de pressão contínua *versus* intermitente / Eduardo Augusto Víctor Rocha. – São Paulo, 2016.

Tese(Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Renato Samy Assad.

Co-orientadora: Vera Demarchi Aiello.

*“Somos assim, sonhamos com o voo, mas tememos a altura.
Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio.
Porque é só no vazio que o voo acontece.
O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas.
Mas é isso que tememos, o não ter certezas.
Por isso trocamos o voo por gaiolas.
As gaiolas são os lugares onde as certezas moram”*

Fiodor Dostoievski

Dedicatória

À minha esposa Cláudia, companheira de mais de trinta anos, amiga e parceira de uma vida.

Aos meus filhos, Leticia, Isabela e Arthur, que fazem minha vida mais feliz e me estimulam a tentar progredir sempre.

Ao meu pai Dr. Luiz Fábio Rocha (In Memoriam), Médico, Professor da UFMG e Cardiologista, exemplo de vida e da medicina. Formado na primeira turma de Cardiologia da USP pelo Prof. Luiz Decourt.

À minha mãe Maria José Victor Rocha, exemplo de amor incondicional aos filhos.

Aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo constantes.

Agradeço aos meus irmãos, cunhados e concunhados, especialmente à Flávia e Renato, pela acolhida em São Paulo, durante a realização desta tese.

Agradecimientos

Ao Professor Dr. Renato S. Assad, Cientista vocacionado, meu orientador, que me estimulou a seguir na carreira acadêmica após tantos anos.

À Professora Dra. Vera Aiello, cuja co-orientação foi essencial no desenho deste projeto de pesquisa e na interpretação dos resultados encontrados.

Ao Tiago Almeida Meniconi, a quem devemos grande mérito na obtenção dos dados deste estudo, pela sua incondicional colaboração e dedicação.

À Dra. Maria Cristina Abduch, Médica Veterinária, sempre dedicada e disponível para realização dos ecocardiogramas dos animais.

Aos meus colegas Sérgio Caporali Oliveira e Marcus Gustavo Tito, pelo apoio durante minha ausência em prol da Tese.

Aos meus colegas da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, pelo incentivo à obtenção do Título de Doutorado.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1-	INTRODUÇÃO.....	1
1.1-	Linha de pesquisa sobre treinamento ventricular para a cirurgia de Jatene.....	5
1.2-	Neoangiogênese e hipertrofia ventricular.....	7
1.3-	Apoptose e hipertrofia ventricular.....	9
2-	OBJETIVOS.....	13
3-	MÉTODO.....	15
3.1-	Anestesia.....	16
3.2-	Procedimento cirúrgico.....	17
3.3-	Dispositivo de bandagem do tronco pulmonar.....	18
3.4-	Protocolo de sobrecarga sistólica do VD.....	19
3.4.1-	Grupo contínuo.....	20
3.4.2-	Grupo intermitente.....	20
3.4.3-	Grupo controle.....	22
3.5-	Avaliação ecocardiográfica.....	22
3.6-	Análise morfológica.....	23
3.6.1-	Pesagem das massas cardíacas.....	23
3.6.2-	Conteúdo de água dos tecidos.....	24
3.6.3-	Análise imuno-histoquímica (VEGF e CASPASE).....	25
3.6.4-	Detecção de células apoptóticas pelo túnel.....	32
3.7-	Análise estatística.....	36
4-	RESULTADOS.....	37
4.1-	Medidas hemodinâmicas.....	38
4.1.1-	Gradiente de pressão VD/TP.....	38
4.2-	Achados ecocardiográficos.....	39
4.3-	Achados morfológicos.....	41
4.3.1-	Pesagem das paredes cardíacas.....	41
4.3.2-	Conteúdo de água nas paredes cardíacas.....	42

4.3.3-	Expressão de VEGF nas paredes cardíacas.....	44
4.3.4-	Análise da apoptose nas paredes cardíacas.....	46
5-	DISCUSSÃO.....	50
5.1-	Parâmetros hemodinâmicos.....	52
5.2-	Parâmetros ecocardiográficos.....	53
5.3-	Parâmetros morfológicos.....	53
5.3.1-	Neoangiogênese.....	54
5.3.2-	Apoptose.....	57
5.4-	Implicações clínicas.....	59
5.5-	Limitações do estudo.....	60
5.6-	Perspectivas futuras.....	61
6-	CONCLUSÕES.....	63
7-	ANEXOS.....	65
8-	REFERÊNCIAS.....	74

Ao	Aorta
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (anti-apoptótico)
CA	Conteúdo de água
CASPASE CK	Caspase-citoqueratina clivada
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	<i>Endothelial constitutive nitric oxide synthase</i>
EPCs	Progenitores de células endoteliais
EV	Endovenoso
Ps	Peso seco
PBS	<i>Phosphate Buffered-Saline</i>
Pi	peso inicial
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>
TGA	Transposição de Grandes Artérias
TP	Tronco pulmonar
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
μl	Microlitro
μm	Micrometro

	Pág.
Tabela 1. Peso dos animais dos grupos Controle, Contínuo e Intermitente...	16
Tabela 2. Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico.....	27
Tabela 3. Espessura do VD nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente, medida pelo Ecocardiograma.....	40
Tabela 4. Conteúdo de Água das Paredes Cardíacas nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.....	43
Tabela 5. Expressão do VEGF das Paredes Cardíacas.....	45
Tabela 6. Número de células apoptóticas/campo das Massas Cardíacas (Caspase).....	46
Tabela 7. Número de células apoptóticas/campo das Massas Cardíacas (TUNEL).....	48

	Pág.
Figura 1. Esquema original da cirurgia de Jatene.....	3
Figura 2. Características morfológicas da apoptose e da necrose.....	11
Figura 3. Diagrama do procedimento cirúrgico.....	18
Figura 4. Dispositivo de bandagem ajustável do TP, produzido pela SILIMED (Rio de Janeiro).....	19
Figura 5. Diagrama cronológico da coleta de dados do grupo Intermitente.....	21
Figura 6. Técnica de Fulton para separar as massas cardíacas.....	24
Figura 7. Esquema da secção transversal do coração no nível dos músculos papilares (P) para coleta das amostras para análise histológica.....	26
Figura 8. Fotomicrografia de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica para marcação de VEGF.....	28
Figura 9. Fotomicrografia do mesmo campo histológico da Figura 8, onde se vê a área perivascular delimitada manualmente (linha vermelha).....	29
Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-caspase, obtido no endocárdio e sub-endocárdio do ventrículo direito.....	30
Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-caspase, obtido da região médio-mural do ventrículo direito.....	31
Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico submetido à reação de TUNEL, obtido da região subepicárdica do ventrículo direito....	34
Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico submetido à reação de TUNEL, obtido da região endocárdica do ventrículo direito.....	35
Figura 14. Evolução do gradiente pressórico sistólico entre o ventrículo direito e tronco pulmonar (mmHg) nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (mmHg) = média ± Erro	

	Padrão das Médias.....	39
Figura 15.	Espessura das paredes cardíacas dos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.....	41
Figura 16.	Massas do VD, Septo e VE (indexada para o peso corporal) nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (g/kg) = Média \pm Erro Padrão das Médias.....	42
Figura 17.	Conteúdo de água das paredes do VD, VE e Septo nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.....	44
Figura 18.	Expressão do VEGF no VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.....	45
Figura 19.	Número de células apoptóticas/campo (Método da Caspase) do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.....	47
Figura 20.	Número de células apoptóticas/campo (Método do TUNEL) do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente..	49

ROCHA EAV. Avaliação da apoptose e angiogênese miocárdica no retreinamento ventricular de cabritos jovens submetidos à sobrecarga de pressão contínua *versus* intermitente [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: A correção anatômica da transposição das grandes artérias após o período neonatal demanda a preparação prévia do ventrículo subpulmonar, com bandagem do tronco pulmonar, para induzir a hipertrofia ventricular. Estudos experimentais prévios demonstraram que a sobrecarga sistólica intermitente determina uma hipertrofia ventricular mais eficiente, em relação à bandagem convencional (fixa) do tronco pulmonar. Os mecanismos adaptativos envolvidos no retreinamento do ventrículo subpulmonar ainda não estão completamente estabelecidos, pois se sabe que, além da hipertrofia e hiperplasia das células contráteis, também células do interstício e vasos sofrem alterações fenotípicas. Permanece indefinida a taxa ideal de incremento, tanto da matriz extracelular quanto da vascularização do miocárdio na situação do retreinamento ventricular, para suportar a resistência sistêmica. **Objetivo:** Avaliar a adaptação do ventrículo subpulmonar no que se refere a apoptose e estímulo à neovascularização miocárdica em resposta à sobrecarga pressórica contínua *versus* intermitente, obtida pela bandagem ajustável do tronco pulmonar de cabritos jovens. **Método:** Foram utilizados 21 cabritos hípidos, com idade de 30 a 60 dias e pesos comparáveis, divididos em três grupos: Controle (n = 7, sem sobrecarga sistólica), Contínuo (n = 7, sobrecarga sistólica contínua do VD), Intermitente (n = 7, 12 horas/dia de sobrecarga sistólica intermitente do VD). A sobrecarga sistólica do VD foi mantida por 96 horas no grupo Contínuo e por quatro períodos de 12 horas, alternados com 12 horas de descanso, no grupo intermitente. Os animais do grupo Controle foram submetidos ao implante do dispositivo de bandagem, o qual foi mantido desinsuflado. As medidas hemodinâmicas foram tomadas diariamente, antes e após o ajuste da sobrecarga sistólica. Avaliações ecocardiográficas foram realizadas no pré-operatório e no final do protocolo de estudo. Após 96 horas de estudo, os animais foram mortos para avaliação dos parâmetros morfológicos (peso e conteúdo de água das massas cardíacas e análise imuno-histoquímica da apoptose e da expressão do VEGF). **Resultados:** Ao final do protocolo, o ecocardiograma revelou uma diferença

significativa da espessura do VD no grupo Intermitente (+129,2%), quando comparado ao grupo Contínuo (+58,2%; $p < 0,001$) e de ambos os grupos de estudo quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,001$). Sob a análise morfológica, ambos os grupos de estudo apresentaram ganho de magnitude semelhante nas massas do VD (Intermitente: +115,8%; Contínuo: +90,8%; $p < 0,0001$) e do septo (Intermitente: +55,8%; Contínuo: +45,4%; $p < 0,047$), em relação ao grupo Controle, apesar do menor tempo de sobrecarga pressórica no grupo Intermitente. O protocolo de sobrecarga sistólica do VD não influenciou a massa muscular do VE. Houve um discreto aumento do conteúdo de água do VD (Contínuo: +3,5%, Intermitente: +4,6%) e do septo (ambos os grupos de estudo: +3,5%) em relação ao grupo Controle ($p < 0,002$). A expressão do VEGF foi maior no VD do grupo Intermitente ($2,89\% \pm 0,41\%$; $p=0,005$) em relação ao VD dos demais grupos (Controle: $1,43\% \pm 0,18\%$; Contínuo: $1,80\% \pm 0,19\%$). A expressão desta molécula no miocárdio do VD do grupo Intermitente foi também maior que o do VE e septo dentro do mesmo grupo ($p < 0,050$). Não houve diferença na expressão do VEGF das demais massas cardíacas (VE: $p > 0,252$; Septo: $p > 0,740$). Em relação à apoptose, não foram observadas diferenças significativas no miocárdio do VD dos três grupos (Caspase: $p=0,784$; TUNEL: $p=0,374$). **Conclusões:** Ambos os grupos de estudo desenvolveram hipertrofia miocárdica do VD, não acompanhada de edema miocárdico importante ou apoptose. No entanto, a sobrecarga sistólica intermitente promoveu maior expressão do VEGF no miocárdio do VD. Esta associação entre sinalização de proliferação vascular e hipertrofia tem implicações importantes quando se objetiva preparar um ventrículo para suportar pressões sistêmicas, uma vez que o desejável é que a proliferação vascular ocorra de forma sustentada, permitindo uma hipertrofia do VD mais eficiente.

Palavras-chave: cabras; transposição dos grandes vasos; hipertrofia ventricular direita; hipertrofia ventricular esquerda; apoptose; fator A de crescimento do endotélio vascular/metabolismo; DNA nucleotidiltransferase; caspases; indutores da angiogênese; moduladores da angiogênese; neovascularização fisiológica.

Abstract

ROCHA EAV. Assessment of myocardial apoptosis and angiogenesis in ventricular retraining of young goats submitted to continuous versus intermittent overload [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introduction: Surgical correction of transposition of the great arteries beyond the neonatal period needs a previous pulmonary artery band to promote left ventricular hypertrophy thereby preparing the ventricle. Experimental studies have demonstrated that intermittent systolic overload causes a more efficient ventricular hypertrophy, as compared to traditional pulmonary artery banding. The adaptive mechanisms involved in the subpulmonary ventricle retraining are not completely established. Nevertheless, besides the hypertrophy and/or hyperplasia of the contractile cardiomyocytes, noncontractile cells (vascular and interstitial) from the stimulated ventricle also present structural phenotype changes. It remains unclear the ideal increasing rate of the myocardial interstitium as well as capillary vessel proliferation in the process of ventricular retraining before undertaking the arterial switch.

Objective: This study sought to assess adaptive changes of the subpulmonary ventricle in regards to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and apoptosis in young goats submitted to continuous versus intermittent systolic overload by means of an adjustable pulmonary artery band. **Methods:** 21 young goats were separated into 3 groups: Control (no systolic overload), Continuous (96-hour continuous systolic overload), and Intermittent (four 12-hour periods of systolic overload paired with a 12-hour resting period). Systolic overload was adjusted to achieve a 0.7 RV / aortic pressure ratio. Hemodynamic evaluations were performed before and after systolic overload every day postoperatively. Echocardiograms were obtained preoperatively and at the end of protocol. After the study period, the animals were humanely killed for morphologic assessment, apoptosis and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. **Results:** Echocardiography revealed a marked increase in RV wall thickness in the Intermittent group (+129.2%), compared with the Continuous group (+58.2%; $p < 0.001$), as well as both trained groups compared to Control group ($p < 0.001$). Regardless of the shorter systolic overload exposure of Intermittent group, both study groups had a similar increase in RV mass (Intermittent: +115.8%; Continuous: +90.8%; $p < 0.001$), and septal mass (Intermittent: +55.8%; Continuous: +45.4%; $p < 0.047$), compared with the Control group. No significant changes in the left ventricle mass were seen. There was a negligible but

significant increase in water content of RV (Continuous: +3.5%, Intermittent: +4.6%) and septal masses (both study groups: +3.5%) compared with that in the Control group ($p < 0.002$). RV VEGF expression was greater in the Intermittent group ($2.89\% \pm 0.41\%$) than in the Continuous ($1.80\% \pm 0.19\%$) and Control ($1.43\% \pm 0.18\%$) groups ($p < 0.023$). VEGF expression in the myocardium of the right ventricle in the Intermittent group was also greater than that in the left ventricle and septum within the same group ($p < 0.050$). There was no significant difference in VEGF expression between the other cardiac sections or within the Control and Continuous groups. Regarding apoptosis, there were no significant changes in the RV myocardium of the three groups (Caspase: $p = 0.784$; TUNEL: $p = 0.374$). **Conclusions:** Both study groups have developed RV hypertrophy with no apoptosis or relevant myocardial edema. Nevertheless, intermittent systolic overload causes upregulation of VEGF expression in the subpulmonary ventricle, an adaptation that provides a mechanism for increased myocardial perfusion during the rapid myocardial hypertrophy of young goats. The association of the marked increase in RV mass and increased angiogenesis signaling has an important implication on the subpulmonary ventricle retraining protocol by promoting a compensatory growth of the coronary vasculature, allowing for a more efficient hypertrophy.

Keywords: goats; transposition of great vessels; hypertrophy, right ventricular; hypertrophy, left ventricular; apoptosis; vascular endothelial growth factor A; DNA nucleotidylexotransferase; caspases; angiogenesis inducing agents; angiogenesis modulating agents; neovascularization, physiologic.

A transposição de grandes artérias (TGA) foi inicialmente descrita em 1797 por Baillie.¹ Ela se caracteriza pela discordância ventrículo-arterial. As cardiopatias congênitas apresentam prevalência de 3,7 a 8/1.000 nascidos vivos (4,8/1.000 na América Latina), e 5% a 7% dos quais apresentam TGA.² Acomete mais o sexo masculino na proporção 2/3 dos pacientes. Esta malformação aparentemente cursa sem maiores riscos na vida intrauterina. Durante a vida intrauterina, a resistência vascular pulmonar é muito maior que a sistêmica, o que faz o débito cardíaco do ventrículo direito preferencial para a circulação sistêmica fetal via canal arterial. Apenas 8% do débito cardíaco fetal segue para os pulmões.³ Portanto, pelo paralelismo da circulação fetal, as massas ventriculares do coração fetal encontram-se equalizadas. Entretanto, após o nascimento, esta malformação pode levar a criança a ter graves complicações. A resistência vascular pulmonar diminui significativamente. A queda progressiva desta resistência vascular interfere na capacidade do ventrículo subpulmonar (morfologicamente esquerdo) em suportar a circulação sistêmica. Portanto, a correção anatômica primária da TGA com septo ventricular funcionalmente íntegro deve ser idealmente realizada no período neonatal, podendo acontecer em no máximo dois meses de vida.⁴ Em 1975, Jatene e colaboradores publicaram a primeira experiência de sucesso na correção anatômica da TGA (Figura 1)⁵. Yacoub et al.⁶, Quaegebeur et al.⁷ e Castaneda et al.⁸ demonstraram que era possível realizar a correção cirúrgica anatômica nos primeiros dias de vida, com excelentes resultados. Posteriormente, vários autores aprimoraram a técnica, com publicações importantes, como Yacoub et al.⁹, Lecompte et al.¹⁰, dentre outras. Contudo, lactentes com septo ventricular

funcionalmente ou anatomicamente íntegro, operados após o período neonatal, não sobreviviam à correção cirúrgica no plano arterial.

