

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FLÁVIA LOPES BARRETTO

**MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA INDUZIDA
POR EPINEFRINA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO - 2013

FLÁVIA LOPES BARRETTO

**MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA INDUZIDA
POR EPINEFRINA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758)**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal,
na área de concentração de Sanidade
Animal.**

**ORIENTADOR – PROF. DR. CLAUDIO BAPTISTA DE CARVALHO
CO-ORIENTADORES – PROF. DR. LEONARDO SERAFIM DA SILVEIRA**

DR. FELIPP DA SILVEIRA FERREIRA

CAMPOS DOS GOYTACAZES

AGOSTO - 2013

FLÁVIA LOPES BARRETTO

**MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA INDUZIDA
POR EPINEFRINA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758)**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como requisito para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal,
na área de concentração de Sanidade
Animal.**

Aprovada em 20 de Agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Jonimar Pereira Paiva (Doutor, Clínica e Reprodução Animal) – UFRRJ

Profa. Adriana Jardim de Almeida (Doutora, Produção Animal) - UENF

Prof. Leonardo Serafim da Silveira (Doutor, Produção Animal) - UENF
(Co-orientador)

Prof. Claudio Baptista de Carvalho (Doutor, Clínica Médica) - UENF
(Orientador)

Aos

Meus pais, Lícia Maria Lopes Barretto e Sandoval Cloves Barretto, que sempre me apoiaram nesta jornada e foram essenciais para tornar este sonho realidade,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor incondicional e por sempre me guiar pelo caminho certo;

Ao Prof. Claudio Baptista de Carvalho pelos ensinamentos, orientação, confiança no meu trabalho e pelo exemplo de profissional e de ser humano;

Ao Prof. Leonardo Serafim da Silveira, pela co-orientação, dedicação e paciência durante as análises histopatológicas;

Ao querido amigo e co-orientador Felipp da Silveira Ferreira pelos ensinamentos, parceria, amizade e por compartilhar este projeto, tornando-o mais “ameno”;

Aos professores Jonimar Pereira Paiva e Adriana Jardim de Almeida, pela participação na banca examinadora, pela atenção dispensada e pela oportunidade de aprendizado com sua experiência pessoal e profissional, a fim de deixar sua valiosa contribuição científica neste trabalho;

Ao Prof. Alexandre Pio Viana, pela fundamental orientação e auxílio estatístico;

Ao Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, pelos ensinamentos, carinho, dedicação e incentivo ao meu crescimento pessoal.

Ao Laboratório de Morfologia e Patologia Animal e ao Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da UENF, pela infraestrutura e equipe imprescindíveis para o desenvolvimento desta pesquisa;

A Arianne Fabres, pelo auxílio técnico durante a feitura dos ensaios de ELISA;

Ao amigo Sebastián Ricardo Bustamante Bustamante, pela dedicação com nosso trabalho durante o período em que esteve presente;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelo oferecimento deste curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo financiamento desta pesquisa através de fomento financeiro via projeto;

Aos meus pais, Sandoval Cloves Barretto e Lícia Maria Lopes Barretto, por todo o amor, doação e confiança a mim dedicados e por serem meu maior orgulho;

Aos meus irmãos Fábio Shiva e Fabrício Barretto pela amizade, carinho e pelas canções que embalaram meu berço e hoje embalam minha vida;

A minha irmã Jussara Lopes Barretto pela amizade, dedicação, carinho e por ser um exemplo de mulher guerreira;

A minha irmã e amiga Dilma Souza por todo carinho, presença, dedicação e ajuda essenciais no meu desenvolvimento;

A minhas tias Diolinda Lopes Santos e Ana Maria Araújo Penna, por todo o incentivo, apoio e dedicação desde o início da minha jornada acadêmica;

A meus sobrinhos Luan Barretto e Yara Barretto, por preencherem minha vida de alegria;

A Jomar Marques, pelo companheirismo, amor, dedicação e paciência, essenciais para esta realização;

A Jomar "Pai" e a sua família, por todo carinho e suporte que tanto contribuíram nesta jornada;

A amiga, prima e cunhada, Sandra Maria dos Santos, por todo o carinho e presença mesmo na distância;

Ao Dr. Pedro Nunes Caldas, por toda a ajuda e apoio essenciais ao meu ingresso no Mestrado e pela confiança no meu trabalho que incentivaram a conclusão desta etapa;

Aos amigos Marcos Fontes, Taiane Dias, Vivian Santos, Vivian Kreppeke, Cristine Couto, Schayanna Ramos, Priscila Negrini, Andressa Tardem, Camila Torres, Bianca Stern, Aline D'Angelo, Mariah Bianchi, Glaydston Corrêa e Vitor Foletto, pelos momentos de aprendizado, alegria e carinho que me deram força nos momentos difíceis;

Aos animais que participaram deste trabalho e contribuíram com suas vidas em prol da ciência;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram e me incentivaram para a realização deste projeto,

Meu eterno agradecimento!

RESUMO

BARRETTO, Flávia Lopes. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2013. Modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758). Professor Orientador: Claudio Baptista de Carvalho e Co-orientadores: Leonardo Serafim da Silveira e Felipp da Silveira Ferreira.

A Insuficiência Cardíaca é uma síndrome clínica caracterizada pela incapacidade do aparato cardiovascular suprir a demanda metabólica do organismo, resultando na diminuição da qualidade de vida e no aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos. Durante sua instalação ocorre a ativação de mecanismos neuroendócrinos adaptativos, como o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistemas peptidérgicos. O desenvolvimento de modelos experimentais de insuficiência cardíaca se torna essencial para melhor entendimento de sua fisiopatogenia e validação de novos métodos diagnósticos e terapêuticos. Neste contexto, esta pesquisa tem como objetivo a avaliação de um modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos e sua implicação sobre marcadores neuroendócrinos e funcionais miocárdicos (avaliação clínica, histopatológica, Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial, Proteína C Reativa e Eletrocardiografia convencional). Para tal, foram utilizados 38 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), Nova Zelândia, sem restrição de sexo, com 2 meses de idade, pesando aproximadamente 2,0kg. O modelo experimental de insuficiência cardíaca utilizado caracterizou-se por duas infusões de epinefrina, em intervalos de 16 dias, em um total de 29 animais, compondo o grupo experimental (GE). Nove animais sadios permaneceram como grupo controle (GC). As avaliações funcionais e neuroendócrinas foram realizadas em intervalos de 7 dias, totalizando 4 tempos de amostragem. Ao fim deste período os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação histopatológica. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de GLM, Teste T de Student, regressão linear e correlação de Pearson. Os resultados mostraram alterações significativas dos parâmetros clínicos, histopatológicos, neuroendócrinos e funcionais miocárdicos. Os biomarcadores utilizados apresentaram variações significativas ao longo da fase de indução da doença, compatíveis com as lesões causadas pelo protocolo empregado. A

avaliação eletrocardiográfica revelou alterações sugestivas de cardiomiopatia, incluindo arritmias fatais. Observou-se um alto índice de óbitos (52%) e as principais alterações histopatológicas observadas consistiram em hipertrofia, degeneração e fibrose de cardiomiócitos além de fibrose, processo inflamatório difuso, edema e congestão nos diversos tecidos avaliados. O modelo experimental empregado resultou em cardiomiopatia com insuficiência diastólica e mostrou-se eficiente para o desenvolvimento clínico e laboratorial desta síndrome. As provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas utilizadas se mostraram viáveis e eficientes para o diagnóstico e acompanhamento desta enfermidade.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca, modelo experimental, biomarcadores, coelhos.

ABSTRACT

BARRETTO, Flávia Lopes. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2013. Experimental model of congestive heart failure induced by epinephrine in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758). Professor Adviser: Claudio Baptista de Carvalho and Co-Advisers: Leonardo Serafim da Silveira and Felipp da Silveira Ferreira.

Heart failure is a clinical syndrome characterized by the inability of the cardiovascular system to provide the metabolic demands of the body, resulting in decreased quality of life and increased morbidity and mortality of affected patients. During its installation occur the activation of adaptive neuroendocrine mechanisms, such as the sympathetic nervous system, the renin-angiotensin-aldosterone system and peptidergic systems. The development of experimental models of heart failure becomes essential for better understanding of its pathophysiology and validation of new diagnostic and therapeutic methods. In this context, this research aims to evaluate an experimental model of heart failure induced by epinephrine in rabbits and its implication on functional and neuroendocrine myocardial markers (clinical evaluation, histopathological, Angiotensin Converting Enzyme, Atrial Natriuretic Peptide, C-Reactive Protein and conventional electrocardiography). To this end, were used 38 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), New Zealand, male/female, 2 months old, weighing about 2.0 kg. The experimental model of heart failure employed was characterized by two infusions of epinephrine, at intervals of 16 days, for a total of 29 animals, composing the experimental group (GE). Nine healthy animals remained as a control group (CG). Neuroendocrine and functional evaluations were performed at intervals of 7 days, totaling 4 sampling times. After this period the animals were undergo euthanasia for histopathological evaluation. Statistical analyzes were performed using the GLM test, Student's t test, linear regression and Pearson correlation. The results showed significant changes in clinical, histopathological, neuroendocrinal and functional myocardium parameters. The biomarkers showed significant variations during the induction phase of the disease, consistent with the injuries caused by the protocol employed. The electrocardiographic changes were suggestive of cardiomyopathy and revealed fatal arrhythmias. There was a high rate of deaths (52%) and the main histopathological changes observed consisted of

hypertrophy, fibrosis and degeneration of cardiomyocytes as well as fibrosis, diffuse inflammatory process, edema and congestion in the various tissues analyzed. The experimental model resulted in cardiomyopathy with diastolic failure and was effective for clinical and laboratory development of this syndrome. The neuroendocrinal and functional myocardial markers proved to be feasible and effective for the diagnosis and monitoring of this disease.

Keywords: Heart failure, experimental model, biomarkers, rabbits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma da fisiopatologia da insuficiência cardíaca. PVC: Pressão Venosa Central; RVP: Resistência Vascular Periférica; DC: Débito cardíaco. Adaptado de Ferreira et al. (2012).....	27
Figura 2 – Delineamento experimental e cronograma de amostragem do período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	47
Figura 3 – Contenção física e administração de epinefrina em infusão contínua em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	48
Figura 4 – Eletrocardiografia em coelho. Posicionamento dos eletrodos e decúbito esternal. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	49
Figura 5 – Contenção física e coleta sanguínea para avaliação sérica dos biomarcadores. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	50
Figura 6 – Microplaca específica pré-sensibilizada para determinação dos biomarcadores por ELISA. LQFPP/ UENF, 2013.....	52
Figura 7 – Comportamento da variável peso corporal de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	58
Figura 8 – Comportamento da variável Peptídeo Natriurético Atrial de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	61
Figura 9 – Comportamento da variável Proteína C Reativa de alta sensibilidade de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	64
Figura 10 – Comportamento da variável Enzima Conversora de Angiotensina I de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	67
Figura 11 – Comportamento da variável Frequência Cardíaca de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	70
Figura 12 – Comportamento da variável amplitude da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	74

Figura 13 – Comportamento da variável duração da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	75
Figura 14 – Comportamento da variável amplitude do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	76
Figura 15 – Comportamento da variável duração do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	77
Figura 16 – Achados de necropsia compatíveis com os sinais clínicos observados no modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzido pela epinefrina. A: Observa-se ascite; B: efusão pleural e pericárdica hemorrágica; C: epistaxe. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	81
Figura 17 – Achados necroscópicos e histopatológicos cardíacos em coelhos. A: Esquerda: cardiomegalia em animal do GE; Direita: coração normal de animal do GC; B: Esquerda: corte transversal de coração de animal do GE evidenciando hipertrofia concêntrica e redução da luz do ventrículo esquerdo; Direita: corte transversal de coração normal de animal do GC; C: Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GC com congestão (HE; Aumento 10X); D: Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GE com congestão, edema, processo inflamatório difuso com predominância de mononucleares (HE; Aumento 20X); E: Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GE com fibrose (em destaque) (HE; Aumento 10X); F: Microscopia óptica de átrio esquerdo de animal do GE com fibrose (em destaque) (Tricrômico de Gomori; Aumento 10X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	85
Figura 18 – Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais do GC e GE. A: Tecido pulmonar de animal do GC com leve congestão (HE; Aumento 10X); B: Tecido pulmonar de animal do GE com áreas de edema, enfisema, atelectasia e foco de processo inflamatório com predominância de células mononucleares (HE; Aumento 10X); C: Tecido hepático de animal do GC com congestão (HE; Aumento 10X); D: Tecido hepático de animal do GE com congestão e degeneração grave e difusa, mais acentuada na região	

centrolobular (HE; Aumento 10X); E: Tecido renal de animal do GC com congestão (HE; Aumento 20X); F: Tecido renal de animal do GE com cistos, esclerose glomerular e congestão mais acentuada na região corticomedular (HE; Aumento 10X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	86
Figura 19 - Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais do GC e GE. A: Tecido esplênico de animal do GC sem alterações (HE; Aumento 10X); B: Tecido esplênico de animal do GE com cirrose e congestão (HE; Aumento 20X); C: Tecido intestinal de animal do GC sem alterações (HE; Aumento 20X); D: Tecido intestinal de animal do GE com processo inflamatório leve na mucosa e edema de submucosa (em destaque) (HE; Aumento 20X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	87
Figura 20 – Comportamento da variável peso cardíaco de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	88
Figura 21 – Comportamento da variável morfometria das fibras miocárdicas de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais sinais clínicos observados nos animais submetidos ao modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos, ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	56
Tabela 2 – Peso corporal médio de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	58
Tabela 3 – Análise estatística para a variável peso corporal de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	58
Tabela 4 – Análise estatística para as variáveis-resposta Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial e Proteína C Reativa. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	60
Tabela 5 – Concentração sérica média de Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013	62
Tabela 6 – Concentração sérica média de Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	65
Tabela 7 – Concentração sérica média de Enzima Conversora de Angiotensina I (ng/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	68
Tabela 8 – Análise estatística para as variáveis-resposta eletrocardiográficas. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	69
Tabela 9 – Frequência cardíaca média de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	72
Tabela 10 – Principais alterações de ritmo cardíaco em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	72

Tabela 11 – Valores médios para as variáveis-resposta amplitude e duração da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	76
Tabela 12 - Valores médios para as variáveis-resposta amplitude e duração do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	78
Tabela 13 - Achados histopatológicos e necroscópicos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2013. Onde: * regiões discretas e em pequeno número de observações; ** regiões evidentes e freqüentes, *** regiões acentuadas e observadas em grande número de animais.....	80
Tabela 14 – Análise estatística pelo Teste T de Student para a variável peso cardíaco de coelhos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	88
Tabela 15 – Análise estatística pela ANOVA (GLM) para as variáveis-resposta peso cardíaco e morfometria das fibras cardíacas. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	89
Tabela 16 – Peso cardíaco médio de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	89
Tabela 17 – Análise estatística pelo Teste T de Student para a variável morfometria das fibras miocárdicas de coelhos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	92
Tabela 18 – Valores médios da morfometria das fibras miocárdicas de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.....	92

ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm – micrômetro

ACTH – Hormônio Adenocorticotrófico

ADH – Hormônio Anti-diurético

bpm – batimentos por minuto

Cat# - Número de catálogo

cm – centímetro

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECG – Eletrocardiografia

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

G – Gauge

g – gramas

HE – Hematoxilina e Eosina

IC – Insuficiência cardíaca

ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva

IM – Intramuscular

Kg – Quilograma

LDL - *Low Density Lipoprotein*

mg – miligrama

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ – miligrama por quilo

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mV – milivolts

nm – nanômetro

NPR – Receptores peptídeos Natriuréticos

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

PCR – Proteína C Reativa

pg – picograma

PNA – Peptídeo Natriurético Atrial

PNB - Peptídeo Natriurético Cerebral

PNC - Peptídeo Natriurético Tipo-C

PND - Peptídeo Natriurético Tipo-D

rpm – rotações por minuto

s – segundos

SNS – Sistema Nervoso simpático

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TG – Tricrômico de Gomori

TMB - tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Justificativa.....	21
1.2. Objetivos.....	21
1.2.1. Gerais.....	21
1.2.2. Específicos.....	22
1.3. Hipótese.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Insuficiência cardíaca.....	23
2.1.1. Fisiopatogenia da Insuficiência Cardíaca.....	24
2.2. Modelos experimentais de Insuficiência Cardíaca.....	27
2.2.1. Catecolaminas.....	29
2.2.2. Insuficiência Cardíaca induzida por Catecolaminas.....	32
2.3. Avaliação neuroendócrina e funcional cardíaca.....	34
2.3.1. Marcadores cardíacos.....	34
2.3.1.1. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	36
2.3.1.2. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA).....	38
2.3.1.3. Proteína C Reativa (PCR).....	41
2.3.2. Eletrocardiografia Convencional (ECG).....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Comitê de Ética para Uso de Animais.....	45
3.2. Local.....	45
3.3. Modelo animal de experimentação.....	45
3.3.1. Estabelecimento do grupo controle.....	46
3.3.2. Estabelecimento do modelo experimental de insuficiência cardíaca.....	46
3.4. Avaliação neuroendócrina e funcional cardíaca.....	48
3.4.1. Exame Eletrocardiográfico Convencional.....	48
3.4.2. Avaliação neuroendócrina.....	49
3.4.2.1. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)	50
3.4.2.2. Proteína C-Reativa de alta sensibilidade (PCR).....	52

3.5. Eutanásia.....	53
3.6. Análise histopatológica.....	53
3.6.1. Morfometria das fibras miocárdicas.....	54
3.7. Análise estatística e interpretação dos resultados.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Avaliação clínica.....	56
4.2. Peso corporal.....	58
4.3. Biomarcadores cardíacos.....	60
4.3.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA).....	61
4.3.2. Proteína C Reativa (PCR).....	64
4.3.3. Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA).....	67
4.4. Eletrocardiograma.....	69
4.4.1. Frequência cardíaca.....	70
4.4.2. Ritmo cardíaco.....	72
4.4.3. Demais variáveis eletrocardiográficas.....	73
4.5. Óbitos.....	78
4.6. Avaliação histopatológica.....	79
4.6.1. Peso cardíaco.....	87
4.6.2. Morfometria das fibras miocárdicas.....	91
5. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta prevalência, caracterizada pela incapacidade do aparato cardiovascular suprir a demanda metabólica do organismo, resultando na diminuição da qualidade de vida e no aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos (VILARINHO, 2008; SEIXAS-CAMBÃO; LEITE MOREIRA, 2009). Tem sido descrita como uma enfermidade progressiva que resulta na perda de massa muscular ou, alternativamente, perda da habilidade contrátil miocárdica (BREGAGNOLLO et al., 2007; VILARINHO, 2008).

Com a instalação da disfunção cardíaca, ocorre a ativação de mecanismos neuroendócrinos adaptativos, dentre os quais se destacam o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema nervoso simpático (SNS) (NAP et al., 2003; MUCHA; BELERENIAN, 2008; VILARINHO, 2008). Além disso, sistemas peptidérgicos, tais como os peptídeos natriuréticos, endotelina e vasopressina, parecem ser ativados também (NAP et al., 2003; SISSON, 2004; OMLAND; HAGVE, 2009) e são considerados pontos chave na manutenção da homeostase cardiovascular (OMLAND; HAGVE, 2009).

Outro mecanismo adaptativo conhecido é o remodelamento ventricular, processo pelo qual fatores mecânicos, neuro-hormonais e genéticos alteram o tamanho, a forma e a função ventricular (BREGAGNOLLO et al., 2007; VILARINHO, 2008). Identificam-se, também, outros aspectos fisiopatológicos que envolvem além dos sistemas neuroendócrinos, como as citocinas, a modificação imune e a morte celular programada (FEITOSA; CARVALHO, 2000).

Os sistemas neurohumorais desempenham papéis cruciais na origem e evolução da IC. Inicialmente, estas respostas podem contribuir para manutenção da homeostase cardiovascular e adequada perfusão tecidual, sendo estes considerados mecanismos adaptativos em curto prazo. No entanto, em longo prazo, a ativação destes mecanismos, predominantemente do SNS e SRAA, causa efeitos prejudiciais sobre a função cardíaca (NAP et al., 2003).

Tais mecanismos causam primariamente taquicardia, vasoconstrição periférica e retenção de sódio e água, elevando a pressão arterial e o débito cardíaco, favorecendo a perfusão tecidual. Entretanto, atuando de forma crônica, os mecanismos compensatórios contribuem para a evolução dos sinais clínicos

observados nos pacientes com IC, visto que a retenção de sódio e água leva à congestão, ascite, efusão pleural, edema pulmonar e edema dos membros. Outros sinais, iniciais da doença cardíaca, incluem cansaço, intolerância ao exercício, dispnéia, taquicardia, presença de ritmo de galope, sopros e arritmias (PEREIRA et al., 2005).

Algumas dessas respostas orgânicas podem ser avaliadas e traduzidas quantitativamente através do comportamento sérico/plasmático de biomarcadores específicos, dentre os quais se destacam os mais clássicos como os peptídeos natriuréticos, as troponinas, a proteína C reativa, análises de subfrações de lipoproteínas, enzimas séricas (creatinquinases), mioglobina e alguns marcadores observados em estudos mais recentes, como a osteopontina, a cromogranina A, a cistatina C, a resistina, a leptina e a adiponectina (ADAMS et al., 2007; VON HAFE, 2011; BOCCHI et al., 2012).

O emprego destes biomarcadores pode proporcionar diagnósticos mais acurados e precoces, de forma mais simples e menos invasiva. Ainda, podem auxiliar no prognóstico e proporcionar conduta terapêutica mais eficaz (SISSON, 2004; ADAMS et al., 2007).

Nas pesquisas cardiovasculares a utilização de modelos animais tem contribuído substancialmente no progresso e no conhecimento da patogenia da IC, e tem permitido o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e de validação de procedimentos preventivos e terapêuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas. Entretanto, o entendimento da fisiopatologia da insuficiência cardíaca ainda não é completo (MUDERS; ELSNER, 2000; VILARINHO, 2008; CHORRO et al., 2009).

Dentre os modelos animais experimentais de IC, destaca-se o de indução por altas doses de catecolaminas em coelhos, pois permite explorações e avaliações que se mostram difíceis em outros métodos, porém ainda não está completamente caracterizado, suas consequências clínicas, funcionais e hemodinâmicas ainda não são bem estudadas (MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

1.1. Justificativa

O desenvolvimento de modelos reprodutíveis de insuficiência cardíaca torna-se importante para uma completa elucidação desta síndrome assim como para o desenvolvimento e validação de métodos diagnósticos mais precoces e terapêuticos mais eficazes.

Modelos experimentais em animais de laboratório geralmente são limitados pelas dificuldades na obtenção de um estado de disfunção cardíaca estável, pela falta de ativação neuro-humoral, ou limitações na realização de avaliações hemodinâmicas crônicas ou repetidas.

Ademais, as inovações no campo das provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas, que possibilitaram avanços inestimáveis na conduta terapêutica da medicina humana, ainda não vêm sendo aplicadas à rotina da medicina veterinária, devido aos altos custos e a necessidade de adaptações.

Desta maneira, justifica-se esta pesquisa a fim de que as informações geradas possam servir de subsídio para a realização de ensaios experimentais nas áreas de medicina experimental e cardiologia veterinária, assim como possam ser aplicadas à prática clínica da medicina veterinária.

1.2. Objetivos

1.2.1. Gerais

Gerar o modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

Fornecer informações sobre os marcadores cardíacos em tela em medicina experimental, almejando apontar sua real utilidade em medicina veterinária.

Colaborar no aprimoramento e fornecimento de informações sobre estes métodos laboratoriais não invasivos que permitem o monitoramento da integridade da célula miocárdica, introduzindo-os, gradativamente, à rotina veterinária.

1.2.2. Específicos

Avaliação das seguintes provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas em um modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos:

- Avaliação clínica;
- Avaliação histopatológica;
- Eletrocardiografia convencional;
- Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA);
- Peptídeo Natriurético Atrial (PNA);
- Proteína C-Reativa (PCR).

1.3. Hipótese

Testar a hipótese de que o modelo experimental composto por infusões de altas doses de epinefrina é capaz de induzir insuficiência cardíaca em coelhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Insuficiência cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) pode ser definida como uma síndrome clínica complexa, decorrente da disfunção do coração em suprir as necessidades metabólicas teciduais de maneira adequada, devido a redução da capacidade sistólica ou diastólica cardíaca (SISSON, 2004; MUCHA; BELERENIAN, 2008; VILARINHO, 2008).

Descrita como uma enfermidade progressiva, muito prevalente em humanos, a IC é desencadeada a partir de um insulto inicial que culmina no acometimento do músculo cardíaco, resultando em perda de massa muscular ou, alternativamente, perda da habilidade do miocárdio gerar força e manter sua função contrátil adequada, sendo considerada a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares (BREGAGNOLLO et al., 2007; VILARINHO, 2008). Está associada à redução da capacidade funcional, redução da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes portadores (VILARINHO, 2008). Ainda, compreende uma porção substancial dos casos atendidos na medicina veterinária em pequenos animais (MUCHA; BELERENIAN, 2008; TILLEY et al., 2008).

A IC pode ser classificada de diversas formas: quanto ao tempo de instalação (aguda ou crônica), quanto à etiologia (diabética, hipertensiva, isquêmica, valvar, inflamatória, infecciosa e outras) ou quanto à estabilidade clínica do quadro (compensada ou descompensada) (VILARINHO, 2008).

A IC pode comumente se originar da falência miocárdica. A incapacidade do coração de ejetar sangue adequadamente, denominada insuficiência sistólica, e/ou ter enchimento ventricular inadequado, insuficiência diastólica, resultam na redução do débito cardíaco e consequente hipotensão arterial (SANTOS JÚNIOR et al., 2007; VILARINHO, 2008). Este baixo débito cardíaco é tipicamente causado por doença miocárdica com perda da função sistólica (cardiomiopatia dilatada ou degeneração mixomatosa valvular mitral e tricúspide avançada), perda da função diastólica (cardiomiopatia hipertrófica), arritmias cardíacas, obstruções nas vias de saída ventriculares (estenoses aórtica ou pulmonar), regurgitação mitral e hipertensão pulmonar (DARKE et al., 2000).

Na medicina humana a progressão da doença pode se tornar difícil de ser determinada devido a fatores como incerteza do início da doença, idade do paciente, doenças concomitantes e utilização de medicamentos a longo prazo (TOYODA et al., 1998). Em medicina veterinária, pacientes com insuficiência cardíaca congestiva podem apresentar-se com um grande número de alterações, requerendo uma rápida identificação e intervenção por parte do clínico, sendo um ponto crítico a seleção dos testes diagnósticos apropriados (BEARDOW, 2000).

Nesse âmbito, os modelos animais de insuficiência cardíaca tornam-se bastante relevantes para que se possa avaliar de forma mais fiel os efeitos de novos métodos diagnósticos e terapias para a insuficiência cardíaca (TOYODA et al., 1998).

2.1.1. Fisiopatogenia da Insuficiência Cardíaca

Inicialmente, após a instalação da disfunção cardíaca, a redução do volume sistólico sensibiliza barorreceptores que estimulam o sistema nervoso simpático (SNS) a produzir e liberar catecolaminas, com o intuito de aumentar a contratilidade miocárdica, a frequência cardíaca e a pós-carga, além de promover vasoconstrição, aumentando o retorno venoso e conseqüentemente a pré-carga, conforme ilustrado na Figura 1 (BOTONI, 2006). Entretanto, o crescente incremento da atividade simpática determinará em longo prazo efeitos deletérios ao coração. Em humanos com insuficiência cardíaca, o aumento da atividade simpática pode ser demonstrado pela elevação dos níveis séricos de norepinefrina, podendo ser observado mesmo em pacientes assintomáticos, também está diretamente relacionado a gravidade e ao prognóstico da doença, independentemente da causa (COHN, 1989; BOTONI, 2006).

