

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FELIPP DA SILVEIRA FERREIRA

**EFEITOS DO PIMOBENDAN E DO ENALAPRIL ASSOCIADO À
ESPIRONOLACTONA SOBRE MARCADORES NEUROENDÓCRINOS E
FUNCIONAIS MIOCÁRDICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
MIOCARDIOPATIA CATECOLAMINÉRGICA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

ABRIL/2013

FELIPP DA SILVEIRA FERREIRA

**EFEITOS DO PIMOBENDAN E DO ENALAPRIL ASSOCIADO À
ESPIRONOLACTONA SOBRE MARCADORES NEUROENDÓCRINOS E
FUNCIONAIS MIOCÁRDICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
MIOCARDIOPATIA CATECOLAMINÉRGICA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Sanidade animal.

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
ABRIL/2013**

FELIPP DA SILVEIRA FERREIRA

**EFEITOS DO PIMOBENDAN E DO ENALAPRIL ASSOCIADO À
ESPIRONOLACTONA SOBRE MARCADORES NEUROENDÓCRINOS E
FUNCIONAIS MIOCÁRDICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
MIOCARDIOPATIA CATECOLAMINÉRGICA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Sanidade animal.

Aprovada em 23 de abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tatiana Champion (Doutora, Medicina Veterinária) - UVV

Profa. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho (Doutora, Medicina Veterinária) – UFG

Prof. André Lacerda de Abreu Oliveira (Doutor, Medicina) - UENF

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

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

Ao

Meu Avô, Djalma Silveira (In Memoriam), que sempre me incentivou durante o período em que esteve presente nesta caminhada. Hoje seu incentivo transcende o plano material.

A

Todos aqueles que acreditaram e contribuíram para transformar este sonho em realidade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, por todo carinho, incentivo e gestos de encorajamento por toda esta caminhada;

Aos animais utilizados nesta pesquisa, que, sem opção, cederam suas vidas em benefício da ciência;

Ao “mestre” e orientador Claudio Baptista de Carvalho, pela orientação, ensinamentos e confiança no meu trabalho; Ao amigo Claudio Baptista de Carvalho, pelos exemplos de hombridade, serenidade e paciência;

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

Ao Prof. André Lacerda, pela confiança no meu trabalho e pelas oportunidades profissionais;

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

Ao amigo e “mestre” Carlos Mucha, pelas dicas, ensinamentos e amizade durante todos esses anos;

A Arianne Fabres, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e companheirismo durante estes últimos anos em que estamos juntos; A ela também o meu agradecimento pelo auxílio técnico durante a execução dos ensaios de ELISA;

A amiga e “orientada” Flavia Lopes Barreto, pela amizade, dedicação e exemplos de simplicidade, além da minha gratidão por embarcar incondicionalmente na aventura deste projeto;

Ao Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da UENF pela cessão do espaço físico e equipamentos imprescindíveis para desenvolvimento desta pesquisa;

Ao amigo José Antônio de Azevedo Pereira (“Zé Careca”), pela amizade, companheirismo, aconselhamentos e oportunidades;

Aos amigos Luiz Antônio Eckhardt de Pontes e Melissa Paes Petrucci, pela amizade e dicas com meus coelhos durante esta pesquisa;

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

Aos professores da banca examinadora, pela atenção dispensada e pela oportunidade de poder aprender um pouco mais com suas experiências profissionais, a fim de deixar suas valiosas contribuições científicas neste trabalho;

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 doutorado 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;

E a todos aqueles que contribuíram, à sua maneira, para a realização deste projeto,

Meu eterno agradecimento!

EPIGRAFE

“Acreditar na medicina seria a suprema loucura se não acreditar nela não fosse uma maior ainda, pois desse acumular de erros, com o tempo, resultaram algumas verdades.”

Marcel Proust

“Até onde vai o limite do ser humano, somos humanos. Depois disso, somos Médicos Veterinários”

Marcell Hideki

RESUMO

FERREIRA, Felipp da Silveira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2013. Efeitos do pimobendan e do enalapril associado à espironolactona sobre marcadores neuroendócrinos e funcionais miocárdicos em modelo experimental de miocardiopatia catecolaminérgica em coelhos (*oryctolagus cuniculus*). Orientador: Prof. Dr. Claudio Baptista de Carvalho. Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira.

A Insuficiência Cardíaca é uma síndrome clínica associada à redução da capacidade funcional do coração, via final da maioria das doenças cardiovasculares. Sua fisiopatogenia envolve a ativação de mecanismos adaptativos compensatórios, como o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistemas peptidérgicos. O modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina é um dos diversos modelos utilizados para melhor compreensão da insuficiência cardíaca e destes mecanismos envolvidos, sendo essencial em estudos diagnósticos envolvendo o desenvolvimento de biomarcadores e ensaios terapêuticos. Assim, esta pesquisa objetivou uma avaliação terapêutica dos efeitos do pimobendan e do Enalapril associado à espironolactona sobre marcadores neuroendócrinos e funcionais miocárdicos (avaliação clínica, histopatológica, mensuração dos biomarcadores Enzima Conversora de Angiotensina, Peptídeo Natriurético Atrial, Proteína C Reativa e Eletrocardiografia convencional) em modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida em coelhos. Para tal, foram utilizados 38 coelhos Nova Zelândia branco, adultos, sem restrição de sexo, pesando $2,0 \pm 0,25$ kg. O modelo experimental de insuficiência cardíaca utilizado caracterizou-se por duas infusões de adrenalina, em intervalos de 16 dias, em um total de 29 animais, caracterizando o G1. Nove animais sadios receberam solução fisiológica e permaneceram durante todo o experimento como grupo controle. Após a fase de indução, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos distintos para o controle farmacológico da insuficiência cardíaca congestiva (G2: Enalapril associado à Espironolactona, PO, SID, n=5; G3: Pimobendan, PO, SID, n=5; G4: Cloreto de Sódio, PO, SID, n=4). As avaliações funcionais e neuroendócrinas foram realizadas em intervalos de 48 horas durante a fase de tratamento, durante 15 dias. Ao fim deste período os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação histopatológica. Os resultados foram analisados

estatisticamente através do teste de GLM, regressão linear e correlação de Pearson. Os resultados apontam que o protocolo composto pelo enalapril associado à espironolactona mostrou-se superior à terapia isolada com pimobendan em relação aos parâmetros clínicos, histopatológicos, marcadores neuroendócrinos e funcionais miocárdicos.

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

ABSTRACT

FERREIRA, Felipp da Silveira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April 2013. Effects of pimobendan and enalapril associated with spironolactone on neuroendocrine and functional myocardium markers in experimental catecholamine cardiomyopathy in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Adviser: Prof. Dr. Claudio Baptista de Carvalho. Co-Adviser: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira.