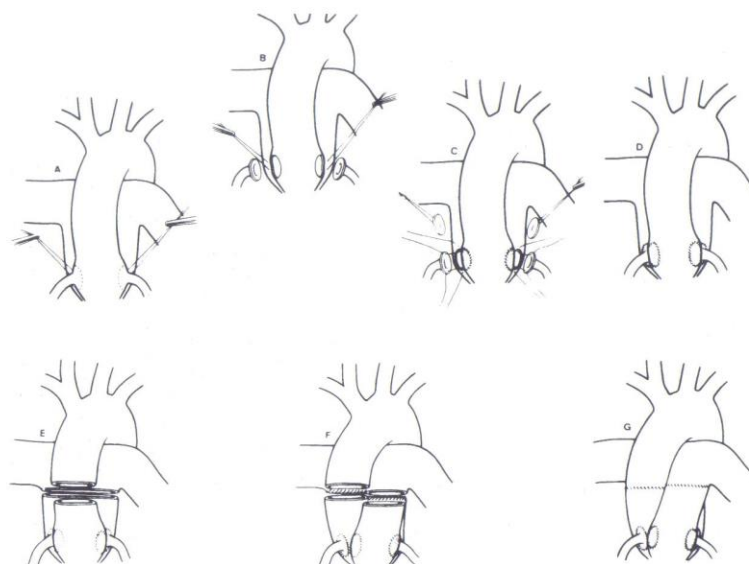


Figura 1. Esquema original da cirurgia de Jatene

Em 1977, Yacoub et al.⁶ propuseram o preparo ventricular, obtido pela bandagem do tronco pulmonar, para realização da correção anatômica em dois estágios, para aqueles casos de encaminhamento tardio aos centros terciários, isto é, após o período neonatal. Em meados dos anos 70, Mauck et al.¹¹ e Abe et al.¹² também publicaram sua experiência com a correção cirúrgica da TGA em dois estágios. Em 1989, o grupo de Boston introduziu o conceito de preparo rápido do VE, obtendo o retreinamento do ventrículo subpulmonar em um período médio de nove dias, realizando, então, a cirurgia de Jatene a seguir¹³. Entretanto, a qualidade funcional do processo de hipertrofia do ventrículo treinado pode não ser a mesma de um ventrículo normal¹⁴. Quinn et al.¹⁵ demonstraram que a evolução imediata da correção primária da TGA com a cirurgia de Jatene é semelhante à cirurgia em dois estágios. No entanto, na evolução tardia, evidencia-se a deterioração da função

ventricular e até mesmo indicação de transplante cardíaco. Lim et al.¹⁶ demonstraram que o preparo ventricular representa um fator de risco de mortalidade após a correção anatômica. Bautista-Hernandez et al.¹⁷ demonstraram que a função do ventrículo esquerdo pode deteriorar após a cirurgia de Jatene em dois estágios, com consequente aumento da mortalidade tardia. A disfunção ventricular causada pela sobrecarga aguda da bandagem do tronco pulmonar, na evolução tardia dos pacientes do grupo de Boston, foi cerca de 25%.¹⁸ Áreas de necrose e/ou fibrose foram descritas em estudos de preparo ventricular por bandagem fixa e contínua¹⁹. Todas estas observações nos fazem compreender por que pacientes submetidos à cirurgia de Jatene primária apresentam melhores resultados no longo prazo em relação a pacientes submetidos à correção cirúrgica em dois estágios²⁰. O regime ideal de sobrecarga pressórica (protocolo de treinamento) do ventrículo subpulmonar ainda é controverso. Tradicionalmente, a bandagem fixa do tronco pulmonar é utilizada na prática clínica, ajustada numa condição hemodinâmica diferente da situação pós-operatória, com o tórax aberto e sob efeito de drogas anestésicas. Reajustes adicionais da bandagem podem ser necessários no pós-operatório, através de nova toracotomia, o que aumenta a morbidade dos pacientes.^{21,22}

1.1- Linha de pesquisa sobre treinamento ventricular para a cirurgia de Jatene

Estudos experimentais prévios sobre dispositivos de sobrecarga sistólica ajustável do ventrículo pulmonar foram iniciados na década de 90, no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Trabalhos pioneiros utilizaram um cateter balão para promover a sobrecarga sistólica endovascular, com o objetivo de treinar o ventrículo pulmonar, sem a necessidade de intervenção cirúrgica a céu aberto^{23,24,25,26}. O cateter balão permitiu a manipulação da sobrecarga sistólica do ventrículo pulmonar, de modo a equalizar as massas ventriculares num período mínimo de seis dias. Posteriormente, estudos de Dias et al. demonstraram que é possível equalizar as massas ventriculares direita e esquerda em apenas 96 horas de sobrecarga sistólica do ventrículo direito (VD).^{27,28,29} Caneo et al. compararam os dois métodos de sobrecarga sistólica, endovascular (cateter balão) *versus* extravascular (bandagem ajustável), constatando hipertrofia de magnitude semelhante para os dois métodos.^{30,31} Realizou-se ainda um protocolo com bandagem intermitente do TP, no qual períodos de sobrecarga sistólica foram alternados com períodos de descanso, procurando aprimorar o processo de hipertrofia ventricular rápida. Este conceito de protocolo de sobrecarga sistólica intermitente foi inspirado no miocárdio de atletas que realizam exercícios aeróbicos com sobrecarga sistólica.^{32,33,34,35} Foi demonstrado que o protocolo intermitente promoveu maior hipertrofia ventricular, mesmo com uma menor exposição à sobrecarga sistólica. Entretanto, não foram evidenciadas diferenças funcionais entre os dois protocolos de sobrecarga sistólica (tradicional *versus* intermitente), na condição de repouso. Sob a condição de estresse

farmacológico, os animais submetidos à sobrecarga sistólica intermitente apresentaram melhor desempenho funcional do ventrículo treinado.^{36,37} Há grande interesse sobre o mecanismo adaptativo do ventrículo preparado, pois além da hipertrofia e hiperplasia das células contráteis, também células do interstício e vasos sofrem alterações. Dois aspectos são relevantes: a expansão da matriz extracelular, com desenvolvimento de fibrose, e a adequação do leito capilar ao aumento da massa ventricular. Deve-se ainda ressaltar que a resposta do miocárdio de animais jovens é diferente da apresentada pelos adultos.^{38,39} A proliferação celular persiste até algumas semanas após o nascimento, assim como o aumento no diâmetro dos miócitos. Não se sabe ao certo qual seria a taxa ideal de incremento da matriz extracelular e dos vasos na situação do miocárdio treinado, para suportar a resistência sistêmica. Abduch et al. demonstraram que a proliferação celular era semelhante entre os ventrículos treinados pelos dois protocolos de sobrecarga sistólica (convencional x intermitente).^{40,41,42} O número de células contráteis positivas para marcadores de proliferação celular era muito pequeno em relação ao das células intersticiais marcadas. Entretanto, naquele estudo não foi possível evidenciar células endoteliais em proliferação. Essa distinção se revela de suma importância, uma vez que a proliferação de células endoteliais indicaria o aumento numérico de capilares, necessário para manter a nutrição da massa miocárdica em expansão para suportar a resistência sistêmica. As informações obtidas nesta linha de pesquisa são importantes para o desenvolvimento de uma hipertrofia ventricular durável, sem disfunção ventricular. Desta forma, é essencial o perfeito entendimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação entre a hipertrofia “fisiológica” desejável e a hipertrofia “patológica” deletéria induzida pela bandagem do tronco pulmonar.

1.2- Neoangiogênese e hipertrofia ventricular

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína de sinalização que promove o crescimento de novos vasos sanguíneos. A rede de capilares é essencial para o transporte de oxigênio, nutrientes e moléculas de sinalização, além da remoção de CO₂ e de produtos finais do metabolismo das células, tecidos e órgãos⁴³. A neovascularização é dividida em dois componentes: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese embriônica ou clássica consiste no processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de hemangioblastos, que se diferenciam em células sanguíneas e endotélio maduro.^{44,45} Por outro lado, a angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da rede de capilares pré-existentes. Durante este processo, as células endoteliais maduras se dividem e são incorporadas em novos capilares. A sinalização do VEGF é necessária para o processo completo de vasculogênese e angiogênese. O VEGF é um fator mitogênico e de sobrevivência para as células endoteliais^{46,47,48}, além de promover a mobilização de monócitos e seletivamente permeabilizar o endotélio ao plasma e proteínas plasmáticas de modo reversível, sem causar lesões^{49,50}. Todas essas características são essenciais para a neoangiogênese. Nos casos em que ocorre a obstrução de vasos sanguíneos, o VEGF também promove a circulação colateral, para contornar as obstruções ao fluxo sanguíneo normal. Alterações da expressão de VEGF podem também demonstrar o caminho para a morte celular, bem como para o restabelecimento do funcionamento adequado da célula. Maharaj et al.⁵¹ sugerem que, além de estimular a proliferação endotelial, o VEGF promove a estabilização de vasos maduros. O VEGF e seu receptor (VEGFR) representam o eixo central para a migração de angioblastos e progenitores de células endoteliais

(EPCs). No adulto, as EPCs derivadas da medula óssea podem circular através dos vasos e são foco para neovascularização, onde se diferenciam em células endoteliais. As EPCs proliferam e migram em resposta aos fatores de crescimento e quimiocinas e podem contribuir para a neovascularização. A formação de tubos vasculares (vasculogênese) é seguida por fusão de ramos, para formar canais maiores (angiogênese) e, em seguida, através do recrutamento de células murais, para formar as camadas média e adventícia de artérias e veias. Estes processos são rigorosamente controlados por fatores de crescimento. Tanto o VEGF quanto a eritropoietina e seu receptor são importantes, tanto para a vasculogênese, como para a angiogênese. Estudos prévios em humanos e camundongos demonstraram que estes receptores facilitam a proliferação e migração de células endoteliais, além de inibirem a apoptose⁵². A migração de progenitores de células endoteliais é também dependente da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), que facilita o desacoplamento da matriz extracelular e das próprias células progenitoras, permitindo a sua migração ao longo de um caminho definido por gradientes atrativos e repulsivos de fatores solúveis.^{53,54} O VEGF e dois dos seus receptores, VEGFR-1 e VEGFR-2, são os reguladores-chave da vasculogênese.⁵⁵ A importância fundamental do VEGFR-2 é indicada por evidências de que a sua ausência impede o desenvolvimento de angioblastos, com a consequente falha na formação de plexos capilares primários.⁵⁶ Quanto ao retreinamento ventricular após o período neonatal, ainda não está estabelecida na literatura a associação entre melhor desempenho ventricular encontrado no protocolo de sobrecarga sistólica intermitente e a expressão da neoangiogênese, como base de uma hipertrofia ventricular sustentável e mais fisiológica.

1.3- Apoptose e hipertrofia ventricular

Outro mecanismo importante a ser considerado é a apoptose, i.e., a morte celular programada, que, identificada em células miocárdicas, pode definir o melhor protocolo de treinamento ventricular, uma vez que a associação entre apoptose e proliferação vascular tem implicações na evolução da função ventricular no longo prazo. Os processos de morte celular podem ser classificados, de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. A apoptose, conhecida como "morte celular programada" ("morte celular não seguida de autólise")⁵⁷ é um tipo de "autodestruição celular", que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução (diferentemente da necrose)⁵⁸. Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental⁵⁹. Em 1972, Kerr et al.⁶⁰ sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo na organogênese e hematopoese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos⁶¹. É um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode também ser causada por um estímulo patológico (como a lesão ao DNA celular). O termo apoptose também é usado tanto para exemplificar toda a cascata da morte celular, quanto para demonstrar o estágio final da fragmentação do DNA. A apoptose se caracteriza por algumas modificações morfológicas, tais como a

retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do ácido desoxiribonucleico (DNA) e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. Vários mediadores participam destas alterações, incluindo as citocinas, proto-oncogenes, membros da família de proteínas BCL-2, sistema de receptores ligados ao FAS (gene que decodifica a proteína reguladora da morte celular programada), proteases ICE-*like*, etc.⁶² De modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula, que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, exceto em alguns casos, como o das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas com o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos, sem causar um processo inflamatório (Figura 2)⁶³. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base⁶⁴. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer.

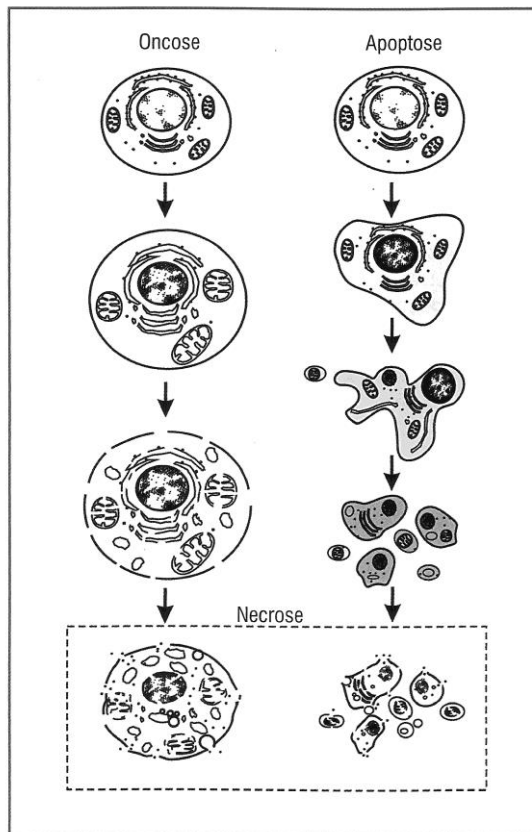


Figura 2. Características morfológicas da apoptose e da necrose

Estudos de Freude et al.⁶⁵ Demonstraram, em corações isolados de cães, que até 45 minutos de isquemia, seguidos de 6 horas de reperfusão, não determinavam a fragmentação do DNA. No entanto, após 90 minutos de isquemia, também seguidos de 6 horas de reperfusão, a morte celular estava presente em 90% dos cardiomiócitos, sendo observada a ativação da Caspase-3 em 30% destas células. Isto indica o início da cadeia apoptótica. Os autores concluíram que a morte celular é iniciada pela isquemia, porém a reperfusão é necessária para completar a cascata da apoptose. Sugeriram também que a morte celular na isquemia global aguda, seguida de reperfusão, ocorre predominantemente por necrose, sendo a apoptose irrelevante nesta condição. Para determinar o número de núcleos apoptóticos, a técnica do TUNEL deve ser empregada. Contudo esta reação pode

ser encontrada em miócitos necróticos e também em células vivas que estejam em reparo do seu DNA, demonstrando resultado falso positivo. A técnica de imunohistoquímica com anticorpos para caspase complementa a informação da ocorrência de apoptose no tecido miocárdico. A apoptose, quando identificada em células miocárdicas, pode definir o melhor protocolo de treinamento ventricular, uma vez que a associação entre apoptose e hipertrofia tem implicações na evolução da função ventricular no longo prazo. A situação ideal seria aquela na qual a hipertrofia ocorra de forma sustentada, não acompanhada de morte celular e, conseqüentemente, de fibrose e disfunção do miocárdio.

- 2.1- Analisar o processo de hipertrofia aguda do ventrículo subpulmonar de cabritos jovens em dois protocolos de sobrecarga sistólica;

- 2.2- Analisar a apoptose celular e a expressão de marcadores da neoangiogênese miocárdica neste processo de hipertrofia aguda do ventrículo subpulmonar.

O protocolo de pesquisa deste estudo (459/13) foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP, sob o protocolo SDC-3983/13/118, apreciado e aprovado na sessão 422/03/01 de 14.02.2003.

Foram selecionados aleatoriamente 21 cabritos hígidos, de estudos anteriores desta linha de pesquisa, com 30 a 60 dias de vida e pesos comparáveis (Tabela 1), divididos em três grupos: Controle (ausência de sobrecarga sistólica, n=7), Contínuo (sobrecarga sistólica contínua do VD, n=7) e Intermitente (sobrecarga sistólica intermitente do VD, n=7, 12 horas/dia). Todos os animais foram estudados por um período de 96 horas. Foi realizada avaliação pré-operatória pelo veterinário na entrada dos animais no biotério, para afastar doenças pré-existentes.

Tabela 1. Peso dos animais dos grupos Controle, Contínuo e Intermitente

Controle n=7	Contínuo n=7	Intermitente n=7	Valor de p
12,00 ± 1,00	9,39 ± 0,58	9,84 ± 0,79	0,076

Valores (Kg) = Média ± Erro Padrão das Médias.

3.1- Anestesia

Os animais permaneceram 24 horas em jejum antes da cirurgia. A indução anestésica foi feita com quetamina (20 mg/ kg, intramuscular). Os animais foram pesados e submetidos à tricotomia cervical e no hemitórax esquerdo. Em seguida, uma linha de infusão venosa foi obtida através de punção da veia cervical com

cateter 18G (BD, Juiz de Fora, MG), para administração de drogas e infusão de soro fisiológico. Os animais foram então sedados com pentobarbital sódico (nembusal, 5-10 mg/Kg, via intravenosa) e intubados. A ventilação mecânica (Harvard 708, South Natick, MA, E.U.A.) foi mantida com fração inspirada de oxigênio de 100% e volume corrente de 15 ml/kg. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, monitorizados com ECG e preparados para procedimento estéril. A anestesia foi mantida com pentobarbital sódico (nembusal, 5-10 mg/Kg) e quetamina (1 mg/kg), ambos por via intravenosa. Todos os animais receberam antibioticoterapia por via intramuscular (cefazolina 500 mg e gentamicina 40 mg), iniciada imediatamente antes da cirurgia e mantida até o final do protocolo. Também foram administrados digoxina (0,005 mg/Kg por via intravenosa a cada 12 horas) e heparina (2500 U a cada 12 horas, por via subcutânea) até o fim do protocolo.

3.2- Procedimento cirúrgico

Foi realizada toracotomia lateral esquerda no 4º espaço intercostal para abordar a via de saída do VD, bem como do TP e da aorta torácica descendente (Ao). Foram implantados três cateteres (intracath 17G) previamente heparinizados no VD, TP e Ao, conforme diagrama da Figura 3. Os cateteres foram fixados com suturas em bolsa de prolipropilene 5-0 e exteriorizados através da parede torácica, próximos à coluna vertebral, onde também foram fixados à pele com fio de algodão 3-0. Em seguida, estes cateteres foram testados (permeabilidade e curvas de pressão) e mantidos heparinizados. As pressões, proximal e distal ao dispositivo de bandagem ajustável do TP, bem como a pressão arterial sistêmica, foram medidas

através de sistema de software ACQ Knowledge 3.01 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA).

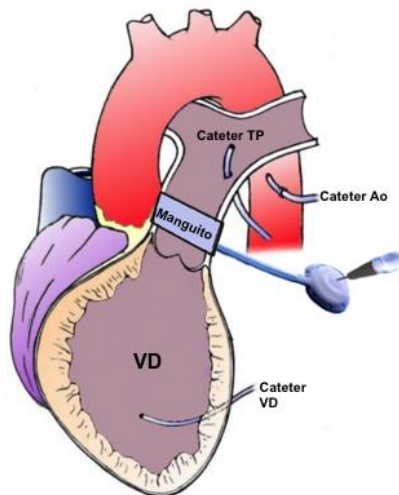


Figura 3. Diagrama do procedimento cirúrgico

3.3- Dispositivo de bandagem do tronco pulmonar

O tronco pulmonar foi dissecado e separado da aorta ascendente para implante do dispositivo de bandagem do tronco pulmonar (SILIMED - Silicone e Instrumental Médico-Cirúrgico e Hospitalar Ltda., Rio de Janeiro, RJ), conforme publicado anteriormente (Figura 4).³⁵⁻⁴² O anel de bandagem foi posicionado imediatamente acima da valva pulmonar e fixado na adventícia do TP para se evitar a migração do mesmo. O botão de insuflação autosselante foi implantado subcutaneamente no animal para permitir o ajuste do diâmetro do anel de bandagem por via percutânea. Após o implante do dispositivo, a cavidade pleural esquerda foi drenada em selo d'água. As costelas foram aproximadas e as partes moles, suturadas por planos. A recuperação anestésica completa do animal foi obtida no biotério, em maca especial para quadrúpedes. Após cerca de seis horas de pós-

operatório imediato, o dreno de tórax foi removido, com a constatação de drenagem mínima, ausência de fístula bronco-pleural e boa expansibilidade pulmonar. Todos os animais apresentaram boa evolução pós-operatória, sendo mantidos sem sobrecarga sistólica durante os dois primeiros dias de pós-operatório, para recuperação plena do estresse cirúrgico.