A exposição crônica às catecolaminas contribui para a progressão da doença, em virtude dos efeitos tóxicos aos cardiomiócitos, como isquemia, favorecimento e provocação de apoptose celular, hipertrofia miocárdica, reparação fibrótica, remodelamento e alteração da atividade elétrica do coração, propiciando o surgimento de arritmias e morte súbita (COHN, 1989; BOTONI, 2006).

Adicionalmente, uma interação complexa pode ser observada entre o SNS e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), caracterizada por uma potencialização mútua. O SRAA é estimulado pela necessidade de manutenção da

circulação arterial, que é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica (Figura1) (NAP et al., 2003; BOTONI, 2006).

Além da capacidade de controlar a pressão arterial por meio do líquido extracelular, os rins também produzem e secretam a renina, uma enzima que é liberada quando a pressão arterial cai para níveis muito baixos. Sua resposta consiste em elevar a pressão arterial de diversas maneiras, contribuindo para a correção da queda inicial da pressão (GUYTON; HALL, 2006).

A renina produzida e secretada pela mácula densa do aparelho justaglomerular, uma vez na circulação, catalisa a conversão do angiotensinogênio, produzido no fígado, coração, rins, sistema nervoso central e parede vascular, em angiotensina I. Esta por sua vez é convertida no peptídeo efetor, angiotensina II a partir da ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) tissular e pulmonar (FEITOSA; CARVALHO, 2000; SISSON, 2004; BOTONI, 2006; SAMUELSON, 2007).

Participa também da conversão de angiotensina I em II outro sistema independente da ECA, representado por cinases e cateptases (BOTONI, 2006).

A angiotensina II liga-se, preferencialmente, ao receptor de alta afinidade AT1 existente em vários tecidos, como vasos sanguíneos, rins, fígado, coração, pituitária e adrenal. Sua ação fisiológica vai além de seu grande poder vasoconstritor, estimulando diretamente a reabsorção de sódio no túbulo proximal dos rins e a produção adrenal e liberação da aldosterona que, por sua vez, promove a reabsorção tubular distal de sódio. Ainda, age reduzindo o fluxo sanguíneo renal mediante vasoconstrição da arteríola eferente, estimulando fatores de crescimento, promovendo hipertrofia e aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio, necrose, apoptose, migração de fibroblastos, fibrose e remodelamento ventricular (FEITOSA; CARVALHO, 2000; SISSON, 2004; GUYTON; HALL, 2006; BOTONI, 2006; SAMUELSON, 2007).

A angiotensina II também aumenta a liberação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas, aumentando a contratilidade miocárdica e de prostaglandinas, que mantém a taxa de filtração glomerular por dilatar a arteríola glomerular ascendente (FEITOSA; CARVALHO, 2000; SISSON, 2004; SAMUELSON, 2007). Uma vez liberada, sua meia-vida na circulação é de um a dois minutos, entretanto, quando permanece inapropriadamente elevada por períodos excessivos, como nos casos de insuficiência cardíaca, a angiotensina II e a

aldosterona induzem um processo de remodelamento vascular e ventricular, papel preponderante na evolução do processo (FEITOSA; CARVALHO, 2000; SISSON, 2004).

Como descrito, além da produção de angiotensina, também haverá síntese e liberação de aldosterona, por estimulação da angiotensina II no córtex adrenal. A produção tecidual da aldosterona, no coração e vasos, compreende uma via não dependente de angiotensina II, fato confirmado por estudos que relatam que os inibidores da enzima conversora da angiotensina só impedem temporariamente a secreção da aldosterona (WEBER, 2001; GUYTON; HALL, 2006).

A aldosterona, por sua ação mineralocorticóide, promove a reabsorção de sais (sódio e cloreto) e água para manutenção do volume vascular efetivo em circulação e eliminação de potássio e magnésio. Sua ação crônica também leva à hipertrofia miocárdica, necrose de miócitos, migração de fibroblastos, fibrose e, novamente, remodelamento cardíaco (WEBER, 2001; SAMUELSON, 2007).

Outro sistema envolvido na patogenia da IC é o sistema arginina-vasopressina, também conhecido como hormônio antidiurético (ADH), que se encontra elevado em pacientes com insuficiência cardíaca (Figura 1). Sua síntese e ação são estimuladas pela angiotensina II, por diminuição da função baroceptora e consequente ativação simpática. Age nos tubos coletores, levando a retenção de água livre e sódio, na regulação da osmolaridade e também possui ação vasoconstritora (BOTONI, 2006; SAMUELSON, 2007).

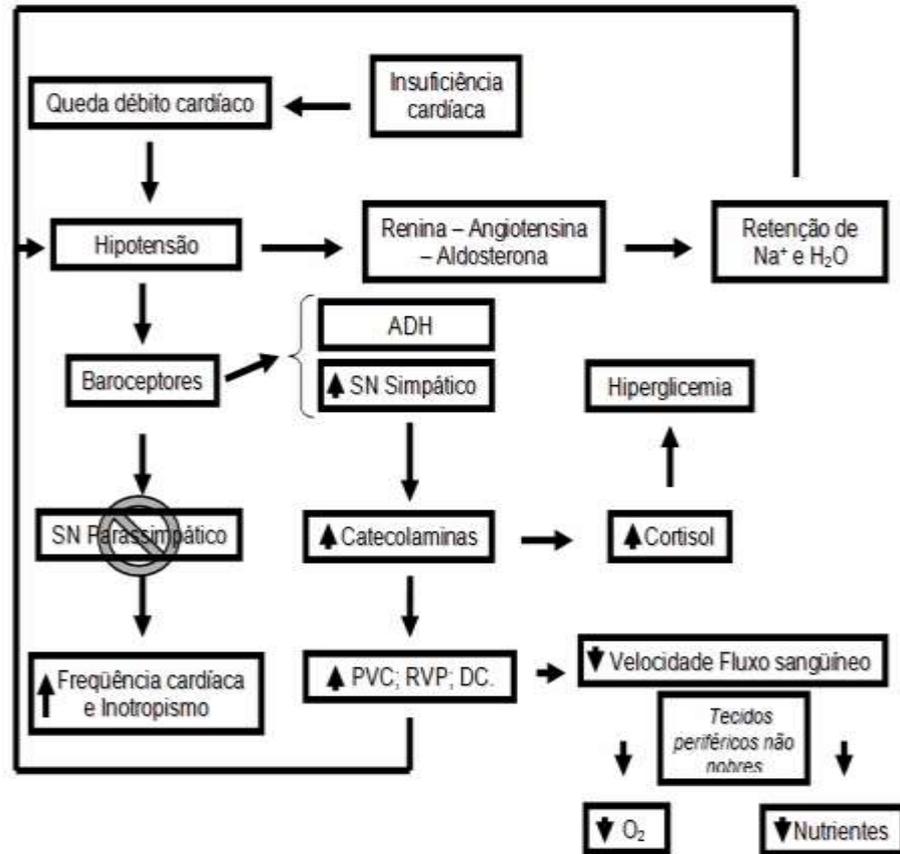


Figura 1: Organograma da fisiopatologia da insuficiência cardíaca. PVC: Pressão Venosa Central; RVP: Resistência Vascular Periférica; DC: Débito cardíaco. Adaptado de Ferreira et al. (2012).

2.2. Modelos experimentais de Insuficiência Cardíaca

A utilização de modelos animais experimentais de IC tem proporcionado uma nova visão sobre a complexa patogênese desta síndrome, trazendo novas informações sobre a fisiopatologia da IC e fornecendo suporte aos estudos clínicos e à avaliação de intervenções terapêuticas (MUDERS; ELSNER, 2000; VILARINHO, 2008; CHORRO et al., 2009).

Desta forma, torna-se de grande importância o desenvolvimento de modelos animais de IC com o intuito de relacionar as alterações mecânicas e histopatológicas, para posterior desenvolvimento de terapias mais eficazes, sejam cirúrgicas ou farmacológicas (VILARINHO, 2008; CHORRO et al., 2009).

De acordo com Vilarinho (2008), o modelo animal ideal deve preencher alguns critérios para mimetizar adequadamente a IC: permitir estudos da

apresentação crônica da insuficiência cardíaca, produzir sintomas de maneira previsível e controlada, permitir a mensuração de parâmetros cardiovasculares, bioquímicos e hemodinâmicos relevantes, ser econômica e tecnicamente factível e estar de acordo com os protocolos de proteção animal.

O uso do coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) como animal de experimentação para o desenvolvimento de IC parece ser um modelo adequado, pois permite mimetizar esta síndrome em curtos períodos de tempo, como quatro semanas, e tem sido amplamente utilizado como modelo animal para a pesquisa cardiovascular (MUDERS et al., 1999; NAP et al. 2003; VILARINHO, 2008; PARIAUT, 2009; VILARINHO et al., 2010).

Além disso, são animais geralmente dóceis, de fácil manuseio, manutenção relativamente simples, além de apresentarem porte físico adequado, facilitando uma série de manobras, como a realização de estudos crônicos e avaliações sequenciais de parâmetros hemodinâmicos, sistemas hormonais e funções orgânicas (FLECKNELL, 1993; FONSECA et al. 1996; PETRONIANU, 1996; VILARINHO, 2008).

Embora seu coração seja menor do que o canino ou suíno, é grande o suficiente para fácil cateterização cirúrgica, além de proporcionar intervenções com menor custo. Mais importante, ainda, é o fato de que a fisiologia cardíaca dos coelhos apresenta características mais semelhantes à fisiologia cardíaca humana do que ratos ou camundongos (POGWIZD; BERS, 2008).

De acordo com Pariaut (2009), tem sido comum observar o emprego de coelhos como modelo para indução de diferentes cardiomiopatias experimentais, como realizado por Nap et al. (2003), Chen et al. (2009), Jin et al. (2009), Verkerk et al. (2011) e Vilarinho et al. (2010).

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos na tentativa de proporcionar maior compreensão da lesão miocárdica e vascular. Modelos de insuficiência cardíaca podem ser induzidos através de isquemia, modificação genética, sobrecarga de volume ou pressão, taquicardia sustentada, ou drogas tóxicas (ABARBANELL et al., 2009).

O modelo cirúrgico, geralmente é realizado através de um mecanismo de sobrecarga de volume e pressão, por meio da destruição mecânica dos folhetos valvares aórticos somada a colocação de bandagem aórtica (NAP et al. 2003; VILARINHO et al, 2010), acompanhado, ou não de isquemia miocárdica através da

colocação de uma ligadura adicional na artéria coronária circunflexa descendente (ABARBANELL et al., 2009; VERKERK et al., 2011).

Outro modelo bastante difundido é o da miocardiopatia tóxica e várias drogas de uso clínico já foram utilizadas com esse intuito, tais como epirubicina, doxorubicina e epinefrina (MUDERS et al., 1999; VILARINHO, 2008; POGWIZD; BERS, 2008). O modelo de indução da Cardiomiopatia Dilatada (CMD) pela doxorubicina (adriamicina), vem sendo amplamente empregado (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006; POGWIZD; BERS, 2008), sobretudo pelo fato deste modelo assemelhar-se a CMD idiopática em humanos (NAGAMI et al., 1997). Estes modelos parecem ser adequados para avaliar a progressão da IC crônica por medidas seriadas da função ventricular em pequenos animais, além de permitir a identificação de processos patológicos subcelulares (VILARINHO, 2008).

Modelos experimentais de IC em pequenos animais de laboratório são geralmente limitados por dificuldades na obtenção de um estado estável de disfunção cardíaca, falta de ativação neuro-humoral, característica esta típica da IC, ou possibilidades limitadas para realizar mensurações hemodinâmicas seriadas. Além disso, a maioria dos modelos constituem-se em métodos muito invasivos, sendo necessário mais estudos acerca de métodos menos invasivos (MUDERS et al., 1999; VILARINHO, 2008).

Um modelo experimental que pode ser adequado para o estudo da insuficiência cardíaca, mas que ainda não tem sido bem caracterizado é o da cardiomiopatia induzida por altas doses de catecolaminas (MUDERS et al., 1999; TAO et al., 2010). Esta técnica vem sendo estudada em várias espécies de animais e promove um dano miocárdico considerável. Diferentes agonistas adrenérgicos, como a norepinefrina, epinefrina e isoproterenol, têm sido empregados em estudos experimentais, com resultados similares em termos de danos histológicos (DOWNING; CHEN, 1985).

2.2.1. Catecolaminas

As catecolaminas produzidas e liberadas pelo sistema nervoso simpático e pela medula adrenal atuam na regulação de inúmeras funções fisiológicas, em especial nas respostas de “luta ou fuga” às situações que ameaçam os mecanismos homeostáticos (COHN, 1989; HARDMAN et al., 1996; BERNE; LEVY, 1996;

SAMUELSON, 2007). A presença de perigo iminente, ansiedade, traumatismo, dor, hipovolemia, hipotensão, anóxia, temperaturas extremas, hipoglicemia e exercício intenso, causam rápida secreção de epinefrina (adrenalina) (BERNE; LEVY, 1996).

A dopamina, norepinefrina e a epinefrina são catecolaminas que partilham da mesma via biossintética. Nos neurônios dopaminérgicos a dopamina é convertida em norepinefrina e nas células cromafins da medula adrenal a epinefrina é produzida através da adição de um radical metila a norepinefrina. A epinefrina resultante é armazenada em grânulos cromafins como o hormônio predominante da medula adrenal (MORAN, 1963; BERNE; LEVY, 1996; SAMUELSON, 2007). A síntese de norepinefrina e epinefrina é regulada por vários fatores, sendo grande parte, regulada pelos mesmos mecanismos que controlam a atividade do sistema nervoso simpático. A própria norepinefrina inibe esta via sintética por *feedback* negativo. A estimulação simpática, a ação do ACTH e do cortisol atuam ativando enzimas desta via (BERNE; LEVY, 1996).

A epinefrina e norepinefrina possuem curta duração na circulação, estando sua meia-vida na faixa de 1 a 3 minutos. A maior porção da epinefrina é metabolizada dentro das células cromafins da medula adrenal quando a síntese excede a capacidade de armazenamento. A epinefrina e norepinefrina circulantes são metabolizadas em muitos tecidos, mas predominantemente no tecido hepático e renal. Os vários produtos oriundos das reações deste metabolismo são excretados na urina (BERNE; LEVY, 1996).

As catecolaminas causam hiperglicemia, via hipercortisolemia transitória, através do estímulo da glicogenólise no fígado e tecido muscular; gliconeogênese no fígado; secreção de glucagon e inibição da secreção de insulina. Ainda, ativa a lipase do tecido adiposo promovendo cetose (HIMMS-HAGEN 1967; BERNE; LEVY, 1996; GUYTON; HALL, 2006; SAMUELSON, 2007). Aumentam a secreção de renina nas células justaglomerulares do rim, o que induz aumento da secreção de aldosterona e ainda estimulam a secreção do hormônio tireóideo, paratireóideo, da calcitonina, do hormônio do crescimento e da gastrina (Figura 1) (COHN, 1989; BERNE; LEVY, 1996; GUYTON; HALL, 2006).

Os efeitos cardiovasculares da epinefrina incluem aumento do débito cardíaco como resultado do aumento da frequência cardíaca e da força contrátil; constrição arteriolar seletiva dos leitos renal, esplâncnico e cutâneo; aumento da pressão arterial sistólica, enquanto a pressão arterial diastólica se mantém inalterada ou sofre

ligeira redução, desviando o sangue para os músculos e mantendo o fluxo sanguíneo coronário e cerebral (MORAN, 1963; HIMMS-HAGEN 1967; RONA, 1985; COHN, 1989; BERNE; LEVY, 1996; HARDMAN et al., 1996; SAMUELSON, 2007). Como a epinefrina reage bem com os receptores β -1 e β -2, mas sua potência é menor com os receptores α , em baixas concentrações a epinefrina causa vasodilatação no músculo esquelético (efeito β -adrenérgico) e em altas concentrações produz vasoconstrição (efeito α -adrenérgico). Na pele, apenas a vasoconstrição é obtida, ajudando a conservar o calor (BERNE; LEVY, 1996; HARDMAN et al., 1996).

Ademais, as ações da epinefrina compreendem: redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular devido a vasoconstrição; aumento da captação de K^+ pelo músculo esquelético, fígado, tecido ósseo e glóbulos vermelhos, evitando quadros de hipercalemia; regulação do apetite como inibidor do comportamento ingestório; participação no mecanismo de agregação plaquetária; inibição da atividade motora gastrointestinal e geniturinária; broncodilatação e midríase (BERNE; LEVY, 1996; HARDMAN et al., 1996).

Tais ações beneficiam indivíduos em perigo ou que sofreram traumatismo importante, insuficiência circulatória ou hipóxia, entretanto, essas ações prolongadas podem tornar-se deletérias. A redução do fluxo sanguíneo renal pode levar a insuficiência renal, assim como a redução do fluxo sanguíneo no leito esplâncnico a insuficiência hepática, paralisia intestinal e necrose. Ainda, a redução do fluxo sanguíneo no geral leva a uma menor oxigenação tecidual e ao aumento da produção de lactato, resultando em acidose metabólica e estresse oxidativo (BERNE; LEVY, 1996; SAMPATH; VIJAYARAGAVAN, 2008).

Embora as catecolaminas endógenas, em especial a epinefrina, sejam algumas vezes utilizadas como fármacos, a maioria dos agonistas disponíveis consiste em análogos estruturais da epinefrina ou norepinefrina, devido as vantagens terapêuticas destes análogos. Os efeitos da administração exógena de epinefrina e norepinefrina são quase sempre exacerbados, altas doses de epinefrina podem causar vasoconstrição da musculatura esquelética (efeito α -adrenérgico); edema pulmonar; extrassistoles ventriculares podendo ser seguidas de taquicardia ventricular multifocal ou fibrilação ventricular. A infusão intravenosa de epinefrina e outras catecolaminas podem causar também a morte dos cardiomiócitos

(DOWNING; CHEN 1985; RONA, 1985; HARDMAN et al., 1996; SAMPATH; VIJAYARAGAVAN, 2008).

Neste âmbito, deve-se ressaltar a importância do monitoramento de pacientes com insuficiência cardíaca, pois exibem sinais clínicos referentes ao aumento do tônus simpático, sendo que esta estimulação crônica do sistema nervoso simpático pode gerar inúmeras consequências nocivas ao paciente (COHN, 1989).

2.2.2. Insuficiência cardíaca induzida por catecolaminas

Desde a descoberta das catecolaminas, por volta de 1906, diversos trabalhos vêm relatando suas ações cardiopáticas. Em geral, as lesões miocárdicas induzidas por catecolaminas endógenas ou sintéticas são similares e causam substancial comprometimento da função ventricular esquerda *in vivo* (DOWNING; CHEN, 1985; RONA, 1985; VLEET; FERRANS, 1986).

A maioria destes estudos foi realizada utilizando-se o isoproterenol, entretanto há vários estudos relatando o uso da epinefrina, norepinefrina, salbutamol, terbutalina e efedrina (RONA, 1985, VLEET; FERRANS, 1986; JIANG; DOWNING, 1990). Diversas espécies também foram empregadas nestes estudos, incluindo ratos, coelhos e cães, nas quais as lesões típicas encontradas foram necroses e fibroses miocárdicas multifocais com concentração do dano celular no subendocárdio ventricular esquerdo e músculos papilares (VLEET; FERRANS, 1986; MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

Segundo Downing e Chen (1985), em geral, utilizando-se o tempo de 90 minutos como base, infusões de doses moderadas de 2 a 3µg/kg/min são suficientes para produzir lesões extensivas nas miofibras musculares. Entretanto, a magnitude dessas lesões é dose-dependente o que incita diversos pesquisadores a estudarem este modelo experimental em diferentes doses e tempos de infusão, dependendo da extensão do dano que objetivam.

Neste contexto, Muders et al. (1999) investigaram os efeitos crônicos da cardiomiopatia induzida por catecolaminas nos parâmetros hemodinâmicos e ecocardiográficos. Para isto, realizaram administrações repetidas de alta dose de epinefrina em coelhos conscientes e cronicamente monitorados, ao longo de um período de 51 dias. Este protocolo reproduziu um modelo viável de cardiomiopatia induzida por epinefrina. Foi possível observar também, que doses mais baixas de

epinefrina associadas a poucas aplicações, acarretaram em reduzido comprometimento hemodinâmico, porém doses mais elevadas ocasionaram alta mortalidade.

Sabe-se que doses excessivas de catecolaminas produzem destruição difusa do miocárdio com perda de miócitos e necrose, bem como extensa fibrose. Tais alterações podem ser observadas em humanos após o tratamento com doses elevadas de catecolaminas e em pacientes com feocromocitoma, que pode levar ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia induzida por catecolamina (MUDERS et al., 1999; COHN, 1989; NAP et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; BOTONI, 2006).

Ainda, o aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina está diretamente relacionado ao prognóstico e mortalidade em portadores de IC, assim como a redução dos níveis plasmáticos de noradrenalina parece ser benéfica, pois tem sido associado a redução da mortalidade (NAP et al., 2003).

Certo número de mecanismos tem sido postulado estar envolvido na patogênese desta forma de cardiomiopatia: radicais altamente citotóxicos produzidos a partir do metabolismo da catecolamina através do sistema de monamina oxidase; vasoconstrição coronariana induzida por catecolaminas com geração de radicais decorrentes de isquemia e necrose miocárdica relacionada com a agregação plaquetária intravascular; sobrecarga de cálcio e deficiência de fosfato por ativação excessiva da adenosina trifosfatase cálcio-dependente são exemplos de tais mecanismos (RONA, 1985; BINDOLI et al., 1992; MUDERS et al., 1999).

Segundo Bindoli et al. (1992) as catecolaminas são lentamente oxidadas devido à ausência de um catalisador e podem gerar radicais livres através de oxidações envolvendo sistemas enzimáticos ou íons metálicos. Os efeitos cardiotoxícos das catecolaminas não são causados pela molécula propriamente dita, mas sim pelos seus produtos oxidados, como o adenocromo. Em nível subcelular, o adenocromo forma uma ligação covalente com a membrana mitocondrial, promovendo um declínio da capacidade respiratória e inibição da absorção de cálcio por essa organela. Em seguida ocorre uma redução significativa da atividade de cálcio ATPases, de sódio/potássio ATPases e da adenilato ciclase. Paralelamente há um rápido declínio de ATP com simultâneo aumento de ADP e AMP. O somatório destes mecanismos induz alterações morfológicas bem características, como degeneração miofibrilar e infiltrado leucocitário, que culminam com a morte celular e conseqüente necrose das fibras musculares (JIANG; DOWNING, 1990).

A literatura relata que, imediatamente após a administração de altas doses de catecolaminas, hemorragias subendocárdicas focais e difusas assim como focos hemorrágicos no miocárdio e no epicárdio podem ser observados ao exame necroscópico. Após 6 a 10 horas, é desencadeada uma resposta intersticial inflamatória, primariamente por células mononucleares, sendo mais intensa na região subendocárdica. Linfócitos, granulócitos e miócitos perivasculares de Anitschkoff também estão presentes no infiltrado inflamatório. Após 48 horas da administração das catecolaminas observam-se lesões demarcadas, envolvendo particularmente a porção apical do coração. As válvulas mitral, tricúspide e aórtica podem apresentar-se edematosas e deformadas, e comumente são hemorrágicas. Edema intersticial e congestão subendocárdica também constituem achados deste período. Aproximadamente após 72 horas observam-se bandas de tecido conectivo colagenoso e numerosos fibroblastos. A partir do quarto ou quinto dia pós infusão iniciam-se focos de fibrose miocárdica, com formação de processos cicatriciais. Ocasionalmente podem ocorrer aneurismas nas áreas fibróticas e degeneração miofibrilar. No sexto dia ocorre reabsorção de fibras musculares necrosadas e há um tecido de granulação proeminente. Camadas de histiócitos e fibroblastos surgem, sugerindo reação granulomatosa. Estas áreas reativas são progressivamente substituídas por tecido fibroso. Duas semanas após restam apenas cicatrizes (VLEET; FERRANS, 1986; JIANG; DOWNING, 1990).

2.3. Avaliação neuroendócrina e funcional cardíaca

2.3.1. Marcadores cardíacos

Em 1954 foi relatada a primeira utilização de um biomarcador para o estudo da lesão miocárdica isquêmica, onde foi descrita a elevação da atividade sérica da transaminase glutâmico-oxalacética (AST), acima dos seus valores de referência, poucas horas após um infarto agudo do miocárdio (MCDONNELL et al., 2009). Isto motivou diversas pesquisas com o intuito de buscar novos marcadores da IC para uma melhor compreensão da sua fisiopatogenia, melhorando a estratificação de risco, terapêutica e prognóstico (FREDERICKS et al., 2001; SINGH et al., 2010; VON HAFE, 2011).

De acordo com Singh et al. (2010) os biomarcadores podem ser definidos como parâmetros biológicos que podem ser mensurados objetivamente e quantificados como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a intervenções terapêuticas. São utilizados geralmente na triagem, diagnóstico ou monitoramento de doenças específicas, além de terem também aplicabilidade na determinação da susceptibilidade à doença e elegibilidade para terapias específicas. Ainda, segundo estes autores, os biomarcadores cardíacos são componentes celulares que são liberados na circulação quando ocorre uma lesão miocárdica e desempenham um papel fundamental no diagnóstico, estratificação de risco e tratamento de pacientes com dor torácica, suspeita de síndrome coronariana aguda e em quadros agudos de insuficiência cardíaca.

O biomarcador ideal é aquele que demonstre um aumento específico, facilmente mensurável e que possa ser usado para comprovar a presença de isquemia, inflamação, necrose do miocárdio, entre outras, fornecendo pistas acerca da fisiopatogenia da IC em cada paciente e orientando para um procedimento terapêutico individualizado. Recentemente, biomarcadores séricos têm sido utilizados para o diagnóstico de infartos agudos do miocárdio e avaliação dos danos miocárdios resultantes de cirurgias, miopatias, exercício, miocardites e uma variedade de outras intervenções médicas, como angioplastias, ablação por cateter de radiofrequência e cardioversão elétrica de arritmias (FREDERICKS et al., 2001; ADAMS et al., 2007; UZUELLI, 2008; SINGH et al., 2010; VON HAFE, 2011).

Muitas dessas condições e procedimentos podem ser estudados utilizando-se modelos animais de experimentação. Neste âmbito, diversas pesquisas têm sido realizadas na área da Medicina Veterinária com o intuito de investigar a utilidade destes biomarcadores em animais com doenças cardíacas (MUDERS et al. 1999; FREDERICKS et al., 2001; SISSON, 2004). Os resultados têm apontado que esta pode ser uma ferramenta promissora e inclusive já está sendo empregada rotineiramente em alguns centros para o diagnóstico de cardiopatias. Além de auxiliar na detecção de lesões miocárdicas associadas a doença cardíaca isquêmica, trauma torácico, miocardite e drogas cardiotóxicas, alguns biomarcadores podem ser utilizados para distinguir causas cardíacas e não-cardíacas de tosse e dispnéia e ainda permitem o diagnóstico da doença cardíaca assintomática ou minimamente sintomática permitindo uma intervenção terapêutica mais precoce e eficaz (SISSON, 2004; REYNOLDS; OYAMA, 2008; RIBEIRO, 2010).

Dentre estes biomarcadores, vêm se destacando a utilização da Proteína C Reativa (PCR) de alta sensibilidade, Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (CAMPBELL et al. 1978; WEN et al. 2000; NAP et al., 2003; HUANG et al. 2009; KALLARAS et al. 2009; SINGH et al., 2010).