Heart failure is a clinical syndrome associated with reduction of functional capacity of the heart, final pathway of the end of most cardiovascular diseases. Its pathophysiology involves the activation of compensatory adaptive mechanisms, such as the sympathetic nervous system, the renin-angiotensin-aldosterone system and peptidergic systems. The experimental model of heart failure induced by epinephrine is one of several models used for better understanding of heart failure and the mechanisms involved, it is essential in diagnostic studies involving the development of biomarkers and therapeutic trials. Thus, this study aimed at evaluation of the therapeutic effects of pimobendan and enalapril associated with spironolactone on functional and neuroendocrine myocardial markers (clinical evaluation, histopathological, Angiotensin Converting Enzyme, Atrial Natriuretic Peptide, C-Reactive Protein and conventional electrocardiography) in experimental heart failure induced in rabbits. Were used 38 New Zealand white rabbits, adults, male/female, weighing $2,0 \pm 0,25$ kg. The experimental model employed in heart failure characterized by two infusions of epinephrine, at intervals of 16 days, for a total of 29 animals, characterized G1. Nine healthy animals received sodium chloride and remained until the end of the experiment as a control group. After the induction phase, animals were randomized into three groups for pharmacological control of congestive heart failure (G2: Enalapril associated with Spironolactone, PO, SID, n = 5; G3: Pimobendan, PO, SID, n = 5; G4: Sodium Chloride, PO, SID, n = 4). The neuroendocrine and functional evaluations were taken every 48 hours during the treatment, for 15 days. After this period the animals were euthanized for histopathological evaluation. The results were statistically analyzed by GLM test, linear regression and Pearson correlation. The results show that the protocol composed by enalapril associated with spironolactone was superior to therapy with

pimobendan in relation to clinical, histopathological, neuroendocrine and functional myocardial markers.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental e cronograma de amostragem. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	51
Figura 2 – Contenção física e administração de adrenalina em infusão contínua em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	52
Figura 3 – Administração oral de fármacos por sonda de gavagem em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	54
Figura 4 – Eletrocardiografia em coelho. Posicionamento dos eletrodos e decúbito esternal. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	55
Figura 5 – Contenção física e coleta sanguínea para avaliação sérica dos biomarcadores. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	56
Figura 6 – Microplaca específica pré-sensibilizada para determinação dos biomarcadores por ELISA. LQFPP/ UENF, 2012.....	58
Figura 7 – Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais com insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina. Em A, tecido cardíaco com infiltração de tecido conjuntivo fibroso (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em B, tecido pulmonar com áreas de edema pulmonar, espessamento de septo alveolar, enfisema e atelectasias (HE; Aumento 10x). Em C, tecido hepático com degeneração e edema (HE; Aumento 10x). Em D, tecido esplênico com pontos de calcificação (HE, Aumento 10x).....	64
Figura 8 – Achados de necropsia compatíveis com os sinais clínicos observados no modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida pela adrenalina. Em A, observa-se ascite, em B efusão pleural e pericárdica hemorrágica, em C epistaxe. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	68
Figura 9 – Comportamento da variável peso corporal sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	68
Figura 10 – Comportamento da variável Peptídeo Natriurético Atrial sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	72
Figura 11 – Comportamento da variável Proteína C Reativa de alta sensibilidade sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	77
Figura 12 – Comportamento da variável Enzima Conversora de Angiotensina sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	82

Figura 13 – Comportamento da variável Frequência cardíaca sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	85
Figura 14 – Comportamento da variável amplitude da onda P sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	91
Figura 15 – Comportamento da variável duração da onda P sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	93
Figura 16 – Comportamento da variável amplitude do Complexo QRS sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	94
Figura 17 – Microscopia óptica de tecido cardíaco de animais sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Em A, tratamento com enalapril associado à espironolactona: tecido conjuntivo fibroso localizado em região subendocárdica (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em B, tratamento pimobendan: tecido conjuntivo fibroso em região subendocárdica avançando ao endocárdio (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em C, animais não tratados: tecido conjuntivo fibroso disperso por todo o endocárdio (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em D, grupo controle: ausência de quaisquer indícios de tecido conjuntivo fibroso (HE; Aumento 10x).....	98
Figura 18 – Microscopia óptica de diferentes tecidos animais dos grupos controle e experimental sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Em A, tecido pulmonar de animal do grupo controle. Em A', tecido pulmonar de animal do G2, observando-se espessamento de septo alveolar, áreas de atelectasia e enfisema. Em B, tecido hepático de animal do grupo controle. Em B', tecido hepático de animal do G3, observando-se degeneração centrolobular e congestão. Em C, tecido renal de animal do grupo controle. Em C', tecido renal de animal do G2, observando-se congestão e esclerose glomerular. Em D, tecido intestinal de animal do grupo controle. Em D', tecido intestinal de animal do G3, observando-se grave edema na região submucosa. (Todas as micrografias em HE; Aumento 10x).....	101
Figura 19 – Comportamento da variável peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	103

Figura 20 – Aspecto macroscópico do coração de animal do grupo controle (direita) e de animal do grupo experimental (esquerda) em T3. Hospital Veterinário/UENF, 2012..	104
Figura 21 – Interação entre as variáveis peso corporal e peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	106
Figura 22 – Comportamento da variável morfometria das fibras miocárdicas sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	107
Figura 23 – Interação entre as variáveis morfometria e peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Achados histopatológicos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	63
Tabela 2 – Principais sinais clínicos observados nos animais submetidos ao modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	65
Tabela 3 – Análise estatística para as variáveis-resposta peso corporal, peso cardíaco e morfometria das fibras cardíacas. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	69
Tabela 4 – Análise estatística para as variáveis-resposta Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial e Proteína C Reativa. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	71
Tabela 5 – Concentração sérica média de Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml) nos tempos 3 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	76
Tabela 6 – Concentração sérica média de Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml) nos tempos 3, 5 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	79
Tabela 7 – Concentração sérica média de Enzima Conversora de Angiotensina (ng/ml) nos tempos 3, 7 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	83
Tabela 8 – Análise estatística para as variáveis-resposta eletrocardiográficas. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	84
Tabela 9 – Frequência cardíaca média nos tempos 3, 4 e 9 para todos os grupos estudados na fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	86
Tabela 10 – Principais alterações de ritmo cardíaco em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	88
Tabela 11 – Valores absolutos médios para as variáveis-resposta amplitude e duração da onda P nos tempos 3 e 9. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	71
Tabela 12 – Valores absolutos médios para a variável-resposta amplitude do Complexo QRS nos tempos 3 e 9. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	92
Tabela 13 – Achados histopatológicos da fase terapêutica de modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012. Onde: * regiões discretas e em pequeno número de observações; ** regiões evidentes e frequentes, *** regiões	

acentuadas e observadas em grande número de animais.....	102
Tabela 14 – Peso cardíaco médio de animais em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	104

ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm – micrômetro

ACTH – Hormônio Adenocorticotrófico

ADH – Hormônio Antidiurético

AMPc – Adenosina Monofosfato cíclico

BID – Duas vezes ao dia

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

g – gravidade

GMPc - Guanosina monofosfato *cíclico*

HE – Hematoxilina e Eosina

His – Histidina

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IC – Insuficiência cardíaca

ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva

IECA – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

IM – Intramuscular

KDa – Quilodalton

Kg – Quilograma

LDL - *Low Density Lipoprotein*

Leu – Leucina

mg – miligrama

mg.kg^{-1} – miligrama por quilo

min – Minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
ms – milisegundos
mV – milivolts
nm – nanômetro
NO – Óxido nítrico
NPR – Receptores peptídeos Natriuréticos
°C – Graus Celsius
PCR – Proteína C Reativa
pg – picograma
PNA – Peptídeo Natriurético Atrial
PNB – Peptídeo Natriurético Cerebral
PO – Via oral
rpm – rotações por minuto
s – segundos
SID – Uma vez ao dia
SNS – Sistema Nervoso simpático
SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TG – Trocrômio de Gomori
TMB - tetrametilbenzidina
Zn – Zinco

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Justificativa.....	23
1.2. Objetivos.....	23
1.2.1. Objetivos gerais.....	23
1.2.2. Objetivos específicos.....	24
1.3. Hipótese.....	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Insuficiência cardíaca.....	25
2.1.1. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos.....	26
2.1.1.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).....	27
2.2. Modelos Experimentais de Insuficiência Cardíaca.....	29
2.2.1. Insuficiência Cardíaca induzida por Catecolaminas.....	31
2.3. Avaliação Neuroendócrina e funcional miocárdica.....	33
2.3.1. Marcadores cardíacos.....	33
2.3.1.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA).....	34
2.3.1.2. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	37
2.3.1.3. Proteína C Reativa (PCR).....	40
2.3.2. Eletrocardiografia (ECG).....	41
2.4. Terapêutica da Insuficiência Cardíaca.....	43
2.4.1. Enalapril.....	43
2.4.2. Espironolactona.....	45
2.4.3. Pimobendan.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1. Comitê de Ética para Uso de Animais.....	49
3.2. Local.....	49
3.3. Animais.....	49
3.4. Estabelecimento do grupo controle.....	50