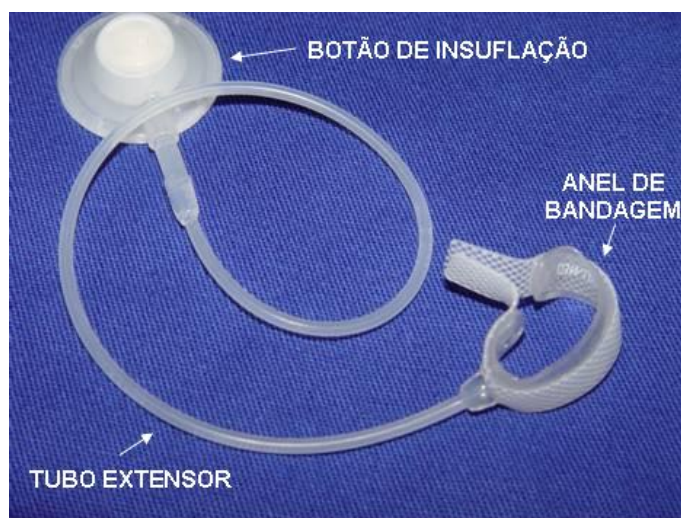


Figura 4. Dispositivo de bandagem ajustável do TP, produzido pela SILIMED (Rio de Janeiro)

3.4- Protocolo de sobrecarga sistólica do VD

O treinamento do VD foi iniciado no terceiro dia pós-operatório (72 horas de convalescença). Com o animal consciente e imobilizado na maca especial, procedeu-se à leitura das pressões basais do VD, TP e Ao, com o dispositivo completamente desinsuflado. Após a leitura das pressões basais, foi iniciada a insuflação do dispositivo com soro fisiológico, percutaneamente, através de seringa de insulina, observando as curvas das pressões do VD e aorta, e objetivando alcançar uma pressão no VD de aproximadamente 70% da pressão sistólica

sistêmica, conforme descrito anteriormente. Este ajuste era realizado dentro do limite clínico tolerável, desde que não provocasse uma queda superior a 10% da pressão sistólica sistêmica. Caso o animal apresentasse sinais clínicos de hipóxia importante, como agitação, dificuldade respiratória ou arritmias, o volume do dispositivo era reduzido para um valor tolerável pelo animal. A calibração do dispositivo foi realizada diariamente nos dois grupos de estudo. As medidas das pressões na Ao, VD e TP foram tomadas diariamente nos três grupos. O gradiente de pressão entre o VD e o tronco da artéria pulmonar foi calculado através da subtração de suas pressões sistólicas.

3.4.1- Grupo contínuo

Os animais permaneceram em sobrecarga sistólica contínua do VD por um período de 96 horas, com insuflações a cada 24 horas, para manter a relação de pressões VD/VE em torno de 70%, com leitura das pressões antes e após as insuflações.

3.4.2- Grupo intermitente

Foram tomadas quatro medidas de pressões a cada período de 12 horas, ou seja, na manhã de cada dia do protocolo, as pressões foram medidas antes de se insuflar o dispositivo de bandagem (1ª medida). Imediatamente a seguir, insuflou-se o dispositivo até a obtenção de uma relação de pressões sistólicas VD/aorta de 70%

(2ª medida). Após 12 horas (período noturno), as pressões deixadas pela manhã foram novamente medidas (3ª medida) para avaliar a manutenção da sobrecarga sistólica durante as 12 horas de treinamento. O dispositivo foi então desinsuflado para permitir 12 horas de descanso. As pressões foram tomadas imediatamente após a suspensão da sobrecarga sistólica do VD (4ª medida). Portanto, os animais permaneceram com quatro períodos de 12 horas de sobrecarga sistólica do VD (período diurno), alternados com 12 horas de descanso (período noturno), durante o mesmo tempo de 96 horas do grupo Contínuo. Após 96 horas de protocolo, foram tomadas medidas pressóricas finais. A Figura 5 ilustra o diagrama cronológico da coleta de dados do grupo Intermitente.

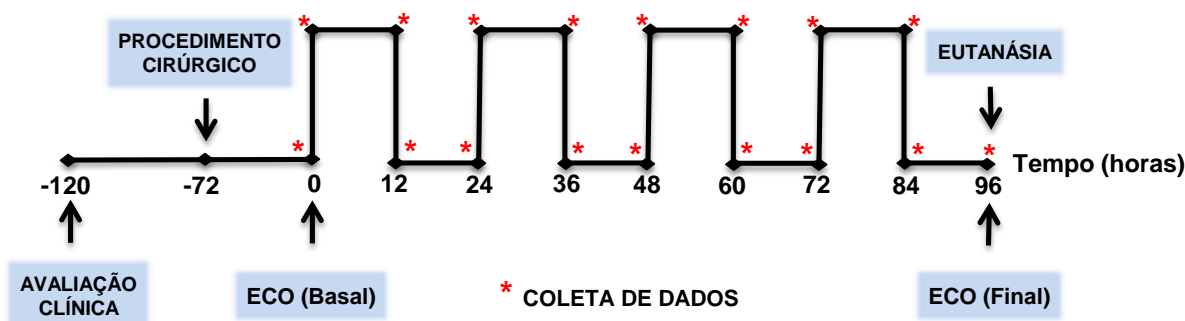


Figura 5. Diagrama cronológico da coleta de dados do grupo Intermitente

3.4.3- Grupo controle

Os animais deste grupo foram submetidos ao implante do dispositivo de bandagem ajustável no TP e cateteres de monitorização hemodinâmica, conforme previamente relatado. Foram tomadas medidas hemodinâmicas diariamente, porém, com o dispositivo de bandagem ajustável vazio até o fim do período de estudo.

3.5- Avaliação ecocardiográfica

Todos os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica pelo mesmo observador, previamente ao início do protocolo, assim como após as 96 horas de estudo. A aquisição de imagens foi obtida com o animal sob sedação superficial (quetamina 20 mg/kg, intramuscular), monitorados com eletrocardiograma, utilizando-se transdutores multifrequenciais (7,5 MHz e 2,5 MHz, Acuson Cypress, Siemens, Erlagen, Alemanha). As espessuras das massas cardíacas foram mensuradas ao ecocardiograma bidimensional, no final da diástole, através do plano paraesternal longitudinal na altura das cúspides da valva mitral. Devido à dificuldade para a obtenção do plano apical quatro câmaras nestes animais, pelo fato de os animais terem o tórax em quilha, o mesmo foi substituído pelo plano longitudinal quatro câmaras, obtido a partir do hemitórax direito, na altura do terceiro espaço intercostal. Nesses dois planos ecocardiográficos utilizados, foi mensurada a espessura da parede livre do ventrículo direito, na região onde seus limites foram mais facilmente visibilizados.^{66,67} Posteriormente, foi obtida a média aritmética desses valores.

3.6- Análise morfológica

Após o encerramento do protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia para ressecção do coração. Antes da indução anestésica, foram aferidas as pressões do VD, TP e Ao. Após anestesia geral com quetamina (30 mg/Kg, intramuscular) e nembutal (15 mg/Kg, endovenoso), procedeu-se a intubação. E realizada a toracotomia esquerda sobre a incisão prévia para exposição do coração. Foram realizadas lises de bridas e dissecação das veias cavas superior, inferior e grandes artérias. Após aprofundamento do plano anestésico, foi administrada heparina (50 mg EV) e cloreto de potássio até causar parada cardíaca. Posteriormente, o coração foi ressecado.

3.6.1- Pesagem das massas cardíacas

Após a remoção do coração, a gordura epicárdica foi cuidadosamente ressecada e as paredes ventriculares e septal separadas, de acordo com a técnica de Fulton et al⁶⁸. A aorta, o TP e os átrios foram ressecados, juntamente com as valvas atrioventriculares. A parede livre do VD foi separada do septo ventricular, sendo cortada paralelamente ao trajeto das artérias interventricular anterior e posterior (Figura 6). O mesmo procedimento foi realizado para separação da parede livre do VE da parede septal. A seguir, o VD, VE e septo ventricular foram pesados em balança digital (Mettler AE-200, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Suíça). Apesar da pequena variação de peso dos animais, as medidas foram normalizadas através da indexação de peso das massas musculares cardíacas pelo respectivo peso

corporal do animal, conforme sugestão de Bishop e Cole⁶⁹. Os pesos indexados foram expressos em g/kg.

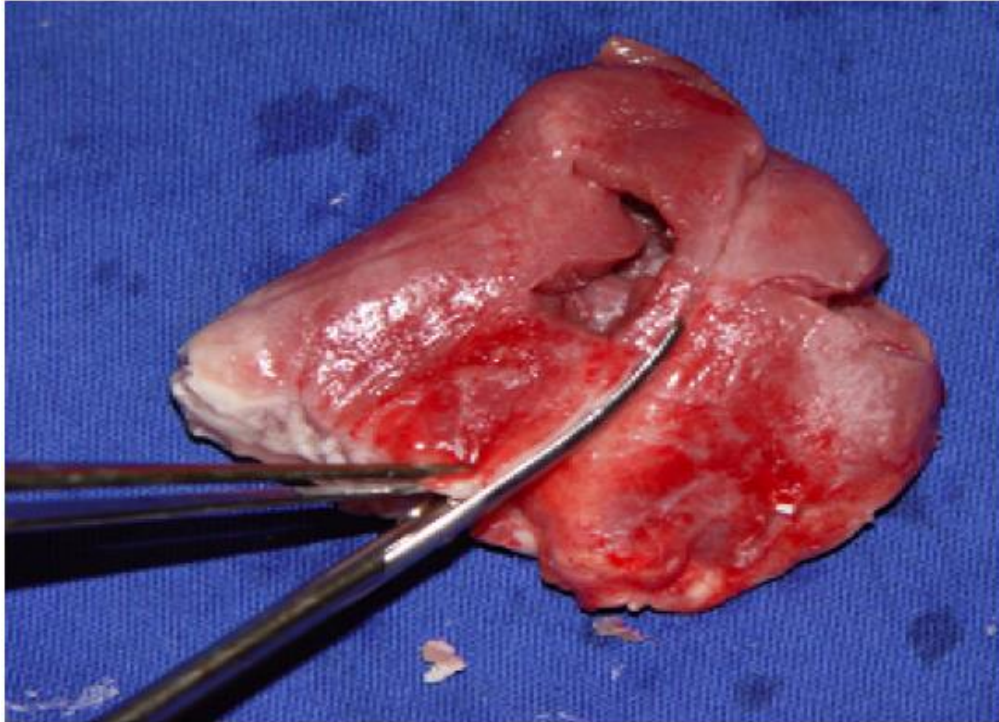


Figura 6. Técnica de Fulton para separar as massas cardíacas. Observa-se na peça, já sem os átrios, o corte guiado pela artéria interventricular anterior, rente ao septo interventricular, para separá-lo do ventrículo direito. Este procedimento é repetido do lado esquerdo para separar o ventrículo esquerdo do septo interventricular

3.6.2- Conteúdo de água dos tecidos

A seguir, foram colhidas amostras de cada uma das paredes cardíacas (VD, Septo e VE) para avaliação de conteúdo de água (CA). O peso inicial (P_i) de cada amostra foi obtido. As amostras foram então acondicionadas em frascos apropriados, fechados com papel filtro e devidamente identificados, então colocados na estufa (temperatura: 55-60° C). Após 72 horas de desidratação, cada amostra foi

novamente pesada para se obter o peso seco (Ps). O percentual do conteúdo de água foi então obtido através da seguinte fórmula, assumindo que a distribuição de água foi homogênea no septo e nos ventrículos:

$$CA (\%) = 100 - (Ps \times Pi^{-1} \times 100)$$

O conteúdo de água das massas musculares cardíacas dos grupos Contínuo e Intermitente foi comparado ao do grupo Controle, com o objetivo de se esclarecer se a variação de peso do VD dos grupos de estudo foi associada a edema miocárdico ou aquisição de massa muscular.

3.6.3- Análise imuno-histoquímica (VEGF e CASPASE)

As massas cardíacas foram fixadas em solução de formalina salina (formol a 10% em solução salina a 0,9%, tamponado com fosfato de sódio monobásico e bibásico para pH 7,0). Os espécimes foram assim mantidos por um período de 24 horas. Posteriormente, foram obtidas secções de ambos os ventrículos e do septo ventricular, após corte transversal das massas cardíacas (Figura 7).

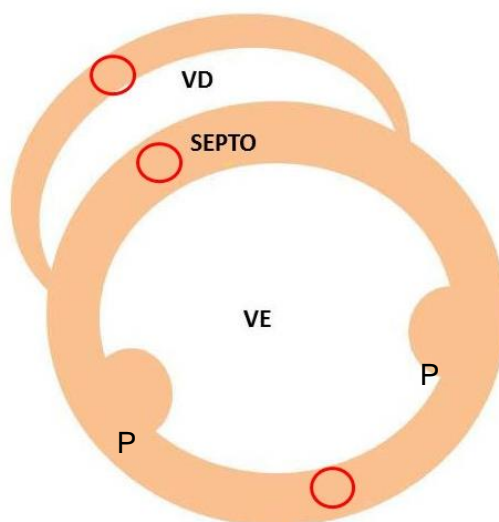


Figura 7. Esquema da secção transversal do coração no nível dos músculos papilares (P) para coleta das amostras para análise histológica. Os círculos vermelhos representam os locais das amostras: septo e parede livre dos ventrículos

As amostras foram processadas para análise histológica e, a partir dos blocos, obtiveram-se cortes de 5 μm de espessura, utilizando-se micrótomo (Leica RM 2145). Os cortes foram pescados em lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano e submetidos à temperatura de 37°C para secagem e colagem. As reações de imuno-histoquímica foram feitas de acordo com protocolo de rotina usado no Laboratório de Imuno-Histoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo FMUSP (sistema Streptavidina conjugada com peroxidase). Os cortes foram colocados em lâminas tratadas com solução de organo-silano (3-Aminopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA). As lâminas foram então desparafinadas em três banhos de xilol, em estufa a 60° C, durante 5 minutos e passadas rapidamente em três banhos de xilol frio. Para desidratação dos cortes, as lâminas foram submetidas a dois banhos de álcool absoluto (95° e 70°). Em seguida, foram lavadas em água

corrente, água deionizada e colocadas em tampão fosfato (pH: 7,4). A técnica de recuperação dos sítios antigênicos foi obtida em solução de ácido cítrico 10 mM (pH: 6,0), em alta temperatura (37° C). O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com Peróxido de Hidrogênio (3%). As lâminas foram incubadas durante 24 horas com os anticorpos primários (Tabela 2) e diluídos em albumina de soro bovino (1%), à temperatura de 4°C.

Tabela 2. Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico

Anticorpo	Marca	Diluição
Caspase 3	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	1:500
TUNEL	Roche (Indianapolis, EUA)	NA
VEGF	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EUA)	1:1500

NA = Não aplicável

Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo secundário Novolink Polymer (Leica Biosystems - Wetzlar, Alemanha), sendo utilizado como cromógeno a Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich Chemie - Steinheim, Alemanha).

A seguir, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck Millipore - Darmstadt, Alemanha) para evidenciar os núcleos. Após montagem e secagem das lâminas, estas foram avaliadas em sistema analisador de imagens, conforme ilustrado na Figura 8 (AxioVision, software V.4.7.1.0, Carl Zeiss).

Para quantificação da área ocupada por células marcadas pelo VEGF, foram obtidas 25 fotos de regiões perivasculares por massa cardíaca (VD, VE e septo ventricular) de cada animal, utilizando-se uma objetiva de 40x (Figura 8).

Não foram quantificados capilares e células presentes no interstício entre os cardiomiócitos em virtude da grande proximidade com as células contráteis, as quais apresentavam “coloração de fundo”, o que ocasionou dificuldade em precisar os limites entre fibra e interstício. A soma das áreas do citoplasma celular marcadas com o anticorpo (coloração marrom acastanhado) foi quantificada proporcionalmente por campo microscópico, em valores percentuais (ou fração de área).

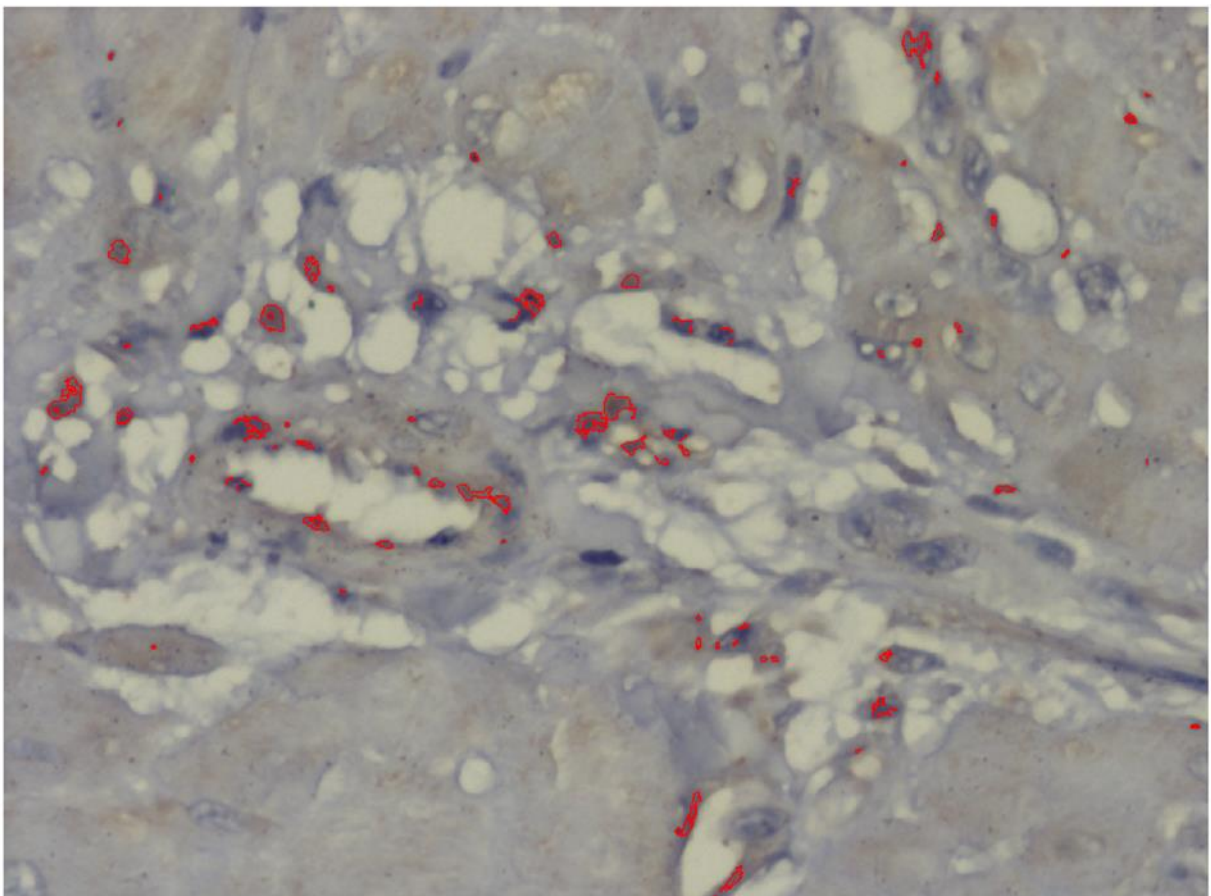


Figura 8. Fotomicrografia de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica para marcação de VEGF. Nota-se, no campo do analisador de imagens, a presença de pontos vermelhos correspondendo a células marcadas na parede de vasos e em região perivascular. Essas áreas estavam marcadas em cor castanha na imagem original e foram detectadas a partir de limiar (threshold) determinado manualmente. Aumento da objetiva=40x

A soma das áreas do citoplasma celular marcadas com o anticorpo (coloração marrom acastanhado, Figura 9) foi quantificada proporcionalmente por campo microscópico, como fração de área. Para cada parede cardíaca, foi calculada a área média ocupada pelas células marcadas, por foto obtida.