2.3.1.1. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma carboxipeptidase que atua em vários sistemas peptídicos, é um regulador crítico do sistema renina-angiotensina-aldosterona e alvo de muitos agentes terapêuticos altamente eficazes utilizados para tratar doenças cardiovasculares e renais (FEITOSA; CARVALHO, 2000; LAMBERT et al., 2008). A ECA é responsável pela conversão do decapeptídeo inativo, angiotensina I, no potente vasoconstritor, angiotensina II, sendo este um importante regulador da homeostase cardiovascular conforme descrito anteriormente. Também é responsável pelo metabolismo do peptídeo bradicinina, com efeito hipotensor (FEITOSA; CARVALHO, 2000; MATA-BALAGUER et al., 2004; LAMBERT et al., 2008).

Desta forma, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) também se interrelaciona diretamente com o sistema cinina-caliceína através da ECA, uma vez que esta é responsável pela inativação da bradicinina, um peptídeo com importantes ações cardiovasculares e metabólicas, como a intensa dilatação arteriolar e o aumento da permeabilidade capilar (GYTON; HALL, 2006; MIRANDA, 2006).

Embora a conversão de angiotensina I em angiotensina II pela ECA possa ocorrer nos rins, esta também pode ocorrer em outras partes do corpo, especialmente nos pulmões e no leito vascular dos pulmões (SAMUELSON, 2007). Quatro tipos celulares distintos são capazes de expressar a ECA: células endoteliais, macrófagos, miofibroblastos e células epiteliais, sendo o endotélio vascular o principal responsável pela atividade da ECA no coração normal (MILL et al., 1997). Entretanto, tem-se demonstrado a existência de concentrações de renina e da ECA, em células do tecido miocárdico tal qual nos rins, nas glândulas salivares, no cérebro e nas artérias. Segundo César (2000), àquela época já se sabia da existência deste sistema, presente em tecidos outros além das células justaglomerulares e das arteríolas aferentes e eferentes renais.

Logo, os efetores finais do SRAA, notadamente a angiotensina II e a bradicinina, exercem efeitos parácrinos nesses órgãos e a atividade da ECA em determinado tecido, tem um papel fundamental no ritmo de produção local de angiotensina II e, conseqüentemente, na concentração e nos efeitos desse peptídeo a nível local (MILL et al., 1997; FEITOSA; CARVALHO, 2000).

O entendimento atual da fisiopatologia da insuficiência cardíaca vai além da falência de bomba propriamente dita e, em conseqüência desta, retenção de sal e água. Identificam-se outros aspectos fisiopatológicos que envolvem o sistema neuroendócrino, as citocinas, a modificação imune, o remodelamento ventricular e a morte celular programada. Todas essas alterações estão envolvidas na gênese ou na manutenção da descompensação cardíaca. Entre elas, a participação do SRAA é a que tem merecido atenção mais concentrada, e conferido melhores resultados no tangente a intervenções terapêuticas (FEITOSA; CARVALHO, 2000).

A ativação neuroendócrina (SRAA e noradrenalina) interfere na síntese protéica intracelular, causando hipertrofia e morte celular, o que aumenta a sobrecarga de trabalho, acelerando a morte das células remanescentes. Isso gera um círculo vicioso, com agravamento progressivo e constante da doença cardíaca até a morte do paciente (PEREIRA et al., 2005).

Entretanto, apesar da ECA ser considerada ponto chave de regulação do SRAA, não é considerada um biomarcador específico para a doença cardíaca, devido sua produção e disponibilidade em diversos outros tecidos, sendo seu uso mais restrito nos casos de sarcoidose e outros tipos de doenças pulmonares, como bronquite crônica, enfisema, carcinoma de brônquio, bronquite asmática e fibrose cística (STUDDY et al., 1983; BAUDIN et al., 2005). Estas aplicações clínicas cursam com redução da atividade sérica desta enzima, devido à perda da área de superfície endotelial vascular pulmonar, região anatômica onde se encontram maiores concentrações e atividades séricas fisiológicas desta enzima (STUDDY et al., 1983).

Não obstante, alguns autores vêm obtendo sucesso em correlações entre os níveis séricos de ECA e alterações na pressão arterial (TODD et al., 1995) e no desenvolvimento de trombose coronária (NIU et al., 2002). Além disso, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas envolvendo a mensuração desta enzima em coelhos. Apresentando resultados amplamente variáveis, foram avaliados os efeitos de diversos procedimentos sobre seu comportamento, tais como a relação entre a

atividade da ECA e a capacidade de desenvolvimento de hipertensão associada à doença arterial (CAMPBELL et al., 1978), os efeitos séricos da administração de bleomicina (LAZO et al., 1981; LAZO et al., 1983) e os efeitos do enalapril sobre a atividade da ECA em coelhos com dieta rica em colesterol (HOSHIDA et al., 1997).

Assim, somado ao fato desta molécula ser o principal alvo da terapêutica anti-hipertensiva, acredita-se que a mensuração desta molécula possa vir a contribuir em pesquisas cardiovasculares objetivando o diagnóstico precoce da insuficiência cardíaca, uma melhor avaliação da progressão da doença, seu prognóstico e terapêutica (NAP et al., 2003).

2.3.1.2. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)

Até meados dos anos 50, acreditava-se que a diurese era controlada por apenas dois mecanismos neuro-hormonais: o sistema vasopressina (ADH) e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). No entanto, com a descrição do aumento da diurese associado a episódios paroxísticos de taquicardia supraventricular, passou-se a suspeitar que o terceiro fator estivesse ligado ao coração (NETO; CLAUSELL, 2004).

Com o advento da microscopia eletrônica, foi possível visualizar a presença de grânulos intracelulares nos miócitos atriais, em grande semelhança aos encontrados nas células endócrinas (NETO; CLAUSELL, 2004). Mas somente na década de 80 pesquisadores demonstraram que o átrio cardíaco continha uma substância capaz de reduzir a pressão sanguínea sistêmica e induzir a natriurese (ATLAS; LARAGH, 1986; CHO et al., 2002; FRANÇOIS et al., 2002).

Em um trabalho realizado por De Bold et al. (1981), foi descrito que o extrato de miocárdio atrial e ventricular injetado em modelos animais causava um rápido aumento na excreção urinária de sódio e cloreto. A substância que causou estes efeitos foi denominada Fator Natriurético Atrial.

O sistema peptídeo natriurético é ativado sempre que o coração sofre uma agressão, seja ela crônica ou aguda, na tentativa de compensar os sistemas vasoconstritores que são ativados nessas situações. As principais ações desse sistema são a promoção de diurese e vasodilatação arterial e venosa. Sabe-se, no entanto, que uma série de efeitos adicionais é deflagrada com a liberação desses peptídeos, como inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona, por meio da

redução da liberação de renina, supressão da atividade da enzima conversora de angiotensina e bloqueio da conversão da aldosterona, além de inibição simpática, inibição de crescimento de células musculares lisas e possivelmente redução de apoptose aumento da permeabilidade vascular, efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos e antifibróticos (CHO et al., 2002; FRANÇOIS et al., 2002; DIETZ, 2005; VILLACORTA JUNIOR; MESQUITA 2006; SILVA et al., 2008; OMLAND; HAGVE, 2009).

O peptídeo natriurético atrial (PNA), o peptídeo natriurético tipo-B, também chamado de peptídeo natriurético cerebral (PNB), e o peptídeo natriurético tipo-C (PNC) constituem a família dos peptídeos natriuréticos e seu papel principal é a participação na homeostase cardiovascular e na modulação do crescimento celular, estando direcionados a proteger o sistema cardiovascular dos efeitos da sobrecarga de volume. Encontram-se aumentados na insuficiência cardíaca e sua elevação correlaciona-se com a gravidade da doença (NETO; CLAUSELL, 2004; BOTONI, 2006; DANIELS; MAISEL, 2007; VINK et al., 2012). Ainda, mais recentemente, foi identificado o peptídeo natriurético tipo-D (PND), com propriedades vasodilatadoras, presente no veneno da serpente mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), porém suas ações ainda não são estabelecidas (D'SOUZA et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Embora o PNA seja preferencialmente sintetizado e secretado a partir dos átrios e o PNB a partir dos ventrículos, ambos podem ser sintetizados em quaisquer câmaras sob condições patológicas, promovendo principalmente vasodilatação, natriurese e diurese. O PNC é sintetizado principalmente a partir de células endoteliais, sendo também produzido no tecido miocárdico e atua inibindo os efeitos do remodelamento cardíaco decorrentes do infarto miocárdico (DANIELS; MAISEL, 2007; VINK et al., 2012).

Alguns estudos têm detectado aumento dos níveis séricos de PNA, PNB e de seu precursor inativo (NT-pró-BNP) em diferentes disfunções cardíacas, incluindo disfunção diastólica, distúrbios valvulares, fibrilação atrial e em afecções não-cardíacas, como tromboembolismo pulmonar agudo, hipertensão pulmonar e hipertireoidismo. Atualmente, estes peptídeos (PNA, PNB e NTpró-BNP) também têm sido utilizados como biomarcadores para doença coronariana em pacientes com doença renal crônica (DANIELS; MAISEL, 2007; SILVA et al., 2008).

Suas ações se fazem nos glomérulos e tubos coletores, determinando vasodilatação da arteríola aferente e vasoconstrição da eferente, além da redução

na reabsorção de sódio e contribuem para a vasodilatação periférica. Todavia, com o evoluir da insuficiência cardíaca, observa-se um bloqueio das ações desses peptídeos, o que contribui para o declínio da função ventricular, redução da perfusão renal e retenção de sódio e água. Essa “resistência” talvez decorra da diminuição da ação dos peptídeos em seus receptores renais ou do aumento da ação das endopeptidases que fazem o seu metabolismo (BOTONI, 2006).

O peptídeo natriurético atrial é armazenado em grânulos e liberado principalmente através de mudança na tensão das paredes atriais, ou seja, através de uma distensão atrial (CHO et al., 2002; DIETZ, 2005; DANIELS; MAISEL, 2007; OMLAND; HAGVE, 2009). Segundo Cho et al. (2002), corroborado por Dietz (2005), o mecanismo pelo qual a distensão atrial regula a liberação do PNA é desconhecido. Foi sugerido que o estímulo para a secreção do PNA é regulado por um mecanismo de dois passos seqüenciais. Inicialmente, o PNA é liberado dos miócitos atriais para o espaço extracelular adjacente. Em segundo lugar, a translocação transendocárdica do fluido extracelular contendo o PNA para o sangue é induzida pela contração atrial.

A forma biologicamente ativa deste fator natriurético atrial compreende um peptídeo com 28 aminoácidos, que exerce suas ações fisiológicas através de ligações com receptores peptídeos natriuréticos (NPR) localizados na superfície celular. Três diferentes NPRs são descritos: NPR-A, NPR-B e NPR-C. O PNA associa-se ao NPR-A com alta afinidade, e este último expressa-se amplamente no sistema cardiovascular, predominantemente nos grandes vasos, pulmões, rins, pele, plaquetas e nas fibras nervosas simpáticas pré-sinápticas. O PNA é removido da circulação pelo receptor para peptídeo natriurético atrial tipo C (NPR-C), por meio da filtração glomerular e pela endopeptidase 24-11, sendo sua meia vida plasmática de dois a quatro minutos em humanos (COSTA et al., 2000; DANIELS; MAISEL, 2007; OMLAND; HAGVE, 2009).

Na medicina humana, a mensuração deste peptídeo vem sendo empregada para o diagnóstico de eventos cardíacos diversos, sendo sua elevação comumente associada insuficiência cardíaca de diversas origens, como taquicardias, estenose mitral ou aórtica, cardiomiopatia dilatada, acentuada hipertrofia ventricular esquerda com disfunção diastólica, distensão atrial e demais condições que cursem com o aumento da pressão atrial e disfunção ventricular (FYHRQUIST; TIKKANEN, 1988; STEVENS et al., 1995; SAGNELLA, 1998; ABASSI et al., 2004). Ainda, segundo

Sagnella (1998), a proporção desta elevação está relacionada à severidade da enfermidade e sua avaliação pode indicar não apenas o grau de insuficiência cardíaca, mas também pode ser utilizada como uma forma de monitoramento a resposta de terapias com diversas drogas.

De acordo com alguns autores, existe um grande número de estudos sobre o PNA em coelhos, avaliando-se os efeitos de diversos procedimentos sobre o comportamento deste peptídeo, tais como a bradicardia e taquicardia induzidas com marcapasso (RANKIN et al., 1986), os efeitos do afogamento (LORENTE et al., 1990), regurgitação aórtica induzida (WAINAI et al., 1990), ligadura do ducto biliar comum (VALVERDE et al., 1992), diabetes Mellitus induzida por aloxana monohidratada (YEGIN et al., 1995) e rigidez aórtica em coelhos normais e com aterosclerose anestesiados (KALLARAS et al., 2009).

Segundo Sisson (2004), a utilização destes peptídeos na Medicina Veterinária em pacientes suspeitos de doença cardíaca ou insuficiência cardíaca é uma possibilidade motivadora, porém carece de um trabalho bastante técnico e uma verificação clínica detalhada antes que possam ser incorporados à rotina. Entretanto, a quantificação destes peptídeos vem sendo realizada no estudo de modelos experimentais de insuficiência cardíaca congestiva em várias espécies, como ratos, camundongos, cães e coelhos (ACKERMANN et al., 1986; MAASS; LEINWAND, 2000; WEN et al., 2000).

2.3.1.3. Proteína C-Reativa (PCR)

A Proteína C-Reativa (PCR) é uma proteína pentamérica, presente no plasma, e constitui o mais estudado e importante marcador inespecífico da fase aguda da inflamação sistêmica. Possui peso molecular de 100 kilodaltons, composta por 5 subunidades idênticas de 20 kilodaltons cada uma (CAIDE et al., 1996; BLACK et al., 2003; CERÓN et al., 2005; VILLACORTA et al., 2007; DANESH; PEPYS, 2009).

A PCR foi a primeira proteína de fase aguda a ser descrita, em 1930, e originalmente nomeada pela habilidade de se unir ao polissacarídeo-C do *Pneumococcus pneumoniae* (CERÓN et al., 2005; VILLACORTA et al., 2007). Acreditava-se que desempenhava um papel importante na defesa do hospedeiro e da inflamação através da sua capacidade de ativar o sistema complemento e acoplar

receptores em células fagocíticas e era utilizada na medicina principalmente para auxiliar o diagnóstico da febre reumática aguda (BLACK et al., 2003; SIMON et al., 2005).

Em 1954, já era conhecida a importância de se estimar os níveis da PCR como uma medida de avaliação de lesão miocárdica em eventos coronarianos agudos. Posteriormente, Kushner e Kaplan (1961) detectaram a PCR dentro e ao redor de miofibras necróticas em infartos do miocárdio em coelhos. Sendo mais tarde detectadas em corações humanos durante o infarto do miocárdio em co-localização com o sistema complemento ativado (BISOENDIAL et al., 2007).

A PCR é sintetizada principalmente pelos hepatócitos, porém estudos anteriores identificaram vários tipos de células que podem servir como fontes extra-hepáticas de PCR, incluindo os macrófagos do pulmão e do cérebro, epitélio renal e adipócitos (SIMON et al., 2005; BISOENDIAL et al., 2007).

Em pessoas saudáveis, os níveis sanguíneos de PCR são muito baixos, mas são impulsionados por qualquer inflamação em qualquer parte do corpo. Um aumento de até mil vezes nos níveis de PCR, dentro de 24 a 72 horas não é incomum em distúrbios infecciosos ou mesmo não infecciosos, como o infarto do miocárdio (SIMON et al., 2005; BISOENDIAL et al., 2007).

A PCR ainda é considerada um dos fatores de risco que podem ajudar a determinar se uma pessoa saudável está em risco de doença cardiovascular. Os níveis de PCR podem ajudar os médicos na estratificação de risco: quanto maior PCR, maior o risco e pior o prognóstico, incluindo eventos cardíacos recorrentes, reestenose de artérias anteriormente tratadas por meio de angioplastia e até morte súbita (SIMON et al., 2005; VILLACORTA et al., 2007).

A mensuração da PCR tem sido defendida como um meio de melhorar a predição de risco cardiovascular. Sabe-se que a PCR liga-se a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e está presente em placas ateroscleróticas. Há também grande interesse em saber se a PCR pode desempenhar um papel causal direto na doença cardíaca coronária e, por implicação, poderia ser um importante alvo terapêutico na prevenção da doença (DANESH; PEPYS, 2009).

A inflamação apresenta papel importante na fisiopatologia de algumas doenças cardiovasculares, como nas síndromes coronarianas agudas, em que apresenta valor prognóstico. Desde a década de 1990, já havia sido demonstrado que a PCR estava elevada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Mais

recentemente, seu papel na insuficiência cardíaca aguda tem sido destacado, podendo ser um fator precipitante de descompensação. Entretanto, a concentração sérica da PCR pode ser influenciada por outros fatores, como medicações, reposição hormonal, tabagismo e causas infecciosas (VILLACORTA et al., 2007).

Recentemente, uma variedade desta proteína, a Proteína C reativa de alta sensibilidade, vem ganhando destaque no diagnóstico da doença cardíaca e da aterosclerose devido a sua maior sensibilidade, possibilitando um diagnóstico mais precoce (HUANG et al., 2009; GAO et al., 2013).

Diversos autores têm desenvolvido estudos em coelhos envolvendo o comportamento desta proteína de alta sensibilidade sob diversas condições, tais como lesões ateroscleróticas (SUN et al., 2005), aneurisma aórtico abdominal (HUANG et al., 2009), administração de extrato aquoso de *piper sarmentosum* em animais submetidos a dieta experimental de colesterol (AMRAN et al., 2011) e administração de rosiglitazone em animais com lesão miocárdica por modelo de isquemia/reperfusão (GAO et al., 2013).

2.3.2. Eletrocardiografia Convencional (ECG)

Os primeiros estudos sobre fisiologia cardíaca datam do início do século XVII por William Harvey, mas apenas em 1887 Augustus Waller registrou pela primeira vez o potencial elétrico cardíaco a partir da superfície corpórea, sendo o primeiro a usar o termo eletrocardiograma. A partir daí, outros estudiosos como Eithoven e Nürr desenvolveram novos aparelhos para registro da atividade elétrica cardíaca e conceitos na eletrocardiografia, passando a ser utilizada como método auxiliar de diagnóstico (TILLEY, 1992; WOLF et al., 2000).

O eletrocardiógrafo, por definição, é um aparelho (voltímetro) capaz de captar o potencial elétrico gerado pela atividade cardíaca que se propaga até a superfície corpórea, e converte-la em um registro gráfico da amplitude em função do tempo, o qual é denominado eletrocardiograma. Basicamente, se trata de um gráfico que trabalha com dois eixos, um horizontal, que mede o tempo em segundos, e um vertical, que mede a amplitude das ondas em milivolts (WOLF et al., 2000; MUCHA; BELERENIAN, 2008).

Segundo Mucha e Belerenian (2008), a eletrocardiografia (ECG) é um método simples, de fácil realização e dentre suas indicações de uso compreende:

determinação de alterações anatômicas das câmaras cardíacas; monitoramento pré, trans e pós-cirúrgico; auxílio na elaboração de prognóstico; detecção de arritmias; avaliação de necessidade e resposta a terapia antiarrítmica.

A ECG é o método de diagnóstico mais utilizado na cardiologia humana e veterinária, é considerado padrão ouro na detecção de arritmias, podendo determinar a origem do ritmo e a frequência de despolarização do coração, fornecendo informações do estado clínico do miocárdio, uma vez que as deflexões P-QRS-T do traçado podem ser alteradas por uma patologia ou fator fisiológico. As arritmias podem produzir sinais clínicos como fadiga, intolerância ao exercício, perda de peso e em casos mais severos podem causar ataxia, colapso, coma e morte súbita. As informações obtidas por meio da ECG são essenciais para a determinação do tipo, origem e severidade das arritmias cardíacas, bem como no direcionamento terapêutico (ETTINGER, 1997; WOLF et al., 2000).

O coelho doméstico tem sido amplamente utilizado como modelo animal para a pesquisa cardiovascular, e apesar de inúmeros estudos se utilizarem desta espécie na avaliação de alterações eletrocardiográficas mediante diferentes terapias ou drogas (MALLACH et al., 1942; ABRAMS; HARRIS, 1951; ZAYERZADEH et al., 2012), e principalmente na reprodução de doenças cardiovasculares humanas (NAP et al., 2003; HU et al., 2011; YANG, 2011) pouco se sabe sobre as alterações eletrocardiográficas associadas a doenças cardíacas no coelho (PARIAUT, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética para uso de animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro sob registro CEUA-UENF 111, válido até 2014.

3.2. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal (LCCA) e Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), localizados no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde foram desenvolvidos o modelo experimental, observações e amostragens clínicas e laboratoriais.

As análises laboratoriais dos biomarcadores foram realizadas no Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF.

3.3. Modelo animal de experimentação

No presente trabalho foram utilizados 38 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os animais empregados na presente investigação tinham aproximadamente 2 (dois) meses de vida e pesavam aproximadamente 2,0kg ao início da pesquisa, sendo 21 machos e 17 fêmeas.

Assim que admitidos no Hospital Veterinário da UENF foram submetidos a exames clínicos a fim de detectar quaisquer alterações orgânicas que os impedisse de participar do estudo. Animais com quaisquer indícios de enfermidade concorrente foram descartados.

Posteriormente, foram everminados com ivermectina¹ (0,2 mg.Kg⁻¹) e alocados em gaiolas metálicas apropriadas no Hospital Veterinário da UENF, durante um período de quinze dias, recebendo alimentação própria para espécie, água *ad libitum*, higienização local e banhos de sol.

3.3.1. Estabelecimento do grupo controle

O grupo controle (GC) foi composto por 9 (nove) animais escolhidos aleatoriamente, sendo 3 destes (1 macho e 2 fêmeas) submetidos a eutanásia previamente ao início da fase de indução do modelo experimental de insuficiência cardíaca pela epinefrina (denominado T0) e os demais (5 machos e 1 fêmea) ao final da fase experimental (denominado T3) para controle histológico.

Todas as provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas (Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Peptídeo Natriurético Atrial (PNA), Proteína C-Reativa (PCR) e Eletrocardiografia) foram realizadas nos 9 animais em T0 e nos 6 animais restantes durante todo período de experimentação. Os animais do controle foram mantidos em condições idênticas aos do grupo experimental descrito abaixo, recebendo solução de Cloreto de Sódio 0,9%² por via intravenosa, em infusão contínua, através da veia marginal da orelha, por um período de 60 minutos, realizadas em intervalos de 16 dias, totalizando duas infusões. O volume total administrado foi calculado através da necessidade basal de líquidos para a espécie, de acordo com o peso de cada animal e o tempo de infusão preconizado (100 mL/Kg/dia) (JEPSON, 2010; QUESENBERRY; CARPENTER, 2011).

As amostragens e observações neste grupo foram realizadas respeitando-se o mesmo cronograma de amostragem (Figura 2) estabelecido para os animais que participaram do modelo experimental de insuficiência cardíaca.

3.3.2. Estabelecimento do modelo experimental de insuficiência cardíaca

Os animais foram submetidos a um modelo de insuficiência cardíaca congestiva conforme proposto por Downing e Chen (1985), Muders et al. (1999), Zhang et al. (2010), sendo as metodologias adaptadas para este estudo (Figura 2).

¹ Ivermectan® 1%. Uzinas Químicas Brasileiras S.A. Praça Dr. Joaquim Batista, 150. Jaboticabal – SP.

² Cloreto de Sódio a 0,9%. Laboratório Sanobiol LTDA. Av. das Quaresmeiras, s/n. Pouso Alegre – MG.

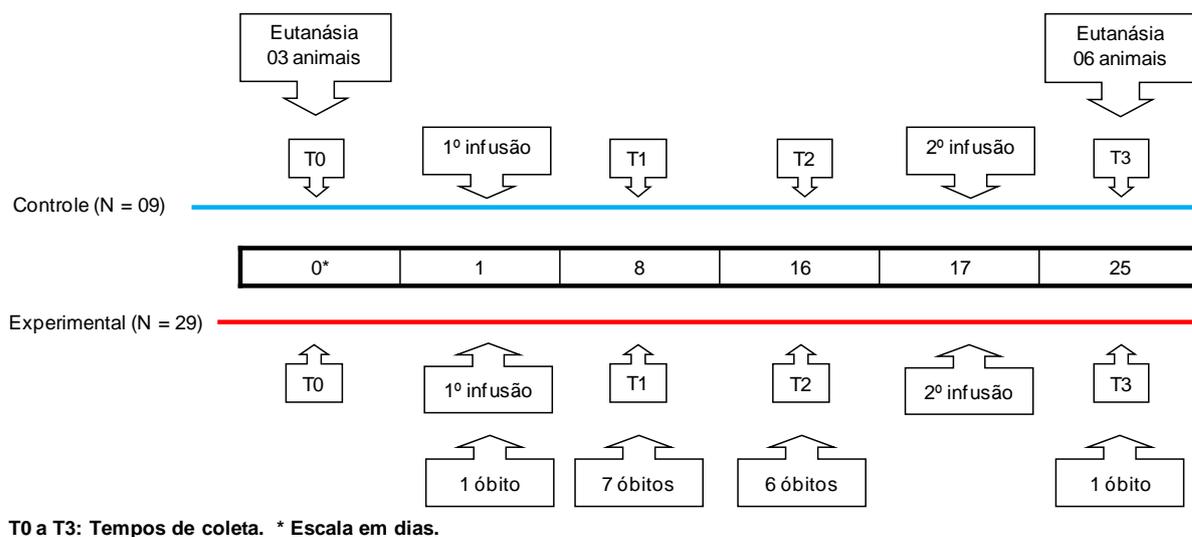


Figura 2 – Delineamento experimental e cronograma de amostragem do período experimental. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

O grupo experimental (GE) foi composto por 29 animais, 15 machos e 14 fêmeas, que foram submetidos a duas infusões subseqüentes de epinefrina¹ em intervalos de 16 dias. A primeira infusão foi realizada utilizando-se a dose de 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}/\text{minuto}$ e a segunda infusão utilizando-se a dose de 3 $\mu\text{g.kg}^{-1}/\text{minuto}$, por um período de 60 minutos.

Após tricotomia e antissepsia local, as infusões de epinefrina foram realizadas mediante cateterismo da veia marginal da orelha através de cateter venoso periférico 24 G, que foi conectado a um equipo macrogotas específico (CELM®²) para realização de infusão contínua através de bomba de infusão (MP-20, CELM®²).

Para a infusão contínua, a dose total da epinefrina foi diluída em solução de Cloreto de Sódio 0,9%, sendo o volume total administrado calculado através da necessidade basal de líquidos para a espécie, de acordo com o peso de cada animal e o tempo de infusão preconizado. Durante as infusões, os animais foram mantidos em caixas de contenção, tipo guilhotina, próprias para a espécie (Figura 3).

¹ Adren®. Hipolabor Farmacêutica Ltda. Rodovia BR 262, Km 12,3. Sabará - MG.

² Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Alameda Amazonas, 764. Alphaville - Barueri - SP

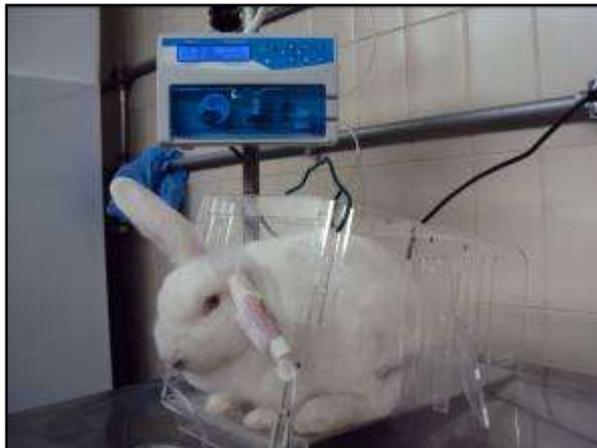


Figura 3 – Contenção física e administração de epinefrina em infusão contínua em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Durante o período restante, todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Hospital Veterinário da UENF sob condições e alimentação semelhantes, conforme especificado anteriormente, por quatro semanas.