3.5. Estabelecimento do modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva.....	52
3.6. Validação do modelo experimental.....	53
3.7. Manejo farmacológico da insuficiência cardíaca congestiva.....	53
3.8. Avaliação neuroendócrina e funcional miocárdica.....	54
3.8.1. Avaliação eletrocardiográfica.....	55
3.8.2. Coleta e preparo de material para processamento dos biomarcadores.....	56
3.8.2.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	57
3.8.2.2. Proteína C Reativa de alta sensibilidade (PCR).....	58
3.9. Eutanásia.....	59
3.10. Análise histopatológica.....	59
3.10.1. Morfometria das fibras miocárdicas.....	60
3.11. Análise estatística e interpretação dos resultados.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Validação do modelo experimental.....	62
4.2. Avaliação clínica descritiva.....	65
4.3. Peso corporal.....	68
4.4. Biomarcadores cardíacos.....	71
4.4.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA).....	72
4.4.2. Proteína C Reativa (PCR).....	77
4.4.3. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	82
4.5. Eletrocardiograma.....	84
4.5.1. Frequência cardíaca.....	85
4.5.2. Ritmo cardíaco.....	88
4.5.3. Demais variáveis eletrocardiográficas.....	90
4.6. Avaliação histopatológica da fase terapêutica.....	95
4.6.1. Peso cardíaco.....	103
4.6.2. Morfometria das fibras miocárdicas.....	106
5. CONCLUSÕES	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa, de alta prevalência, associada à redução da capacidade funcional do coração, diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes portadores (SEIXAS-CAMBÃO e LEITE MOREIRA, 2009). A IC é considerada a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares (BOCCHI et al., 2009).

A insuficiência cardíaca tem sido descrita como uma enfermidade progressiva, desencadeada a partir de uma alteração inicial que acomete o músculo cardíaco, com resultante perda de massa muscular ou, alternativamente, perda da habilidade desse miocárdio de gerar força e manter função contrátil adequada, como por exemplo as cardiomiopatias dilatada, hipertrófica e restritiva (VILARINHO, 2008).

Com a instalação da disfunção cardíaca, ocorre a ativação de mecanismos adaptativos (compensatórios), dentre os quais se destacam o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (NAP et al., 2003; VILARINHO, 2008; MONTERA et al., 2009).

Além destes, sistemas peptidérgicos, como os peptídeos natriuréticos atrial (PNA) e cerebral (PNB), endotelinas e a vasopressina parecem ser ativados também (NAP et al., 2003; SISSON, 2004; OMLAND e HAGVE, 2009) e são considerados pontos chave na manutenção da homeostase cardiovascular (OMLAND e HAGVE, 2009).

Este sistema neurohumoral fornece informações importantes sobre o início e a progressão da ICC. Adicionalmente, uma complexa interação entre o SNS e SRAA pode ser observada na insuficiência cardíaca, caracterizada por uma potencialização mútua (NAP et al., 2003).

Estas respostas neuroendócrinas no processo de instauração da insuficiência cardíaca congestiva são bem documentadas em pacientes humanos, e atualmente, alguns estudos apontam para uma similaridade nas respostas observadas em animais com doença cardíaca (SISSON, 2004).

Algumas dessas respostas orgânicas podem ser avaliadas e traduzidas quantitativamente por meio da mensuração sérica/plasmática 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 (creatinocinas), 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 revolucionou a prática da cardiologia, proporcionando diagnósticos de forma simples, acurada e menos invasiva, sobretudo por meio do aumento da sensibilidade dos testes e a combinação entre biomarcadores para determinado diagnóstico. Entretanto, estas ferramentas não devem ser empregadas de forma isolada, mas sempre buscando uma correlação com o estado clínico do paciente (ADAMS et al., 2007).

Ademais, o emprego destes biomarcadores de forma correta e criteriosa pode auxiliar, ainda, em decisões prognósticas e terapêuticas corretas, elementos não facilmente obtidos pela avaliação clínica de rotina isolada, imagens sofisticadas ou avaliações hemodinâmicas pontuais (SISSON, 2004).

No que concerne à terapêutica da enfermidade cardiovascular, as alternativas disponíveis atualmente estão submetidas a um acelerado processo de atualização, com informações publicadas constantemente por pesquisas científicas, oferecendo novas opções terapêuticas por meio da disponibilização de novos fármacos, novas formas de emprego daqueles já conhecidos, modificações nas indicações ou em suas posologias (MONTERO, 2004).

Nestas pesquisas cardiovasculares, a utilização de modelos animais tem contribuído substancialmente para o progresso e conhecimento de sua patogenia, e tem permitido o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e de validação de procedimentos preventivos e terapêuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas (CHORRO et al., 2009).

Para tal, vários modelos de insuficiência cardíaca vêm sendo testados, como indução por doxorubicina (CHRISTIANSEN e AUTSCHBACH, 2006), cirúrgico (NAP et al. 2003; VILARINHO et al, 2010) e infusão de altas doses de catecolaminas (VLEET e FERRANS, 1986; MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

O modelo de indução por catecolaminas em coelhos parece ser ideal para este fim, permitindo explorações e avaliações que mostram-se dificultosas em outros métodos, entretanto a literatura afirma que as conseqüências clínicas, funcionais e hemodinâmicas do dano cardíaco produzido modelo experimental de

insuficiência cardíaca através da infusão de altas doses de catecolaminas não são bem estudadas (MUDERS et al, 1999; ZHANG et al., 2010).

Somado a estas afirmativas, as inovações no campo da medicina, sobretudo por meio da disseminação dos estudos sobre os biomarcadores e novas formas de tratamento da insuficiência cardíaca, vêm ampliando a gama de formas diagnósticas e terapêuticas da enfermidade cardíaca em medicina, o que invariavelmente não vem sendo aplicado à rotina da medicina veterinária, pelos altos custos e necessidade de adaptações. Estas provas podem predizer eventos outrora tardiamente diagnosticados e representar avanços inestimáveis na conduta terapêutica.

1.1. Justificativa

Desta maneira, justifica-se a presente pesquisa pela necessidade de elaboração, a partir de um modelo experimental consagrado, de informações diagnósticas e terapêuticas que possam ser aplicadas à rotina da medicina veterinária cardiovascular, assim como pela necessidade de gerar mais subsídios para este modelo amplamente utilizado em medicina experimental.

1.2. Objetivos

1.2.1. Gerais

Verificar, por meio das provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas, o efeito de dois diferentes protocolos de tratamento para insuficiência cardíaca em coelhos.

Fornecer informações sobre os marcadores cardíacos e protocolos terapêuticos 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

Estudar o efeito de dois protocolos terapêuticos (Enalapril associado à espironolactona e Pimobendan) sobre o comportamento clínico, avaliações neuroendócrinas e funcionais cardíacas, em um modelo experimental de insuficiência cardíaca em coelhos, utilizando:

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

1.3. Hipótese

Testar a hipótese de que há diferença estatisticamente significativa entre o protocolo composto de pimobendan em relação ao composto pelo enalapril associado à espironolactona no tratamento de modelo experimental de miocardiopatia catecolaminérgica em coelhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Insuficiência cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa muito prevalente, e está associada à redução da capacidade funcional do coração, diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes portadores. A IC é considerada a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares (BOCCHI et al., 2009).

Em humanos, 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). A IC pode comumente se originar da falência miocárdica, situação em que dois defeitos básicos do ciclo contrátil do músculo cardíaco podem estar envolvidos, de forma isolada ou simultânea: a redução da capacidade contrátil sistólica (IC sistólica) ou redução da capacidade de relaxamento diastólico (IC diastólica) (TOYODA et al., 1998; SISSON, 2004; VILARINHO, 2008), resultando em um quadro de baixo débito cardíaco no qual o coração não consegue suprir as demandas metabólicas teciduais ou elevar as pressões (FOX et al, 1999).

Segundo DARKE et al. (2000), 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.