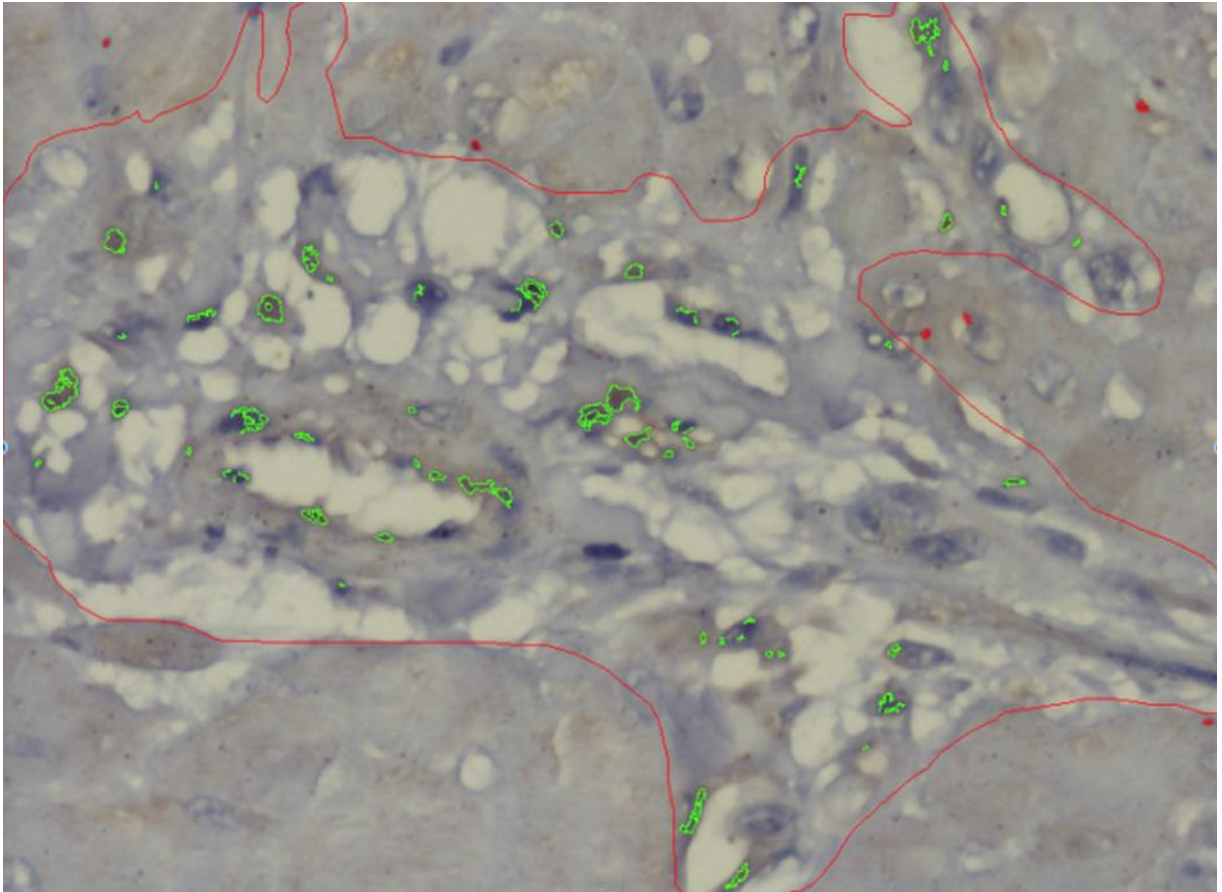


Figura 9. Fotomicrografia do mesmo campo histológico da Figura 8, onde se vê a área perivascular delimitada manualmente (linha vermelha). As áreas positivas estão marcadas em cor verde, por padrão do sistema analisador de imagens. Aumento da objetiva=40x

Para detecção de células marcadas pela CASPASE, a avaliação foi feita por contagem direta de células positivas em microscópio óptico convencional (Nikon-Eclipse 80i), conforme ilustrado na Figura 10.

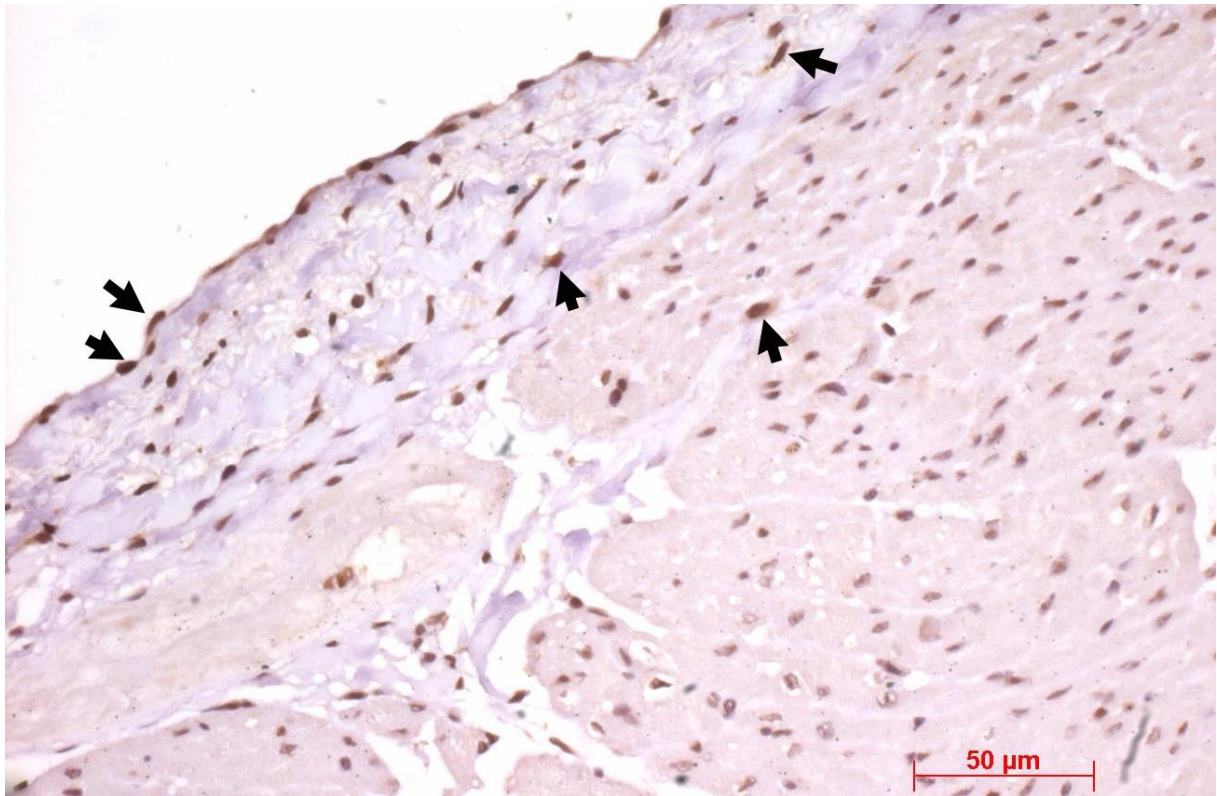


Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-caspase, obtido no endocárdio e sub-endocárdio do ventrículo direito. Notam-se numerosas células positivas (setas) com núcleo castanho-escuro. Contra-coloração pela hematoxilina de Harris, aumento da objetiva=40X

Foram selecionados 30 campos por amostra de parede cardíaca de cada animal (VD, VE e septo ventricular), sistematizando-se a leitura a partir do endocárdio, em direção ao epicárdio, da esquerda para a direita, em faixas paralelas e consecutivas (*“zigue-zague”*). Os núcleos das células marcadas com o anticorpo (coloração marrom acastanhado) foram quantificados microscopicamente, através de contagem direta de seu número por campo microscópico (Figura 11), utilizando-se uma objetiva de 40x, de acordo com a topografia do campo avaliado (endocárdio/sub-endocárdio, médio-mural ou epicárdio/subepicárdio). A área correspondente a um campo de grande aumento analisado contempla um diâmetro

de aproximadamente 272 μm . Para cada corte histológico, foi calculado o número médio de células marcadas por campo microscópico.

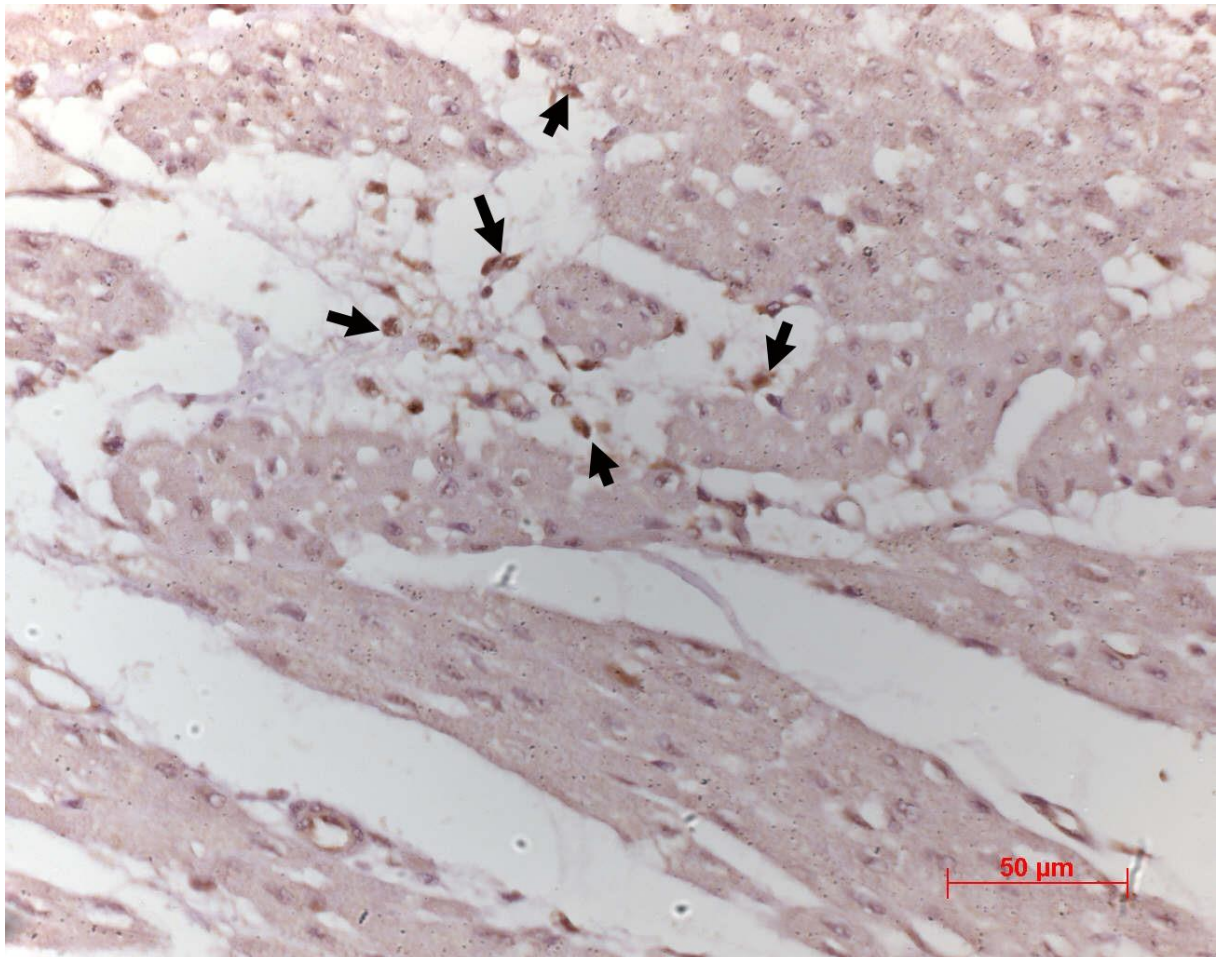


Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio submetido à reação de imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-caspase, obtido da região médio-mural do ventrículo direito. Notam-se células intersticiais cujos núcleos coram-se positivamente em castanho-escuro (setas). Contra-coloração pela hematoxilina de Harris, aumento da objetiva=40X

3.6.4- Detecção de células apoptóticas pelo tunel

A marcação das células apoptóticas foi também realizada através do teste *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) - mediated dUTP-biotin Nick End Labeling* - TUNEL (Roche - Indianapolis, EUA). Durante o processo de apoptose, ocorre a clivagem do DNA genômico. O teste do TUNEL marca preferencialmente segmentos de DNA clivados durante a apoptose.

As lâminas com cortes histológicos foram desparafinadas em três banhos de xilol em estufa a 60 - 65° C, durante 10 minutos e submetidas rapidamente a três banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°.

Em seguida, foram lavadas em água corrente, água destilada e em tampão Fosfato pH 7,4 (PBS - *Phosphate Buffered-Saline*). A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por proteinase K durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

O bloqueio da peroxidase endógena, presente nas hemácias, foi feito com peróxido de hidrogênio (0,3%) em Metanol durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram novamente lavadas em água corrente, água destilada e solução tampão PBS.

As lâminas foram então incubadas com 50 µl da mistura de reação TUNEL (5 µl da solução de Enzima com 45 µl da solução tampão) por amostra, durante 60 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após esta etapa, as lâminas foram novamente incubadas por mais 30 minutos, em câmara úmida a 37°C, com 50 µl do conversor de peroxidase.

Em seguida, as amostras foram lavadas por três vezes em solução tampão PBS, durante três minutos cada. Posteriormente, a reação foi revelada através de Diaminobenzidina (0,2%), associada ao peróxido de hidrogênio (0,05%) em solução tampão PBS, e as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente.

Na sequência, as amostras foram contra-coradas com verde de Metila, lavadas em água destilada, desidratadas com etanol e banhadas em Xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount (Figura 12).

Foram selecionados 30 campos por amostra cardíaca de cada animal (VD, VE e septo ventricular), sistematizando-se a leitura a partir do endocárdio, em direção ao epicárdio, da esquerda para a direita, em faixas paralelas e consecutivas (*“zigue-zague”*).

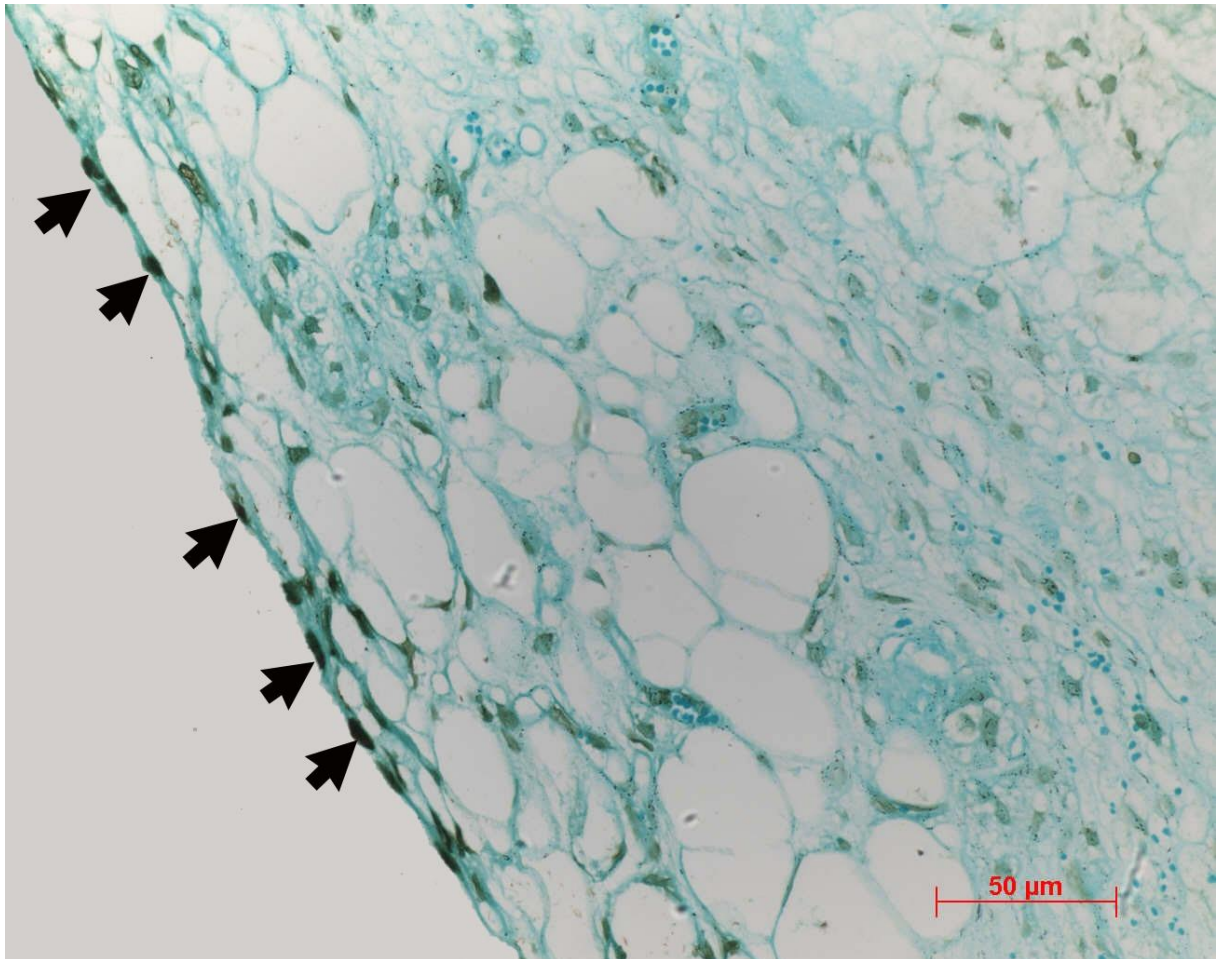


Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico submetido à reação de TUNEL, obtido da região subepicárdica do ventrículo direito. As setas mostram células da superfície do epicárdio, cujos núcleos coram-se positivamente em preto. Aumento da objetiva=40X

Os núcleos dos miocardiócitos e das células do interstício marcados com o kit do TUNEL (coloração marrom escuro ou preto) foram quantificados microscopicamente através de contagem de seu número por campo microscópico, utilizando-se uma objetiva de 40x, de acordo com a topografia do campo avaliado (endocárdio/sub-endocárdio, médio-mural ou epicárdio/subepicárdio). Para cada corte histológico, foi calculado o número médio de células marcadas por campo microscópico (Figura 13).