Após este período os animais foram submetidos à eutanásia para confirmação, por histopatologia, do modelo de insuficiência cardíaca congestiva induzido por epinefrina.

3.4. Avaliação neuroendócrina e funcional cardíaca

As avaliações funcionais e neuroendócrinas foram realizadas conforme descrito nos tópicos seguintes e seguiram os cronogramas de execução propostos na Figura 2.

3.4.1. Exame Eletrocardiográfico Convencional

Para a realização do eletrocardiograma convencional, os animais foram posicionados em decúbito esternal conforme preconizado por Pariaut (2009) e os eletrodos conectados segundo padrão descrito por Tilley (1992) (Figura 4).

Empregou-se um módulo de aquisição de eletrocardiografia ECG TEB - ECGPC TEB®¹, utilizando a calibração de 25 mm/s e 2N, com o qual foram

¹ Tecnologia Eletrônica Brasileira. Av. Diederichsen, 1057. São Paulo – SP.

registradas as derivações bipolares padrões (DI, DII e DIII) e as unipolares amplificadas (aVR, aVF, aVL) e avaliados: ritmo cardíaco, frequência cardíaca, duração e amplitude das ondas P e complexo QRS, amplitude da onda T, duração dos intervalos PR e QT e segmento ST.

As avaliações eletrocardiográficas foram realizadas conforme cronograma apresentado na Figura 2, totalizando 4 (quatro) observações por animal, sendo uma previamente a fase de indução (T0), 3 (três) durante o período experimental.

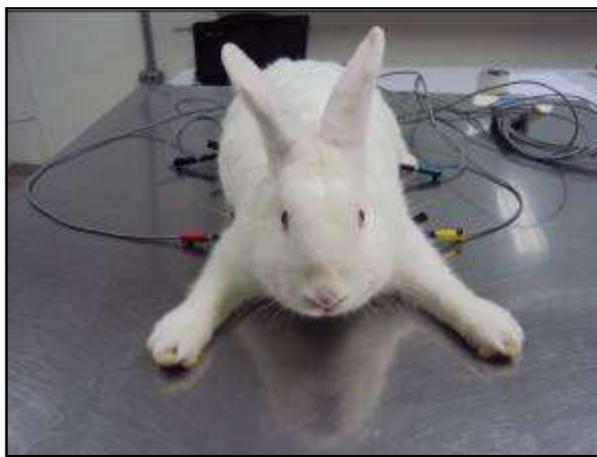


Figura 4 – Eletrocardiografia em coelho. Posicionamento dos eletrodos e decúbito esternal. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

3.4.2. Avaliação neuroendócrina

Para a avaliação dos marcadores neuroendócrinos, foram coletadas amostras com volume mínimo de 3 ml de sangue venoso de cada animal, mediante punção da veia jugular. Os animais foram contidos fisicamente, em decúbito dorsal, sobre uma mesa de procedimento, onde foi colocado um anteparo cilíndrico entre a mesa e o animal, em sua região cervical dorsal, evidenciando a região cervical ventralmente. Uma vez contidos e posicionados, foi realizada a tricotomia da região ventro-lateral do pescoço, seguida de antissepsia com álcool 70%. A veia jugular foi puncionada com uma agulha calibre 25x7mm, conectada a uma seringa de 5ml, conforme ilustrado na Figura 5.



Figura 5 – Contenção física e coleta sangüínea para avaliação sérica dos biomarcadores. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

O sangue coletado foi repassado para tubos siliconados específicos para análise bioquímica. As amostras então foram centrifugadas na velocidade de 1000 G (3000rpm), durante 20 minutos, em até uma hora após a coleta. O produto sobrenadante (soro sangüíneo) foi repassado para microtubos tipo “ependorf” e mantidos sob congelamento em “freezer” à temperatura de -70°C , até a realização dos ensaios, período este que não excedeu 30 dias.

As amostras sangüíneas foram coletadas totalizando 4 (quatro) observações por animal, sendo uma previamente a fase de indução (T0) e 3 (três) durante a fase de indução, conforme cronograma de amostragem apresentado na Figura 2.

A quantificação dos biomarcadores foi realizada no Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da UENF, através do método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por meio de kits comerciais específicos para a espécie estudada. O protocolo de cada marcador estudado está descrito separadamente nos tópicos seguintes.

3.4.2.1. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)

Para a quantificação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) foi utilizado um kit comercial de ELISA específico para ECA I de coelho (Kamiya Biomedical®¹:

¹ 12779 Gateway Drive, Seattle, WA 98168, USA

ACE Cat# KT-51711). Assim como para a quantificação do peptídeo natriurético atrial (PNA) foi utilizado um kit comercial de ELISA específico para PNA de coelho (Kamiya Biomedical®: ANP Cat# KT-51718). Os procedimentos a serem realizados para ambos marcadores estão descritos abaixo, pois são constituídos pelo mesmo protocolo.

Primeiramente, todas as amostras e os componentes do kit foram colocados à temperatura ambiente, entre 18 e 25°C. Em seguida, 100 µl do soro de cada animal foram incubados simultaneamente com 50 µl do conjugado enzima-anticorpo em cada poço da placa de ELISA específica. Depois de homogeneizada, a placa foi incubada em estufa (BOD/DBO FT-1027®¹) por uma hora à temperatura de 37°C, ao abrigo da luz.

Posteriormente, os poços foram lavados com solução de lavagem para a remoção dos anticorpos que não se ligaram ao marcador. Este processo foi repetido por 5 vezes e então a placa foi invertida sobre um papel toalha para secagem.

Foram adicionados 50 µl do substrato A e 50 µl do substrato B em cada poço, incubando-se novamente por 15 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi finalizada com a adição de 50 µl de solução de parada e a leitura da placa (absorbâncias) foi realizada imediatamente em leitor de ELISA (TP-Reader®²) com comprimento de onda de 450 nm (Figura 6).

O cálculo da concentração de cada marcador nas amostras foi realizado utilizando uma curva de concentração disponível no kit e os valores reais foram calculados através de regressão linear. Para a ECA I utilizou-se uma curva de concentração entre 0 e 25ng/ml, enquanto para o PNA empregou-se uma curva de concentração entre 0 e 100pg/ml.

¹ Fluxo Tecnologia LTDA. Rua Ferreira Cardoso, 76, Maria da Graça, Rio de Janeiro- RJ.

² RL New Produtos e Equipamentos Laboratoriais. Rua 29 de Julho, 160, Maré, Rio de Janeiro – RJ.



Figura 6 – Microplaca específica pré-sensibilizada para determinação dos biomarcadores por ELISA. LQFPP/ UENF, 2013.

As amostras foram coletadas conforme Figura 2 apresentada no item 3.3.2., totalizando 4 observações por animal, para cada marcador.

3.4.2.2. Proteína C-Reativa de alta sensibilidade (PCR)

Para a quantificação da proteína C-reativa (PCR) utilizou-se um kit comercial de ELISA específico para PCR de coelho (Kamiya Biomedical®: hs-CRP Cat# KT-097).

Primeiramente, as amostras foram diluídas em 400 vezes e todos os componentes do kit colocados a temperatura ambiente, entre 18 e 25°C. Em seguida, foi adicionado 100 µl do controle positivo nos poços pré-designados da placa de ELISA e 100 µl de cada amostra nos demais poços, procedendo a incubação da placa a 22°C por 10 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente, os poços foram lavados com solução de lavagem por 4 vezes e a placa então foi invertida em papel toalha para secagem. Adicionou-se 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço da placa e esta foi incubada por mais 5 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi finalizada com a adição de 100 µl de solução de parada e a leitura da placa foi realizada imediatamente em equipamento de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm.

Assim como para os outros marcadores analisados, o cálculo da concentração da PCR nas amostras foi realizado utilizando uma curva de concentração disponível no kit e os valores reais foram calculados através de regressão linear. Para o PCR empregou-se uma curva de concentração entre 0 e 200ng/ml.

As amostras foram coletadas conforme Figura 2 apresentada no item 3.3.2., totalizando 4 observações por animal.

3.5. Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia através de um protocolo composto por cetamina¹ (40 mg.kg⁻¹) associado a diazepam² (10 mg.kg⁻¹) IM e a xilazina³ (5 mg.kg⁻¹) IM. Após sedação e indução anestésica, os animais foram cateterizados pela veia marginal da orelha com cateter 24 G, via pela qual receberam a infusão de fentanila⁴ (7,4 µg.kg⁻¹) e cloreto de potássio⁵ (100mg.kg⁻¹), respeitando-se os princípios éticos para o uso de animais de experimentação conforme Close et al. (1996) com as doses adaptadas de Viana (2007).

3.6. Análise histopatológica

Todos os animais que vieram a óbito durante o período de indução do modelo experimental, assim como os animais remanescentes submetidos a eutanásia ao final do período experimental foram submetidos a exames necroscópicos e histológicos para avaliação da progressão da doença e confirmação do modelo empregado.

O exame necroscópico dos animais para colheita de material e avaliação histopatológica foi realizado no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Durante a necropsia os órgãos foram avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies. Fragmentos de tecido cardíaco, pulmonar, encefálico, hepático, esplênico, renal e intestinal com até 1 cm

¹ Ketamina® – Agener União Química Farmacêutica Nacional. Av. dos Bandeirantes, Planalto Paulista - São Paulo-SP.

² Diazepam® - União Química. Rua Cel. Luiz Tenório de Brito, 90. Embu, Guaçu –SP.

³ Virbaxil® 2% - Virbac do Brasil. Av. Engenheiro Eusébio Stevau, Jurubatuba – São Paulo-SP.

⁴ Fentanil® - Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. Rua Gerivatiba, 207, Butantã. São Paulo-SP.

⁵ Cloreto de Potássio 10% - Ariston Indústria Química e Farmacêutica LTDA. R. Adherbal Stresser - São Paulo-SP.

de espessura foram colhidos e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%, excetuando-se o coração, que foi colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Todo o material foi fixado por um período mínimo de 48 horas.

Após a fixação dos corações, estes foram pesados em balança digital de precisão.

A seguir todas as amostras foram clivadas em fragmentos menores de até 02-03 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica®¹ TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos seqüenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em seqüência o material foi incluído manualmente, com auxílio do dispensador de parafina e de moldes metálicos, no próprio cassete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de 5 µm de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145). Os cortes foram colocados em banheira histológica, de onde foram coletados por lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (TG).

As fotomicrografias obtidas foram documentadas, arquivadas e analisadas com auxílio de um *software* de morfometria digital (Nis-Elements Basic Research versão 3.22, Nikon®²).

3.6.1. Morfometria das fibras miocárdicas

Para a realização da morfometria das fibras miocárdicas foi utilizado um microscópio óptico (Nikon®) com sistema de aquisição de imagens e análise de imagens (Nis-Elements Basic Research versão 3.22, Nikon®).

¹ Leica - Rua Afonso Celso, 1244. São Paulo – SP.

² Hayamax Distribuidora. Rua Angelo Sarabia, Pq. Ind. Castelo Branco, Ibiporã – PR.

A morfometria foi realizada em cada lâmina histológica de miocárdio, sendo escolhidos aleatoriamente 3 (três) campos diferentes e em cada campo foram escolhidas randomicamente 10 (dez) fibras, totalizando 30 (trinta) fibras por animal.

3.7. Análise estatística e interpretação dos resultados

Os resultados foram anotados em fichas individuais e as diferenças entre os momentos foram analisadas com auxílio do programa estatístico *Statistical Analysis System (SAS)*, através dos testes de análise de variância para dados desbalanceados (GLM), Teste T de Student para dados não pareados, ambos com $p < 0,05$ e regressão linear, considerando-se significativo $R^2 > 0,60$.

Os dados coletados no experimento foram analisados em conjunto de forma a buscar um entendimento a respeito da viabilidade e aplicabilidade das provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas sobre o modelo experimental de insuficiência cardíaca estudado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação clínica

Os principais sinais clínicos observados nos animais do GE ao longo do período de indução do modelo experimental de insuficiência cardíaca se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais sinais clínicos observados nos animais submetidos ao modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos, ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Avaliação clínica	Frequência de observação	
	GE (n=29)	
	Absoluto	Relativo
Dispnéia	26	89,66
Estertor a ausculta	15	51,72
Ascite	14	48,28
Convulsões	4	13,79
Anisocoria	1	3,45
Paraplegia	1	3,45
Pulso jugular	1	3,45
Epistaxe	2	6,9
Inapetência	18	62,07

A maioria dos animais do GE começou a apresentar inapetência no dia da primeira infusão de epinefrina, retomando a alimentação normal em média dois dias após a infusão. Entretanto, ao longo de todo o período de experimentação, comparado ao GC, o GE apresentou uma menor ingestão alimentar, caracterizando a inapetência observada na Tabela 1.

Os sinais clínicos começaram a se pronunciar de forma mais evidente em T1, sete dias após a primeira infusão de epinefrina, sendo a dispnéia e a inapetência os sinais clínicos mais prevalentes neste período. Em T2, 15 dias após a primeira infusão, sinais como ascite e estertor a ausculta se tornaram mais evidentes e neste período observou-se a ocorrência de anisocoria e pulso jugular. Após a segunda infusão de epinefrina foram observadas convulsões em quatro animais e paraplegia em um animal. A ocorrência de epistaxe se deu após a primeira infusão de epinefrina em um animal e após a segunda infusão em outro.

Os sinais clínicos descritos na Tabela 1 foram devido aos efeitos deletérios causados pelo protocolo adrenérgico proposto. Estes achados são similares aos de

Muders et al. (1999), que em experimento semelhante observaram alta incidência de sinais clínicos de retenção de fluidos e descompensação cardíaca, tais como edema, anorexia, dispnéia e ascite. Tais achados também foram descritos em trabalhos realizados por Wilkes et al. (1963) em coelhos e por Van Vleet et al. (1977) em suínos, ambos utilizando-se a administração de altas doses de catecolaminas por via intraperitoneal.

Apesar de a literatura apresentar diversos trabalhos em que foram utilizados modelos experimentais empregando-se catecolaminas, como Wilkes et al. (1963), Van Vleet et al. (1977), Fripp et al. (1981), Downing e Chen (1985), Todd et al. (1985), Muders et al. (1999), Zhang et al. (2010), poucos autores descreveram a ocorrência de sinais clínicos em seus trabalhos. Entretanto, baseado na presente pesquisa, a inapetência observada após as infusões de epinefrina possa ser justificada pela hiperglicemia causada pela epinefrina, visto que o excesso crônico de catecolaminas pode produzir perda de peso e inapetência como resultados do aumento da taxa metabólica e da hiperglicemia causada pela redução da secreção de insulina, além do desconforto gerado pela dispnéia observada na maioria dos animais (HARDMAN et al., 1996; BERNE; LEVY, 1996; GUYTON; HALL, 2006).

A presença de epistaxe em alguns animais pode estar relacionada com a hipertensão arterial promovida pela epinefrina. Em humanos, é descrita uma alta prevalência de hipertensão arterial sistêmica em pacientes que apresentam epistaxe (FAISTAUER et al., 2009).

Uma das reações mais graves decorrentes da administração de doses elevadas de catecolaminas consiste na hemorragia cerebral em conseqüência da elevação aguda da pressão arterial. Em humanos, foi relatada a ocorrência de hemorragia subaracnóide e de hemiplegia após a aplicação de alta dose de epinefrina por via subcutânea (HARDMAN et al., 1996). Tal fato pode estar relacionado a ocorrência de anisocoria, convulsões e paraplegia em alguns animais do presente estudo, por uma possível lesão encefálica.

Ademais, vale ressaltar que os animais do grupo controle (GC) não apresentaram quaisquer sinais de doença, fato comprovado por exames necroscópicos e histopatológicos ao final do experimento, assim como para os animais do GE que demonstraram sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva.

4.2. Peso corporal

Os resultados da avaliação do peso corporal dos animais do grupo experimental (GE) e do grupo controle (GC) ao longo do período de experimentação são observados na Figura 7.

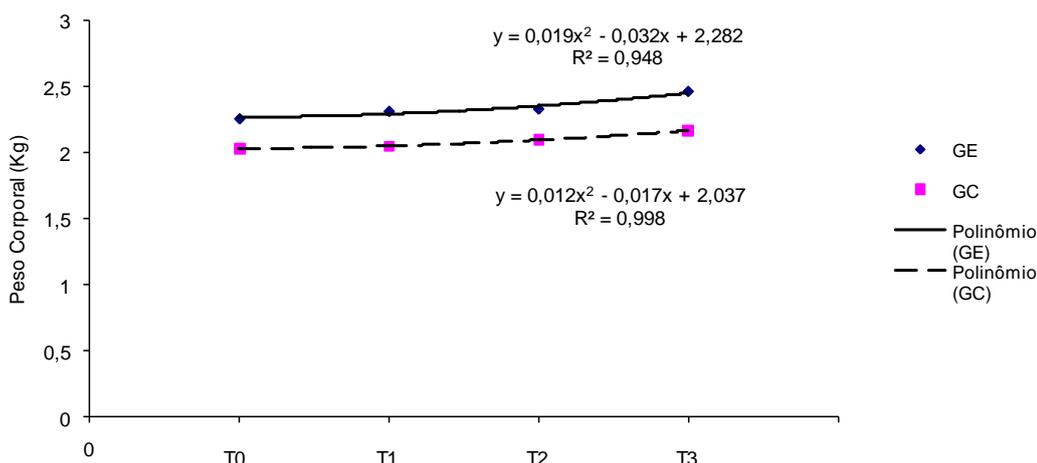


Figura 7 – Comportamento da variável peso corporal de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Os valores médios do peso corporal dos animais do grupo experimental (GE) e do grupo controle (GC) nos 4 tempos de avaliação (T0, T1, T2 e T3) estão apresentados na Tabela 2, assim como o resumo da análise estatística se encontra na Tabela 3.

Tabela 2 – Peso corporal médio de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Peso Corporal (Kg)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	2,26±0,25	2,32±0,26	2,34±0,29	2,47±0,31
GC	2,03±0,35	2,05±0,42	2,10±0,43	2,17±0,50

Média±Desvio Padrão.

Tabela 3 – Análise estatística para a variável peso corporal de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05		Regressão linear	
	Tratamento	Tempo	GE	GC
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com $R^2 > 0,60$	
Peso corporal	*	ns	0,948	0,998

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta peso corporal foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, ao nível de $p < 0,05$ de significância (Tabela 3).

Analisando-se os resultados através da regressão linear (Figura 7) observa-se que os dois grupos estudados sofreram alterações significativas ao longo do tempo de estudo ($R^2_{GE}=0,948$ e $R^2_{GC}=0,998$). Ademais, através da análise das equações de retas geradas pode-se perceber que ambos os grupos apresentaram uma tendência de aumento de peso ao longo do experimento.

Vale ressaltar que a média inicial do peso corporal do GE já era maior que a do GC em T0, tempo anterior as infusões de epinefrina, onde todos os animais estavam sadios, sendo tal observação devida a aleatoriedade na escolha dos animais pertencentes a cada grupo. Entretanto observa-se que o GE apresentou uma tendência de maior ganho de peso quando comparado ao GC, comprovada pelas equações de reta de $y = 0,019x^2 - 0,032x + 2,282$ do GE, contra $y = 0,012x^2 - 0,017x + 2,037$ do GC, conforme demonstrado na Figura 7.

Conforme o esperado, o grupo de animais não doentes (GC), apresentou comportamento de ganho de peso ao longo do tempo, atribuído ao seu desenvolvimento corporal fisiológico, sobretudo em situação de cativeiro, com alimentação *ad libitum* e restrição de atividades físicas.

Em contrapartida, era esperada uma redução do peso dos animais do GE, devido a inapetência gerada pelo protocolo adrenérgico empregado, conforme discutido no item anterior (4.1.) e devido a instauração da doença cardíaca. Segundo alguns autores, a perda de peso pode estar associada a severidade da insuficiência cardíaca, sendo considerada um elemento relevante na avaliação clínica do paciente (LOPEZ-JIMENEZ et al., 2008; ATKINS et al., 2009; BOCCHI et al. 2009; FARIA et al., 2011; LORD et al. 2011).

Entretanto, o maior ganho de peso observado nos animais do GE pode estar relacionado a alta incidência de derrames cavitários e edemas, conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 12. Segundo Bocchi et al. (2009), embora o monitoramento do peso deva ser realizado em pacientes com insuficiência cardíaca, este deve ser feito de forma criteriosa, visto que muitas vezes torna-se difícil diferenciar ganho de peso por incremento de massa muscular e gordura daquele relacionado com o aumento da volemia, retenção hídrica e edemas.

Resultado semelhante foi descrito no trabalho realizado por Muders et al. (1999), no qual observaram que o peso corporal dos coelhos investigados se manteve constante até a terceira infusão de epinefrina, apresentando um aumento significativo posteriormente, o que foi atribuído a retenção de fluídos, bem como a presença de ascite, edema e efusões pleural e pericárdica.

4.3. Biomarcadores cardíacos

O comportamento sérico dos biomarcadores estudados em modelo experimental de insuficiência cardíaca é descrito a seguir em tópicos distintos. Um resumo da análise estatística para cada caso é apresentado na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 – Análise estatística para as variáveis-resposta Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial e Proteína C Reativa. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05		Regressão linear	
	Tratamento	Tempo	GE	GC
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com R ² > 0,60	
ECA	*	ns	0,213	0,058
PNA	ns	ns	0,921	0,635
PCR	ns	ns	0,638	0,870

4.3.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)

Os resultados da avaliação do Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) dos animais do GE e GC ao longo do período de experimentação estão apresentados na Figura 8.

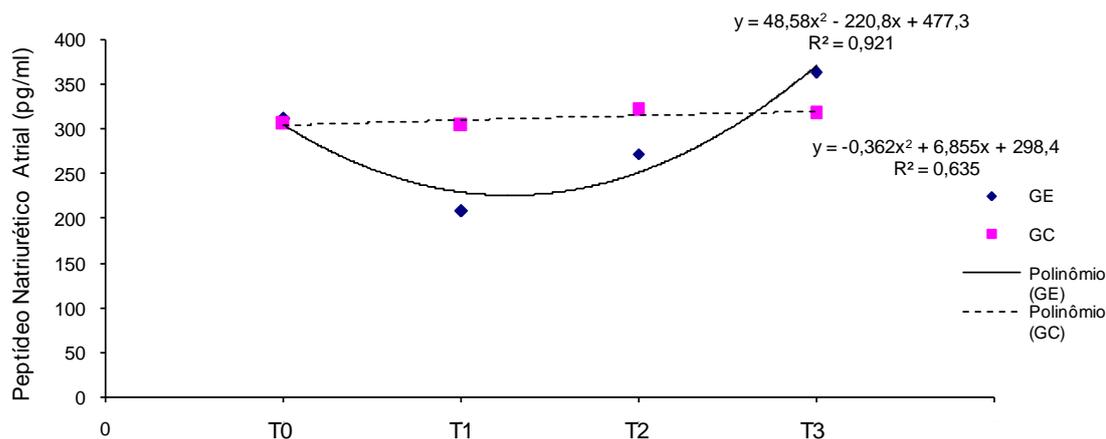


Figura 8 – Comportamento da variável Peptídeo Natriurético Atrial de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) não foram observadas alterações significativas entre os grupos estudados para a variável-resposta PNA, ao nível de $p < 0,05$ de significância (Tabela 4). Entretanto, por meio da regressão linear pôde-se identificar que houve variações significativas de comportamento individualizado ao longo do tempo, tanto no GE quanto no GC, onde $R^2 = 0,921$ e $R^2 = 0,635$, respectivamente.

Conforme observado na Figura 8, o comportamento do PNA no GC apresentou-se mais homogêneo quando comparado ao GE, em valores reais, ao longo de todo o experimento, o PNA do GC manteve um valor médio de $312,87 \pm 8,18$ pg/ml, enquanto o valor médio do GE foi de $289,51 \pm 65,55$ pg/ml.

Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ao longo do tempo, as amplitudes destas curvas resposta foram bem diferenciadas. Observa-se que em T1 (sete dias após a primeira infusão de epinefrina) o valor médio da concentração de PNA para os grupos de animais enfermos (GE) foi de $208,52 \pm 144,19$ pg/ml, abaixo daquele obtido para o GC no mesmo tempo de investigação, de $304,97 \pm 188,35$ pg/ml. Entretanto, observa-se, de

fato, um elevado desvio-padrão neste ponto, o que corrobora a não observância de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A partir de T2 (15 dias após a primeira infusão de epinefrina) o valor médio da concentração de PNA no GE começou a se elevar ($273,34 \pm 141,11$ pg/ml) e atingiu $364,05 \pm 123,34$ pg/ml em T3 (7 dias após a segunda infusão de epinefrina), superando o observado no GC de $318,16 \pm 131,36$ pg/ml (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração sérica média de Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	$312,15 \pm 100,18$	$208,52 \pm 144,19$	$273,34 \pm 141,11$	$364,05 \pm 123,34$
GC	$306,86 \pm 28,85$	$304,97 \pm 188,35$	$321,49 \pm 144,15$	$318,16 \pm 131,36$

Média \pm Desvio Padrão.

No trabalho desenvolvido por Muders et al. (1999), onde propuseram um modelo semelhante de insuficiência cardíaca induzida por epinefrina em coelhos e avaliaram seu efeito sobre o PNA, com mensurações realizadas em intervalos de quatro dias, observou-se que após cada infusão de epinefrina os níveis de PNA aumentavam consideravelmente, provavelmente por causa da distensão atrial e taquicardia. Porém, após um pico inicial, decresciam e aproximavam-se dos valores basais cerca de dez dias após cada infusão, de forma parecida com os resultados observados neste estudo, entretanto não esclarecem o motivo deste comportamento. Armstrong et al. (1986), também descreveram decréscimos na atividade do PNA em cães com insuficiência cardíaca por estimulação ventricular rápida, porém não justificaram tais achados.

Moe et al. (1989), ao realizarem um estudo em cães com insuficiência cardíaca induzida por estimulação, observaram a ocorrência de um pico da concentração de PNA na fase inicial da doença com posterior declínio até atingir um platô, o que atribuíram ao esgotamento da capacidade de síntese e secreção das células mioendócrinas, alterações nos receptores de estiramento atriais e a redução da complacência atrial durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Resultados semelhantes foram descritos por Zucker et al. (1977), em um modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva em cães, onde relataram uma redução da capacidade dos receptores de estiramento atriais responderem a

elevações na pressão intra atrial, o que atribuíram as alterações estruturais encontradas nas terminações destes receptores assim como a redução da complacência atrial.

Tais achados podem justificar a redução da concentração dos níveis de PNA observada no GE até o T2, entretanto, não se pode excluir a ocorrência de aumentos em sua concentração durante este período, visto que as dosagens de PNA foram pontuais e se deram em intervalos de 7 dias, podendo estes picos terem ocorridos porém não terem sido detectados devido ao delineamento experimental empregado nesta pesquisa.

Um estudo realizado em observações clínicas em humanos, conduzido por Roy et al. (1987), observou que a maioria dos pacientes investigados com casos de fibrilação atrial e taquicardia supraventricular apresentavam os níveis séricos de PNA consideravelmente elevados ao momento do exame.

De maneira semelhante ao estudo de Rankin et al. (1986), Luchner et al., (2001) desenvolveram um modelo de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca através da implantação de um marcapasso em coelhos que induzia uma frequência cardíaca elevada, cerca de 350bpm, durante 30 dias. Neste experimento, os autores observaram que os níveis séricos de PNA foram elevados concomitantes ao surgimento dos sinais de insuficiência cardíaca.