No desenvolvimento desta insuficiência cardíaca intervêm tanto o coração como a circulação periférica, e os complexos mecanismos neurohumorais que regulam os processos hemodinâmicos (TOYODA et al., 1998; CHORRO et al., 2009).

A progressão destes processos durante a evolução da insuficiência cardíaca tem sido difícil de ser determinada em humanos devido a vários fatores, como incerteza de quando a insuficiência cardíaca realmente começou, os efeitos da

idade do paciente, doenças concomitantes e o uso de medicamentos (TOYODA et al., 198).

Em medicina veterinária, um paciente com insuficiência cardíaca congestiva frequentemente apresenta-se com um grande número de alterações, que requerem uma rápida identificação e intervenção por parte do clínico. Quando o paciente está hemodinamicamente instável, a seleção dos testes diagnósticos apropriados é um ponto crítico, devendo, inicialmente, proceder à internação para estabilização do paciente para, momentos após, lançar mão de quaisquer ferramentas diagnósticas (BEARDOW, 2000).

A IC é uma síndrome clínica que requer mais investimentos em recursos físicos e humanos. Além disso, as novas opções de tratamento devem ter como objetivo melhorar a qualidade de vida, reduzir o tempo de internação e aumentar a sobrevida dos pacientes (VILAS-BOAS e FOLLATH, 2006).

Devido a estes problemas, os modelos animais de insuficiência cardíaca são 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. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos

Com a instalação da disfunção cardíaca, ocorre a ativação de mecanismos adaptativos, dentre os quais se destacam o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema nervoso simpático (SNS) (FOX et al, 1999; NAP et al., 2003).

Estes sistemas possuem papéis fundamentais em relação à origem e a progressão da insuficiência cardíaca congestiva. Adicionalmente, uma interação complexa pode ser observada entre o SNS e o SRAA, caracterizada por uma potencialização mútua. Inicialmente, estas respostas podem contribuir para a manutenção da homeostase e adequada perfusão tecidual em curto prazo. Entretanto, ao longo do tempo, a ativação destes sistemas causa efeitos maléficos (NAP et al., 2003).

O entendimento destes sistemas complexos é vital para a compreensão dos tratamentos mais modernos da insuficiência cardíaca, que são amplamente baseados no conceito de modificar ou atenuar o funcionamento excessivo de determinadas respostas neuroendócrinas mal adaptadas, como o sistema nervoso

simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SISSON, 2004). Identificam-se, também, outros aspectos fisiopatológicos que envolvem além dos sistemas neuroendócrinos, como as citocinas, a modificação imune, o remodelamento ventricular e a morte celular programada (FEITOSA e CARVALHO, 2000).

Esses mecanismos causam primariamente taquicardia, vasoconstrição periférica e retenção de sódio e água, elevando a pressão arterial e o débito cardíaco, o que favorece a perfusão tissular. Os mecanismos compensatórios, ao agirem cronicamente, contribuem para a evolução dos sinais clínicos observados nos pacientes com insuficiência cardíaca. A retenção de sódio e água leva à congestão, ascite, efusão pleural e edema pulmonar e dos membros. Outros sinais incluem cansaço, intolerância ao exercício, dispnéia, taquicardia, presença de ritmo de galope, sopros e arritmias (PEREIRA et al., 2005).

Inicialmente, as respostas destes sistemas podem contribuir para a manutenção da homeostase cardiovascular e adequada perfusão tecidual e este pode ser considerado um mecanismo adaptativo de curto prazo. Entretanto, sua perpetuação ou maior intensidade de estimulação em longo prazo é deletéria para a função cardíaca (BARRETTO e RAMIRES, 1998; NAP et al., 2003).

2.1.1.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

A insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é uma síndrome que tem como característica a diminuição crônica do débito cardíaco, que leva à diminuição da pressão arterial, ativando mecanismos compensatórios, como o sistema renina-angiotensina (SRA) e o sistema nervoso simpático, que tentam restabelecê-la, sobretudo por mecanismos que causam primariamente taquicardia e vasoconstrição periférica (por ativação simpática) e retenção de sódio e água (via inibição da liberação do hormônio antidiurético – ADH) (FOX et al., 1999; PEREIRA et al., 2005; GUYTON e HALL, 2006).

Além da capacidade dos rins de controlar a pressão arterial por meio do líquido extracelular, os rins têm, também, outro mecanismo potente de controle da pressão, chamado de sistema renina-angiotensina-aldosterona (GUYTON e HALL, 2006).

A renina é uma enzima protéica liberada pelos rins 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 e HALL, 2006).

Em resposta à diminuição do volume sanguíneo efetivo, a renina é liberada pela mácula densa do aparelho justaglomerular. Na circulação, ela catalisa a conversão do angiotensinogênio, que é liberado pelo fígado, em angiotensina I, que, por seu turno, ao entrar em contato com a enzima conversora da angiotensina, situada na superfície do endotélio vascular, é convertida no peptídeo efector angiotensina II (FEITOSA e CARVALHO, 2000; SISSON, 2004).

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

Para exercer sua atividade biológica, 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. Dessa forma, as ações fisiológicas da angiotensina II vão além de seu grande poder vasoconstritor, estimulando diretamente a reabsorção de sódio no túbulo proximal dos rins e aumentando a produção adrenal da aldosterona que, por sua vez, promove a reabsorção tubular distal de sódio (FEITOSA e CARVALHO, 2000; SISSON, 2004; GUYTON e HALL, 2006).

A angiotensina II também aumenta a liberação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas, portanto, aumentando a contratilidade miocárdica. Porém, além desses efeitos mais imediatos da ativação dos SRAs, a produção exagerada crônica de angiotensina II pode resultar em remodelação dos vasos sanguíneos e do coração, papel preponderante na evolução do processo (FEITOSA e CARVALHO, 2000).

Uma vez liberada, a meia-vida da angiotensina II na circulação é de um a dois minutos (SISSON, 2004). 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 (SISSON, 2004).

Como descrito, além da produção de angiotensina, também haverá síntese e liberação de aldosterona, por estimulação da angiotensina II no córtex adrenal. Também é reconhecida a produção tecidual (coração e vasos) da aldosterona. Esta via não é dependente de angiotensina II, fato confirmado por estudos recentes que relatam que os inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECAs) só

temporariamente impedem a secreção da aldosterona (WEBER, 2001; GUYTON e HALL, 2006).

A aldosterona, por sua ação mineralocorticóide, promove retenção de sódio 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).

A participação deste sistema é a que tem merecido maior atenção na literatura científica, e vem oferecendo os melhores resultados no tangente a intervenções terapêuticas (FEITOSA e CARVALHO, 2000).

2.2. Modelos experimentais de insuficiência cardíaca

Inúmeras revisões vêm sendo realizadas em uma tentativa de definir o papel exato dos modelos animais como plataformas para extrapolação dos resultados para terapias em outras espécies, sobretudo humana (ABARBANELL et al., 2009).

No âmbito das enfermidades cardiovasculares, a utilização de modelos animais tem contribuído substancialmente no progresso e no conhecimento de sua patogenia, e tem permitido o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e de validação de procedimentos preventivos e terapêuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas (CHORRO et al., 2009).

As doenças miocárdicas nos animais, induzidas ou não, fornecem oportunidades ímpares de explorar diversos aspectos da medicina cardiovascular. Algumas dessas doenças correspondem, exatamente, a doenças conhecidas de seres humanos, outras constituem sistemas modelo para algumas enfermidades humanas e outras representam situações que permitem estudos específicos genéticos, morfológicos, toxicológicos ou farmacológicos (VLEET e FERRANS, 1986).

Nesse sentido, entre os animais utilizados em experimentação, os coelhos estão entre os mais requisitados, por serem dóceis, de fácil manuseio, manutenção relativamente simples, além de apresentam porte físico adequado, facilitando uma série de procedimentos (FLECKNELL, 1993; FONSECA et al. 1996; PETRONIANU, 1996).