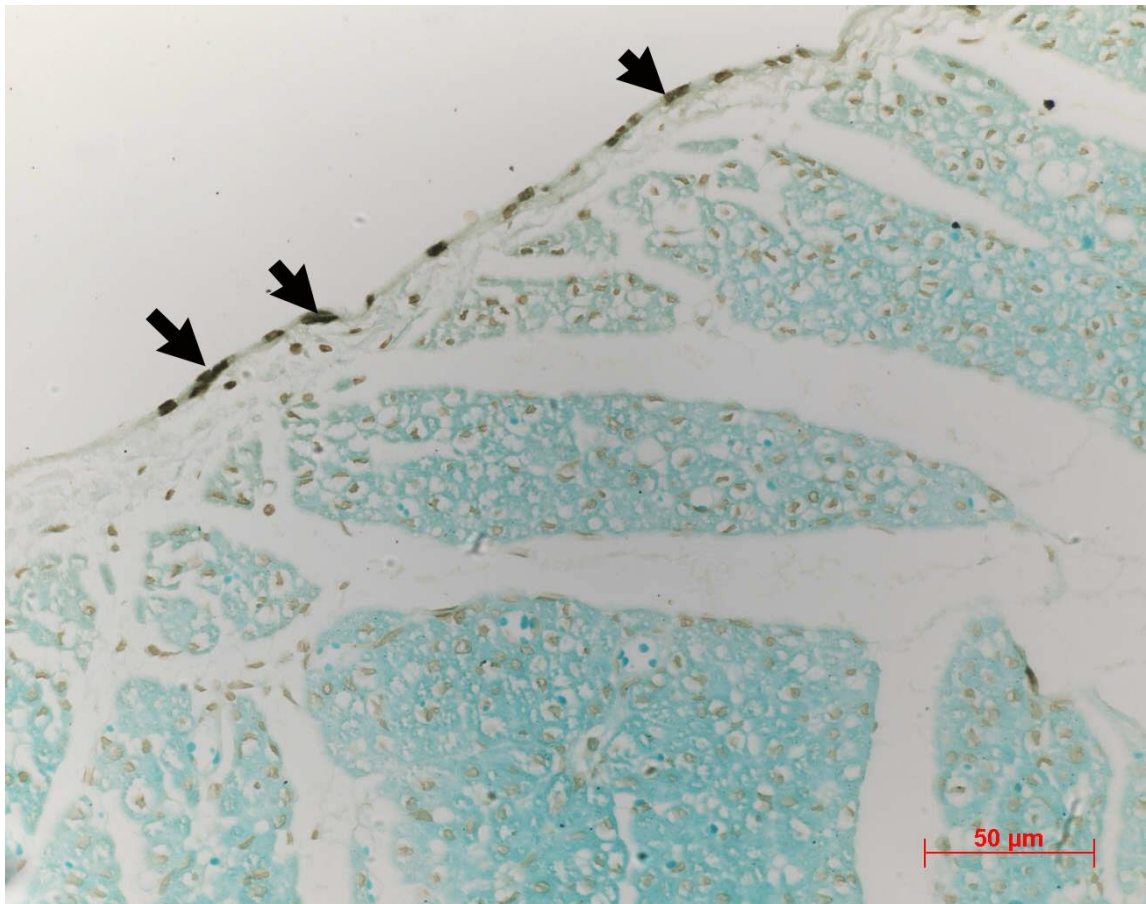


Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico submetido à reação de TUNEL, obtido da região endocárdica do ventrículo direito. As setas mostram células endocárdicas cujos núcleos coram-se positivamente em preto. Aumento da objetiva=40X

3.7- Análise estatística

A normalidade da distribuição de cada variável foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os parâmetros foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA) de dois fatores, considerados os tempos e os grupos, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores estão apresentados na forma de média \pm erro padrão das médias. Para todos os casos, o nível de significância utilizado foi de 5%. Os resultados foram analisados através do programa GraphPad Prism v.5.04 (San Diego, CA - EUA).

Em nenhum animal, foi observada qualquer falha do dispositivo de bandagem ajustável do tronco pulmonar. Foi observada uma perda mínima diária do volume injetado no dispositivo durante o período de estudo. Para se atingir os parâmetros preconizados de sobrecarga sistólica do VD, um volume progressivamente maior foi injetado no dispositivo de bandagem, ao longo do protocolo.

4.1- Medidas hemodinâmicas

As pressões sistêmicas não foram afetadas pelo protocolo de sobrecarga sistólica do VD.

4.1.1- Gradiente de pressão VD/TP

A figura 14 mostra um aumento do gradiente de pressão VD/TP nos grupos Controle e naqueles submetidos à sobrecarga sistólica do VD (Contínuo e Intermitente) para cada momento observado (0, 24, 48, 72 e 96 horas). A Análise de Variância de dois fatores mostrou diferenças entre os grupos ($p < 0,001$) e ao longo do tempo ($p < 0,001$). Todos os gradientes VD/TP gerados nos grupos Contínuo e Intermitente foram maiores que os do grupo Controle, a partir do início da sobrecarga sistólica do VD (0 hora). Nos períodos de descanso do grupo

Intermitente, os parâmetros hemodinâmicos eram semelhantes ao grupo Controle. No final do protocolo, o gradiente VD/TP gerado no grupo Intermitente foi significativamente maior daquele gerado pelo grupo Contínuo ($p < 0,001$).

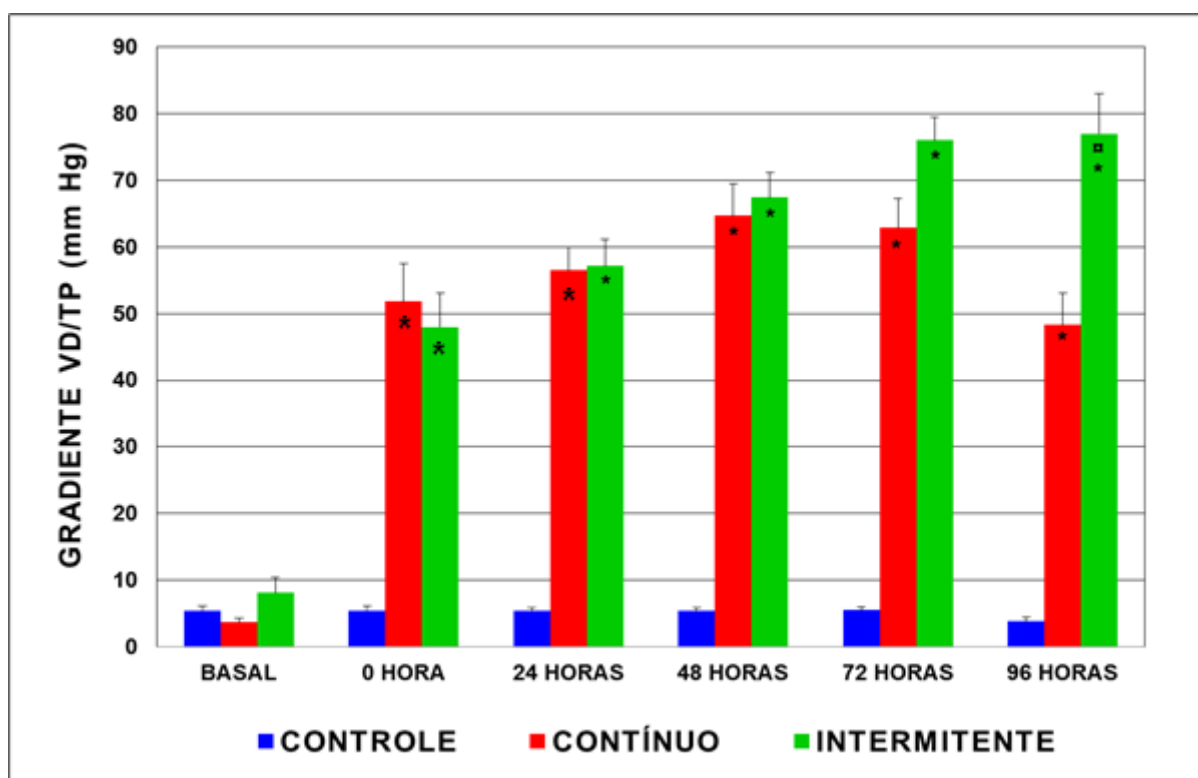


Figura 14. Evolução do gradiente pressórico sistólico entre o ventrículo direito e tronco pulmonar (mm Hg) nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (mmHg) = média \pm Erro Padrão das Médias. * $p < 0,001$ quando comparado ao seu respectivo instante Basal e ao grupo Controle para o mesmo instante; □ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Contínuo para o mesmo instante (96 horas)

4.2- Achados ecocardiográficos

A tabela 3 mostra a espessura da parede do VD dos grupos Controle e de estudo no início e no final do protocolo de sobrecarga sistólica. Ambos os grupos de estudo apresentaram aumento da espessura da parede livre do VD no final do

protocolo (Intermitente +129,2%; Contínuo +58,2%), comparados ao grupo Controle e ao seu respectivo momento basal ($p < 0,001$), sendo significativamente maior no grupo Intermitente, quando comparado ao grupo Contínuo ($p < 0,001$).

Tabela 3. Espessura do VD nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente, medida pelo ecocardiograma

Momento	Controle	Contínuo	Intermitente
0 hora	3,24 ± 0,05	3,16 ± 0,14	2,81 ± 0,22
96 horas	3,36 ± 0,03	5,0 ± 0,38*†	6,44 ± 0,48*†‡

n=7 em cada grupo; Valores (mm) = média ± Erro Padrão das Médias; * $p < 0,001$ quando comparado ao seu respectivo instante basal; † $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle para o mesmo instante; ‡ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Contínuo para o mesmo instante.

O protocolo de sobrecarga sistólica do VD não promoveu alterações significativas das espessuras das paredes septal e do VE dos três grupos ao final do protocolo de sobrecarga sistólica. Estes dados estão apresentados no gráfico da Figura 15.

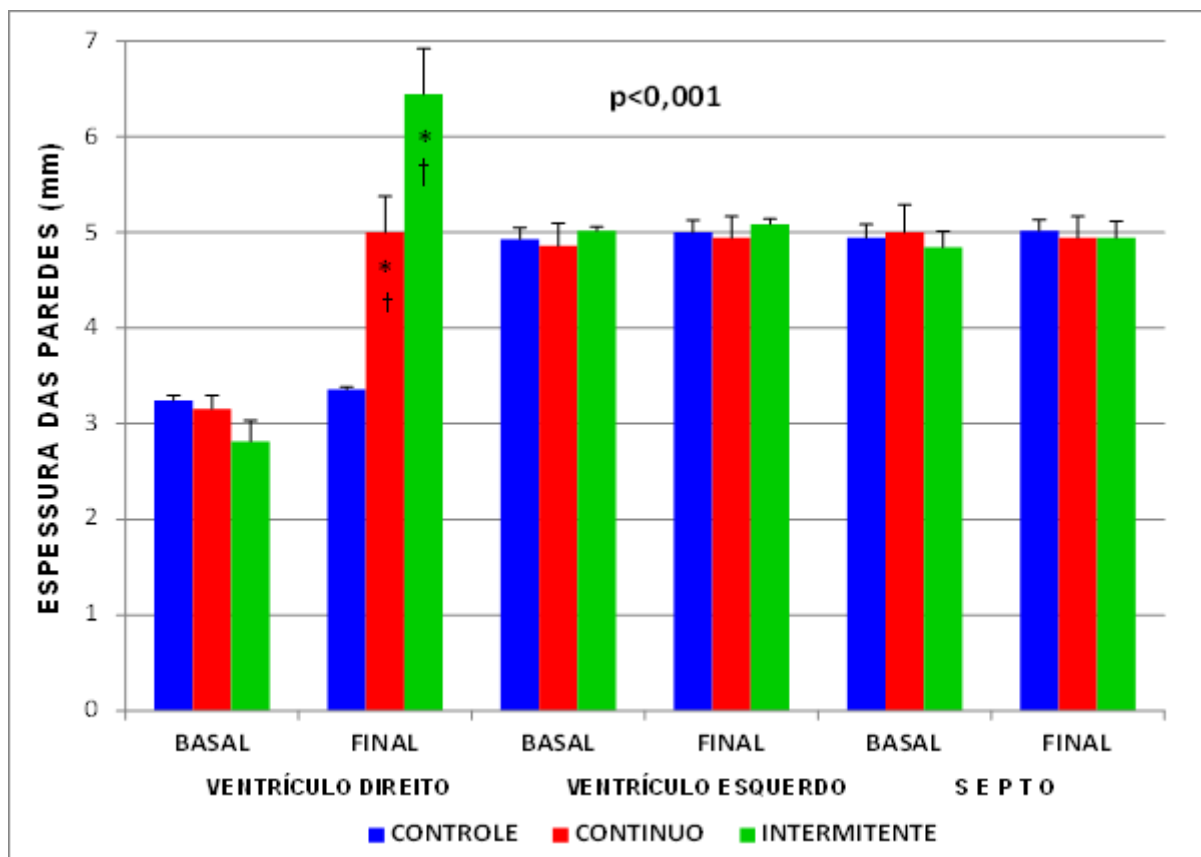


Figura 15. Espessura das paredes cardíacas dos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (mm) = Média \pm Erro Padrão das Médias. * $p < 0,001$ quando comparado ao seu respectivo instante Basal; † $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle para o mesmo instante; ‡ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Contínuo para o mesmo instante

4.3- Achados morfológicos

4.3.1- Pesagem das paredes cardíacas

A figura 16 mostra a representação gráfica do peso das paredes cardíacas, indexados para o peso corporal dos animais, nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Ambos os grupos de estudo apresentaram aumento significativo nas

massas do VD (Intermitente: 115,8%; Contínuo: 90,8%; $p < 0,001$) e septo (Intermitente: 55,8%; Contínuo: 45,4%; $p < 0,047$), em relação ao grupo Controle. O protocolo de sobrecarga sistólica do VD não influenciou a massa muscular do VE.

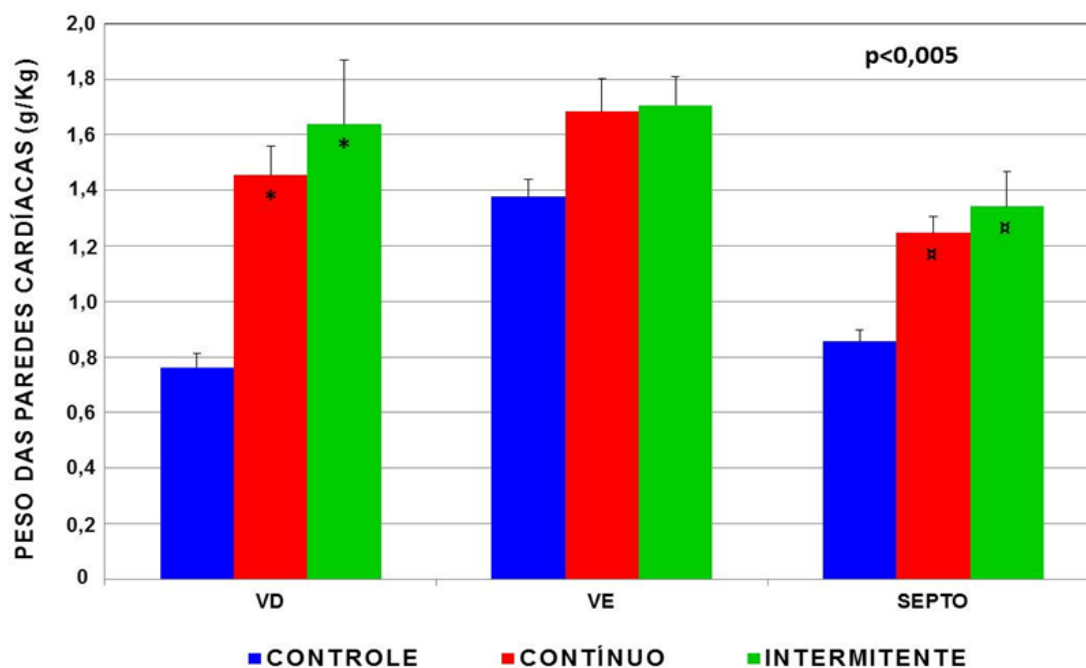


Figura 16. Massas do VD, Septo e VE (indexada para o peso corporal) nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (g/kg) = Média \pm Erro Padrão das Médias. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Controle; # $p < 0,047$ quando comparado ao grupo Controle

4.3.2- Conteúdo de água nas paredes cardíacas

A tabela 4 mostra o conteúdo de água do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. As paredes cardíacas do VD e septo dos grupos submetidos à sobrecarga sistólica contínua e intermitente apresentaram um aumento discreto do conteúdo de água (VD: Contínuo: +3,5%, Intermitente: +4,6%,

$p < 0,002$; Septo: ambos os grupos: +3,5%, $p < 0,002$) em relação aos valores das respectivas paredes cardíacas do grupo Controle.

Tabela 4. Conteúdo de Água das Paredes Cardíacas nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.

Paredes Cardíacas	Controle	Contínuo	Intermitente	Valor de p
VD	78,4 ± 0,98	81,6 ± 0,37	82,5 ± 0,30	<0,002
SEPTO	77,1 ± 0,85	79,8 ± 0,34	79,8 ± 0,22	<0,002
VE	77,2 ± 0,77	79,1 ± 0,28	79,4 ± 0,26	>0,273

n = 6 (Grupo Controle); n=7 (demais grupos). Valores (%) = Média ± Erro Padrão das Médias.

Já em relação ao conteúdo de água do VE, não foi observada diferença significativa do conteúdo de água entre os grupos. Os dados do conteúdo de água das paredes cardíacas dos três grupos estão representados graficamente na figura 17.

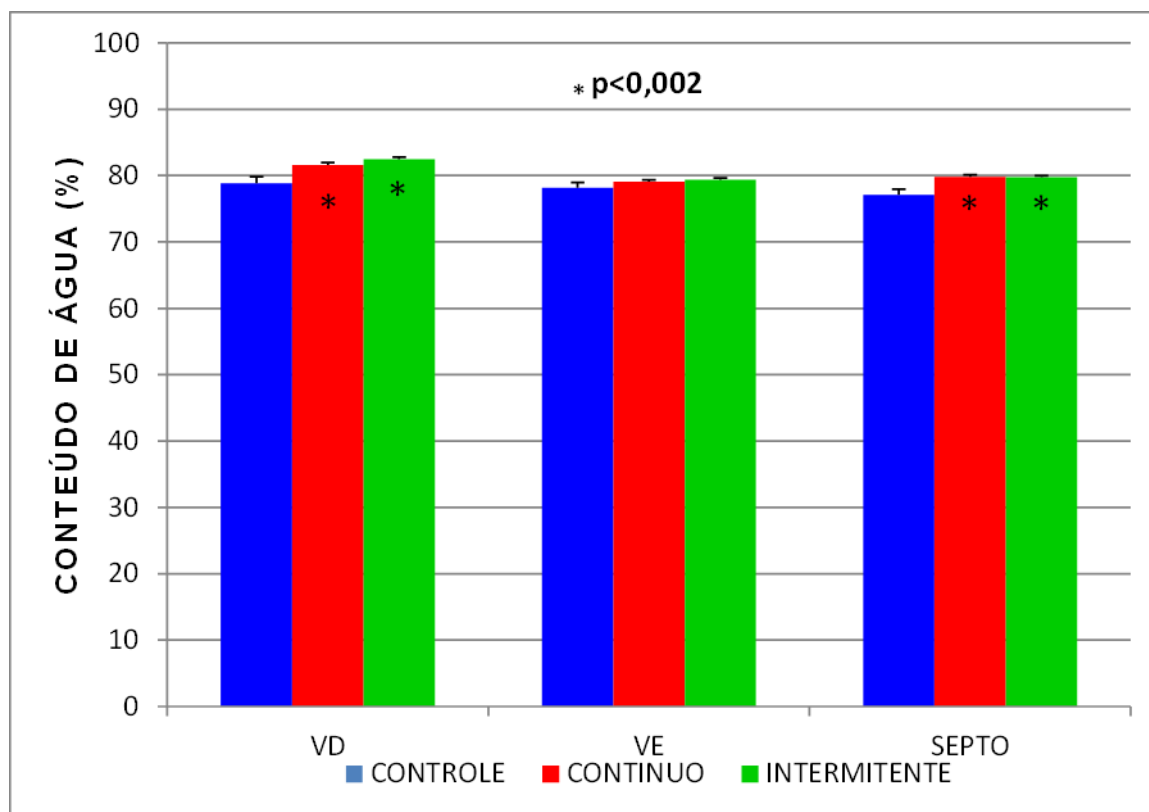


Figura 17. Conteúdo de água das paredes do VD, VE e Septo nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias. * $p < 0,002$ quando comparado ao grupo Controle

4.3.3- Expressão de VEGF nas paredes cardíacas

A tabela 5 mostra os dados da expressão de VEGF do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente.