Segundo citações de alguns autores, este sistema peptidérgico é precocemente ativado na insuficiência cardíaca, apresentando elevação em seus níveis séricos por meio da síntese e liberação do PNA de grânulos específicos localizados no miocárdio atrial (ABASSI et al., 2004; SEIXAS-CAMBÃO; LEITE-MOREIRA, 2009). Esta liberação ocorre mediante aumento e distensão atrial (CROZIER et al., 1987; SAGNELLA, 1998).

A concentração sérica de PNA pode elevar-se devido à insuficiência cardíaca de origens distintas, como taquicardias, estenose mitral ou aórtica, cardiomiopatia dilatada, acentuada hipertrofia ventricular esquerda com disfunção diastólica, distensão atrial e demais condições que cursem com aumento da pressão atrial e disfunção ventricular (FYHRQUIST; TIKKANEN, 1988; STEVENS et al., 1995; SAGNELLA, 1998; ABASSI et al., 2004).

Ademais, de acordo com Takemura et al. (1991) e Vikstrom et al. (1998), a expressão do PNA no tecido cardíaco aumenta em casos de insuficiência cardíaca,

principalmente em regiões com desordens histológicas, como desarranjo das fibras miocárdicas, hipertrofia e fibrose dos cardiomiócitos.

As informações anteriores elucidam o comportamento sérico do PNA em T3. A elevação de sua concentração ocorreu em virtude das infusões prévias de epinefrina, que desencadeou taquicardia, insuficiência cardíaca com disfunção diastólica e alterações cardíacas estruturais importantes, como a hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose, conforme descrito nos próximos itens desta pesquisa.

4.3.2. Proteína C Reativa (PCR)

Os resultados da avaliação da concentração sérica da Proteína C Reativa (PCR) de alta sensibilidade dos animais do GE e GC ao longo do período de experimentação estão apresentados na Figura 9.

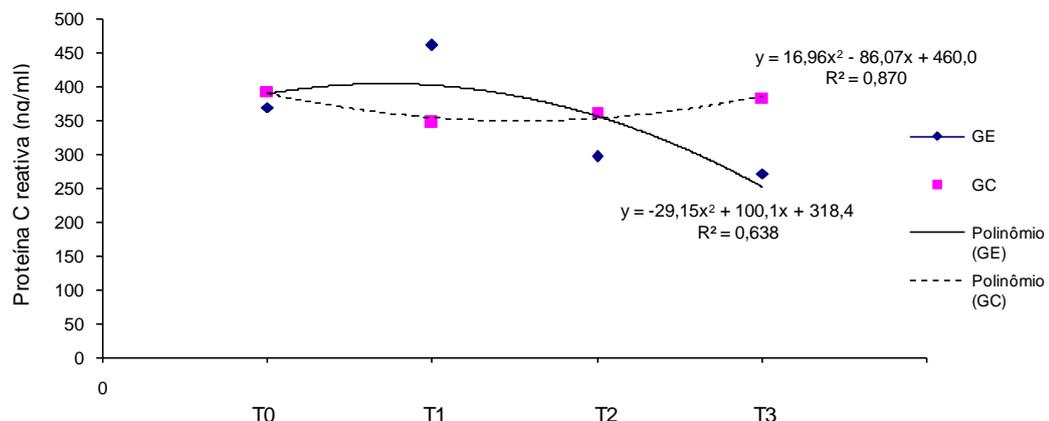


Figura 9 – Comportamento da variável Proteína C Reativa de alta sensibilidade de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) não foram observadas alterações significativas entre os grupos estudados para a variável-resposta PCR, ao nível de $p < 0,05$ de significância (Tabela 4). Todavia, por meio de uma avaliação subsequente através da regressão linear pode-se perceber uma tendência de alteração nos valores da variável-resposta em questão ao longo do período de experimentação, tanto no GE quanto no GC, onde $R^2 = 0,638$ e $R^2 = 0,870$, respectivamente.

Ao decorrer de todo o experimento, o comportamento da PCR no GC apresentou-se mais homogêneo, em valores reais, a concentração da PCR do GC manteve um valor médio de $372,08 \pm 21,07$ ng/ml, enquanto o valor médio do GE foi de $350,21 \pm 84,87$ ng/ml, que pode ser visualizado pela diferença nas amplitudes das curvas resposta destes grupos na Figura 9.

Observa-se que, no GE, este biomarcador apresentou um pico em T1, sete dias após a primeira infusão de epinefrina, reduzindo-se constantemente até T3, com valores abaixo dos observados no GC (Tabela 6). Porém devido ao delineamento experimental proposto nesta pesquisa, não é possível afirmar que esta concentração sérica elevada observada em T1 seja o ponto máximo após a primeira infusão, visto que este biomarcador foi avaliado apenas duas vezes após a primeira infusão de epinefrina, tendo um intervalo de sete dias entre as avaliações.

Tabela 6 – Concentração sérica média de Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	$369,70 \pm 193,40$	$461,45 \pm 207,90$	$297,28 \pm 223,35$	$272,41 \pm 197,24$
GC	$393,86 \pm 165,89$	$346,91 \pm 290,02$	$363,31 \pm 270,95$	$384,23 \pm 244,26$

Média±Desvio Padrão.

De acordo com diversos autores, a literatura é unânime ao descrever que em situações de isquemia miocárdica aguda (infarto agudo do miocárdio) em humanos, os valores séricos de PCR aumentam vertiginosamente em até 6 horas após evento isquêmico propriamente dito. Esta elevação sérica ocorre devido ao processo inflamatório e ao remodelamento arterial e cardíaco desencadeado pela morte tecidual pós isquêmica. Contudo, inicia-se a redução destes valores após 19 horas decorridas da isquemia, devido a curta meia-vida plasmática desta proteína (KOENIG et al., 1999; SANO et al., 2003; PRASAD, 2006, BISOENDIAL et al., 2007; ZAMANI et al., 2012). Entretanto, no presente trabalho, aumentos na concentração desta proteína puderam ser detectados cerca de sete dias após o insulto inicial cardíaco promovido pela administração de epinefrina.

Sugere-se que este comportamento diferenciado possa estar relacionado a ação tóxica tecidual direta da epinefrina sobre os tecidos miocárdico, hepático e renal (resultados apresentados no item 4.6.), promovendo alterações progressivas

das funções destes órgãos, retardando o metabolismo e excreção da droga administrada de forma excessiva.

Segundo Carr et al. (1997), as concentrações plasmáticas de PCR podem permanecer indefinidamente aumentadas na presença de condições inflamatórias crônicas.

Estudos realizados por Barrett et al. (2002), relataram uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de PCR e o tamanho da área de infarto miocárdico em modelo de isquemia/reperfusão em coelhos na presença de um insulto inflamatório contínuo e associaram o aumento da dimensão da área infartada a ativação do sistema complemento pela PCR. Ainda, de acordo com estes autores e corroborado por Simon et al. (2005) e Villacorta et al. (2007), aumentos expressivos na concentração plasmática de PCR estão associados ao aumento da morbidade e mortalidade por eventos cardiovasculares.

Estas informações podem elucidar o pico de PCR detectado em T1, visto que a ação tóxica da epinefrina sobre os diversos tecidos ocasionou uma resposta inflamatória crônica, devido as altas doses empregadas, o que coincidiu com a maior ocorrência de óbitos neste período e a alta prevalência de infiltrado inflamatório, degeneração e fibrose do tecido cardíaco, conforme descritos nos itens 4.5. e 4.6.

Huang et al. (2009) avaliaram a concentração sérica de PCR de alta sensibilidade em um modelo de aneurisma da aorta abdominal em coelhos e observaram um pico na concentração no primeiro dia após a realização do modelo, com subsequente redução, porém se mantendo em níveis significativamente aumentados em relação a concentração basal por até 30 dias após o estabelecimento do modelo experimental. De acordo com estes autores, durante a fase inicial, o aumento sérico da PCR foi devido ao aumento de sua síntese hepática, sendo posteriormente atribuído a síntese extra-hepática nas artérias dilatadas pelo modelo experimental empregado, conforme demonstrado por testes de imunocoloração, western blot, e transcriptase reversa-PCR.

Segundo alguns autores, apesar de existirem vários tipos de células capazes de sintetizar a PCR, como macrófagos do pulmão e do cérebro, epitélio renal e adipócitos, o fígado constitui sua principal fonte produtora. Quando ocorre um processo inflamatório, as células inflamatórias liberam citocinas que estimulam a expressão gênica da PCR no fígado, aumentando sua síntese e liberação e

conseqüentemente sua concentração sérica (SUN et al., 2005; SIMON et al., 2005; BISOENDIAL et al., 2007; HUANG et al., 2009).

Neste âmbito, o decréscimo da concentração sérica da PCR observado no GE do presente estudo, após o T1, pode estar relacionado a extensa lesão hepática proporcionada pela toxicidade da epinefrina e pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva no GE (conforme descrito no item 4.6.), inabilitando este órgão a responder com acréscimos na produção da PCR, sendo seus níveis séricos remanescentes provavelmente oriundos de fontes extra-hepáticas.

4.3.3. Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

Os resultados da avaliação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) dos animais do GE e GC ao longo do período de experimentação estão apresentados na Figura 10.

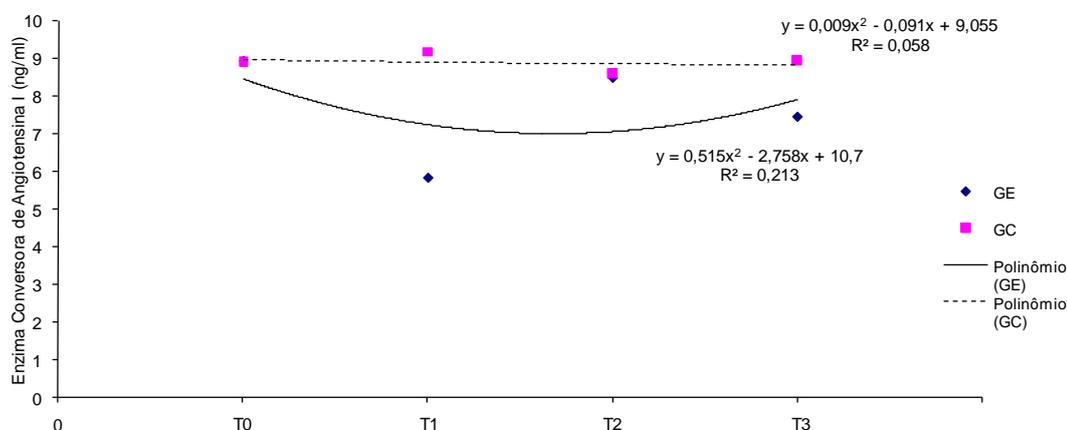


Figura 10 – Comportamento da variável Enzima Conversora de Angiotensina I de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que variável-resposta ECA apresentou comportamento estatisticamente diferente entre os grupos estudados, ao nível de $p < 0,05$ de significância (Tabela 4).

Entretanto, analisando-se os resultados através da regressão linear não foram observadas alterações significativas ao longo do tempo tanto para o GE quanto para o GC, onde $R^2 = 0,213$ e $0,058$, respectivamente.

Em valores absolutos, percebe-se que as médias de concentração sérica de ECA no GC variaram pouco ao longo do período de experimentação, mantendo uma média geral de $8,90 \pm 0,25$ ng/ml o que pode ser observado pela linha de tendência mais homogênea deste grupo (Figura 10).

Ainda analisando a Figura 10, é possível perceber que as médias de concentração sérica de ECA no GE apresentaram um comportamento heterogêneo, mantendo uma média geral de $7,67 \pm 1,38$ ng/ml. Observa-se que em T1, o GE apresentou um decréscimo destes valores, retornando aos valores de controle em T2 e apresentando novo decréscimo em T3.

Tabela 7 – Concentração sérica média de Enzima Conversora de Angiotensina I (ng/ml) de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Enzima Conversora de Angiotensina I (ng/ml)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	8,93±2,17	5,82±2,32	8,49±2,68	7,44±0,98
GC	8,88±1,52	9,19±4,76	8,59±3,30	8,93±2,69

Média±Desvio Padrão.

De acordo com alguns autores, a ECA não é considerada um biomarcador específico para a insuficiência cardíaca, devido a sua produção e disponibilidade em diversos outros tecidos, sendo empregada mais restritamente em casos de sarcoidose e diversos outros tipos de doenças pulmonares, como bronquite crônica, enfisema, carcinoma de brônquio, bronquite asmática e fibrose cística, estando seus valores séricos reduzidos nestes casos (STUDDY et al., 1983; BAUDIN et al., 2005). Este comportamento de redução dos níveis séricos de ECA é semelhante aos resultados apresentados neste trabalho para este biomarcador, entretanto, a princípio não se deve correlacionar esta redução em resposta a insuficiência cardíaca propriamente dita desenvolvida neste trabalho. Os resultados obtidos neste estudo (item 4.6.) demonstram graves lesões pulmonares durante a instauração do modelo experimental de ICC induzida pela epinefrina e de acordo com Studdy et al. (1983), a perda de área de superfície endotelial vascular pulmonar, região anatômica onde encontram-se maiores concentrações e atividades séricas fisiológicas desta enzima, justificaria este comportamento de redução destes valores séricos nos animais estudados.

Em oposição a esta redução, em T2 este comportamento se inverte, demonstrando uma elevação deste biomarcador. Sugere-se que, neste momento possa estar ocorrendo a evolução da insuficiência cardíaca e, mesmo com a perda de tecido pulmonar, esta enzima possa estar sendo produzida, ainda que em dimensões reduzidas. Neste caso, sua elevação estaria relacionada à maior ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona em resposta ao baixo débito cardíaco e tentativa de restabelecimento da pressão arterial (FEITOSA; CARVALHO, 2000; SISSON, 2004).

A nova tendência de redução de seus valores médios em T3 corrobora o que foi previamente discutido para o T1, visto que ambos os tempos de avaliação ocorreram após as infusões de epinefrina, indicando que a redução da concentração sérica de ECA observada neste estudo seja devida a lesão pulmonar promovida pelas altas doses de epinefrina empregadas neste modelo experimental.

4.4. Eletrocardiograma

A tabela 8 apresenta de forma conjunta o resultado das análises estatísticas para todas as variáveis eletrocardiográficas estudadas.

Nos tópicos seguintes são apresentados e discutidos apenas o comportamento das variáveis dignas de nota ao longo do tempo, seus valores reais para cada variável e as respectivas discussões. Assim, as variáveis apresentadas são: Freqüência cardíaca, ritmo cardíaco, amplitude e duração de P e do complexo QRS.

Tabela 8 – Análise estatística para as variáveis-resposta eletrocardiográficas. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05		Regressão linear	
	Tratamento	Tempo	GE	GC
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com R2 > 0,60	
Freqüência cardíaca	*	ns	0,1268	0,9256
Duração P	*	ns	0,844	0,998
Amplitude P	*	*	0,992	0,924
Duração QRS	*	ns	0,902	0,914
Amplitude QRS	*	*	0,959	0,626
Intervalo PR	ns	ns	1	0,993
Intervalo QT	ns	*	0,386	0,839
Segmento ST	ns	ns	0,980	0,565
Amplitude T	ns	ns	0,870	0,971

4.4.2. Frequência cardíaca

Os resultados da avaliação da frequência cardíaca (FC) dos animais do GE e GC ao longo do período de experimentação são observados na Figura 11.

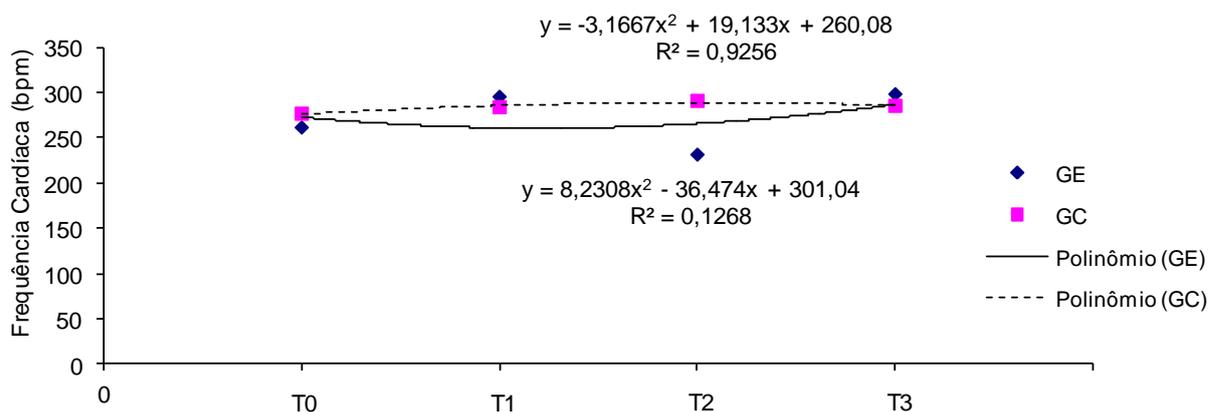


Figura 11 – Comportamento da variável Frequência Cardíaca de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta frequência cardíaca foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, ao nível de $p < 0,05$ de significância, entretanto estudando seu comportamento individualizado, estes grupos não mostraram diferenças significativas ao longo do tempo (Tabela 8).

Todavia, por meio de uma avaliação subsequente através da regressão linear pode-se perceber uma tendência de alteração nos valores da variável-resposta em questão do GC no momento final do estudo em relação ao momento inicial do experimento (Tabela 8), onde $R^2 = 0,9256$. Entretanto, para o GE não foi observada alteração significativa pela regressão, no qual $R^2 = 0,1268$.

Entretanto, avaliando o comportamento da FC do GE (Figura 11) é possível perceber que o seu comportamento foi mais heterogêneo do que o do GC, apresentando um pico em T1, decréscimo em T2 e nova elevação em T3. Atribui-se esta elevação da frequência cardíaca nestes tempos (T1 e T3) a instauração e progressão do processo de insuficiência cardíaca neste grupo.

A epinefrina possui ação cronotrópica positiva, ao estimular receptores β -1, promove um aumento da frequência de despolarização no nodo sinoatrial,

umentando assim a frequência cardíaca (RONA, 1985; COHN, 1989; BERNE; LEVY, 1996; HARDMAN et al., 1996; SAMUELSON, 2007).

Segundo Hori e Okamoto (2012), a frequência cardíaca é um dos biomarcadores que refletem relevantemente as atividades autonômicas simpática e parassimpática em indivíduos saudáveis ou cardiopatas. Em relação aos portadores de insuficiência cardíaca, os autores supracitados relatam que é evento comum a elevação da frequência cardíaca. Esta é uma adaptação que ocorre devido à ativação do sistema nervoso simpático, desencadeada por reflexos barorreceptores e neurais musculares (HORI; OKAMOTO, 2012; AKYÜZ et al., 2013). Em consequência, estes pacientes apresentam maior demanda de oxigênio pelo miocárdio, eficiência da função ventricular reduzida e comprometimento diastólico (COWIE; DAVIDSON, 2012). Estes fatores aceleram o comprometimento da função cardíaca e podem levar ao óbito. Por tais motivos, a elevação da frequência cardíaca em portadores de insuficiência cardíaca congestiva é considerada um fator de risco e de mau prognóstico em termos de morbidade e mortalidade (PALATINI, 2011; AKYÜZ et al., 2013).

A tendência de comportamento da frequência cardíaca neste estudo foi de taquicardia nos tempos posteriores as infusões de epinefrina, porém uma taquicardia que, controversamente, mesmo com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, não se sustentou durante todos os tempos de investigação. Como anteriormente descrito, esta taquicardia inicialmente observada é um reflexo mediado por barorreceptores (HORI; OKAMOTO, 2012; AKYÜZ et al., 2013) e a não sustentação deste reflexo de taquicardia pode estar ligada a uma disfunção baroreceptora demonstrada cientificamente em diversos modelos animais de insuficiência cardíaca (MUDERS et al. 1999). Ainda, é descrito que a frequência cardíaca pode não se encontrar elevada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, mesmo com os altos níveis de catecolaminas circulantes, sugerindo uma adaptação à estimulação simpática prolongada. A capacidade do coração em responder às catecolaminas endógenas e exógenas se torna marcadamente atenuada na IC crônica, o que está provavelmente relacionada a uma deficiência intracelular de AMP cíclico e de receptores β -adrenérgicos e ao decréscimo da atividade da adenilato ciclase (PACKER, 1988). Tais informações podem estar relacionadas ao decréscimo da FC observado no GE em T3 (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequência cardíaca média de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Frequência cardíaca média (bpm)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	261,35±35,06	295,35±35,63	231,35±21,76	298,28±52,24
GC	276,67±34,06	283,83±43,45	290,83±39,33	285,33±38,52

Média±Desvio Padrão.

Segundo Pariaut (2009), a frequência cardíaca normal para coelhos saudáveis se aproxima de 220 bpm, entretanto é comum encontrar uma frequência mais elevada devido ao aumento do tônus simpático secundário ao estresse da contenção, podendo apresentar uma frequência cardíaca entre 200 e 300 bpm.

No trabalho realizado por Levine (1942), no qual foram avaliadas as variações eletrocardiográficas de coelhos hígidos, este autor descreveu uma faixa de 174 a 282 bpm para a frequência cardíaca, valores próximos aos obtidos na presente pesquisa para o GC.

4.4.3. Ritmo cardíaco

A Tabela 10 apresenta de forma descritiva as principais alterações de ritmo cardíaco observadas nos animais ao longo de todo o período de experimentação.

Tabela 10 – Principais alterações de ritmo cardíaco em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Arritmia cardíaca	Frequência de observação	
	GE n=29	
	Absoluto	Relativo
Complexo ventricular prematuro (isolado)	2	28,57
Complexo ventricular prematuro (salva)	1	14,28
Complexo atrial prematuro	1	14,28
Taquicardia supraventricular	2	28,57
Taquicardia ventricular	1	14,28

As arritmias que se encontram dispostas nesta tabela ocorreram em maior número de observações nos tempos 1 e 3 no GE, não sendo detectadas quaisquer alterações de ritmo nos animais do GC.

Segundo Gürlek et al. (1994), Zimmerman e Liberman (2000) e Bocchi et al. (2009) o surgimento de arritmias cardíacas é um evento não raro nos casos de insuficiência cardíaca, sobretudo naqueles de curso crônico, sendo a intensidade

destes eventos correlacionada ao risco de morte súbita em pacientes não tratados adequadamente. Estas arritmias ocorrem devido ao remodelamento cardíaco e deformações no sistema de condução elétrico cardíaco. Soma-se a esta afirmação o fato da insuficiência cardíaca em tela ter sido causada pela administração de um fármaco adrenérgico de ação direta, com características arritmogênicas evidentes. Por tais motivos, justifica-se a ocorrência destas alterações do ritmo cardíaco, principalmente nos tempos subsequentes a administração de epinefrina.

Todd et al. (1985) descreveram a ocorrência de complexos ventriculares e atriais prematuros, tendo estes últimos uma maior ocorrência, em cães submetidos a infusão contínua de isoproterenol.

Segundo Rona (1985), o adrenocromo, um produto da oxidação da epinefrina, pode causar arritmias importantes, sobretudo complexos ventriculares prematuros e morte súbita.

Complexos atriais prematuros e taquicardia supraventricular estão associados ao aumento atrial e alterações no sistema de condução elétrico cardíaco, sendo esta última relacionada a doença miocárdica grave. Complexos ventriculares prematuros podem estar relacionados a inúmeras causas, sendo geralmente associados a um déficit na oxigenação miocárdica. Complexos ventriculares prematuros em salva podem progredir para taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e morte súbita. A taquicardia ventricular indica doença cardíaca grave, sendo considerada uma emergência (MUCHA; BELERENIAN, 2008; TILLEY et al., 2008).

A ocorrência de taquicardia sinusal compensatória, complexos atriais prematuros, assim como taquicardia ventricular e complexos ventriculares prematuros podem ser achados comuns ao exame eletrocardiográfico de gatos com cardiomiopatia hipertrófica (MUCHA; BELERENIAN, 2008), afecção morfológicamente semelhante a desenvolvida nesta pesquisa pelo modelo experimental preconizado, conforme demonstrado no item 4.6.

4.4.4. Demais variáveis eletrocardiográficas

O resultado da análise estatística das demais variáveis eletrocardiográficas está apresentado na Tabela 8.

A partir da análise desta tabela pode-se perceber que pela análise de variância para dados desbalanceados (GLM), somente as variáveis-resposta

amplitude da onda P, duração da onda P, amplitude do complexo QRS e duração do complexo QRS apresentaram alterações significativas entre os grupos estudados, entretanto apenas as variáveis amplitude da onda P, amplitude do complexo QRS e intervalo QT apresentaram alterações significativas ao longo do tempo. Mesmo tendo sido realizada a regressão linear para melhor compreensão do comportamento daquelas variáveis que não apresentaram alterações significativas entre os grupos ao longo do tempo, a seguir descreve-se e discute-se apenas aquelas variáveis com maior relevância e variabilidade eletrocardiográfica.

Os comportamentos da amplitude e da duração da onda P nos grupos estudados são observados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

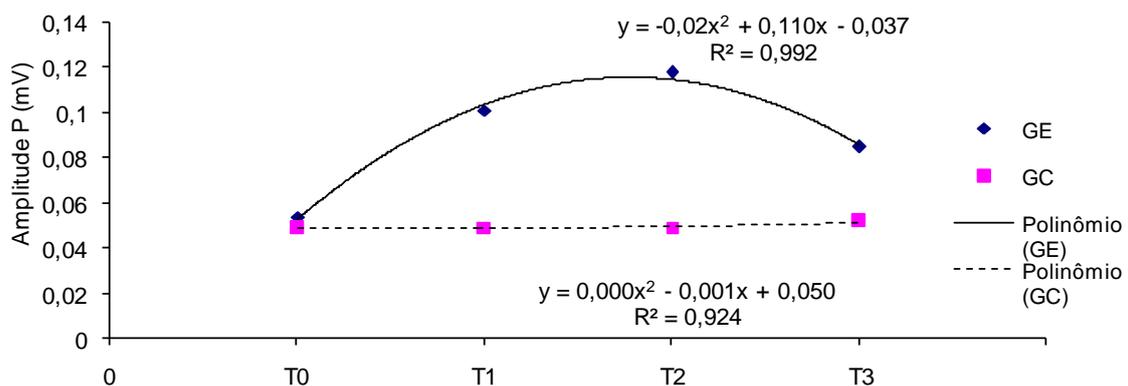


Figura 12 – Comportamento da variável amplitude da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Apesar da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) ter detectado diferença significativa apenas entre os tratamentos (GE e GC) para a variável duração da onda P, através da análise de regressão pode-se perceber uma tendência de alteração nos valores desta variável, em ambos os grupos, no momento final do estudo em relação ao momento inicial do experimento (Figura 13).