De acordo com BIRCK et al., (2006), esta espécie vem desempenhando papel de indiscutível relevância ao longo de toda a história da medicina investigativa, seja no âmbito da cirurgia, da farmacologia ou da imunologia.

Segundo a literatura, por causa do seu tamanho intermediário, os coelhos oferecem importantes vantagens sobre outras espécies. Embora seu coração seja menor do que o cão ou do suíno, é grande o suficiente para fácil cateterização cirúrgica, além de proporcionar intervenções com menor custo (POGWIZD e BERS, 2008).

Mais importante, ainda, é o fato de que a fisiologia cardíaca dos coelhos apresenta características mais semelhantes à fisiologia cardíaca humana do que a de ratos ou camundongos (POGWIZD e BERS, 2008).

De acordo com PAIRAUT (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. (2009) e VILARINHO et al. (2010).

Assim, para a indução destes modelos experimentais, alguns métodos vêm sendo propostas, como a forma farmacológica de indução da Cardiomiopatia Dilatada (CMD) pela doxorubicina (adriamicina), que vem sendo empregada amplamente (CHRISTIANSEN e AUTSCHBACH, 2006; POGWIZD e BERS, 2008), sobretudo pelo fato deste modelo de cardiopatia induzida assemelhar-se a CMD idiopática em humanos (NAGAMI et al. 1997).

Outro modelo empregado é o cirúrgico, através de um mecanismo de sobrecarga de volume e pressão, por meio da destruição mecânica dos folhetos valvares aórticos somada a colocação de uma bandagem aórtica (NAP et al. 2003; VILARINHO et al, 2010), acompanhado, ou não, de uma isquemia miocárdica através da colocação de uma ligadura adicional na artéria coronária circunflexa descendente (ABARBANELL et al., 2009; VERKERK et al. 2009).

Outra técnica muito difundida e estudada há décadas no meio científico é a indução da insuficiência cardíaca por meio da administração exógena de altas doses de catecolaminas. 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, tem sido empregados em estudos experimentais, com resultados similares e termos de

danos histológicos (DOWNING e CHEN, 1985). O tópico seguinte aborda esta técnica de forma mais aprofundada.

2.2.1. Insuficiência cardíaca induzida por catecolaminas

Os primeiros trabalhos que relatam a ação tóxica das catecolaminas sobre o miocárdio datam do início do século XX, logo após a descoberta destes compostos, com informações disponíveis na literatura a partir de 1906/1907 (RONA, 1985).

A partir de então, diversos autores estudaram a ação destes compostos e estão disponíveis na literatura um grande volume de informações sobre a cardiotoxicidade das catecolaminas. Entretanto apresentam as mesmas características e descrevem que, em geral, as lesões miocárdicas induzidas, seja por catecolaminas endógenas ou sintéticas, são similares, além de causarem substancial comprometimento da função ventricular esquerda *in vivo* (DOWNING e CHEN, 1985; VLEET e FERRANS, 1986).

A maioria destes estudos foi realizada com o isoproterenol, entretanto há vários estudos com epinefrina, norepinefrina, salbutamol, terbutalina e efedrina (RONA, 1985, VLEET e FERRANS, 1986; JIANG e DOWNING, 1990).

Para tal, diversas espécies foram empregadas, como ratos, coelhos e cães. Nestas espécies as lesões típicas são necroses e fibroses miocárdicas multifocais com concentração do dano celular no subendocárdio ventricular esquerdo e músculos papilares (VLEET e FERRANS, 1986; MUDERS et al, 1999; ZHANG et al., 2010).

De acordo com a literatura, em geral, utilizando-se o tempo de 90 minutos como base, infusões de doses moderadas de doses de 2 a 3 μ g/kg/min são suficientes para produzir lesões extensas 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 (DOWNING e CHEN, 1985).

Vários mecanismos têm sido postulados para explicar a patogênese desta forma de cardiomiopatia, incluindo radicais altamente citotóxicos produzidos a partir do metabolismo da catecolamina, através do sistema de monoamina oxidase, vasoconstrição coronariana induzida por catecolaminas, com geração de radicais

decorrentes de isquemia e necrose miocárdica relacionada com a agregação plaquetária intravascular, bem como a sobrecarga de cálcio e deficiência de fosfato por ativação excessiva da adenosina trifosfatase cálcio-dependente (RONA, 1985; BINDOLI et al., 1992; MUDERS et al., 1999). De forma mais específica, BINDOLI et al. (1992) descreveram que altos níveis de catecolaminas, sejam endógenas ou exógenas, têm sido relatados como causadores de alterações na morfologia e funcionamento do coração, levando a necrose miocárdica. Estas catecolaminas são lentamente oxidadas devido à ausência de um catalisador e podem gerar radicais livres através de oxidações envolvendo sistemas enzimáticos ou íons metálicos. Ainda segundo estes autores, o efeito cardiotoxico das catecolaminas não são causados pela molécula propriamente dita, mas sim seus pelos 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 demarcadas, que culminam com a morte celular e conseqüente necrose das fibras musculares e um predominante infiltrado mononuclear leucocítico (JIANG e DOWNING, 1990).

De acordo com a literatura, imediatamente após a administração de altas doses de catecolaminas, hemorragias subendocárdicas focais e difusas são observadas ao exame necroscópico. Focos hemorrágicos também podem ser encontrados no miocárdio e no epicárdio. Cerca de seis a dez horas após, uma resposta intersticial inflamatória é desencadeada primariamente por células mononucleares, e é mais intensa no subendocárdio. 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. Outros achados histológicos neste período incluem edema intersticial e congestão subendocárdica. Aproximadamente após 72 horas da administração adrenérgica, 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 e FERRANS, 1986; JIANG e DOWNING, 1990).

Modelos experimentais de insuficiência cardíaca em animais de laboratório podem ser considerados limitados devido à dificuldade de obtenção de um estado de disfunção cardíaca estável, falta de ativação neuro-humoral, ponto chave da insuficiência cardíaca, ou limitadas possibilidades de repetição da avaliação dos parâmetros hemodinâmicos (MUDERS et al, 1999).

Este modelo de indução por catecolaminas em coelhos parece ser ideal para o desenvolvimento da IC experimentalmente, permitindo explorações e avaliações que mostram-se difíceis em outros métodos, entretanto ainda não é completamente caracterizado (MUDERS et al, 1999; ZHANG et al., 2010).

2.3. Avaliação neuroendócrina e funcional miocárdica

2.3.1. Marcadores cardíacos

Os biomarcadores são parâmetros biológicos que podem mensurar objetivamente e quantificar indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a intervenções. Normalmente são utilizados na triagem, diagnóstico ou monitoramento de doenças específicas, além de terem aplicabilidade na determinação da susceptibilidade à doença e elegibilidade para terapias específicas (SINGH et al., 2010).

Especificamente, os biomarcadores cardíacos são componentes celulares que são liberados na circulação quando ocorre uma lesão miocárdica. Eles desempenham um papel essencial no diagnóstico, estratificação de risco e tratamento de pacientes com dor torácica e síndrome coronariana aguda, assim como em pacientes com insuficiência cardíaca aguda (SINGH et al., 2010).

O primeiro relato do uso de biomarcadores para o estudo de uma doença cardíaca data de 1954, quando 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).

Os marcadores específicos de danos miocárdios apresentam um papel significativo no diagnóstico das lesões miocárdicas. Os marcadores séricos têm sido utilizados para avaliar os danos miocárdios resultados de cirurgias, miopatias, exercício, miocardites e uma variedade de outras intervenções médicas, como angioplastias, ablação por cateter de radiofrequência, cardioversão elétrica de arritmias. Algumas dessas condições e procedimentos podem ser avaliados em modelos animais de experimentação, o que vem aumentando o interesse na detecção do miocárdico em espécies não humanas (FREDERICKS et al., 2001; UZUELLI, 2008).