Tabela 5. Expressão do VEGF das Paredes Cardíacas

Massas Cardíacas	Controle	Contínuo	Intermitente	Valor de p
VD	1,43 ± 0,18	1,80 ± 0,19	2,89 ± 0,41	<0,023
SEPTO	1,35 ± 0,23	1,50 ± 0,25	1,65 ± 0,14	>0,740
VE	1,43 ± 0,18	1,73 ± 0,34	2,07 ± 0,44	>0,252

n = 7 para cada grupo; Valores (%) = média ± Erro Padrão das Médias

O miocárdio do VD do grupo intermitente apresentou um aumento significativo da expressão de VEGF em relação ao VD dos demais grupos ($p < 0,023$). Não houve diferença na expressão do VEGF das demais massas cardíacas (VE: $p > 0,252$; Septo: $p > 0,740$). Estes dados estão expressos graficamente na figura 18.

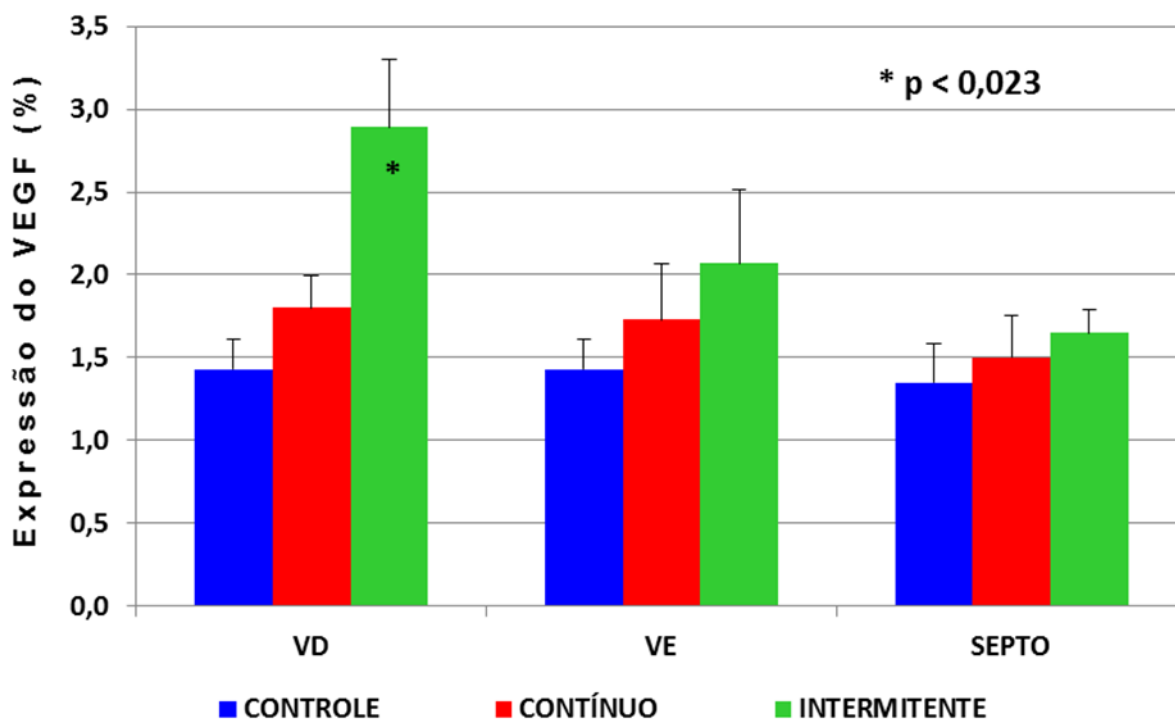


Figura 18. Expressão do VEGF no VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (percentual/campo) = Média ± Erro Padrão das Médias. n= 7 para cada grupo. * $p < 0,023$ quando comparado aos grupos Controle e Contínuo

4.3.4- Análise da apoptose nas paredes cardíacas

A tabela 6 mostra o resultado da contagem de células apoptóticas por campo microscópico das paredes cardíacas nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente, pelo método da **Caspase**.

Tabela 6. Número de células apoptóticas/campo das Massas Cardíacas (Caspase)

Massas Cardíacas	Controle	Contínuo	Intermitente	Valor de p
VD	4,63 ± 0,51	3,99 ± 0,52	5,19 ± 0,82	>0,225
SEPTO	2,56 ± 0,46	3,07 ± 0,50	2,47 ± 0,32	>0,679
VE	3,45 ± 0,29	3,60 ± 0,37	3,83 ± 0,58	>0,854

n = 7 para cada grupo; valores (número de células apoptóticas/campo) = Média ± Erro Padrão das Médias.

Não foram observadas diferenças significativas dentre as paredes cardíacas dos três grupos ($p=0,784$). Estes dados estão expressos graficamente na figura 19.

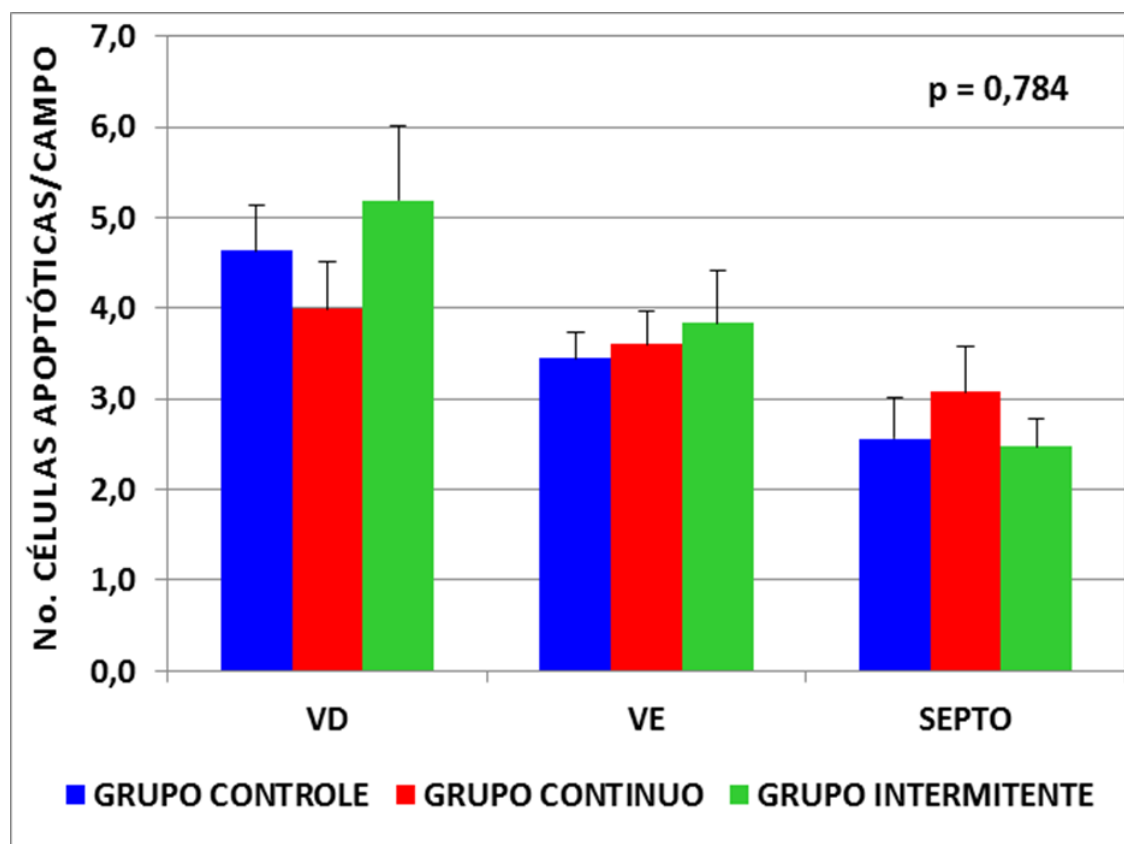


Figura 19. Número de células apoptóticas/campo (Método da Caspase) do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (no. Células apoptóticas/campo) = Média \pm Erro Padrão das Médias. $n=7$ para cada grupo. $p=0,784$ entre grupos

A tabela 7 mostra o resultado da contagem de células apoptóticas por campo microscópico das paredes cardíacas nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente, pelo método do **TUNEL**.

Tabela 7. Número de células apoptóticas/campo das Massas Cardíacas (TUNEL)

Massas Cardíacas	Controle	Contínuo	Intermitente	Valor de p
VD	1,87 ± 0,22	1,60 ± 0,12	1,97 ± 0,30	>0,396
SEPTO	1,27 ± 0,17	1,42 ± 0,17	1,17 ± 0,06	>0,637
VE	2,01 ± 0,15	1,85 ± 0,28	1,22 ± 0,16	0,016*

n = 7 para cada grupo; * p = 0,016 para grupo Intermitente *versus* Controle; Valores (no. Células apoptóticas/campo) = média ± Erro Padrão das Médias.

Houve um menor número de células apoptóticas por campo no VE do Grupo Intermitente (1,22 células/campo ± 0,41 células/campo), quando comparado ao Grupo Controle (2,01 células/campo ± 0,40 células/campo; p=0,016). Não foram observadas diferenças significativas nas paredes do VD e septo dos três grupos (p>0,396). Estes dados estão expressos graficamente na figura 20.

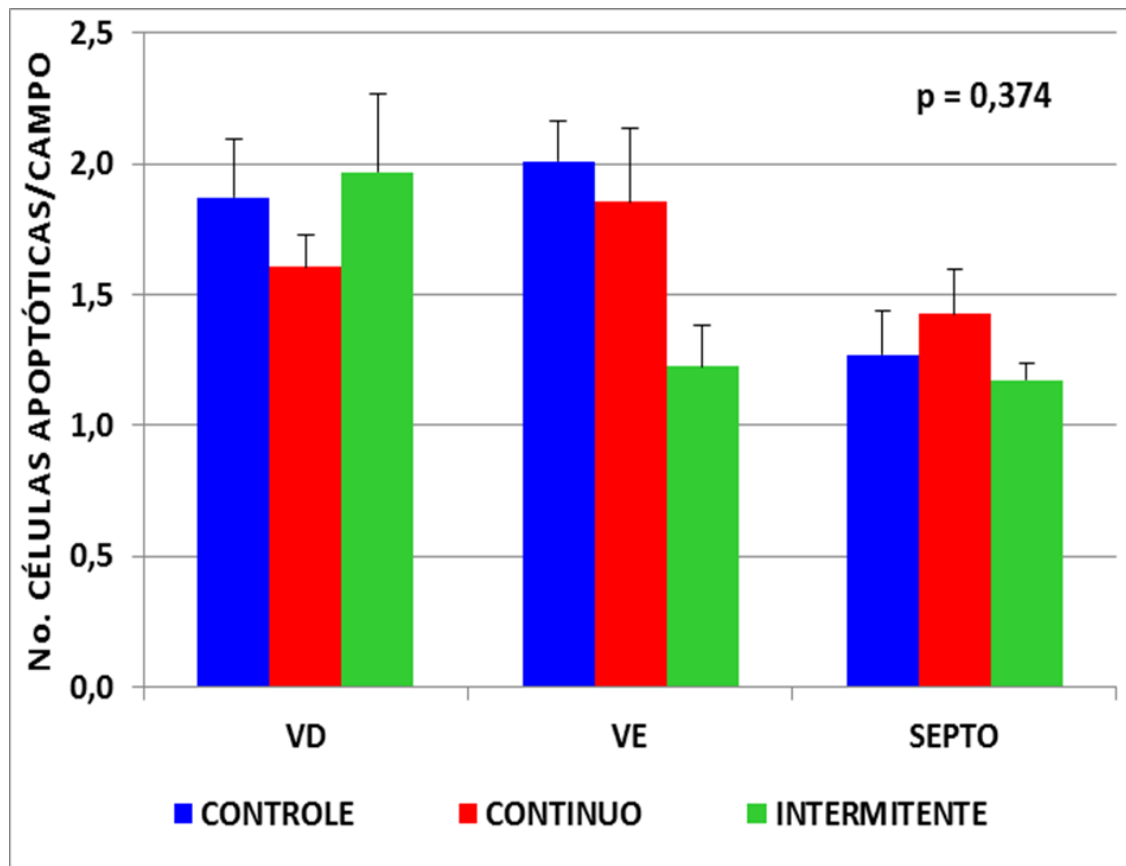


Figura 20. Número de células apoptóticas/campo (Método do TUNEL) do VD, Septo e VE nos grupos Controle, Contínuo e Intermitente. Valores (no. Células apoptóticas/campo) = Média \pm Erro Padrão das Médias. $n=7$ para cada grupo. $p=0,374$ entre grupos

A bandagem ajustável do tronco pulmonar por via percutânea representa uma extraordinária ferramenta para o desenvolvimento de uma re-hipertrofia cardíaca fisiológica, a qual permite o manuseio do tipo e da qualidade de sobrecarga sistólica imposta ao miocárdio do ventrículo sub-pulmonar. A hipertrofia fisiológica é caracterizada pelo aumento da massa cardíaca com densidade capilar normal ou aumentada. As informações obtidas nesta linha de pesquisa são importantes para o entendimento de uma hipertrofia ventricular durável, sem disfunção ventricular. Desta forma, é essencial que haja a perfeita compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação entre a hipertrofia “fisiológica” desejável e a hipertrofia “patológica” deletéria, induzida pela bandagem do tronco pulmonar. Este estudo procura analisar e aprimorar este processo de re-hipertrofia do ventrículo subpulmonar, analisando marcadores da apoptose e da indução de neoangiogênese miocárdica. Já foi evidenciado em trabalhos anteriores, e confirmado neste estudo, que ambos os regimes de sobrecarga produzem hipertrofia. Determinar a superioridade de algum método no desenvolvimento de uma hipertrofia sustentável é fundamental. Corroborando trabalhos anteriores desta linha de pesquisa, o regime de sobrecarga intermitente foi mais eficiente no desenvolvimento da hipertrofia miocárdica, apesar da menor exposição ao estímulo de hipertrofia miocárdica. Ademais, foi também demonstrado um desempenho miocárdico superior sob estresse farmacológico, tanto em animais jovens quanto nos adultos.^{36-39,70} Contudo, a disfunção ventricular observada após a cirurgia de Jatene em dois estágios se desenvolve tardiamente e o modelo experimental deste estudo não permite este tipo de análise. Desta forma, foi analisada a apoptose miocárdica, na intenção de se

avaliar alguma eventual tendência negativa nos regimes de sobrecarga ventricular estudados, assim como a neoangiogênese, buscando um mecanismo protetor para uma hipertrofia sustentável. O melhor estímulo hipertrófico, com o mínimo de apoptose e o máximo de estímulo de neoangiogênese, seria o cenário ideal.

5.1- Parâmetros hemodinâmicos

Conforme observado em estudos anteriores desta linha de pesquisa, tanto o grupo Intermitente quanto o Contínuo promoveram um incremento no gradiente VD/TP. Contudo, a sobrecarga sistólica intermitente promoveu maiores gradientes de pressão ao final do protocolo, provavelmente pelo caráter intermitente do estímulo de hipertrofia miocárdica. A maior eficiência da sobrecarga sistólica intermitente pode estar relacionada ao disparo do estímulo hipertrófico e da cascata de síntese proteica, da mesma forma que no grupo Contínuo, porém com menor gasto energético para o miocárdio. Durante o descanso noturno, ocorre o alívio da tensão da parede ventricular, com otimização da perfusão coronariana subendocárdica e, conseqüentemente, uma melhora do metabolismo energético do miocárdio e a diminuição da produção de radicais livres.^{71,72,73} Provavelmente, o mecanismo deste processo hipertrófico desencadeado pela cascata molecular pode se desenvolver em boas condições durante os períodos de descanso noturno e transporte de oxigênio ideal. Estes fatos podem justificar um melhor desempenho hemodinâmico do miocárdio do grupo Intermitente no final do protocolo.

5.2- Parâmetros ecocardiográficos

Embora tenha havido um aumento da massa das paredes ventriculares direitas de magnitude semelhante em ambos os grupos de estudo, foi observado o maior aumento da espessura da parede livre do VD no grupo Intermitente, em relação ao grupo com sobrecarga contínua. Por outro lado, o aumento significativo de peso da massa septal de ambos os grupos de estudo não resultou em aumento de espessura, sob a visão do ecocardiograma. Apesar desta discordância entre espessura e peso das massas septal e do VD, a avaliação de peso das paredes cardíacas pela ecocardiografia foi corroborada em estudos prévios desta linha de pesquisa.⁴⁰⁻⁴² Estes trabalhos evidenciaram uma aquisição de massa muscular do VD em ambos os grupos estimulados, também de magnitude semelhante. A espessura da parede livre do VD é apenas um parâmetro linear considerado no cálculo ecocardiográfico da massa ventricular.⁷⁴ Além da espessura, o ecocardiograma leva em consideração, no cálculo da massa cardíaca, três medidas de perímetros internos da parede livre do ventrículo direito, que aumentam a correlação com a massa verdadeira, aferida pela balança de precisão.