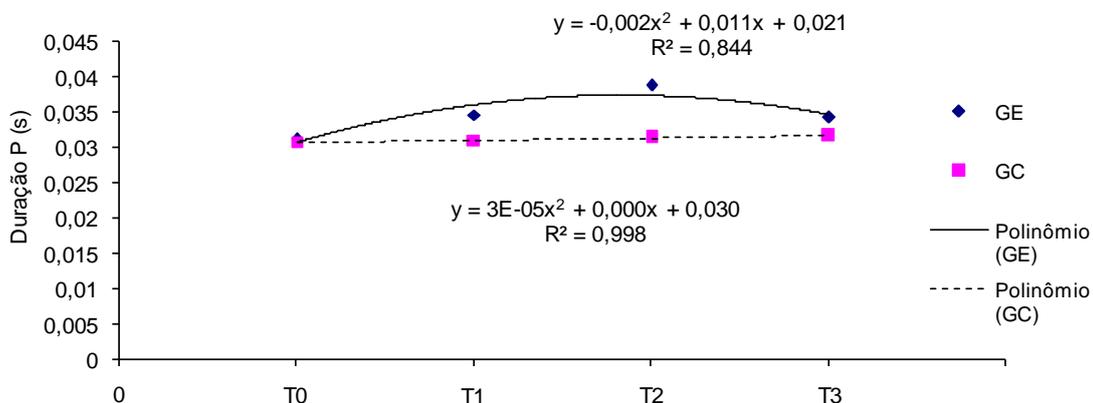


Figura 13 – Comportamento da variável duração da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Conforme observado nas Figuras 12 e 13, a amplitude e duração média da onda P do GE aumentaram em T1 e se mantiveram com valores superiores aos do GC ao longo de todo o período de experimentação.

De acordo com alguns autores, em coelhos saudáveis a amplitude e a duração média da onda P podem variar segundo diversos parâmetros, não tendo ainda sido padronizados valores de referência para diferentes raças, pesos ou idades (SZABUNIEWICZ et al., 1971; PARIAUT, 2009). Segundo Pariaut (2009), a amplitude da onda P pode abranger um intervalo de 0,04 a 0,07mV e a duração da onda P pode variar de 0,02 a 0,04s. Em contrapartida, Lord et al. (2010) e Quesenberry e Carpenter (2011), referenciam valores de até 0,12mV para a amplitude e de até 0,05 para a duração da onda P.

Embora Pariaut (2009), recomende que, devido a reduzida amplitude natural das ondas eletrocardiográficas, não se utilize da variação morfológica das ondas P e complexo QRS para sugestão de dilatação ou hipertrofia de câmaras durante a doença cardíaca em coelhos, o fato dos animais do GE apresentarem valores superiores aos observados no GC (Tabela 11), tendo estes valores apresentado diferença estatisticamente significativa entre os grupos e ao longo do tempo (Tabela 8), sugere-se que este aumento possa ser explicado pelo aumento biaxial decorrente do desenvolvimento da doença cardíaca induzida pela epinefrina neste grupo (Figura 17A).

De acordo com alguns autores, o aumento do átrio direito pode resultar em um aumento da amplitude da onda P e o aumento do átrio esquerdo em aumento da duração da onda P (FOX et al. 1999; TILLEY; GOODWIN, 2002; TILLEY et al., 2008; MUCHA; BELERENIAN, 2008). Ainda, segundo Noszczyk-Nowak et al. (2009), Lord et al. (2010) e Lord et al. (2011), tais achados podem ser observados em coelhos com insuficiência cardíaca.

Tabela 11 – Valores médios para as variáveis-resposta amplitude e duração da onda P de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Amplitude P (mV)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	0,054±0,022	0,101±0,046	0,118±0,040	0,085±0,032
GC	0,049±0,009	0,049±0,011	0,049±0,007	0,052±0,007
Duração P (s)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	0,031±0,007	0,035±0,010	0,039±0,005	0,034±0,006
GC	0,031±0,007	0,031±0,005	0,031±0,008	0,032±0,004

Média±Desvio Padrão.

Os comportamentos da amplitude e da duração do complexo QRS nos grupos estudados são observados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

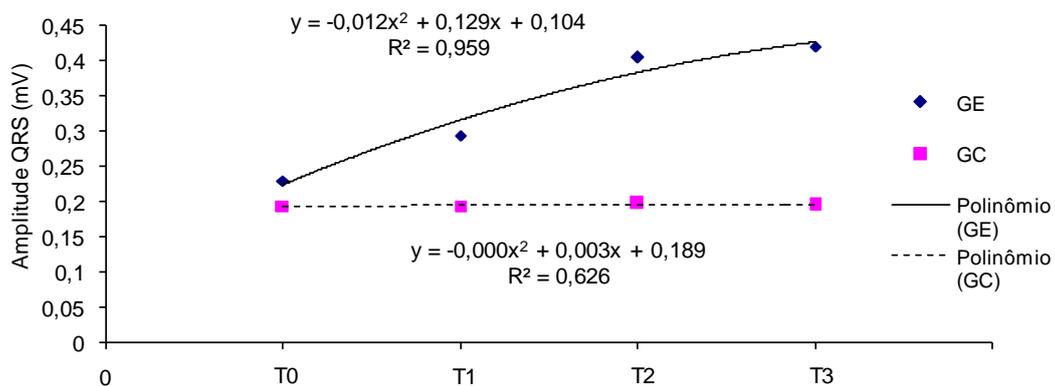


Figura 14 – Comportamento da variável amplitude do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Através da análise da Figura 14 e da Tabela 8 pode-se perceber que a variável amplitude do complexo QRS apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados ao longo do tempo experimental.

De acordo com a análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da duração do complexo QRS foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, ao nível de $p < 0,05$ de significância, entretanto estudando seu comportamento individualizado, estes grupos não mostraram diferenças significativas ao longo do tempo (Tabela 8). Entretanto, por meio da regressão linear, pode-se perceber uma tendência de alteração nos valores desta variável, em ambos os grupos, no momento final do estudo em relação ao momento inicial do experimento (Figura 15).

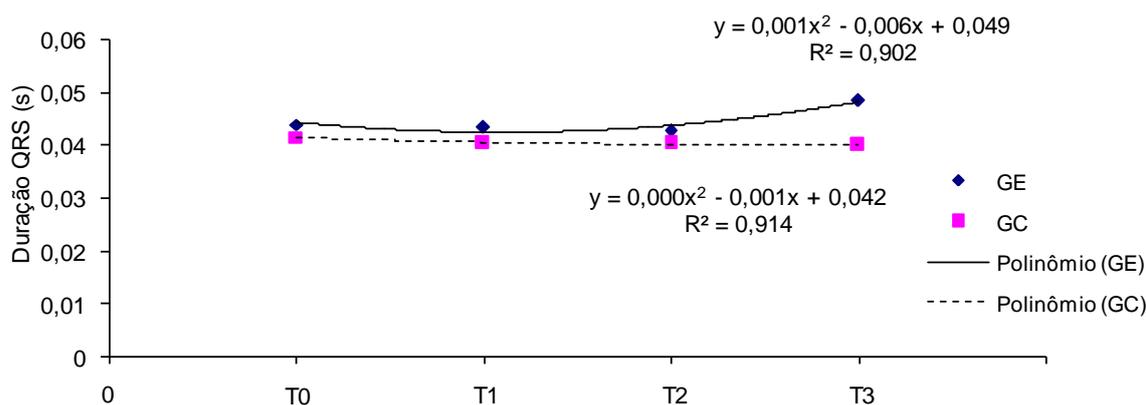


Figura 15 – Comportamento da variável duração do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

A amplitude do complexo QRS de coelhos saudáveis abrange uma faixa de 0,12 a 0,20mV, entretanto estes valores também podem variar amplamente de acordo com a idade, peso e a raça do animal (SZABUNIEWICZ et al., 1971; PARIAUT, 2009), tendo valores de referência de até 0,39mV (LORD et al., 2010). Szabuniewicz et al. (1971) e Pariaut (2009), descrevem valores de 0,03 a 0,04s para a duração do complexo QRS de coelhos saudáveis, porém Lord et al. (2010), determinam uma faixa de 0,02 a 0,06s para esta variável.

Os valores observados para os animais do GC são bastante similares ao padrão descrito na literatura para esta espécie, enquanto para os animais do GE o valor médio obtido para a variável amplitude de QRS foi quase o dobro daquele

observado no GC e por Szabuniewicz et al. (1971) e Pariaut (2009), ao final desta pesquisa, estando a duração do complexo QRS também acima do observado por estes autores e para o GC (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores médios para as variáveis-resposta amplitude e duração do Complexo QRS de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Amplitude QRS (mV)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	0,229±0,125	0,294±0,174	0,405±0,232	0,420±0,251
GC	0,193±0,084	0,193±0,010	0,197±0,08	0,195±0,018
Duração QRS (s)				
Médias	T0	T1	T2	T3
GE	0,044±0,008	0,043±0,008	0,043±0,007	0,048±0,010
GC	0,041±0,009	0,040±0,005	0,040±0,006	0,040±0,009

Média±Desvio Padrão.

Embora ainda seja marcante a recomendação de Pariaut (2009), no sentido de não utilização da variação morfológica do complexo QRS sugerindo aumento ventricular, outros autores sugerem este tipo de correlação, mesmo que em outras espécies (FOX et al. 1999; TILLEY; GOODWIN, 2002; TILLEY et al., 2008), justificado pelo aumento e remodelamento ventricular em decorrência da instauração do processo de insuficiência cardíaca.

4.5. Óbitos

Observou-se a ocorrência de óbitos em quinze animais do GE, sendo um durante a primeira infusão, sete na primeira semana após a primeira infusão, seis na segunda semana após a primeira infusão e um na semana seguinte a segunda infusão, conforme disposto cronologicamente na Figura 2.

Este modelo apresentou características similares ao modelo proposto por Muders et al. (1999), que em experimento semelhante observaram um alto índice de óbitos. Estes autores trabalharam com um número total de doze animais, tendo quatro óbitos ocorridos durante ou após a primeira infusão e um óbito após a segunda infusão. Entretanto estes autores utilizaram três infusões em sua investigação, obtendo mais um óbito após esta terceira infusão.

Ainda, de acordo com estes autores, os óbitos observados durante ou momentos após a primeira infusão de epinefrina podem ter sido causados por arritmias, o que pode ser atribuído ao óbito observado durante a primeira infusão do presente trabalho.

Comparando-se momentos equivalentes entre este trabalho e o desenvolvido por Muders et al. (1999), após a segunda infusão, a taxa de óbitos foi de 52% contra 42%, respectivamente, tendo os referidos autores alcançado a taxa de 50% de óbitos após sua terceira infusão.

A taxa de óbitos observada no presente estudo também se assemelha com as obtidas por Van Vleet et al. (1977), de 60%, em um modelo de miocardiopatia catecolaminérgica em suínos submetidos a altas doses de isoproterenol e por Bregagnollo et al. (2007), de 49%, em modelo de insuficiência cardíaca congestiva em ratos com estenose aórtica supravalvar. Entretanto, vale ressaltar que o modelo animal e as metodologias utilizadas nestes últimos trabalhos diferem dos utilizados na presente pesquisa.

Wilkes et al. (1963), investigaram os efeitos de administrações diárias e crescentes de epinefrina por via intraperitoneal em coelhos recém nascidos e alcançaram uma taxa de 79% de óbitos na primeira semana de tratamento, chegando a 97% na quarta semana.

Embora a literatura apresente diversos artigos em que foram utilizados modelos experimentais empregando-se catecolaminas, como Wilkes et al. (1963), Van Vleet et al. (1977), Fripp et al. (1981), Downing e Chen (1985), Todd et al. (1985), Muders et al. (1999), Zhang et al. (2010), poucos autores descrevem a ocorrência de óbitos em seus trabalhos, o que não descarta a hipótese destes terem ocorrido e estes animais excluídos das fases seguintes de suas investigações.

4.6. Avaliação histopatológica

Todos os animais do grupo experimental (GE) que vieram a óbito durante o ensaio experimental foram submetidos a avaliação necroscópica e histológica para comprovação dos achados clínicos de insuficiência cardíaca e validação do modelo experimental proposto, assim como os animais do grupo controle (GC) que foram submetidos a eutanásia conforme cronograma da Figura 2. Os principais achados necroscópicos e histológicos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Achados histopatológicos e necroscópicos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2013. Onde: * regiões discretas e em pequeno número de observações; ** regiões evidentes e freqüentes, *** regiões acentuadas e observadas em grande número de animais.

Órgãos	Achados necroscópicos e histopatológicos	Freqüência GE	Freqüência GC
Gerais	Ascite	**	--
	Fígado noz moscada	**	--
	Efusões pleural e pericárdica	**	--
Coração	Edema perivascular	*	--
	Hipertrofia cardiomiócito	***	--
	Aumento massa ventricular	***	--
	Fibrose	***	--
	Infiltrado mononuclear difuso	**	--
	Congestão	***	**
	Degeneração cardiomiócitos	**	--
Cerebelo	Manguito perivascular	*	--
	Edema perineuronal	*	--
Pulmões	Edema pulmonar	***	--
	Enfisema pulmonar	***	--
	Atelectasia	***	--
	Espessamento de septo alveolar	**	--
	Infiltrado mononuclear	***	--
	Congestão	***	**
Fígado	Degeneração hidrópica difusa	*	--
	Degeneração centrolobular	**	--
	Edema	**	--
	Congestão	**	**
	Cirrose	*	--
	Processo inflamatório	*	--
Rim	Edema perivascular	*	--
	Congestão	**	--
	Esclerose glomerular	**	--
	Processo inflamatório	*	--
Baço	Congestão	***	**
	Cirrose	*	--
	Processo inflamatório	**	--
Intestino	Edema na região submucosa	**	--
	Congestão	**	--
	Processo inflamatório	**	--

Analisando-se inicialmente o GC, percebe-se que este não apresentou quaisquer alterações histopatológicas compatíveis com enfermidades, excetuando-se a presença de congestão, em órgãos como coração (Figura 17C), pulmões, fígado e rim (Figuras 18A, C e E). Este achado também foi observado com freqüência nos animais do GE, porém com intensidade mais severa. De acordo com Jones et al. (2000) e Bochi et al. (2009), a congestão é um sinal clínico comum em casos de insuficiência cardíaca, estando relacionada a baixa capacidade do coração em manter a perfusão sistêmica adequada, promovendo um conseqüente aumento

da pressão venosa. Entretanto, no grupo experimental, pode-se até inferir que o processo congestivo tenha aumentado em decorrência da lesão cardíaca produzida pela epinefrina, porém devido ao fato da mesma ter sido observada também nos animais do grupo controle, sem quaisquer indício de cardiopatia, deve-se atentar a outro motivo que possa ter causado o evento de congestão observado à luz da histopatologia, pressupondo-se o emprego da eutanásia por técnica sem exanguinação.

Dentre os achados necroscópicos do GE destacam-se os compatíveis com os sinais clínicos de insuficiência cardíaca observados, como a presença de efusões pleural e pericárdica, padrão hepático rendilhado (fígado em noz moscada) e ascite, devido ao processo de congestão supracitado (Figura 16).

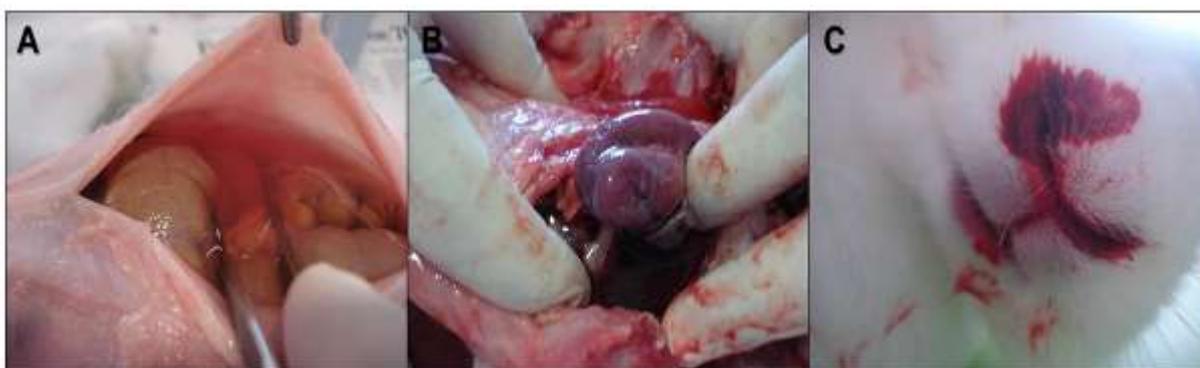


Figura 16 – Achados de necropsia compatíveis com os sinais clínicos observados no modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzido pela epinefrina. **A:** Observa-se ascite; **B:** efusão pleural e pericárdica hemorrágica; **C:** epistaxe. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Embora não tenham sido realizadas avaliações ecocardiográficas para avaliação da função miocárdica, pressupõe-se que este modelo apresente sinais de remodelamento por sobrecarga pressórica devido às características histopatológicas apresentadas, como acentuada hipertrofia cardíaca, hipertrofia dos cardiomiócitos, substituição de tecido muscular cardíaco por tecido fibroso e redução da luz do ventrículo esquerdo, conforme demonstrado nas Figuras 17 A e B. Estes achados de disfunção diastólica são corroborados por Lorell e Grossman (1987).

Acerca dos achados histopatológicos do GE, destacam-se a hipertrofia e degeneração dos cardiomiócitos, processo inflamatório e a fibrose miocárdica, sobretudo em ventrículo esquerdo (Figuras 17D, E e F).

A hipertrofia de cardiomiócitos está associada ao aumento da atividade cardíaca e hipertensão causados pela epinefrina, com vistas a atender as demandas

metabólicas do organismo, conforme documentado pela literatura (DiPALMA; MASCATELLO, 1951; LORELL; GROSSMAN, 1987; RAWLINS et al., 2009). A degeneração de cardiomiócitos está de acordo com o descrito por Rona (1985), Todd et al. (1985) e Jiang e Downing (1990) acerca da cardiotoxicidade da epinefrina. Segundo Rona (1985), esta degeneração ocorre devido a depleção da reserva energética das células miocárdicas causada pela epinefrina, levando a alterações celulares bioquímicas complexas e alterações estruturais subseqüentes, caracterizadas como degeneração irreversível ou necrose.

Após a administração de altas doses de catecolaminas desencadeia-se um processo inflamatório mediado por células mononucleares, principalmente linfócitos e granulócitos, permeados em meio ao tecido cardíaco. Este evento pode iniciar-se em até 10 horas após a infusão de epinefrina. Estas células mononucleares promovem não somente uma injúria tecidual em curto prazo, mas também são responsáveis por desenvolver angiogênese e deposição de colágeno tardiamente. O avançar deste processo está associado ao desenvolvimento de tecido fibroso e lesões cicatriciais a partir de cerca de uma semana após o insulto inicial (VLEET; FERRANS, 1986; JIANG; DOWNING, 1990; MUDERS et al., 1999; KANIA et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

A presença de manguito perivascular e edema perineuronal no cerebelo corroboram os achados clínicos referentes as lesões neurológicas descritas no item 4.1., provavelmente devido a hipertensão causada pela epinefrina, conforme descrito anteriormente.

Os achados histopatológicos pulmonares mais marcantes incluem freqüentes e extensas áreas de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, atelectasias, enfisema e edema pulmonar (Figura 18B). Todos estes achados são comuns quando da utilização de epinefrina em altas doses, conforme demonstrado por diversos modelos animais de edema pulmonar induzido pela epinefrina, incluindo ratos, coelhos e cães (HATAKEYAMA; SHIGEI, 1968; WORTHEN et al., 1969a; CHENG et al., 1973). O mecanismo que leva a este edema causado pela epinefrina inclui vasoconstrição arterial e venosa promovendo desvio do sangue da circulação periférica para a pulmonar, aumento da pressão capilar pulmonar, redução da pressão oncótica e alteração na permeabilidade capilar. Esta combinação de eventos resulta em edema intersticial e alveolar, atelectasias,

hemorragias e invasão tecidual de células inflamatórias (WORTHEN et al., 1969b; BERK et al., 1973; ISHIKAWA et al., 1975; HARDMAN et al., 1996).

As principais lesões hepáticas consistiram em congestão, edema e degeneração centrolobular (Figura 18D). Segundo Jones et al. (2000) estes eventos são comuns em casos de congestão em geral, sobretudo aqueles em virtude da insuficiência cardíaca congestiva. Ademais, o processo degenerativo, além de ter como causa a congestão, também parece ter envolvimento da lesão tecidual tóxica das catecolaminas. Focos hemorrágicos, edemas e congestões em diversos órgãos, sobretudo nos pulmões e o desenvolvimento de tecido fibroso e lesões cicatriciais podem ser observados em poucos dias após a administração de catecolaminas (VLEET; FERRANS, 1986; JIANG; DOWNING, 1990; BINDOLI et al., 1992; MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

As lesões renais mais evidentes foram a esclerose glomerular e a congestão (Figura 18F). Segundo alguns autores, a esclerose glomerular é um evento comum em situações de insuficiência cardíaca e/ou hipertensão essencial, caracterizando um processo de insuficiência renal crônica. Esta ocorre por vários mecanismos, dentre eles ocorrência de isquemia glomerular devido ao progressivo estreitamento vascular e esclerose glomerular propriamente dita, devido à perda da auto-regulação renal com transmissão da hipertensão sistêmica para o capilar glomerular, resultando em hipertensão intraglomerular, hiperfiltração glomerular e esclerose glomerular. Assim, o órgão torna-se hipoperfundido e começa a apresentar alterações compatíveis com um processo inflamatório e degenerativo tecidual (CAETANO; PRAXEDES, 1998; CASTRO et al., 2010).

Assim como nos demais órgãos, o baço e o intestino também apresentaram congestão, edema e regiões de infiltrado mononuclear de forma mais evidente (Figuras 19B e D). Tais achados são compatíveis com aqueles descritos por Wilkes et al. (1963) em coelhos após a administração de sucessivas doses de epinefrina.

Vale acrescentar, que os achados apresentados na Tabela 13 para o GE, também foram observados na maioria dos animais que vieram a óbito durante o período de indução do modelo experimental, apenas se diferenciando dos animais que perduraram por todo o período experimental pela menor intensidade e frequência das lesões descritas.

Os achados do presente estudo são bastante similares as informações disponíveis na literatura sobre este modelo de miocardiopatia catecolaminérgica

(VLEET; FERRANS, 1986; JIANG; DOWNING, 1990; MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010). Tais achados foram utilizados para comprovação do modelo consagrado na literatura e servem, não apenas para validar o presente estudo, como para justificar os achados clínicos e o elevado número de óbitos observados na presente investigação (dados apresentados nos tópicos 4.1. e 4.5.).

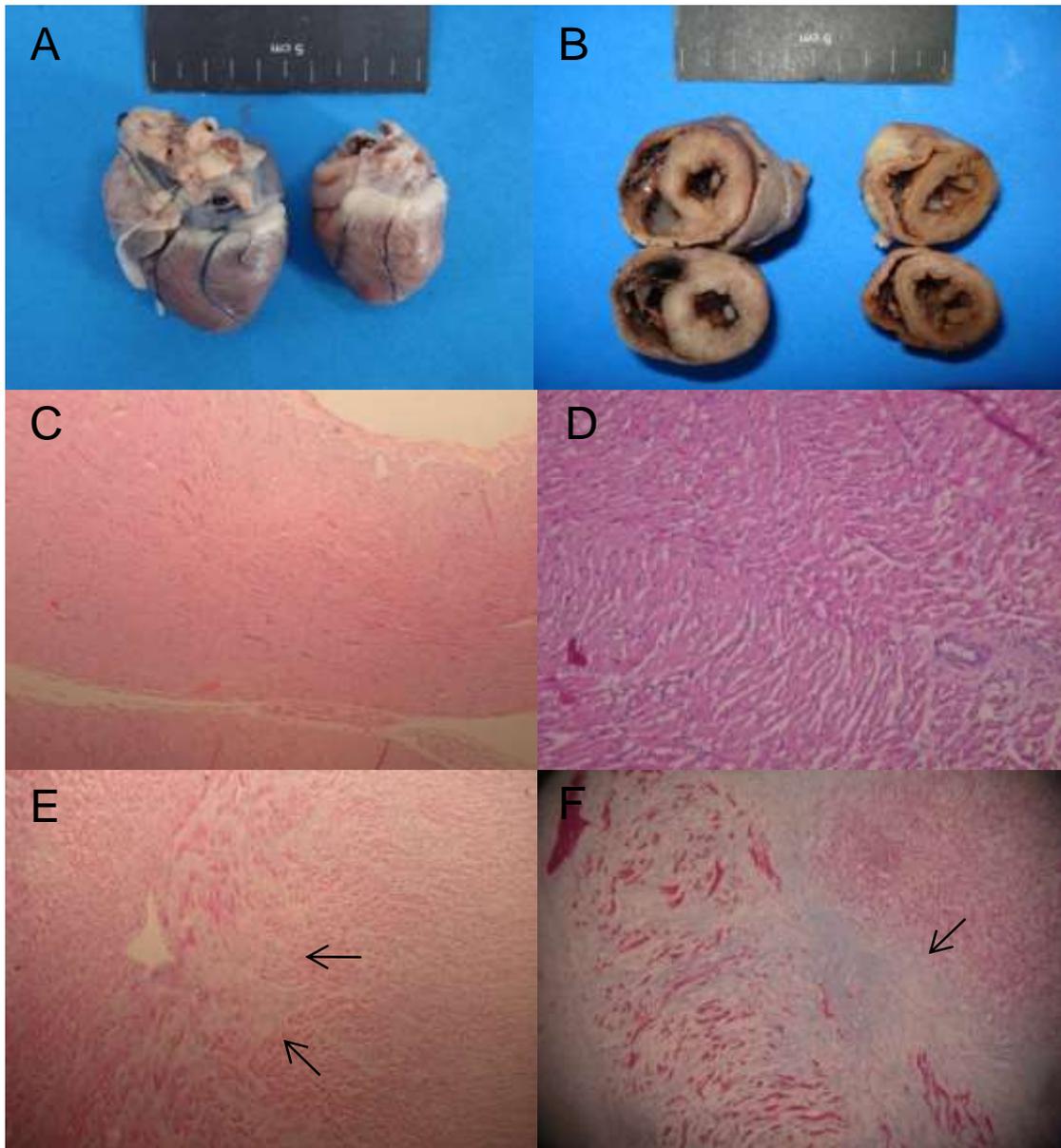


Figura 17 – Achados necrscópicos e histopatológicos cardíacos em coelhos. **A:** Esquerda: cardiomegalia em animal do GE; Direita: coração normal de animal do GC; **B:** Esquerda: corte transversal de coração de animal do GE evidenciando hipertrofia concêntrica e redução da luz do ventrículo esquerdo; Direita: corte transversal de coração normal de animal do GC; **C:** Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GC com congestão (HE; Aumento 10X); **D:** Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GE com congestão, edema, processo inflamatório difuso com predominância de mononucleares (HE; Aumento 20X); **E:** Microscopia óptica de ventrículo esquerdo de animal do GE com fibrose (em destaque) (HE; Aumento 10X); **F:** Microscopia óptica de átrio esquerdo de animal do GE com fibrose (em destaque) (Tricrômico de Gomori; Aumento 10X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.