Em Medicina Veterinária, diversos estudos e pesquisas têm sido desenvolvidos nos últimos anos para avaliar a utilidade destes biomarcadores em animais com doenças cardíacas e seus resultados indicam que esta é uma ferramenta promissora, que, inclusive já esta sendo empregada rotineiramente em alguns centros para o diagnóstico de cardiopatias (REYNOLDS e OYAMA, 2008; RIBEIRO, 2010).

Atualmente novos biomarcadores cardíacos têm sido empregados para a detecção de enfermidades miocárdicas, sobretudo para o diagnóstico de infartos agudos do miocárdio (IAM) em humanos (ADAMS et al., 2007), para o estudo de cardiopatias experimentais em animais (MUDERS et al. 1999) e para obtenção de informações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas sobre a insuficiência cardíaca em animais (SISSON, 2004). 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) (ANGERMANN e ERTL, 2004; VAN DE WAL et al. 2006, HUANG et al. 2009; RAMOS et al. 2009; GAROFALLO et al. 2012).

2.3.1.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)

Até meados de 1950, acreditava-se que a diurese era controlada por dois mecanismos neuro-hormonais: o sistema vasopressina (ADH) e o sistema renina-

angiotensina-aldosterona (SRAA). No entanto, ainda em relatos daquela década, acreditava-se existir um terceiro fator, o qual era pouco elucidado. Com a descrição de aumento de diurese associado a episódios paroxísticos de taquicardia supraventricular, passou-se a suspeitar que o terceiro fator estivesse ligado ao coração (NETO e CLAUSELL, 2004).

Posteriormente, 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. A noção de que o coração possuía funções endócrinas ganhava fundamentação (NETO e CLAUSELL, 2004).

A literatura relata que na década de 80 alguns pesquisadores, em um trabalho pioneiro, demonstraram que o átrio cardíaco contém uma substância capaz de reduzir a pressão sangüínea sistêmica e induzir a natriurese (ATLAS e LARAGH, 1986; CHO et al. 2002; FRANÇOIS et al. 2002).

Em 1981, Bold e colaboradores descreveram 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 (COSTA et al, 2000).

Este hormônio, o peptídeo natriurético atrial (PNA), é liberado principalmente por meio de mudança na tensão das paredes atriais, ou seja, através de uma distensão atrial, e tem repercussões sobre o equilíbrio hidroeletrolítico e a homeostase. Subseqüentes contribuições também confirmaram efeitos de vasodilatação e inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona, por meio da redução da liberação de renina, supressão da atividade da enzima de conversão da angiotensina e bloqueio da conversão da aldosterona (ATLAS e LARAGH, 1986; CHO et al. 2002; FRANÇOIS et al. 2002; DIETZ, 2005; OMLAND e HAGVE, 2009).

Segundo CHO et al. (2002) e 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 e é removido da circulação pelo receptor para peptídeo natriurético atrial tipo C, por meio da filtração glomerular e pela

endopeptidase 24-11. A meia vida plasmática do fator natriurético atrial é de dois a quatro minutos em humanos (COSTA et al, 2000).

Os peptídeos natriuréticos exercem suas ações fisiológicas por meio de ligações com os receptores peptídeos natriuréticos (NPR) localizados na superfície celular. Três diferentes NPRs são descritos: NPR-A, NPR-B e NPR-C. Os peptídeos natriuréticos atriais e cerebrais associam-se com o NPR-A com alta afinidade, entretanto o peptídeo natriurético tipo-C parece não exercer qualquer efeito via NPR-A. Este último peptídeo, porém, liga-se com alta afinidade pelo NPR-B (OMLAND e HAGVE, 2009).

Os receptores NPR-A e NPR-B expressam-se amplamente no sistema cardiovascular, pulmões, rins, pele, plaquetas e nas fibras nervosas simpáticas pré-sinápticas. O NPR-A é o receptor para peptídeo natriurético predominante nos grandes vasos, enquanto o NPR-B é encontrado abundantemente no cérebro (OMLAND e HAGVE, 2009).

Em medicina 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 aumento da pressão atrial e disfunção ventricular (FYHRQUIST E TIKKANEN, 1988; STEVENS et al., 1995; SAGNELLA, 1998; ABASSI et al., 2004).

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

De acordo com SISSON (2004), a mensuração destes peptídeos na Medicina Veterinária em pacientes suspeitos de doença cardíaca ou insuficiência cardíaca é uma possibilidade motivadora, entretanto carece de um trabalho bastante técnico e uma verificação clínica detalhada antes que os ensaios destes peptídeos possam ser incorporados à rotina. Segundo este autor, à época, o único método empregado para realização destes testes era o radioimunoensaio, um método extremamente laborioso.

Desta forma, a quantificação deste peptídeo vem sendo realizada em estudos experimentais em várias espécies, como em ratos, camundongos, cães e coelhos

para avaliação de modelos de insuficiência cardíaca congestiva induzidos nestas espécies e em outros modelos de doenças (ACKERMANN et al. 1986; MAASS e LEINWAND et al. 2000; WEN et al. 2000).

Especificamente em coelhos, observa-se na literatura um grande número de estudos sobre o PNA com resultados amplamente variáveis, 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).

2.3.1.2. 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 (ANTONACCIO, 1982; LAMBERT et al., 2008). Esta conversão ocorre por meio da clivagem de um dipeptídeo da região COOH terminal da angiotensina I provocando a liberação do dipeptídeo His-Leu da Angiotensina I, transformando-a em Angiotensina II (ANTONACCIO, 1982).

A ECA também é responsável pelo metabolismo do peptídeo bradicinina, com efeito hipotensor (FEITOSA; CARVALHO, 2000; MATA-BALAGUER et al., 2004).

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).

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).

Por tais motivos, a Enzima Conversora de Angiotensina é considerada o ponto chave de regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Este sistema responde ativamente durante a insuficiência cardíaca, na tentativa de restabelecimento da pressão arterial por meio da produção de Angiotensina II, potente vasoconstritor, (FEITOSA e CARVALHO, 2000; SISSON, 2004) e da

secreção de aldosterona, promovendo retenção de sódio e água para manutenção do volume vascular efetivo (WEBER, 2001).

Entretanto esta molécula não é considerada um biomarcador específico para a doença cardíaca, visto sua produção e disponibilidade em diversos outros tecidos, sendo seu uso mais restrito em casos de sarcoidose e diversos outros tipos de doenças pulmonares, tais 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 de área de superfície endotelial vascular pulmonar, região anatômica onde encontram-se maiores concentrações e atividades séricas fisiológicas desta enzima (STUDDY et al. 1983).

Entretanto alguns autores vêm obtendo sucesso em correlações entre os níveis séricos de ECA e o alterações na pressão arterial (TODD et al. 1995) e no desenvolvimento de trombose coronária (NIU et al. 2002). 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 de diversas origens, assim como em pesquisas que avaliem a progressão da doença cardíaca e a terapêutica com os inibidores da ECA (NAP et al. 2003).

Neste âmbito, acredita-se que a mensuração da ECA possa representar uma importante ferramenta no auxílio ao diagnóstico precoce da insuficiência cardíaca, assim como pode possibilitar melhor avaliação da progressão da doença e seu prognóstico (NAP et al., 2003).

Neste sentido, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas envolvendo a mensuração desta enzima em coelhos, também apresentando resultados amplamente variáveis, avaliando-se 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), efeitos do enalapril sobre a atividade da ECA em coelhos com dieta rica em colesterol (HOSHIDA et al. 1997).

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 KDa, composta por cinco subunidades idênticas de 20 KDa 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 por meio 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, em 1960, Kushner et al. 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 (VILLACORTA et al., 2007). 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 e possibilidade de 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 um extrato aquoso de *piper sarmentosum* em coelhos com dieta experimental de colesterol (AMRAN et al. 2011), e administração do rosiglitazone em animais modelo de lesão miocárdica por isquemia/reperfusão (GAO et al. 2013).