5.3- Parâmetros morfológicos

Esperava-se observar uma hipertrofia maior no grupo Contínuo, pela exposição mais prolongada do estímulo de sobrecarga sistólica em relação ao grupo Intermitente. No entanto, houve um aumento similar de ganho de massa do VD nos grupos estimulados. O discreto edema cardíaco observado nos ventrículos de

ambos os grupos treinados foi irrelevante diante do aumento substancial das suas massas. Pode-se inferir que o aumento de massa tenha ocorrido principalmente à custa de síntese proteica, pois o aumento proporcional e de pequena magnitude do conteúdo de água não poderia explicar as diferenças entre os grupos de estudo e o grupo Controle. Conforme demonstrado previamente por Abduch e colaboradores, foi observada uma proliferação dos elementos contráteis e não contráteis no miocárdio dos ventrículos estimulados, além da hipertrofia dos cardiomiócitos, o que poderia também justificar a aquisição de massa muscular em cabritos jovens.⁴⁰⁻⁴² Por outro lado, estudos em cabras adultas de hipertrofia do miocárdio maduro demonstraram um aumento no diâmetro de cardiomiócitos e núcleos, porém com rara proliferação celular no miocárdio destes animais, diferentemente dos cabritos jovens.^{38,39}

5.3.1- Neoangiogênese

Este estudo comparou dois programas de sobrecarga sistólica do ventrículo subpulmonar de cabritos jovens quanto ao processo de neoangiogênese miocárdica. Foi claramente demonstrado que, apesar de atingir uma hipertrofia do VD de magnitude semelhante nos dois grupos de estudo, um estímulo proporcionalmente menor à sobrecarga sistólica do grupo Intermitente promoveu maior evidência de sinalização da neoangiogênese. Provavelmente, o miocárdio do VD submetido intermitentemente à sobrecarga de pressão e ao estiramento de suas fibras sofreu adaptações celulares e moleculares, com maior expressão de VEGF nas células endoteliais e mesenquimais. Teoricamente, este aumento da expressão do VEGF

deve promover maior neovascularização e, conseqüentemente, proporcionar maior suprimento sanguíneo aos cardiomiócitos hipertrofiados. Esta linha de pesquisa vem buscando o aprimoramento do processo de hipertrofia fisiológica desencadeada pela bandagem do ventrículo subpulmonar. Conforme achados de estudos prévios, a sobrecarga sistólica intermitente promove os efeitos desejáveis de uma hipertrofia miocárdica rápida, sem seus efeitos adversos. A hipertrofia fisiológica é caracterizada por uma densidade capilar normal ou aumentada, associada a pouca ou nenhuma fibrose do miocárdio. Assim, a avaliação morfológica dos mecanismos adaptativos dos elementos contráteis e não contráteis do miocárdio, submetidos ao processo de hipertrofia aguda, também pode contribuir significativamente para o entendimento dos efeitos do preparo ventricular quando a cirurgia de Jatene em dois estágios se fizer necessária. O objetivo final seria o de minimizar danos celulares e maximizar a eficiência da bandagem do tronco pulmonar, proporcionando assim o melhor programa de treinamento para o ventrículo subpulmonar. O aumento da expressão de VEGF observado nos animais do grupo Intermitente pode representar um dos principais benefícios fisiológicos para o miocárdio submetido à sobrecarga sistólica intermitente. Estudos prévios demonstraram um melhor índice de desempenho miocárdico para o ventrículo submetido ao treinamento intermitente, corroborado agora por este aumento significativo na expressão do VEGF.^{36,37,72} O VEGF tem sido muito estudado como uma das principais moléculas reguladoras da vasculogênese.⁷⁵ Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o melhor desempenho do ventrículo submetido à sobrecarga sistólica intermitente. Dentre eles, foi observado um aumento do metabolismo anaeróbio e das reservas de glicogênio,⁷⁶ uma melhor recuperação de eventos isquêmicos⁷⁷ e uma diminuição na produção de radicais livres.⁷³⁻⁷⁵ Estes processos envolvem vias de sinalização

essenciais, incluindo aquelas reguladas pelo VEGF. Esta molécula-chave participa de mecanismos que restabelecem o fluxo sanguíneo para os tecidos, quando ocorre comprometimento na distribuição de oxigênio ou aumento de demanda de energia, devido a distúrbios na perfusão sanguínea. A proliferação vascular e o remodelamento são fenômenos desencadeados por alterações do meio ambiente, como, por exemplo, a isquemia, estresse de parede, estiramento dos cardiomiócitos e aumento ou diminuição na perfusão e/ou pressão arterial. Conforme mostrado pela evolução das pesquisas científicas nos últimos anos, muitas moléculas de fatores de crescimento estão envolvidas nas vias sinalizadoras que regulam a neoangiogênese. Este remodelamento está associado à ativação de vários fatores de crescimento, tais como VEGF, fator de crescimento de fibroblastos e angiopoetinas, ocasionando recrutamento, proliferação e migração de células endoteliais e facilitando a formação de novos vasos.⁷⁸ Durante o preparo ventricular, ocorre o aumento da pressão na região subendocárdica, determinada pela sobrecarga sistólica gerada pela bandagem do tronco pulmonar. Por conseguinte, um desequilíbrio entre a perfusão sanguínea e demanda de oxigênio pode promover um estado de hipóxia subendocárdica relativa. A hipóxia, por sua vez, é um poderoso estímulo para a vasculogênese, conforme observado em tecidos embrionários, em consequência da expansão do tecido previamente à circulação funcional. A hipóxia desencadeia um aumento na produção do fator-1 hipóxia-induzível (HIF-1) e ao subsequente estímulo do VEGF. Esta cascata de sinalização estimula os progenitores de células endoteliais durante a vasculogênese. As células endoteliais se diferenciam a partir de células precursoras, migram e formam canais vasculares. Estes mecanismos compensatórios incluem tanto os capilares⁷⁹, permitindo distâncias normais de difusão de oxigênio, quanto artérias e arteríolas⁸⁰,

proporcionando perfusão miocárdica adequada e maior reserva coronariana.^{81,82} No período neonatal, a capacidade de adaptação do coração em aumentar a proliferação vascular frente à sobrecarga pressórica está bem documentada.⁸³ Esta sinalização de angiogênese adaptativa é crítica para a perfusão em regiões específicas do miocárdio com reserva limitada de fluxo coronariano, como ocorreria no subendocárdio durante o preparo do ventrículo subpulmonar para a cirurgia de Jatene. Isto corrobora uma melhor adaptação do ventrículo treinado com o protocolo intermitente de sobrecarga sistólica para gerar uma hipertrofia sustentável.

5.3.2- Apoptose

A apoptose desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares e contribui para eventos fisiológicos e patológicos. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para quantificar e identificar a apoptose celular.⁸⁴ A detecção de fragmentação do DNA com a técnica de TUNEL tem sido o padrão para a análise da apoptose em cortes histológicos. Embora esta técnica seja muito sensível e amplamente utilizada, ela é suscetível a falhas, pois trata-se de uma técnica inespecífica para a detecção da apoptose. Por outro lado, os avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares da morte celular e a descoberta das caspases como os principais mediadores da apoptose, a utilização de anticorpos que reconhecem especificamente as enzimas caspase-3 e caspase-citoqueratina clivada (CK) 18 tornaram-se um método complementar na detecção e quantificação da apoptose em cortes histológicos. Os resultados deste estudo demonstram que o regime intermitente promove hipertrofia miocárdica associada ao

maior estímulo de neoangiogênese que o regime contínuo, contudo não se evidenciou como vantagem nos dois protocolos de sobrecarga ventricular em relação à apoptose do miocárdio. Entretanto, vários estudos encontraram uma relação entre a expressão de VEGF e substâncias antiapoptóticas, como a proteína BCL2.^{85,86,87,88} Zorc e colaboradores⁸⁹ evidenciaram que a apoptose, a menor expressão de BCL2 e baixo índice de proliferação de miocardiócitos são preditores do mau prognóstico na insuficiência cardíaca. Os autores afirmaram que o inverso determina melhor prognóstico. Esta relação conferiria um efeito protetor ao miocárdio treinado de forma intermitente. O cenário ideal consiste numa hipertrofia miocárdica, sustentada por proliferação vascular e sem apoptose, isto é, sem fibrose e/ou disfunção do miocárdio. Foi encontrada menor presença de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL no VE do grupo Intermitente. Este achado não foi corroborado pela mesma detecção e quantificação da apoptose no teste da caspase, o que torna este achado questionável. O teste do TUNEL marca o DNA fragmentado, necrose, trauma ou outras formas de lesão miocárdica, que podem ter seu resultado alterado, o que explicaria tal achado. A caspase é um marcador do início do processo de morte celular e, por não estar alterada, coloca em dúvida o resultado obtido no VE do grupo Intermitente. Mesmo assim, o VE não é o objeto deste estudo. Ademais, não há nenhuma evidência de que a sobrecarga sistólica imposta ao VD possa ter influenciado este resultado. Apesar de não termos encontrado nenhuma diferença entre os dois regimes de sobrecarga estudados com relação a substâncias marcadoras de apoptose, não podemos descartar se um dos métodos é superior ao outro de maneira definitiva. Como as células cardíacas se renovam lentamente, a apoptose ou fenômenos proapoptóticos, estudados pela Caspase e TUNEL, podem não ter se manifestado no período de 96 horas deste

protocolo. Seria interessante avaliar substâncias antiapoptóticas, como a proteína BLC2. A manifestação desta proteína pode demonstrar um mecanismo de proteção anti-apoptótico, o que seria uma forte evidência protetora para um dos regimes de sobrecarga estudados.

5.4- Implicações clínicas

Esta linha de pesquisa tem por finalidade fundamentar as bases do uso clínico do preparo do ventrículo subpulmonar em pacientes que se submeterão à cirurgia de Jatene em dois estágios. O regime de pressão e resistência vascular a que o ventrículo subpulmonar terá de se submeter na circulação sistêmica após a cirurgia de Jatene demandará um maior consumo de oxigênio e nutrientes. A ocorrência de neoangiogênese pode determinar uma melhor adaptação a esta condição. Há fortes evidências de que o preparo intermitente promove uma hipertrofia mais sustentável. A associação entre a maior sinalização de neoangiogênese miocárdica em resposta à sobrecarga pressórica intermitente tem implicações importantes quando se objetiva preparar um ventrículo para suportar pressões sistêmicas, uma vez que a situação ideal seria aquela na qual a proliferação vascular ocorra de forma sustentada, permitindo uma hipertrofia do VD mais eficiente.

5.5- Limitações do estudo

Em primeiro lugar, inferências baseadas em resultados com animais não se traduzem necessariamente nas mesmas conclusões obtidas a partir de estudos com seres humanos. A disfunção ventricular após a cirurgia de Jatene em dois estágios geralmente ocorre tardiamente e o modelo experimental deste estudo não permite este tipo de análise. O protocolo de sobrecarga sistólica empregado nesta linha de pesquisa abrange um período de 96 horas. A presença de capilares neoformados seria uma constatação definitiva do mecanismo adaptativo. Teria sido mais objetivo se também fosse medida a densidade capilar ou marcadores de células endoteliais relacionadas com a angiogênese. Entretanto, não foram encontrados marcadores histológicos adequados para identificar capilares do miocárdio de cabras. Além do mais, alterações significativas na densidade capilar não seriam observadas dentro deste limite de tempo. Uma vez que a sinalização do VEGF é uma das principais vias de proliferação capilar, deve haver uma concordância no aumento da expressão de VEGF e suposto aumento da densidade capilar no grupo Intermitente. No entanto, um aumento da sinalização de VEGF não indica necessariamente proliferação capilar, uma vez que se trata de uma simplificação excessiva para assumir e interpretar um processo de angiogênese, baseado na atividade de uma única molécula. O achado da maior expressão do VEGF seria um marcador precoce de melhor função ventricular durante a cirurgia de Jatene em dois estágios. Em relação à apoptose, a avaliação de substâncias anti-apoptóticas, como a proteína BLC2, teria proporcionado uma informação importante, uma vez que a detecção da apoptose pelas técnicas da caspase e do TUNEL não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. A expressão desta proteína pode demonstrar um

mecanismo de proteção celular, o que seria uma evidência favorável para um dos regimes de sobrecarga estudados. A expressão aumentada de BLC2 poderia corroborar a superioridade do protocolo intermitente, como ocorreu com a maior expressão do VEGF, proporcionando uma resposta definitiva para se determinar a superioridade de um método de preparo ventricular. Apesar de não termos encontrado nenhuma diferença entre os dois regimes de sobrecarga estudados com relação a substâncias marcadoras de apoptose, não podemos afirmar, de maneira definitiva, que um dos métodos é superior ao outro.. Como as células cardíacas se renovam lentamente, a apoptose ou fenômenos proapoptóticos, estudados pela Caspase e TUNEL, podem não ter se manifestado durante o tempo estabelecido neste protocolo. Outra limitação deste estudo reside no fato de se estudar o ventrículo morfologicamente direito, enquanto que, na TGA, o ventrículo subpulmonar é morfologicamente esquerdo. Todavia, seria inviável a utilização do VE como ventrículo subpulmonar em um modelo experimental de TGA. Além do mais, a bandagem aórtica submetria o sistema coronariano a altas pressões o que certamente traria repercussões diversas. Esta abordagem experimental também não corresponderia à realidade, já que, na TGA, o VE está conectado à artéria pulmonar.

5.6- Perspectivas futuras

O desenvolvimento de um dispositivo ajustável de bandagem pulmonar, desenvolvido por esta linha de pesquisa, permite o manuseio clínico mais seguro e eficaz do paciente a ser submetido à cirurgia de Jatene em dois estágios. O ajuste da sobrecarga sistólica durante o treinamento ventricular pode ser individualizado,

de acordo com as condições clínicas de cada paciente. Certamente, um programa de treinamento intermitente do ventrículo subpulmonar poderá proporcionar melhores resultados, com relação a uma hipertrofia sustentável e funcionalmente mais bem preparado para sustentar a resistência vascular sistêmica.

- 1- Ambos os protocolos de sobrecarga sistólica promoveram hipertrofia ventricular por ganho de massa muscular de magnitude similar, não acompanhado de edema importante.
- 2- A sobrecarga sistólica intermitente promoveu maior expressão do VEGF no miocárdio do VD.
- 3- Não houve diferença entre os protocolos de sobrecarga sistólica em relação à apoptose.

7.1 Espessura das massas do grupo **Controle**, medidas pelo Ecocardiograma

Animal	ESPESSURA DO VD (mm)		ESPESSURA DO VE (mm)		ESPESSURA DO SEPTO (mm)	
	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL
290508 A	3,20	3,30	4,80	4,60	4,80	4,80
290408	3,30	3,40	5,30	5,60	5,20	5,40
290208	3,10	3,30	5,00	5,20	5,40	5,40
280208	3,10	3,30	5,40	5,10	5,30	5,20
240408 B	3,20	3,30	4,70	4,90	4,40	4,80
240408 A	3,50	3,40	4,70	4,90	4,90	4,80
150408	3,30	3,50	4,60	4,70	4,60	4,70
MÉDIA	3,24	3,36	4,93	5,00	4,94	5,01
EP	0,05	0,03	0,12	0,13	0,14	0,12

*Erro Padrão

7.2. Espessura das massas do grupo **Contínuo**, medidas pelo Ecocardiograma

Animal	ESPESSURA DO VD (mm)		ESPESSURA DO VE (mm)		ESPESSURA DO SEPTO (mm)	
	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL
3008	3,00	6,00	5,00	5,00	6,00	5,00
0407	4,00	4,00	5,00	5,00	6,00	6,00
0410	3,00	6,00	6,00	6,00	5,00	5,00
2009	3,00	6,00	4,00	4,00	4,00	4,00
210508	3,00	5,00	4,50	4,60	4,60	4,60
2706B	3,00	4,00	5,00	5,00	5,00	5,00
060209A	3,10	4,00	4,50	5,00	4,40	5,00
MÉDIA	3,16	5,00	4,86	4,94	5,00	4,94
EP*	0,14	0,38	0,24	0,23	0,29	0,23

*Erro Padrão

7.3 Espessura das massas do grupo **Intermitente**, medidas pelo Ecocardiograma

Animal	ESPESSURA DO VD (mm)		ESPESSURA DO VE (mm)		ESPESSURA DO SEPTO (mm)	
	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL	BASAL	FINAL
0606	3,00	8,00	5,00	5,00	4,00	4,00
060209B	3,00	4,80	4,80	5,00	4,60	4,90
051208	3,40	5,30	5,20	5,30	5,40	5,40
1605A	2,00	6,00	5,00	5,00	5,00	5,00
140308	3,30	7,00	5,10	5,30	4,90	5,30
1306A	3,00	6,00	5,00	5,00	5,00	5,00
2305A	2,00	8,00	5,00	5,00	5,00	5,00
MÉDIA	2,81	6,44	5,01	5,09	4,84	4,94
EP*	0,05	0,03	0,12	0,13	0,14	0,12

*Erro Padrão

7.4 Peso das massas cardíacas do grupo **Controle**, medidas em balança de precisão

Animal	Peso do Animal	Peso - VD (G/KG)	Peso - VE (G/KG)	Peso - Septo (G/KG)
290508 A	7,00	0,91	1,64	1,04
290408	12,50	0,85	1,52	0,88
290208	14,50	0,73	1,35	0,78
280208	15,00	0,66	1,41	0,82
240408 B	11,50	0,81	1,34	0,85
240408 A	12,50	0,81	1,24	0,88
150408	11,00	0,56	1,14	0,74
MÉDIA	12,00	0,76	1,38	0,86
EP*	1,00	0,05	0,06	0,04

*Erro Padrão

7.5 Peso das massas cardíacas do grupo **Contínuo**, medidas em balança de precisão

Animal	Peso do Animal	Peso - VD (G/KG)	PESO - VE (G/KG)	Peso - Septo (G/KG)
3008	8,00	1,81	1,87	1,47
0407	9,50	1,10	1,75	1,21
0410	12,00	1,69	1,75	1,36
2009	8,10	1,70	2,05	1,13
210508	8,00	1,18	1,23	1,07
2706B	9,40	1,41	1,88	1,39
060209A	10,70	1,29	1,25	1,10
MÉDIA	9,39	1,45	1,68	1,25
EP*	0,58	0,11	0,12	0,06

*Erro Padrão

7.6 Peso das massas do grupo **Intermitente**, medidas em balança de precisão

Animal	Peso do Animal	Peso - VD (G/KG)	Peso - VE (G/KG)	Peso - Septo (G/KG)
0606	8,50	2,86	2,21	1,67
060209B	11,50	1,23	1,28	0,95
051208	11,80	1,11	1,67	0,96
1605A	9,50	1,51	1,66	1,52
140308	12,50	1,19	1,58	1,17
1306A	7,60	1,64	1,75	1,35
2305A	7,50	1,92	1,79	1,77
MÉDIA	9,84	1,64	1,71	1,34
EP*	0,79	0,23	0,11	0,12

*Erro Padrão

7.7 Conteúdo de água do grupo **Controle** (%)

Animal	Água VD	Água VE	Água Septo
290508 A	NO	NO	No
290408	80,07	79,66	74,90
290208	75,40	75,00	74,70
280208	77,40	77,00	77,19
240408 B	81,50	79,80	79,42
240408 A	77,60	78,30	76,97
150408	81,08	79,41	79,46
MÉDIA	78,84	78,20	77,11
EP*	0,98	0,77	0,85

*Erro Padrão; NO: não obtido

7.8 Conteúdo de água do grupo **Contínuo** (%)

	Água VD	Água VE	Água SEPTO
3008	82,89	79,99	80,90
0407	80,75	78,00	78,38
0410	81,08	78,27	79,64
2009	81,23	79,90	80,49
210508	81,87	79,26	80,50
2706B	80,50	78,95	78,96
060209A	82,90	79,12	79,81
MÉDIA	81,60	79,07	79,81
EP*	0,37	0,28	0,34

*Erro Padrão

7.9 Dados conteúdo de água do grupo **Intermitente** (%)

Animal	Água VD	Água VE	Água Septo
0606	82,17	79,62	79,55
060209B	81,94	78,93	79,65
051208	84,04	78,03	80,94
1605A	81,90	79,67	79,46
140308	81,78	79,49	79,35
1306A	82,76	80,19	80,10
2305A	82,74	79,55	79,33
MÉDIA	82,48	79,35	79,77
EP*	0,30	0,26	0,22

*Erro Padrão

7.10 Células apoptóticas marcadas/campo no grupo **Controle** (TUNEL)

Animal	VE	Septo	VD
290508 A	2,70	0,93	2,57
290408	2,13	1,07	1,20
290208	1,47	1,23	2,33
280208	1,97	1,90	1,20
240408 B	1,93	0,97	2,43
240408 A	2,20	1,90	1,90
150408	1,67	0,90	1,47
MÉDIA	2,01	1,27	1,87
EP*	0,15	0,17	0,22

*Erro Padrão

7.11 Células apoptóticas marcadas/campo no grupo **Contínuo** (TUNEL)

Animal	VE	Septo	VD
3008	2,87	1,73	1,77
0407	1,03	0,97	1,23
0410	1,73	1,50	2,17
2009	1,57	1,60	1,67
210508	2,90	2,13	1,70
2706B	1,57	1,20	1,23
060209A	1,30	0,83	1,47
MÉDIA	1,85	1,42	1,60
EP*	0,28	0,17	0,12

*Erro Padrão

7.12 Células apoptóticas marcadas/campo no grupo **Intermitente** (TUNEL)

Animal	VE	Septo	VD
0606	1,37	1,33	1,70
060209B	0,63	0,97	1,57
051208	1,20	1,37	1,93
1605A	0,97	1,07	1,73
140308	1,90	1,30	2,33
1306A	1,00	0,97	3,50
2305A	1,50	1,20	1,00
MÉDIA	1,22	1,17	1,97
EP*	0,16	0,06	0,30