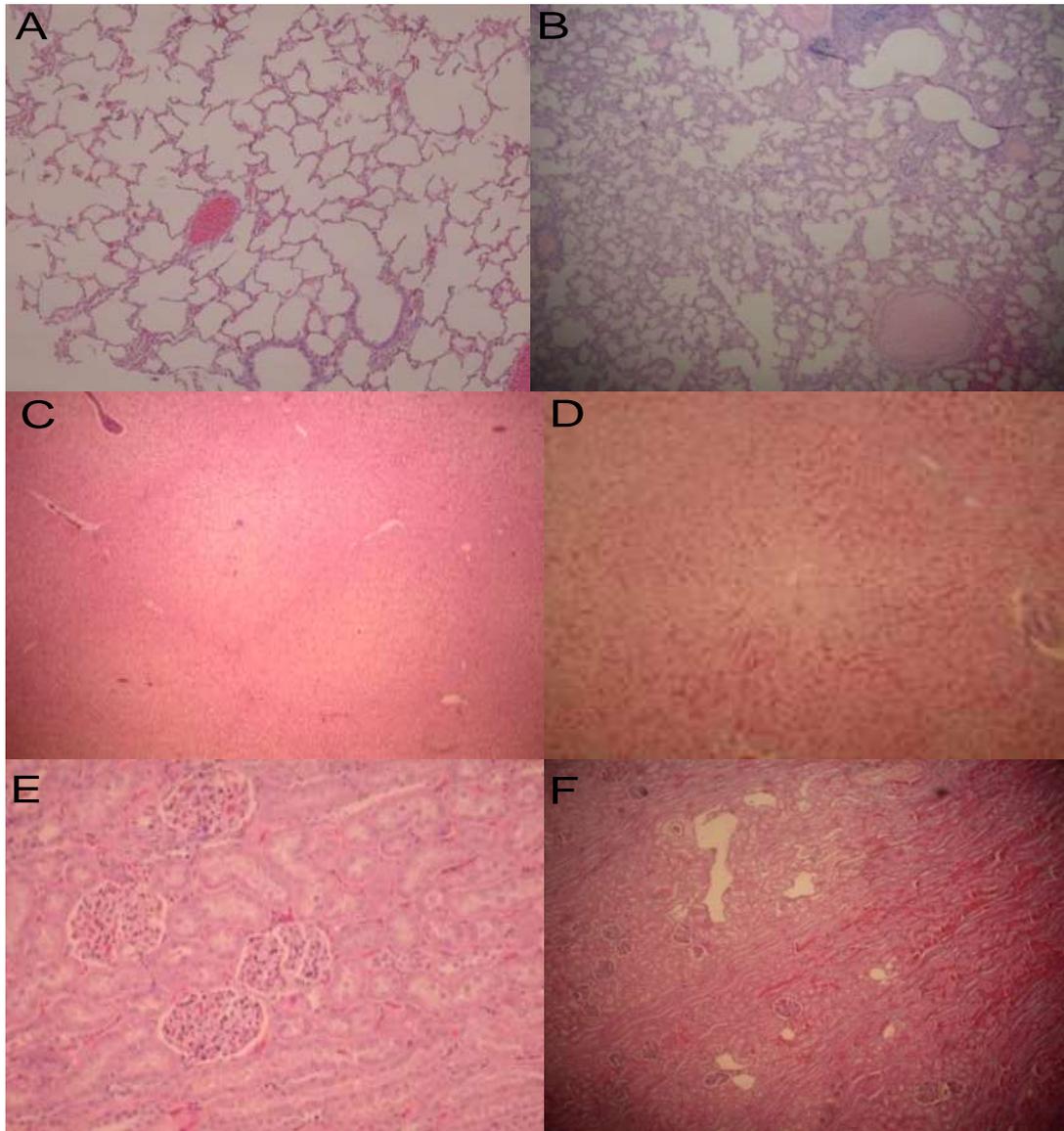


Figura 18 – Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais do GC e GE. **A:** Tecido pulmonar de animal do GC com leve congestão (HE; Aumento 10X); **B:** Tecido pulmonar de animal do GE com áreas de edema, enfisema, atelectasia e foco de processo inflamatório com predominância de células mononucleares (HE; Aumento 10X); **C:** Tecido hepático de animal do GC com congestão (HE; Aumento 10X); **D:** Tecido hepático de animal do GE com congestão e degeneração grave e difusa, mais acentuada na região centrolobular (HE; Aumento 10X); **E:** Tecido renal de animal do GC com congestão (HE; Aumento 20X); **F:** Tecido renal de animal do GE com cistos, esclerose glomerular e congestão mais acentuada na região corticomedular (HE; Aumento 10X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.

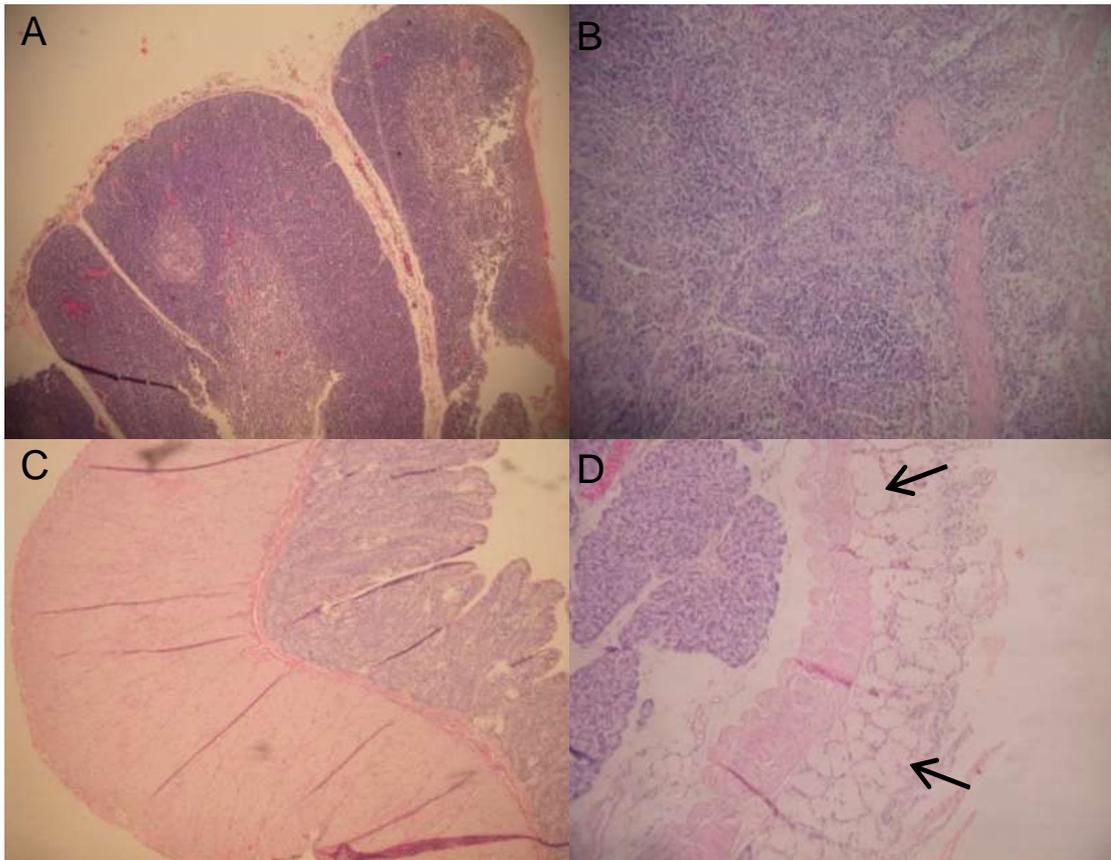


Figura 19 – Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais do GC e GE. **A:** Tecido esplênico de animal do GC sem alterações (HE; Aumento 10X); **B:** Tecido esplênico de animal do GE com cirrose e congestão (HE; Aumento 20X); **C:** Tecido intestinal de animal do GC sem alterações (HE; Aumento 20X); **D:** Tecido intestinal de animal do GE com processo inflamatório leve na mucosa e edema de submucosa (em destaque) (HE; Aumento 20X). Hospital Veterinário/UENF, 2013.

4.6.1. Peso cardíaco

Os resultados da avaliação do peso cardíaco dos animais do GE e do GC no tempo inicial (T0) e final (T3) do período de experimentação são observados na Figura 20.

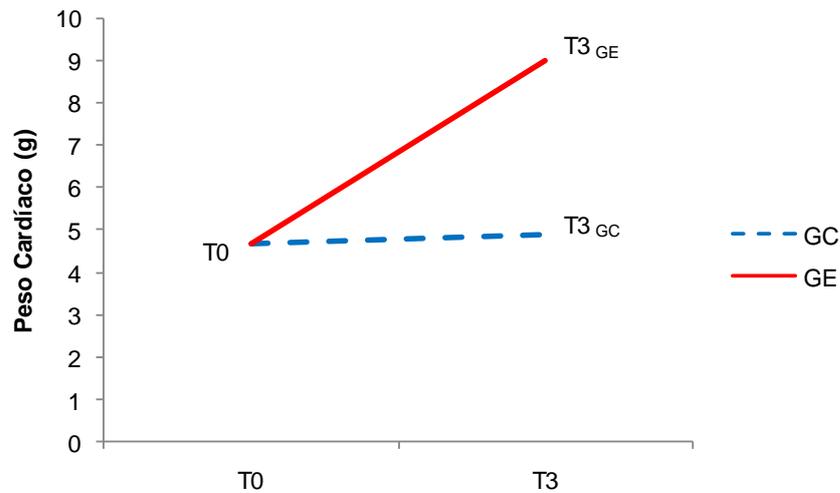


Figura 20 – Comportamento da variável peso cardíaco de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

A análise estatística do peso cardíaco dos animais do GE e do GC no tempo inicial (T0) e final (T3) assim como para todo o período de experimentação se encontra descrita nas Tabelas 14 e 15 e os respectivos valores médios estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 14 – Análise estatística pelo Teste T de Student para a variável peso cardíaco de coelhos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Teste T	
* = Significativo ($p < 0,05$) ; ns = não significativo	
T0xT3_{GE}	*
T0xT3_{GC}	ns
T3_{GE} xT3_{GC}	*

Por meio da análise da Figura 20 e Tabela 14 é possível observar que, através do Teste T de Student, houve diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$, entre o peso cardíaco obtido no início do experimento (T0) e o obtido ao final do mesmo (T3) no GE e entre os pesos cardíacos finais dos grupos estudados, não havendo diferença significativa entre o peso cardíaco inicial e final do GC. Ainda, é possível observar que o GE apresentou uma forte tendência de elevação do peso cardíaco ao longo do período de experimentação, contrapondo a do GC que se manteve praticamente inalterada.

Tabela 15 – Análise estatística pela ANOVA (GLM) para as variáveis-resposta peso cardíaco e morfometria das fibras cardíacas. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05	
	Tratamento	Tempo
	* = Significativo ; ns = não significativo	
Peso cardíaco	*	ns
Morfometria	ns	ns

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta peso cardíaco foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, ao nível de p<0,05 de significância.

As Figuras 17 A e B permitem observar claramente o efeito do modelo experimental sobre o peso cardíaco dos animais do grupo que recebeu a epinefrina em comparação ao controle. Em T3 observa-se que a média de peso do grupo experimental foi de $8,97 \pm 2,03$ g, contra $4,90 \pm 0,38$ g do grupo controle.

Tabela 16 – Peso cardíaco médio de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Médias	Peso Cardíaco (g)	
	T0	T3
GE	$4,67 \pm 0,19$	$8,97 \pm 2,03$
GC	$4,67 \pm 0,19$	$4,90 \pm 0,38$

Média±Desvio Padrão.

Esta informação é corroborada por Nap et al. (2003), Verkerk et al. (2011) e Vilarinho et al. (2010), que através de seus estudos em coelhos com insuficiência cardíaca induzida experimentalmente, observaram um aumento significativo de massa cardíaca com a instauração da enfermidade, sobretudo aumento de massa ventricular.

O desenvolvimento de hipertrofia ventricular é um dos principais mecanismos pelos quais o coração compensa o aumento de trabalho. Quando ocorre uma sobrecarga pressórica, ocorre um aumento do estresse sistólico da parede ventricular, levando a replicação das miofibrilas, espessamento dos cardiomiócitos e hipertrofia concêntrica, resultando em insuficiência diastólica. (ANVERSA et al., 1986; COHN, 1995). Ainda, conforme discutido anteriormente, a hipertrofia dos cardiomiócitos está associada ao aumento da atividade cardíaca e a hipertensão causados durante a instalação da insuficiência cardíaca, assim como pela ação da epinefrina no tecido cardíaco, objetivando suprir as demandas metabólicas do

organismo (DiPALMA; MASCATELLO, 1951; LORELL; GROSSMAN, 1987; RAWLINS et al., 2009).

Estas informações elucidam os achados da presente pesquisa, visto que, conforme apresentado no item anterior, o GE apresentou acentuada hipertrofia cardíaca, hipertrofia de cardiomiócitos e hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, com conseqüente redução de seu diâmetro cavitário.

Cimini e Weiss (1990), empregaram coelhos Nova Zelândia de mesma idade, porém não informada e peso corporal médio de 3 Kg, em seus estudos sobre hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda induzida experimentalmente. O peso cardíaco médio obtido no grupo controle foi de 6,44g e de 8,51g nos animais enfermos, valor este próximo ao encontrado no GE do presente estudo.

Nap et al. (2003), desenvolveram um estudo utilizando um modelo cirúrgico de insuficiência cardíaca congestiva combinando sobrecarga de volume e de pressão, em coelhos Nova Zelândia com nove meses de idade e peso corporal médio de 4,3 Kg. O peso cardíaco médio obtido no grupo controle foi de 9,07g e no grupo experimental foi de 22,99g.

Valores estes próximos aos obtidos por Verkerk et al. (2011), em modelos experimentais de cardiomiopatia dilatada e isquêmica em coelhos Nova Zelândia, de cinco meses de idade e aproximadamente 4,1Kg, onde foram encontrados valores médios de 9,44g para o peso cardíaco do grupo controle, 12,95g para o grupo de animais com cardiomiopatia isquêmica e 20g para o grupos de animais com cardiomiopatia dilatada.

Estes últimos trabalhos apresentam valores superiores aos obtidos no presente estudo. Porém, as diferenças observadas podem ser devidas aos diferentes modelos experimentais preconizados, assim como a diferença na idade e peso corporal dos animais empregados na presente pesquisa, visto que ao final do experimento, os animais apresentavam três meses de idade, tendo o GC aproximadamente 2,2Kg de peso corporal e o GE 2,5Kg.

Segundo Brown et al. (1925) e Patel e Ramakrishnan (1968), em animais saudáveis, o peso cardíaco está relacionado ao peso corporal, o que corrobora as diferenças encontradas entre os trabalhos supracitados e o atual.

Segundo Pariaut (2009), o peso cardíaco corresponde a aproximadamente 0,20% do peso corporal de coelhos saudáveis, o que aplicado na presente pesquisa,

resulta em 4,4g de peso cardíaco para os 2,2Kg de peso corporal médio dos animais do GC, valor bastante próximo ao encontrado de 4,9g.

A literatura mostra que o peso cardíaco de coelhos saudáveis pode apresentar pequenas variações segundo a raça estudada e a idade do animal. A primeira descrição destes valores observada na literatura disponível data da década de 1920, quando Brown et al. (1925), apresentaram um estudo do peso de diferentes órgãos de 350 coelhos de diferentes raças e idades. Neste estudo, apresentam um valor médio de 5,26g. Patel e Ramakrishnan (1969), descreveram este valor normal em 3,63g, entretanto também não especificaram a raça do coelho empregado em seu estudo. Embora, não seja possível comparar a raça e a idade dos animais empregados nestes trabalhos e no atual, os valores obtidos para o peso cardíaco de coelhos saudáveis se aproximam dos obtidos no presente estudo para os animais do GC.

4.6.2. Morfometria das fibras miocárdicas

Os resultados da avaliação da morfometria das fibras miocárdicas dos animais do GE e do GC no tempo inicial (T0) e final (T3) do período de experimentação são observados na Figura 21.

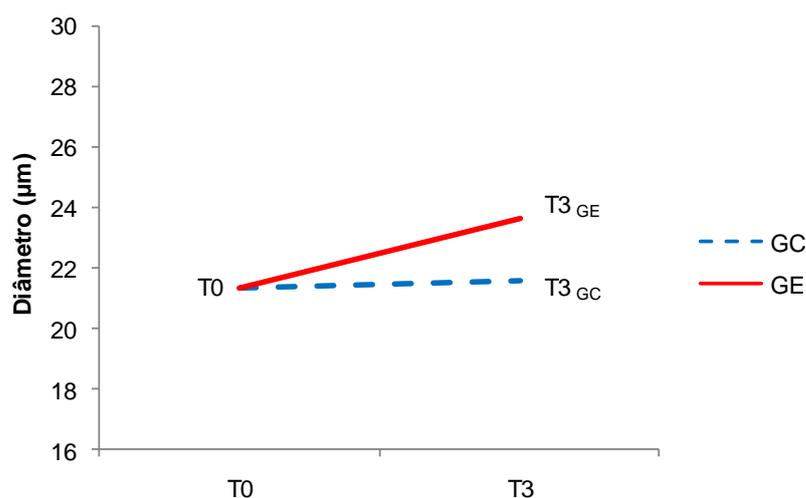


Figura 21 – Comportamento da variável morfometria das fibras miocárdicas de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) ao longo do período de experimentação. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

A análise estatística da morfometria das fibras miocárdicas dos animais do GE e do GC no tempo inicial (T0) e final (T3) do período de experimentação se

encontra descrita nas Tabelas 15 e 17 e os respectivos valores médios estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 17 – Análise estatística pelo Teste T de Student para a variável morfometria das fibras miocárdicas de coelhos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por epinefrina. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Teste T	
* = Significativo ; ns = não significativo	
T0xT3 _{GE}	ns
T0xT3 _{GC}	ns
T3 _{GE} x T3 _{GC}	ns

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) e através do Teste T de Student, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos e grupos estudados para a variável-resposta morfometria das fibras cardíacas. Entretanto, é possível observar que houve uma tendência de aumento dos valores médios obtidos no GE no momento final do estudo em relação ao momento inicial.

Tabela 18 – Valores médios da morfometria das fibras miocárdicas de coelhos com IC induzida pela epinefrina (GE) e saudáveis (GC) em T0 e T3. Hospital Veterinário/UENF, 2013.

Morfometria das fibras miocárdicas (μm)		
Médias	T0	T3
GE	21,35 \pm 5,15	23,64 \pm 4,17
GC	21,35 \pm 5,15	21,56 \pm 1,73

Média \pm Desvio Padrão.

Segundo Rona (1985), e Muders et al. (1999) este é um achado clássico e esperado, visto o conhecido efeito da epinefrina de induzir hipercontratilidade das fibras musculares cardíacas, através das suas ações inotrópicas e cronotrópicas bem estabelecidas.

Costa et al.(1997), avaliaram um modelo de hipertrofia ventricular esquerda induzida pelo isoproterenol em ratos, onde observaram, através da morfometria das células miocárdicas, um incremento significativo do volume dos cardiomiócitos, o que atribuíram a ação direta deste fármaco nos receptores β -adrenérgicos, além de seu estímulo na produção de renina e angiotensina II e de sua ação cronotrópica e

inotrópica positiva sobre o coração, ações estas também desempenhadas pela epinefrina (COHN, 1989; BERNE; LEVY, 1996; GUYTON; HALL, 2006).

Achados similares também foram relatados por Verkerk et al. (2011), em modelos de cardiomiopatia dilatada e isquêmica em coelhos, onde descreveram aumentos da largura e do comprimento das fibras miocárdicas em ambos os modelos estudados, obtendo em média 25 μm de largura das células cardíacas dos animais do grupo controle, 34 μm para os animais com cardiomiopatia isquêmica e 35 μm para os animais com cardiomiopatia dilatada, entretanto, conforme discutido no item anterior, este trabalho difere do atual em relação ao modelo experimental adotado, idade e peso dos animais empregados, o que pode justificar a diferença encontrada para esta variável.

É importante ressaltar que a literatura disponível é extremamente escassa em termos de informações a este respeito, sendo o valor de normalidade para os cardiomiócitos ventriculares de coelhos adultos e sadios descrito apenas por Noszczyk-Nowak et al. (2009), com um valor médio aproximado de 20,45 μm , bastante próximo àquele observado neste experimento para o grupo controle.

5. CONCLUSÕES

- O protocolo composto por duas infusões de epinefrina empregado para o desenvolvimento do modelo experimental resultou em cardiomiopatia com insuficiência diastólica;
- O modelo experimental mostrou-se eficiente para o desenvolvimento clínico e laboratorial da insuficiência cardíaca congestiva em coelhos, observando-se um alto índice de óbitos (52%);
- O modelo experimental desencadeou o aparecimento de diferentes arritmias cardíacas, incluindo arritmias fatais;
- O modelo experimental resultou em extensas lesões teciduais compatíveis com o processo insuficiência cardíaca congestiva decorrente de infusões de altas doses de catecolaminas;
- Os biomarcadores neuroendócrinos e funcionais cardíacos utilizados (Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial, Proteína C Reativa e Eletrocardiografia convencional) foram viáveis e eficientes para o diagnóstico e acompanhamento desta enfermidade;
- Mais estudos necessitam serem realizados utilizando-se deste modelo experimental, porém com avaliações seqüenciais em um menor intervalo de tempo, para melhor avaliação do comportamento dos biomarcadores em tela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARBANELL, A. M.; HERRMANN, J. L.; WEIL, B. R.; WANG, Y.; TAN, J.; MOBERLY, S. P.; FIEGE, J. W.; MELDRUM, D. R. Animal Models of Myocardial and Vascular Injury. **Journal of surgical research**, v. 6, n. 21, p. 1-11, 2009.

ABASSI, Z.; KARRAM, T.; ELLAHAM, S.; WINAVER, J.; HOFFMAN, A. Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 3, p. 223–241, 2004.

ABRAMS, W. B.; HARRIS, T. N. The effect of cortisone on the electrocardiograms of normal rabbits. **American Heart Journal**, n. 42, p. 876-883, 1951.

ACKERMANN, U. Structure and Function of Atrial Natriuretic Peptide. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 241-247, 1986.

ADAMS, J.E.; APPLE, F.; JAFFE, A.S. **Markers in cardiology. A case-oriented approach**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2007. 268p.

AMRAN, A.A.; ZAKARIA, Z.; OTHMAN, F.; DAS, S.; AL-MEKHLAFI, H.M.; NORDIN, N.M.M. Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and c-reactive protein following administration of aqueous extract of piper sarmentosum on experimental rabbits fed with cholesterol diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 10, p. 1-8, 2011.

ANVERSA, P.; RICCI, R.; OLIVETTI, G. Quantitative structural analyses of the myocardium during physiologic growth end induced cardiac hypertrophy: A review. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 7, n. 5, p. 1440-1449, 1986.

ATKINS, C.; BONAGURA, J.; ETTINGER, S.; FOX, P.; GORDON, S.; HAGGSTROM, J.; HAMLIN, R.; KEENE, B.; FUENTES, V.L.; STEPIEN, R. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1142-1150, 2009.

ATLAS, S. A.; LARAGH, J. H. Atrial Natriuretic Peptide: A New Factor in Hormonal Control of Blood Pressure and Electrolyte Homeostasis. **Annual Review of Medicine**, v. 37, p. 397-414, 1986.

ARMSTRONG, P. W. ; STOPPS, T. P. ; FORD, S. E. ; DE BOLD, A. J. Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1075-1084, 1986.

AKYÜZ, A.; ALPSOY, S.; AKKOYUN, D. Ç.; GÜLER, N. A new approach to the measurement of heart rate in patients with chronic heart failure-Heart rate performance index: an observational study. **Anadolu Kardiyol Dergisi**, v. 13, 2013.

BAUDIN, B.; BÉNÉTEAU-BURNAT, B.; VAUBOURDOLLE, M. Enzyme de conversion de l'angiotensine I dans le liquide céphalorachidien et neurosarcoïdose. **Annales de Biologie Clinique**, v. 63, n. 5, p. 475-480, 2005.

BARRETT, T. D. ; HENNAN, J. K. ; MARKS, R.,M. ; LUCCHESI, B. R. C-Reactive-Protein-Associated Increase in Myocardial Infarct Size After Ischemia/Reperfusion. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 3, p. 1007-1013, 2002.

BEARDOW, A. W. The Diagnostic and Therapeutic Approach to the Patient in Acute Congestive Heart Failure. **Clinical Techmques in Small Animal Practice**, v. 15, n. 2, p. 70-75, 2000.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. 988 p.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M.P.; DEEBLE, D.J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 391-405, 1992.

BISOENDIAL, R. J.; KASTELEIN, J. J. P.; STROES, E. S. G. C-reactive protein and atherogenesis: From fatty streak to clinical event. **Atherosclerosis**, n. 195, p. e10–e18, 2007.

BLACK, S.; AGRAWAL, A.; SAMOLS, D. The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct. **Molecular Immunology**, n. 39, p. 1045–1054, 2003.

BOCCHI, E.A.; MARCONDES-BRAGA, F.G.; AYUB-FERREIRA, S.M.; ROHDE, L.E.; OLIVEIRA, W.A.; ALMEIDA, D.R.; et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, n. 1, supl. 1, p. 1-71, 2009.

BOCCHI, E.A.; MARCONDES-BRAGA, F.G.; BACAL, F.; FERRAZ, A.S.; ALBUQUERQUE, D.; RODRIGUES, D.; et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica – 2012, Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 98, n. 1, supl., 1, p. 1-33, 2012.

BOTONI, F. A. **Efeitos da inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do betabloqueio com carvedilol na cardiopatia chagásica crônica.** (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2006. 169p.

BREGAGNOLLO, E. A.; MESTRINEL, M. A.; OKOSHI, K.; CARVALHO, F. C.; BREGAGNOLLO, I. F.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. Papel Relativo da Remodelação Geométrica do Ventrículo Esquerdo, Morfológica e Funcional do Miocárdio na Transição da Hipertrofia Compensada para a Falência Cardíaca em Ratos com Estenose Aórtica Supravalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 2, p. 225-233, 2007.

BROWN, W. H.; PEARCE, L.; VAN ALLEN, C. M. Organ weights of normal rabbits. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 42, n. 1, p. 69–82, 1925.

CAETANO, E. R. S. P.; PRAXEDES, J. N. Lesão renal na hipertensão essencial. **HiperAtivo**, v. 5, n. 4, p. 234-241, 1998.

CAIDE, X.; LIU, Z.; GAO, K.; ZHOU, Q.; SUI, S-F. Specific interaction of rabbit C-reactive protein with phospholipid membranes. **Thin Solid Films**, v. 284-285, p. 793-796, 1996.

CAMPBELL, W. G.; DONOHUE, J. A.; DUKET, L. H. The Capacity to Develop Hypertension-Associated Arterial Disease. **American Journal of Pathology**, v. 93, p. 383-404, 1978.

CARR, S. C.; FARB, A.; PEARCE, W. H.; VIRMANI, R.; YAO, J. S. Activated inflammatory cells are associated with plaque rupture in carotid artery stenosis. **Surgery**, v. 122, n.4, p. 757–764, 1997.

CASTRO, F. D.; CHAVES, P. C.; LEITE-MOREIRA, A.F. Síndrome cardiorenal e suas implicações fisiopatológicas. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 29, n. 10, p. 1535-1554, 2010.

CERÓN, J. J; ECKERSALL, P. D; MARTINEZ-ZUBIELA, S. Acute-phase Proteins in dogs in cats: current knowledge and future perspective. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CÉSAR, L. A. M. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e doenças isquêmicas. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 255-260, 2000.

CHEN, Y.; LIU, W.; LI, W.; GAO, C. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 20, n. 20, 2009.

CHENG, C. P. K.; CHENG, K. K.; WANG, J. C. C. Adrenaline-induced acute massive pulmonary oedema in the dog. **British Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 728-730, 1973.

CHO, K. W.; LEE, S. J.; WEN, J. F.; KIM, S. H.; SEUL, K. H.; LEE, H. S. Mechanical control of extracellular space in rabbit atria: an intimate modulator of the translocation of extracellular fluid and released atrial natriuretic peptide. **Experimental Physiology**, v. 87, n. 2, 185-194, 2002.

CHORRO, F. J.; BELENGUER, L. S.; MERINO, V. L. Medicina cardiovascular traslacional. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. **Revista Espanhola de Cardiologia**, v. 62, n. 1, p. 69-84, 2009.

CHRISTIANSEN, S.; AUTSCHBACH, R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 30, p. 611-616, 2006.

CIMINI, C. M.; WEISS, H. R. Hypertension-induced cardiac hypertrophy. Oxygen supply and consumption with pacing. **Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 35-42, 1990.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E-V.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 293-316, 1996.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E-M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 293-316, 1996.