2.3.2. Eletrocardiografia (ECG)

Os primeiros estudos sobre a eletrocardiografia datam de 1887, quando 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 pesquisadores como Eithoven e Nürr desenvolveram novas ferramentas para o registro da atividade elétrica cardíaca e conceitos na eletrocardiografia, passando a ser utilizada como método auxiliar de diagnóstico na medicina e na medicina veterinária (TILLEY, 1992; WOLF et al., 2000).

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 enfermidade 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).

Uma pesquisa minuciosa na literatura disponível revela poucas publicações sobre a eletrocardiografia normal em coelhos, embora diversos autores o tenham utilizado em suas pesquisas nestes animais. Diversas publicações sobre o ECG nesta espécie estão disponíveis em revistas de fisiologia, cardiologia, eletrocardiografia, medicina veterinária, biologia e ciência animal, entretanto como parte de estudos farmacológicos e toxicológicos ou modelos animais para doenças cardíacas humanas (SZABUNIEWICZ et al., 1971; NOSZCZYK-NOWAK, et al., 2009, LORD et al. 2010).

O coelho doméstico tem sido amplamente utilizado como modelo animal experimental para a pesquisa cardiovascular (SZABUNIEWICZ et al., 1971) 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).

2.4. Terapêutica da insuficiência cardíaca

Na atualidade, tem-se considerado que a terapêutica correta da ICC representa importante mecanismo para melhora desta síndrome, sobretudo quando realizada por meio da associação de digitálico, diurético e inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), sendo a primeira escolha apenas a associação entre o inibidor da ECA e o diurético (BARRETTO et al., 1997 FOX et al. 1999).

Uma vez que não se trata de um protocolo fixo, outros fármacos poderão ser associadas a este esquema, ou mesmo com a substituição de alguns desses medicamentos, conforme a resposta de cada paciente. Beta-bloqueadores, amiodarona, nitratos, hidralazina, inibidores da angiotensina II e novos fármacos vêm sendo empregados com este objetivo (BARRETTO et al., 1997).

2.4.1. Enalapril

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) são um grupo de medicamentos descoberto ao final dos anos 70, sendo, na atualidade, largamente utilizados como anti-hipertensivos, nas terapias da insuficiência cardíaca e da nefropatia diabética (MIRANDA, 2006).

O enalapril é um fármaco que pertence a essa classe de inibidores, considerado um inibidor não peptídico competitivo que, assim como o captopril, se liga ao sítio ativo da enzima ECA. Ele é derivado de um tripeptídeo e se liga à enzima através de seu grupo carboxila com moderada força de ligação ao íon Zn da enzima (ONDETTI e CUSHMAN, 1982).

Quando absorvido, o enalapril é rapidamente metabolizado por deesterificação para a sua forma ativa, o enalaprilato, que por sua vez possui baixa taxa de absorção no trato gastrointestinal. Isto faz que com este composto seja sintetizado na forma de enalapril para melhor absorção e efeito terapêutico (JOHNSTON et al. 1986; TABACOVA e KIMMEL, 2001).

Segundo BARRETTO e RAMIRES (1998), a expectativa de vida em paciente com comprometimento severo da função cardíaca é muito reduzida, entretanto a

terapêutica com inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) tem modificado esta constante.

Estudos prospectivos e randomizados, em humanos, demonstram que o uso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina reduz, de forma significativa, a morbimortalidade tanto nas formas assintomáticas como, principalmente, nas formas mais severas de disfunção ventricular esquerda (FEITOSA e CARVALHO, 2000), e em medicina veterinária estudos apontam que estes inibidores promovem maior qualidade de vida e tempo de sobrevivência (HÄGGSTRÖM et al., 2004).

Esta classe de fármacos, representada pelo Enalapril, atenua a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona por meio da inibição seletiva da enzima conversora de angiotensina (NAP et al., 2003).

Os IECAs tornaram-se a terapia padrão na descompensação cardíaca. Em humanos, embora pareça contraditório, a morbimortalidade da insuficiência cardíaca permanece elevada, mesmo entre os doentes tratados. A explicação para esse fato é que alguns dados revelam que os IECAs ainda são menos prescritos do que deveriam, principalmente nos idosos; observa-se certo temor pela constatação de hipotensão entre esses pacientes. Além disso, as doses utilizadas, muitas vezes, estão aquém daquelas recomendadas nos grandes estudos e, por fim, a descontinuidade do uso dos IECAs devido a efeitos adversos, alguns atribuídos ao excesso de bradicinina, como a tosse, não é um fato desprezível. Entretanto, esses aspectos por si só não parecem justificar o atual prognóstico da insuficiência cardíaca congestiva (FEITOSA e CARVALHO, 2000).

Em medicina veterinária são amplamente difundidos e prescritos rotineiramente na conduta ao paciente com insuficiência cardíaca congestiva, sobretudo naquela causada por degeneração mixomatosa da valva mitral (FOX et al. 1999; HÄGGSTRÖM et al., 2004; ATKINS et al., 2009).

De acordo com a literatura, a dose recomendada para cães é de 0,25-0,50mg.k⁻¹, BID, entretanto deve-se atentar as concentrações séricas de uréia e creatinina para monitorização do risco de lesão renal pela droga (FOX et al. 1999; MUCHA e BELERENIAN, 2008; ATKINS et al., 2009).

Já em coelhos, conforme PAIRAUT (2009) a dose recomendada é de 0,50mg.k⁻¹, SID, assim como outros fármacos, uma extrapolação bem adaptada da dose de cães para esta espécie, porém mantendo-se a mesma atenção à função renal.

Ainda sobre coelhos, a literatura descreve que estudos experimentais nesta espécie demonstraram que a infusão intravenosa de angiotensina II provocava necrose miocárdica focal. Em outros estudos com doses variáveis de angiotensina II, demonstrou-se haver necrose miocárdica no ventrículo esquerdo mesmo em concentrações similares às encontradas em várias condições clínicas em seres humanos. Quando se conseguiu produzir o bloqueio dos receptores da angiotensina II com a saralazina, ficaram evidentes os benefícios do uso dos IECAS em situações experimentais de ICC (CÉSAR, 2000).

2.4.2. Espironolactona

A espironolactona é um inibidor competitivo da aldosterona, atuando em nível dos túbulos coletores distais. Neste ponto, seus efeitos são aumentar a excreção de sódio e água, além de reduzir a excreção do potássio, fato pelo qual esta droga também é conhecida como poupadora de potássio (JEUNESSE et al., 2007; MUCHA e BELERENIAN, 2008).

Esta droga vem sendo empregada há mais de 50 anos em pacientes humanos, de forma isolada ou combinada à hidroclortiazida ou furosemida, para o tratamento da hipertensão, hiperaldosteronismo primário e edemas (causados por insuficiência cardíaca, cirrose ou síndrome nefrótica) (JEUNESSE et al., 2007).

Em medicina veterinária, a espironolactona vem sendo recomendada de forma isolada ou em conjunto adicionada a outros diuréticos, para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva não responsiva a furosemida e inibidores da ECA, ou quando faz-se necessário poupar potássio pela perda indevida deste elemento pelo uso de outros diuréticos não poupadores (JEUNESSE et al., 2007).

Segundo a literatura, a aldosterona apresenta vários efeitos, além da clássica retenção de sódio e água, como forma de elevar a pressão arterial. Estes efeitos são a inibição ou indução da síntese de proteínas e colágeno por meio dos fibroblastos, favorece a perda de potássio e de magnésio, potencializa a ação das catecolaminas, induz arritmias ventriculares, favorece a fibrose miocárdica e reduz a ação dos barorreceptores (SCHMIDT e SCHMIEDER, 2003; MUCHA e BELERENIAN, 2008).

Todas essas ações provocam um grande efeito deletério sobre a função e a hemodinâmica cardiovascular, mas o mais importante é que, mesmo que o paciente receba um inibidor da ECA, impedindo a formação da aldosterona por inibição da conversão da Angiotensina I em Angiotensina II, ao longo do tempo começa a ocorrer formação de Aldosterona por outras vias (potássio, óxido nítrico, ACTH) em um fenômeno conhecido como “escape de aldosterona” (MUCHA e BELERENIAN, 2008).