*Erro Padrão

7.13 Células marcadas por campo no grupo **Controle** (CASPASE)

Animal	VE	Septo	VD
290508 A	2,97	2,17	3,67
290408	2,33	1,53	3,37
290208	4,40	4,23	4,00
280208	3,17	1,47	3,67
240408 B	3,07	3,47	4,97
240408 A	3,80	1,37	7,03
150408	4,40	3,70	5,70
MÉDIA	3,45	2,56	4,63
EP*	0,29	0,46	0,51

*Erro Padrão

7.14 Células marcadas por campo no grupo **Contínuo** (CASPASE)

Animal	VE	Septo	VD
3008	3,63	2,10	3,27
0407	3,13	3,23	3,4
0410	2,50	3,03	3,17
2009	3,70	1,80	2,57
210508	4,57	4,63	6,73
2706B	2,57	5,00	4,37
060209A	5,10	1,73	4,43
MÉDIA	3,60	3,07	3,99
EP*	0,37	0,50	0,52

*Erro Padrão

7.15 Células marcadas por campo no grupo **Intermitente** (CASPASE)

Animal	VE	Septo	VD
0606	1,40	4,07	9,50
060209B	3,37	1,67	3,43
051208	5,40	1,60	3,77
1605A	3,17	2,03	4,90
140308	6,03	2,70	6,43
1306A	4,03	2,53	3,67
2305A	3,43	2,70	4,63
MÉDIA	3,83	2,47	5,19
EP*	0,63	0,35	0,89

*Erro Padrão

7.16 Área de VEGF no grupo **Controle** (%)

Animal	VE	Septo	VD
290508 A	1,77	1,57	2,29
290408	1,31	2,47	1,50
290208	1,94	1,65	1,14
280208	0,96	1,35	1,49
240408 B	1,26	0,76	1,64
240408 A	1,98	0,78	1,09
150408	0,79	0,90	0,84
MÉDIA	1,43	1,35	1,43
EP*	0,18	0,23	0,18

*Erro Padrão

7.17 Área de VEGF no grupo **Contínuo** (%)

Animal	VE	Septo	VD
3008	3,36	2,43	2,52
0407	1,41	1,37	2,47
0410	2,48	1,65	1,66
2009	1,09	0,94	1,78
210508	1,40	0,61	1,44
2706B	1,55	2,25	1,17
060209A	0,81	1,23	1,54
MÉDIA	1,73	1,50	1,80
EP*	0,34	0,25	0,19

*Erro Padrão

7.18 Área de VEGF no grupo **Intermitente** (%)

Animal	VE	Septo	VD
0606	2,25	1,82	2,41
060209B	4,49	1,30	4,19
051208	1,64	2,09	4,53
1605A	2,36	1,82	2,70
140308	1,02	1,49	2,25
1306A	1,37	1,92	1,50
2305AEI	1,36	1,11	2,62
MÉDIA	2,07	1,65	2,89
EP*	0,44	0,14	0,41

*Erro Padrão

7.19 Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa



A **CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 21/11/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **459/13** intitulado: “**APOPTOSE E VASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA FRENTE À SOBRECARGA DE PRESSÃO EM DOIS TIPOS DE REGIMES DE CONDICIONAMENTO VENTRICULAR: CONTÍNUO X INTERMITENTE.**” que utilizará **15** animais da espécie **cabras**, apresentado pela Comissão Científica do InCor.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Renato Samy Assad

Pesquisador (a) Executante : Eduardo Augusto Victor Rocha

CEP-FM USP, 21 de Novembro de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

7.20 Cadastro de Protocolo de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP
CEP-FMUSP

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria)		
Nº do Protocolo:	Tipo: Animais	Instituto: INCOR
Registro on-line nº: 11458	Data de Entrada: 23/10/2013	

Informações sobre o animal:

Quantidade: 15	OGM: Não
Espécies utilizadas: CABRAS	

Este projeto envolve:

Pacientes HC	Não
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa)	Não
Documentos HC(Prontuários e Outros)	Não
Materiais estocados no HC	Não
Peças anatômicas de cadáveres	Não

- 1- Baillie M. The morbid anatomy of some of the most important parts of the human body. London: Johnson and Nichol, 1797, p. 38.
- 2- Oliveira RP, Agorianitis P, Vegni R, Nobre G, Kalichsztein M, Kezen J. Transposição corrigida das grandes artérias: apresentação clínica tardia, na quinta década de vida. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2008; 91(4):e35-e37.
- 3 - Rudolph AM. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res.* 1985; 57(6):811-21.
- 4 - Kang N, de Leval MR, Elliott M, Tsang V, Kocyildirim E, Sehic I, Foran J, Sullivan I. Extending the boundaries of the primary arterial switch operation in patients with transposition of the great arteries and intact ventricular septum. *Circulation.* 2004; 110(11 Suppl 1):II123-7.
- 5- Jatene AD, Fontes VF, Paulista PP, Souza LC, Neger F, Galantier M, Souza JE – Successful Anatomic Correction of Transposition of the Great Vessels: A Preliminary Report. *Arq Bras Cardiol.* 1975; 28:461-4.
- 6- Yacoub MH, Radley-Smith R, Hilton CJ. Anatomical correction of complete transposition of the great arteries and ventricular septal defect in infancy. *Br Med J.* 1976; 1(6018):1112-4.
- 7- Quaegebeur JM, Rohmer J, Ottenkamp J, Buis T, Kirklin JW, Blackstone EH, Brom AG. The arterial switch operation. An eight-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 92(3 Pt 1):361-84.
- 8- Castaneda AR, Norwood WI, Jonas RA, Colon SD, Sanders SP, Lang P. Transposition of the great arteries and intact ventricular septum: anatomical repair in the neonate. *Ann Thorac Surg.* 1984; 38(5):438-43.

-
- 9- Yacoub MH, Radley-Smith R, Maclaurin R: Two-stage operation for anatomical correction of transposition of the great arteries with intact interventricular septum. *Lancet*. 1977; 1:1275-8.
- 10- Lecompte Y, Leca F, Neveux JY, Baillet-Vernant F, Hazan E, Fermont L, Kachaner J. Anatomic correction of transposition of the great vessels with interventricular communication and pulmonary stenosis. *Ann Pediatr (Paris)*. 1984; 31(7):621-4.
- 11- Mauck HP Jr, Robertson LW, Parr EL, Lower RR. Anatomic correction of transposition of the great arteries without significant ventricular septal defect or patent ductus arteriosus. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1977; 74(4):631-5.
- 12- Abe T, Kuribayashi R, Sato M, Nieda S, Takahashi M, Okubo T. Successful Jatene operation for transposition of the great arteries with intact ventricular septum. A case report. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1978; 75(1):64-7.
- 13- Jonas RA, Giglia TM, Sanders SP, Wernovsky G, Nadal-Ginard B, Mayer Jr JE; Castaneda AR. Rapid, two-stage arterial switch for transposition of the great arteries and intact ventricular septum beyond the neonatal period. *Circulation*. 1989; 80:1203-8.
- 14- Rudolph Am. The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation* 1970; 16:343-359.
- 15- Quinn DW, McGuirk SP, Metha C, Nightingale P, de Giovanni JV, Dhillon R, Miller P, Stumper O, Wright JG, Barron DJ, Brawn WJ. The morphologic left ventricle that requires training by means of pulmonary artery banding before the double-switch procedure for congenitally corrected transposition of the great arteries is at risk of late dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 135(5):1137-44, 1144.e1-2.

-
- 16- Lim HG, Kim WH, Lee JR, Kim YJ. Long-term results of the arterial switch operation for ventriculo-arterial discordance. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013; 43(2):325-34.
- 17- Bautista-Hernandez V, Marx GR, Gauvreau K, Mayer JE Jr, Cecchin F, del Nido PJ. Determinants of left ventricular dysfunction after anatomic repair of congenitally corrected transposition of the great arteries. *Ann Thorac Surg.* 2006; 82(6):2059-65.
- 18- Boutin C, Wernovsky G, Sanders SP, Jonas RA, Castañeda A, Colan SD. Rapid two-stage arterial switch operation: evaluation of left ventricular systolic mechanics late after in acute pressure overload stimulus in infancy. *Circulation.* 1994; 90:1294-303.
- 19- Bishop SP, Melsen LR. Myocardial necrosis, fibrosis, and DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy induced by sudden pressure overload. *Circ Res.* 1976; 39:238-45.
- 20- Takahashi Y, Nakano S, Shimazaki Y, Kadoba K, Taniguchi K, Sano T, Nakada T, Tsuchitani Y, Miyamoto K, Matsuda H. Echocardiographic comparison of postoperative left ventricular contractile state between one and two-stage arterial switch operation for simple transposition of the great arteries. *Circulation.* 1991; 84:III-180.
- 21- Mee RB. Severe right ventricular failure after Mustard or Senning operation. Two-stage repair: pulmonary artery banding and switch. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 92:385-90.
- 22- Mavroudis C, Bacjer CL. Arterial switch after failed atrial baffle procedures for transposition of the great arteries. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69:851-857.

-
- 23- Assad RS, Cardarelli M, Abduch MCD, Aiello VD, Maizato M, Marcial MB, et al. Reversible Pulmonary Artery Banding with Balloon Catheter: Assessment of Rapid Pulmonary Ventricular Hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 120:66-72.
- 24- Assad RS, Cardarelli M, Abduch MCD, Aiello VD, Maizato M, Jatene AD. Bandagem reversível do tronco pulmonar: modelo experimental para preparo rápido do ventrículo pulmonar. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1998; 13:239-48.
- 25- Rabello RR. Análise da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina na Hipertrofia Aguda do Ventrículo Direito em Modelo Experimental de Estenose Endovascular Ajustável do Tronco Pulmonar, São Paulo. 2000; 96 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 26- Rabello RR, Assad RS, Krieger JE, Abduch MC, Oliveira AS. Análise da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina na Hipertrofia Aguda do Ventrículo Direito em Modelo Experimental de Estenose Endovascular Ajustável do Tronco Pulmonar. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001; 16(4):364-75.
- 27- Dias CA. Modelo experimental de bandagem ajustável do tronco pulmonar: novo dispositivo para preparo rápido do ventrículo, São Paulo. 1998; 92 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 28- Dias CA, Assad RS, Caneo LF, Abduch MC, Aiello VD, Dias AR. Modelo experimental de bandagem ajustável do tronco pulmonar: Novo dispositivo para preparo rápido do ventrículo. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2000; 15(4):328-37.
- 29- Dias CA, Assad RS, Caneo LF, Abduch MC, Aiello VD, Dias AR, Marcial MB, Oliveira SA. Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(5):999-1006.

-
- 30- Canêo LF. Preparo do ventrículo subpulmonar através de dois modelos ajustáveis de estenose do tronco pulmonar: estudo experimental, São Paulo. 1999; 90 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 31- Canêo LF, Dias CA, Assad RS, Abduch MC, Aiello VD, Lourenço JRD, et al. Preparo do ventrículo subpulmonar através de dois modelos ajustáveis de estenose do tronco pulmonar: Estudo experimental. *Rev Bras Cir Cardiovasc.*2001; 16(1):35-48.
- 32- Assad RS, Rodriguez MQ, Abduch MCD, Valente AS, Andrade JL, Krieger JE, et al. Bandagem ajustável do tronco pulmonar: comparação de dois métodos de hipertrofia aguda do ventrículo subpulmonar. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006; 21(4):418-28.
- 33- Rodriguez MAQ. Bandagem Ajustável do Tronco Pulmonar: Comparação de Dois Métodos de Hipertrofia Aguda do Ventrículo Subpulmonar, São Paulo. 2006; p. 85. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 34- Valente AS. Análise do processo evolutivo da hipertrofia aguda do ventrículo direito em modelo experimental de bandagem intermitente do tronco pulmonar, São Paulo. 2007; p. 140. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 35- Valente AS, Assad RS, Abduch MCD, Silva GJJ, Thomaz PG, Miana LA, et al. Bandagem Reversível do Tronco Pulmonar IV: Análise da Hipertrofia Aguda do Ventrículo Direito em Modelo Experimental de Sobrecarga Intermitente. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008; 23(1):60-9.
- 36- Favaro GAG. Análise da função ventricular direita em dois protocolos de treinamento com bandagem ajustável do tronco pulmonar, São Paulo. 2011; 94 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

-
- 37- Favaro GAG, Assad RS, Abduch MC, Silva GJ, Gomes GS, Andrade JL, Krieger JE, Moreira LF. Reversible pulmonary trunk banding: VII. Stress echocardiographic assessment of rapid ventricular hypertrophy in young goats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 145(5):1345-1351.e4
- 38- Miana LA, Assad RS, Abduch MC, Silva GJ, Nogueira AR, Aiello VD, Moreira LF. Reversible pulmonary trunk banding VIII: Intermittent overload causes harmless hypertrophy in adult goat. *Ann Thorac Surg.* 2013; 95(4):1422-8
- 39- Miana LA. Análise do processo de adaptação ventricular após bandagem do tronco pulmonar em animais adultos. São Paulo. 2009; 107 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 40- Abduch MCD. Avaliação dos mecanismos adaptativos do miocárdio durante sobrecarga de pressão induzida com o uso de bandagem do tronco pulmonar: participação da proliferação celular. São Paulo. 2006; 119 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 41- Abduch MCD, Assad RS, Rodriguez MQ, Valente AS, Andrade JL, Demarchi LM, Marcial MB, Aiello VD. Reversible pulmonary trunk banding III: assessment of myocardial adaptive mechanisms-contribution of cell proliferation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133(6):1510-6.
- 42- Abduch MCD, Assad RS, Aiello VD. Experimental ventricular pressure overload in young animals induces cardiomyocyte hypertrophy in addition to hyperplasia of contractile and noncontractile elements of the myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009; 137(6): 1573.
- 43- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt

AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527–61.

44- Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007; 62(3):179-213.

45- Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006; 312:630–41.

46- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851–8.

47- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1:1024–8.

48- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336–43.

49- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87:3336–43.

50- Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1835–42.

51- Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* 2006; 168:639–48.

52- Muller-Ehmsen J, Schmidt A, Krausgrill B, Schwinger RH, Bloch W. Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290:H331–40.

-
- 53- Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res.* 2007; 101:125–36.
- 54- Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102:147–54.
- 55- Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18:541–73.
- 56- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 376:62–6.
- 57- Krieger J. E. Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares: a interação entre a pesquisa e a prática clínica. São Paulo, Ateneu 2008.
- 58- Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Rev. Bras. Cancerol.* 2007; 53(3): 335-343.
- 59- Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 1964; 10:643-49.
- 60- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 6:239-57.
- 61- Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol.* 2001; 202:159-242.
- 62- Tomanek R. J. Coronary Vasculature; Development, Structure-Function, and Adaptations. New York, Heidelberg, Dordrecht, London, Springer 2013
- 63- Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004; 19:124-28.

-
- 64- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45:528-37.
- 65 - Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(2):197-208.
- 66- Vuille C, Weyman A. Left ventricle I: general considerations, assessment of chamber size and function. In: Weyman AE. *Principles and Practice of Echocardiography.* 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, Cap 20, p.575-624.
- 67- Pontes SC Jr, Assef JE, Barretto RB, Chacur P, Moreira DA, Nina VJS, Nunes F, Melani RH, Correia EB, Dinkuisen J, Sousa AM. Estimation of right ventricular mass by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005; 18(5):427-34.
- 68- Fulton RM, Hutchinson EC, Jones AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J.* 1952; 14:413-20.
- 69- Bishop SP & Cole CR. Ultrastructural changes in the canine myocardium with right ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Lab Invest.* 1969;(20):219-229.
- 70- Miana LA, Assad RS, Abduch MC, Gomes GS, Nogueira AR, Oliveira FS, Telles BL, Souto MT, Silva GJ, Stolf NA. Intermittent systolic overload promotes better myocardial performance in adult animals. *Arq Bras Cardiol.* 2010; 95(3):364-72.
- 71- Atik FA. Avaliação experimental do metabolismo energético em dois protocolos de sobrecarga sistólica do ventrículo direito, São Paulo. 2012; 122 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 72- Assad RS, Atik FA, Oliveira FS, Fonseca-Alaniz MH, Abduch MC, Silva GJ, Favaro GG, Krieger JE, Stolf NA. Reversible pulmonary trunk banding. VI:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rapid ventricular hypertrophy in young goats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 142(5):1108-13, 1113.e1.

73- Assad RS, Miana LA, Fonseca-Alaniz MH, Abduch MC, Silva GJ, Oliveira FS, Moreira LF, Krieger JE. Reversible pulmonary trunk banding: IX. G6PD activity of adult goat myocardium submitted to ventricular retraining. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2013; 28(4):482-90.

74- Pontes Jr SC, Assef JE, Barretto RBM, Chacur P, Moreira DAR, Nina VJS, Nunes F, Melani RH, Correia EB, Dinkuisen J, Sousa AMR. Estimation of right ventricular mass by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiography.* 2005; 18:427-34.

75- Rossant J & Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18:541-73.

76 - Ostadal B, Ostadalova I, Kolar F, Charvatova Z, Netuka I. Ontogenetic development of cardiac tolerance to oxygen deprivation - possible mechanisms. *Physiol Res.* 2009; 58 (Suppl 2):S1-12.

77- Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev.* 1999; 79:635-59.

78- Tomanek RJ. General concepts of blood vessel formation and remodeling. In: Tomanek RJ, ed. *Coronary Vasculature-Development, Structure-Function and Adaptations.* New York: *Springer*, 2013:1-23.

79- Rakusan K, Turek Z. Protamine inhibits capillary formation in growing rat hearts. *Circ Res.* 1985; 57:393-8.

80- Shipley RA, Shipley LJ, Wearn JT. The capillary supply in normal and hypertrophied hearts of rabbits. *J Exp Med.* 1937; 65:29-42.

-
- 81- Rakusan K, Turek Z. Protamine inhibits capillary formation in growing rat hearts. *Circ Res.* 1985; 57:393-8.
- 82- Shipley RA, Shipley LJ, Wearn JT. The capillary supply in normal and hypertrophied hearts of rabbits. *J Exp Med.* 1937; 65:29-42.
- 83- Di Donato RM¹, Fujii AM, Jonas RA, Castañeda AR. Age-dependent ventricular response to pressure overload. Considerations for the arterial switch operation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 104(3):713-22.
- 84- Duan WR¹, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003; 199(2):221-8.
- 85- Won Y-W, Lee M, Kim HA, Nam K, Bull DA, Kim SW. Synergistically combined gene delivery for enhanced VEGF secretion and anti-apoptosis. *Molecular pharmaceutics.* 2013; 10(10): 3676-83.
- 86- Xu XH, Xu J, Xue L, Cao HL, Liu X, Chen YJ. VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation. *J Cardiothorac Surg.* 2011; 6:54.
- 87- Zentilin L, Puligadda U, Lionetti V, Zacchigna S, Collesi C, Pattarini L, Ruozi, Camporesi GS, Sinagra G, Pepe M, Recchia FA, Giacca M. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *FASEB J.* 2010; 24(5):1467-1478
- 88- Hui Y, Zhao Y, Ma N, Peng Y, Pan Z, Zou C, Zhang P, Du Z. M3-mAChR stimulation exerts anti-apoptotic effect via activating the HIF-1 α /HO-1/VEGF

signaling pathway in H9c2 rat ventricular cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012; 60(5): 474-482.

89- Zorc M, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovic R, Radovanovic N, Petrovic D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2003; 12(1):36–39.