COHN, J. N. The sympathetic nervous system in heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.14, n. 57, p. 57-61, 1989.

COHN, J. N. Structural basis for heart failure: Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. **Circulation**, v.91 p. 2504-2507, 1995.

COSTA, E. A. S.; LUNA, B.; PÓVOA, R.; FERREIRA, C.; MURAD, N.; FERREIRA, M.; FERREIRA, C. Enalaprilato na Prevenção da Hipertrofia Ventricular Esquerda Induzida pelo Isoproterenol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 1, p. 35-39, 1997.

COSTA, K. N.; CARVALHO, W. B.; KOPELMAN, B. I.; DIDIO, R. Dosagem do fator natriurético atrial em pacientes pediátricos submetidos à ventilação pulmonar mecânica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 320-324, 2000.

COWIE, M.R.; DAVIDSON, L. Clinical perspective: the importance of heart rate reduction in heart failure. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, n. 8, p. 728–730, 2012.

CROZIER, I. G.; IKRAM, H.; NICHOLLS, M. G.; ESPINER, E. A.; YANDLE T, G. Atrial natriuretic peptide in spontaneous tachycardias. **British Heart Journal**, v. 58. n. 2, p. 96-100, 1987.

DANESH, J.; PEPYS, M. B. C-Reactive Protein and Coronary Disease Is There a Causal Link? **Circulation**, v. 120, p. 2036-2039, 2009.

DANIELS, L. B. MAISEL, A. S. Natriuretic Peptides. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 25, p. 2357-2368, 2007.

DARKE, P.; BONAGURA, J. D.; KELLY, D. F. **Atlas ilustrado de cardiologia veterinária**. São Paulo: Editora Manole, 2000. 186p.

DE BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B. ; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, p. 89-94, 1981.

DIETZ, J. R. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. **Cardiovascular Research** , v. 68, p. 8–17, 2005.

DiPALMA, J. R.; MASCATELLO, A. V. Analysis of the actions of acetylcholine, atropine, epinephrine and quinidine on heart muscle of the cat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 101, n. 3, p. 243-248, 1951.

DOWNING, S.E.; CHEN. V. Myocardial Injury Following Endogenous Catecholamine Release in Rabbits. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 4, p. 377-387, 1985.

D'SOUZA, S. P; DAVIS, M.; BAXTER, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacology & Therapeutics**, v.101, p. 113-129, 2004.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária de pequenos animais** – Moléstias do cão e do gato. São Paulo: Manole, 1997. 3020p.

FAISTAUER , M.; FAISTAUER , A.; GROSSI, R.S.; ROITHMANN, R. Desfecho clínico de pacientes tratados por epistaxe com tamponamento nasal após a alta hospitalar. **Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology**, v. 75, n.6, p. 857-65, 2009.

FARIA, T. O.; BALDO, M. P.; SIMÕES, M. R.; PEREIRA, R. B.; MILL, J. G.; VASSALLO, D. V.; STEFANON, I. Body Weight Loss After Myocardial Infarction in Rats as a Marker of Early Heart Failure Development. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 4, p. 274-280, 2011.

FEITOSA, G. S.; CARVALHO, E. N. Sistema renina-angiotensina e insuficiência cardíaca: o uso dos antagonistas do receptor da angiotensina II. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 250-254, 2000.

FERREIRA, F. S.; SILVEIRA, L. L.; COSTA, A. C.; FREITAS, M. V.; MACHADO, J. A.; CARVALHO, C. B.; OLIVEIRA, A. L. A. Estudo do comportamento de variáveis hemodinâmicas (frequência cardíaca, pressão arterial média e temperatura corporal) e bioquímicas séricas (glicose e lactato desidrogenase total) em cães submetidos a oxigenação extracorpórea por membrana (ECMO). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, n. 581-582, p. 33-42, 2012.

FLECKNELL, P. A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **Brazilian Journal Anaesthesiology**, v.71, p. 885-894, 1993.

FONSECA, N. M.; GOLDENBERG, S.; GOMES, P. O.; DE PAULA LIMA, C. A. Anestesia em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 82-104, 1996.
FOX, P. R.; SISSON, D.; MOÏSE, N. S. **Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. 955 p.

FRANÇOIS, L. M. G.; KALIL, R. A. K.; PEREIRA, J. B.; SANT'ANNA, J. R. M.; NESRALLA, I. A. Relação das pressões atriais com o peptídeo natriurético atrial e

seus efeitos na diurese e natriurese durante operação cardíaca com circulação extracorpórea. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 17, n. 3, p. 258-265, 2002.

FREDERICKS, S.; MERTON, G.K.; LERENA, M.J.; HEINING, P.; CARTER, N.D.; HOLT, D.W. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. **Clinica Chimica Acta**, v. 304, p. 65–74, 2001.

FRIPP, R.R.; LEE, J.C.; DOWNING, S.E. Inotropic responsiveness of the heart in catecholamine cardiomyopathy. **American Heart Journal**, v. 101, n. 1, p. 17–21, 1981.

FYHRQUIST, F.; TIKKANEN, I. Atrial Natriuretic Peptide in Congestive Heart Failure. **American Journal of Cardiology**, v. 62, p. 20A-24A, 1988.

GAO, X.Q.; LI, H.W.; LING, X.; QIU, Y.H.; GAO, Y.G; ZHANG, Y. Effect of rosiglitazone on rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 3, p. 228-231, 2013.

GURLEK, A.; EROL, C.; BASESME, E. Antiarrhythmic effect of converting enzyme inhibitors in congestive heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 43, n. 3, p. 315-318, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. 1150p.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México-DF: McGraw-Hill, 1996. 1436p.

HATAKEYAMA, S.; SHIGEI, T. Comparative study of the fine-structural changes of alveolar wall in adrenaline- and anti-pulmonary edema of the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 279-280, 1968.

HIMMS-HAGEN, J. Sympathetic regulation of metabolism. **Pharmacological Reviews**, v. 19, n. 3, p. 367-461, 1967.

HORI, M.; OKAMOTO, H. Heart rate as a target of treatment of chronic heart failure. **Journal of Cardiology**, v. 60, n. 2, p. 86–90, 2012.

HOSHIDA, S.; NISHIDA, M.; YAMASHITA, N.; IGARASHI, J.; AOKI, K.; HORI, M.; et al. Vascular angiotensin-converting enzyme activity in cholesterol-fed rabbits: effects of enalapril. **Atherosclerosis**, v. 130, n. 1-2, p. 53–59, 1997.

HU, X-B.; ZHANG, P-F.; SU, H-J.; YI, X.; CHEN, L.; RONG, Y. Y.; et al. Intravascular ultrasound area strain imaging used to characterize tissue components and assess vulnerability of atherosclerotic plaques in a rabbit model. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 37, n. 10, p. 1579-1587, 2011.

HUANG, G.; WANG, A.; LI, X.; LONG, M.; DU, Z.; HU, C.; et al. Change in high-sensitive C-reactive protein during abdominal aortic aneurysm formation. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 9, p. 1829-1837, 2009.

ISHIKAWA, N.; HAGINO, Y.; SHIGEI, T. Incidence of epinephrine-induced pulmonary Edema in rabbits and accompanying Metabolic changes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 681-686, 1975.

JEPSON, L. **Clínica de animais exóticos: referência rápida**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 592p.

JIANG, J.P.; DOWNING, E. Catecholamine Cardiomyopathy: Review and Analysis of Pathogenetic Mechanisms. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.63, n. 6, p. 581-91, 1990.

JIN, B.; LUO, X.P.; NI, H.C.; LI, Y.; SHI, H.M. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits. **Molecular Biology Reports**, v. 20, n. 20, 2009.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1424 p.

KALLARAS, K.; BABAS, G.; STERGIU-MICHAILIDOU, V.; KARAMOUZIS, M.; ZARABOUKAS, T. Atrial natriuretic peptide decreases aorta stiffness in cholesterol-fed anesthetized rabbits. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 4, p. 324–331, 2009.

KANIA, G.; BLYSZCZUK, P.; ERIKSSON, U. Mechanisms of Cardiac Fibrosis in Inflammatory Heart Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 247–252, 2009.

KOENIG, W.; SUND, M.; FRÖHLICH, M.; FISCHER, H.; LÖWEL, H.; DÖRING, A.; et al. C-Reactive Protein, a Sensitive Marker of Inflammation, Predicts Future Risk of Coronary Heart Disease in Initially Healthy Middle-Aged Men : Results From the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. **Circulation**, v. 99, n. 2, p. 237-242, 1999.

KUSHNER, I.; KAPLAN, M. H. Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 114, p. 961–974 1961.

LAMBERT, D. W.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme²and newinsights intotherenin–angiotensin system. **Biochemical Pharmacology**, n. 75, p. 781–786, 2008.

LAZO, J.S., CATRAVAS, J.D. & GILLIS, C.N. Reduction in rabbit serum and pulmonary angiotensin converting enzyme activity after subacute bleomycin treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, n. 18, p. 2577-2584, 1981.

LAZO, J.S., CATRAVAS, J.D., DOBULER, K.J. & GILLIS, C.N. Prolonged Reduction in Serum Angiotensin Converting Enzyme Activity after Treatment of Rabbits with Bleomycin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 69, n. 2, 276-282, 1983.

LEVINE, H. D. Spontaneous changes in the normal rabbit electrocardiogram. **American Heart Journal**, n. 24, p. 209-214, 1942.

LOPEZ-JIMENEZ, F.; WU, C.O.; TIAN, X.; O’CONNOR, C.; RICH, M. W.; BURG, M. M.; et al. Weight change after myocardial infarction—the enhancing recovery in coronary heart disease patients (ENRICHD) experience. **American Heart Journal**, v. 155, n. 3, p. 478-484, 2008.

LORD, B.; BOSWOOD, A.; PETRIE, A. Electrocardiography of the normal domestic pet rabbit. **Veterinary Record**, v. 167, n. 25, p. 961-965, 2010.

LORD, B.; DEVINE, C.; SMITH, S. Congestive heart failure in two pet Rabbits. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 1, p. 46–50, 2011.

LORELL, B.H.; GROSSMAN, W. Cardiac Hypertrophy: The Consequences for Diastole. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 9, n. 5, p. 1189-1193, 1987.

LORENTE, J.A.; VILLANUEVA, E.; HERNÁNDEZ-CUETO, C.; LUNA, J.D. Plasmatic Levels of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in Drowning. A Pilot Study. **Forensic Science International**, v. 44, n. 1, p. 69-75, 1990.

LUCHNER, A.; MUDERS F.; DIETL, O.; FRIEDRICH, E.; BLUMBERG, F.; et al. Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction. **Cardiovascular Research**, v. 51, n. 3, p. 601–607, 2001.

MAASS, A.; LEINWAND, L. A. Animal models of hypertrophic cardiomyopathy. **Current Opinion Cardiology**, v. 15, p. 189-196, 2000.

MALLACH, J. F.; MARQUARDT, G. H.; WERCH, S. C. The effect of trichloroethylene on the human, canine, and rabbit electrocardiogram. **American Heart Journal**, v. 26, n. 377, p. 377-384, 1942.

MATA-BALAGUER, T.; HERRÁN, R.; RUIZ-REJÓ, C.; RUIZ-REIÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; RUIZ-REIÓN, F. Angiotensin-converting enzyme and p22 phox polymorphisms and the risk of coronary heart disease in a low-risk Spanish population. **International Journal of Cardiology**, n. 95. p. 145–151, 2004.

MILL, J. G.; MILANEZ, M. Z.; BUSATTO, V. C. W.; MORAES, A. C.; GOMES, M. G. S. Ativação da Enzima Conversora de Angiotensina no Coração após Infarto do Miocárdio e suas Repercussões no Remodelamento Ventricular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 2, p. 101-110, 1997.

MIRANDA, P. A. C. **Efeito do tratamento crônico com enalapril sobre a concentração de glicose, insulina e lipídios do plasma de ratos submetidos ao estresse neurocitoglicopênico**. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2006. 70p.

MOE, G. W.; STOPPS, T. P.; ANGUS, C.; FORSTER, C.; DE BOLD, A. J.; ARMSTRONG, P. W. Alterations in Serum Sodium in Relation to Atrial Natriuretic Factor and Other Neuroendocrine Variables in Experimental Pacing-Induced Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 13, n. 1, p. 173-179, 1989.

MORAN, N. C. Adrenergic Receptors Within the Cardiovascular System. **Circulation**, v. 28, p. 987-993, 1963.

MUCHA, C. J.; BELERENIAN, G. **Manual de cardiologia veterinaria**. Conceptos aplicables al día a día. Buenos Aires: Holliday-Scott S.A., 2008. 113p.

MUDERS, F.; FRIEDRICH, E.; LUCHNER, A.; PFEIFER, M.; ICKENSTEIN, G.; HAMELBECK, B.; RIEGGER, G. A. J.; ELSNER, D. Hemodynamic Changes and Neurohumoral Regulation During Development of Congestive Heart Failure in a Model of Epinephrine-Induced Cardiomyopathy in Conscious Rabbits. **Journal of Cardiac Failure**, v. 5, n. 2, p. 109-115, 1999.

MUDERS, F.; ELSNER, D. Animal Models of Chronic Heart Failure. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 6, p. 605-612, 2000.

NAGAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; SUZUKI, M.; WAINAI, Y.; ANZAI, T.; HANDA, S. Abnormal b-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. **Japanese Circulation Journal**, v. 61, p. 249-255, 1997.

NAP, A.; BELTERMAN, C. N. W.; MATHY, M. J.; BALT, J. C.; PFAFFENDORF, M.; van ZWIETEN, P. A. Impaired neuronal and vascular responses to angiotensin II in a rabbit congestive heart failure model. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 4, n. 4, p. 220-227, 2003.

NETO, L. B. S.; CLAUSELL, N. BNP: do Laboratório à Beira do Leito. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 3, p. 1-4, 2004

NIU, T.; CHEN, X.; XU, X. Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism and Cardiovascular Disease. **Drugs**, v. 62, n. 7, p. 977-993, 2002.

NOSZCZYK-NOWAK, A.; NICPOŃ, J.; NOWAK, M.; SLAWUTA, P. Preliminary reference values for electrocardiography, echocardiography and myocardial morphometry in the European brown hare (*Lepus europaeus*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 6, p. 1-6, 2009.

OMLAND, T.; HAGVE, T. A.; Natriuretic Peptides: Physiologic and Analytic Considerations. **Heart Failure Clinics**, v. 5, p. 471-487, 2009.

PACKER, M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. **Circulation**, v. 77, n. 4, p. 721-730, 1988.

PALATINI, P. Role of Elevated Heart Rate in the Development of Cardiovascular Disease in hypertension. **Hypertension**, v. 58, n. 5, p. 745-750, 2011.

PARIAUT, R. Cardiovascular Physiology and Diseases of the Rabbit. **Veterinary Clinics of Exotic Animals**, v. 12, p. 135-144, 2009.

PATEL, A. J.; RAMAKRISHNAN, C. V. Studies on avian and mammalian heart tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 28, p. 803-815, 1969.

PEREIRA, P. M.; CAMACHO, A. A.; MORAIS, H. A. Tratamento de insuficiência cardíaca com benazepril em cães com cardiomiopatia dilatada e endocardiose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 2, p.141-148, 2005.

PETRONIANU, A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 157-164, 1996.

POGWIZD, S. M.; BERS, D. M. Rabbit models of heart disease. Drug Discovery Today: Disease models. **Cardiovascular disease models**, v. 5, n. 3, p. 185-193, 2008.

PRASAD, K. C-Reactive Protein (CRP)-Lowering Agents. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 24, n. 1, p. 33–50, 2006.

QUESENBERRY, K. E.; CARPENTER, J. W. **Ferrets, Rabbits, and Rodents. Clinical Medicine and Surgery**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. 444p.

RANKIN, A.J.; COURNEYA, C.A.; WILSON, N.; LEDSOME, J.R. Tachycardia releases atrial natriuretic peptide in the anesthetized rabbit. **Life Sciences**, v. 38, n. 21, p. 1951-1957, 1986.

RAWLINS, J.; BHAN, A.; SHARMA, S. Left ventricular hypertrophy in athletes. **European Journal of Echocardiography**, v. 10, n. 3, p. 350–356, 2009.

REYNOLDS, C.; OYAMA, M. Biomarkers in the diagnosis of canine heart disease. **Veterinary Focus**, v. 18, n. 3, p. 1-5, 2008.

RIBEIRO, J. C. G. **Biomarcadores cardíacos em medicina veterinária – Utilidade do NT-proBNP na detecção de cardiomiopatia hipertrófica felina**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, 2010. 141p.

RONA, G. Catecholamine Cardiotoxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 4, p. 291-306, 1985.

ROY, D.; PAILLARD, F.; CASSIDY, D.; BOURASSA, D.; GUTKOWSKA J.; GENEST, J.; CANTIN, M. Atrial Natriuretic Factor During Atrial Fibrillation and Supraventricular Tachycardia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 9, n. 3, p. 509-14, 1987.

SAGNELLA, G.A. Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 5, p. 519–529, 1998.

SAMPATH, P. D.; VIJAYARAGAVAN, K. Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against b-adrenergic catecholamine-induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF-a and COX-2 expressions in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 357-364, 2008.

SAMUELSON, DON A. **Tratado de Histologia Veterinária**. Samuelson, Don A. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527p.

SANO, T.; TANAKA, A.; NAMBA, M.; NISHIBORI, Y.; NISHIDA, Y.; KAWARABAYASHI, T.; et al. C-Reactive Protein and Lesion Morphology in Patients With Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 108, n. 3, p. 282-285, 2003.

SANTOS JÚNIOR, E. R.; MELO, E. N.; WISCHRAL, A. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca e o uso do maleato de enalapril em cães. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2007.

SEIXAS-CAMBÃO, M.; LEITE MOREIRA, A. F. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca Crônica. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 28, n. 4, p. 439:471, 2009.

SILVA, A. C. S.; PINHEIRO, S. V. B.; SANTOS, R. A. S. Peptídeos e interação coração-rim. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 3, p. 134-143, 2008.

SIMON, H. B.; LAING, K. S.; FOLEY, H.; et al. Exercise, C-reactive protein, and your heart. **Harvard Men's Health Watch**, v. 9, n. 12, p. 1-4, 2005.

SINGH, V.; MARTINEZCLARK, P.; PASCUAL, M.; SHAW, E.S.; O'NEILL, W.W. Cardiac biomarkers – the old and the new: a review. **Coronary Artery Disease**, v. 21, n. 4, p. 244-256, 2010.

SISSON, D. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, p. 1105–1126, 2004.

STEVENS, T.L.; BURNETT, J.C.; KINOSHITA, M.; MATSUDA, Y.; REDFIELD, M.M. A Functional Role for Endogenous Atrial Natriuretic Peptide in a Canine Model of Early Left Ventricular Dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 1101-1108, 1995.

STUDDY, P.R.; LAPWORTH, R.; BIRD, R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance a review. **Journal of Clinical Pathology**, 36, n. 8, p. 938-947, 1983.

SUN, H.; KOIKE, T.; ICHIKAWA, T.; HATAKEYAMA, K.; SHIOMI, M.; ZHANG, B.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; WATANABE, T.; ASADA, Y.; CHEN, Y.E.; FAN, J. C-Reactive Protein in Atherosclerotic Lesions Its Origin and Pathophysiological Significance. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 4, p. 1139-1148, 2005.

SZABUNIEWICZ, M.; HIGHTOWER, D.; KYZAR, J.R. The Electrocardiogram, Vectorcardiogram and Spatiocardiogram in the Rabbit. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 35, n. 2, p. 107-114, 1971.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H.; MUKOYAMA, M.; SAITO, Y.; NAKAO, K.; KAWAMURA, A.; ISHIDA, M.; et al. Expression and Distribution of Atrial Natriuretic Peptide in Human Hypertrophic Ventricle of Hypertensive Hearts and Hearts With Hypertrophic Cardiomyopathy. **Circulation**, v. 83, n. 1, p. 181-190, 1991.

TAO, Z.; CHAN-QING, G.; LI-BING, L. Establishment of a rabbit model of congestive heart failure. **Journal of Central South Medicine University**, v. 30, n. 8, p. 1946-1949, 2010.

TILLEY, L. P. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 470p.

TILLEY, L. P.; GOODWIN, J. K. **Manual de Cardiologia para Cães e Gatos**. São Paulo: Editora Roca, 2002. 489p.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. J.; OYAMA, M. A.; SLEEPER, M. M. **Manual of Canine and Feline Cardiology**. 4.ed. St. Louis: Saunders, 2008. 441p.

TOYODA, Y.; OKADA, M.; KASHEM, M.A. A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 115, n. 6, p. 1367-1373, 1998.

TODD, G.L.; BAROLDI, G.; PIEPER, G.M.; CLAYTON, F.C.; ELIOTT, R.S. Experimental Catecholamine-Induced Myocardial Necrosis. II. Temporal Development of Isoproterenol-Induced Contraction Band Lesions Correlated with

ECG, Hemodynamic and Biochemical Changes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 7, p. 647-656, 1985.

TODD, G.P.; CHADWICK, I.G.; HIGGINS, K.S.; YEO, W.W.; JACKSON, P.R.; RAMSAY, L.E. Relation between changes in blood pressure and serum ACE activity after a single dose of enalapril and ACE genotype in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 131-134, 1995.

UZUELLI, J.A. **Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteínas 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães.** Tese (Mestrado em Farmacologia). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo (USP), 2008. 78p.

VALVERDE, J.; MARTINEZ-RODENAS, F.; PEREIRA, J. A.; CARULLA, X.; JIMENEZ, W.; GUBERN, J. M.; SITGES-SERRA, A. Rapid Increase in Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide After Common Bile Duct Ligation in the Rabbit. **Annals of Surgery**, v. 216, n. 5, p. 554-559, 1992.

VAN VLEET, J. F.; REBAR, A. H.; FERRANS, V. J. Acute cobalt and isoproterenol cardiotoxicity in swine: Protection by selenium-vitamin E supplementation and potentiation by stress-susceptible phenotype. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 991-1002, 1977.

VERKERK, A. O.; BAARTSCHEER, A.; GROOT, J. R.; WILDERS, R.; CORONEL, R. Etiology-dependency of ionic remodeling in cardiomyopathic rabbits. **International Journal of Cardiology**, v. 148, p. 154-160, 2011.

VIANA, F. A. B. **Guia Terapêutico Veterinário**. 2.ed. Lagoa Santa: Gráfica e Editora CEM, 2007. 444 p.

VIKSTROM, K. L.; BOHLMAYER, T.; FACTOR, S. M.; LEINWAND, L. A. Hypertrophy, Pathology, and Molecular Markers of Cardiac Pathogenesis. **Circulation**, v. 82, n. 7, p. 773-778, 1998.

VILLACORTA JUNIOR, H.; MESQUITA, E. T. Aplicações Clínicas do Peptídeo Natriurético do Tipo B. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 4, p. 251-255, 2006.

VILLACORTA, H.; MASETTO, A. C.; MESQUITA, E. T. Proteína C-Reativa: Marcador Inflamatório com Valor Prognóstico em Pacientes com Insuficiência

Cardíaca Descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 5, p. 585-589, 2007.

VILARINHO, K. A. S. **Desenvolvimento de modelo experimental de insuficiência cardíaca em coelhos**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2008. 132p.

VILARINHO, K. A. S.; PETRUCCI, O.; BAKER, R. S.; VASSALLO, J.; SCHENKA, A. A.; DUFFYC, J. Y. ; OLIVEIRA, P. P. M.; VIEIRA, R. W. Early changes in contractility indices and fibrosis in two minimally invasive congestive heart failure models. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 37, p. 368-375, 2010.

VINK, S.; JIN, A. H.; POTH, K. J.; HEAD, G. A.; ALEWOOD, P. F. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon**, v. 59, p. 434-445, 2012.

VLEET, J.F.V.; FERRANS, V.J. Myocardial Diseases of Animals. **American Journal of Pathology**, v. 124, n. 1, p. 98-178, 1986.

VON HAFE, A. **Novos biomarcadores na Insuficiência Cardíaca**. Porto: Editora Universidade do Porto, 2011. 12p.

WAINAI, Y.; KUSUHARA, M.; YAMADA, T.; YOSHIKAWA, T.; SUZUKI, M.; HORI, S.; et al. Atrial Natriuretic Peptide Secretion in Rabbits with Aortic Regurgitation. **Research in Experimental Medicine**, v. 190, n. 1, p. 13-18, 1990.

WEBER, K. T. Aldosterone in congestive heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 245, p. 1689-1697, 2001.

WEN, J. F.; CUI, X.; AHN, J. S.; KIM, S. H.; SEUL, K. H. ; KIM, S. Z.; et al. Distinct roles for L- and T-type Ca²⁺ channels in regulation of atrial ANP release. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, p. 2879–2888, 2000.

WILKES, T.E.; IMRIE, S.T.; BRUNSON, J.G. Eeffects of epinephrine on newborn rabbits. **The American Journal of Pathology**, v. 43, n. 5, p. 825–836, 1963.

WOLF, R.; CAMACHO, A. A.; SOUZA, R. C. A. Eletrocardiografia computadorizada em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, 2000.

WORTHEN, M.; ARGANO, B.; SIWADLOWSKIM, W.; BRUCE, D. W.; MACCANON, D. M.; LUISADA, A. A. Epinephrine-Induced Pulmonary Edema in Crosscirculated Animals. **Japanese Heart Journal**, v. 10, n. 2, p. 142-148, 1969a.

WORTHEN, M.; PLACIK, B.; ARGANO, B.; MACCANON, D. M.; LUISADA, A. A. On the Mechanism of Epinephrine-Induced Pulmonary Edema. **Japanese Heart Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-141, 1969b.

YANG, F. Simulation of electrocardiographic manifestation of healed infarctions using a 3D realistic rabbit ventricular model. *International Journal of Cardiology*, v. 152, n. 1, p. 121-123, 2011.

YEGIN, E.; AKCAY, F.; YIGITOGU, M. R.; CELIK, I.; SUZEK, H.; ODABASIOGLU, F. Plasma Atrial Natriuretic Peptide Levels in Rabbits with Alloxan Monohydrate induced Diabetes Mellitus. **Japanese Heart Journal**, v. 36, n. 6, p. 789-795, 1995.

ZAMANI, P.; GANZ, P.; LIBBY, P.; SUTRADHAR, S.C.; RIFAI, N.; NICHOLLS, S.J.; NISSEN, S.E.; KINLAY, S. Relationship of antihypertensive treatment to plasma markers of vascular inflammation and remodeling in the Comparison of Amlodipine versus Enalapril to Limit Occurrences of Thrombosis study. **American Heart Journal**, v. 163, n. 4, p. 735-40, 2012.

ZAYERZADEH, E.; KOOHI, M. K.; MIRAKABADI, A. Z.; FARDIPOOR, A.; KASSAIAN, S. E.; RABBANI, S.; ANVARI, M. S. Amelioration of cardio-respiratory perturbations following Mesobuthus eupeus envenomation in anesthetized rabbits with commercial polyvalent F(ab')₂ antivenom. **Toxicon**, v. 59, p. 249–256, 2012.

ZHANG, T.; GAO, C.; LI, L.; Establishment of a rabbit model of congestive heart failure. **Journal of Central South University**, v. 30, n. 8, p. 1946-1949, 2010.

ZIMERMAN, L. I.; LIBERMAN, A. Tratamento de Arritmias Ventriculares em Pacientes com Insuficiência Cardíaca. **Reblampa**, v. 13, n. 4, p. 219-224, 2000.

ZUCKER, I. H.; EARLE, A. M.; GILMORE, J. P. The Mechanism of Adaptation of Left Atrial Stretch Receptors in Dogs with Chronic Congestive Heart Failure. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 60, p. 323-331, 1977.