Como observado, o excesso de aldosterona apresenta efeitos indesejáveis sobre a função cardíaca, assim estudos mostram que o tratamento de doentes com insuficiência cardíaca grave com um antagonista dos receptores da aldosterona, como a espironolactona associado a um inibidor da ECA, melhora os níveis de morbidade e mortalidade (NISHIZAKA et al., 2003; SCHMIDT e SCHMIEDER, 2003; CHAI et al. 2005). De acordo com MUCHA e BELERENIAN (2008), este antagonismo é obtido por meio da administração de baixas doses de espironolactona, o que melhora a qualidade e a quantidade de vida dos pacientes que a recebem. Em cães, sua dose diurética é de $1-4\text{mg.k}^{-1}$ BID, enquanto a antifibrótica é de $0,25\text{mg.k}^{-1}$ BID. Em humanos, segundo NISHIZAKA et al. (2003) a espironolactona em baixas doses parece ser eficaz, também, no auxílio ao tratamento da hipertensão resistente a outros fármacos.

De acordo com BOCCHI et al. (2012), em modelos experimentais, a espironolactona possui efeito direto na mediação de redução de apoptose de miócito por hormônio, reduzindo taxas de fibrose miocárdica e remodelamento cardíaco.

Uma vez que os receptores da aldosterona estão presentes tanto nos rins como no coração e na parede dos vasos, acredita-se que a espironolactona possa, também, ligar-se a eles, exercendo seus efeitos, pelo menos em parte, independentemente dos seus efeitos renais (CHAI et al. 2005). Assim, este bloqueio impede a ligação da aldosterona nestes receptores cardíacos reduzindo o índice de fibrose miocárdica e demais efeitos deletérios causados pela aldosterona sobre o coração (NISHIZAKA et al., 2003; MUCHA e BELERENIAN, 2008). Este efeito é conhecido como o efeito cardioprotetor da espironolactona (SCHMIDT e SCHMIEDER, 2003).

Este conceito de “cardioproteção farmacológica” deve ser considerado uma nova oportunidade de aumentar ainda mais a sobrevida de pacientes cardiopatas.

Esta nova abordagem é estruturada sobre modelos experimentais pré-clínicos, entretanto precisam ser confrontados com a realidade clínica e demonstrar uma capacidade real para reduzir a morbidade e mortalidade das cardiopatias em humanos (BERDEAUX, 2007).

2.4.3. Pimobendan

Um novo grupo de fármacos, sensibilizadores dos miofilamentos ao cálcio foi recentemente desenvolvido, mostrando-se promissores no manejo da insuficiência ventricular esquerda aguda e crônica: este inclui o pimobendan e o levosimendan (PAGEL et al., 1996).

O pimobendan é um derivado benzimidazólico-pyridazinona, potente inotrópico positivo, capaz de aumentar a força de contração cardíaca por meio de dois mecanismos distintos: sensibilização das células miocárdicas ao efeito do cálcio e, em segundo lugar, uma inibição da enzima fosfodiesterase 3 cardíaca (ATKINSON et al., 2009; SAYER et al., 2009; MACGREGOR et al., 2011; BOYLE e LEECH, 2012). Esta última característica o assemelha a outros fármacos inibidores da fosfodiesterase, como a amrinona e milrinona, entretanto esta característica adicional de sensibilização do miocárdio ao cálcio o coloca em posição de destaque frente às outros fármacos (FUENTES, 2004).

Este efeito combinado aumenta o débito cardíaco sem aumentar a demanda de oxigênio miocárdico (MACGREGOR et al., 2011).

Os efeitos vasculares desta inibição da fosfodiesterase 3 são mediados pelo AMPc, GMPc e NO promovendo arteriodilatação e venodilatação (FUENTES, 2004; RAMÍREZ e ALONSO, 2005; ATKINSON et al., 2009; BOYLE e LEECH, 2012).

Ainda sobre a via do AMPc, o pimobendan atua elevando sua concentração intracelular, e o UD-CG 212 Cl, seu principal metabólito ativo, atua por esta mesma via aumentando o efeito do medicamento, porém atua também mediante um efeito direto sobre os canais de cálcio dependentes de potássio, produzindo um efeito inotrópico mais intenso (RAMÍREZ e ALONSO, 2005).

Além de destacar os mecanismos pelos quais o pimobendan produz esses efeitos, é importante observar que se tem descartado outros mecanismos paralelos que poderiam produzir um efeito similar. O pimobendan inibe a secreção de catecolaminas, não é um estimulante simpático direto, não produz ações mediadas

por meio da liberação de histamina e não tem efeito sobre o fluxo celular de sódio ou sobre a inibição da atividade da $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ ATPase (RAMÍREZ e ALONSO, 2005).

Como características farmacológicas, o pimobendan é insolúvel em água e a sua absorção oral é rápida e o pico plasmático ocorre cerca de uma hora após a administração. A biodisponibilidade é de cerca de 60 a 65%, entretanto é reduzida na presença de alimento. Liga-se altamente às proteínas plasmáticas, na ordem de 90% a 95%, e é eliminada nas fezes por excreção biliar. Em cães e humanos é metabolizado no fígado (FUENTES, 2004).

Quando se administram doses repetidas a cada 12 horas, de 1 mg.k^{-1} por via oral em cães, durante 27 dias seguidos tem se comprovado que não são produzidos fenômenos de taquifilaxia, nem se produzem fenômenos de acumulação que produzam estados de inotropismo cada vez mais acentuados (RAMÍREZ e ALONSO, 2005).

Se administrado por via oral em pacientes humanos com *Cor pulmonale* se consegue que doses baixas, além de exercer sua função inotrópica positiva, reduza de forma significativa a pressão arterial pulmonar e a resistência pulmonar total, melhorando a tolerância ao exercício físico dos pacientes e sem produzir nenhuma redução na concentração arterial de oxigênio nem produzir dessaturação sanguínea (RAMÍREZ e ALONSO, 2005).

Esta droga foi desenvolvida para uso em humanos com insuficiência cardíaca, mas estudos clínicos observaram que sua administração não produzia benefícios sobre qualidade de vida ou tolerância ao exercício (MACGREGOR et al., 2011). Assim, seu uso tem sido aprovado exclusivamente para cães com insuficiência cardíaca em decorrência da cardiomiopatia dilatada ou degeneração mitral com comprometimento da função sistólica e não é recomendado em casos obstrutivos ou insuficiência diastólica (CHETBOUL et al., 2007; ATKINS et al., 2009, BOSWOOD, 2010; MACGREGOR et al., 2011).

De acordo com PARIAUT (2009) o pimobendan é uma estratégia interessante para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva em coelhos, com indicações para uso e doses similares às descritas em cães (FUENTES, 2004; ATKINS et al., 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 (CEUA-UENF), sob registro nº 111.

3.2. Local

O trabalho foi desenvolvido nos Setores de Clínica Médica de Pequenos Animais (LCCA) e Anatomia Patológica (LMPA) do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde foram desenvolvidos o modelo experimental (denominado fase de indução), a fase de tratamento (denominada fase terapêutica) e as respectivas observações e amostragens clínicas e laboratoriais.

As análises laboratoriais dos biomarcadores estudados foram realizadas no Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da UENF.

3.3. Animais

Na presente pesquisa foram utilizados 38 (trinta e oito) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da linhagem Nova Zelândia, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Foram utilizados animais adultos, com seis meses de vida, sem restrição de sexo, pesando $2,0 \pm 0,25$ kg ao início da pesquisa.

Assim que admitidos no Hospital Veterinário da UENF, os animais foram submetidos a exames clínicos a fim de detectar quaisquer alterações orgânicas que os impedissem 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,

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

durante um período de quinze dias, recebendo alimentação específica, água *ad libitum*, higienização local e banhos de sol.

3.4. Estabelecimento do grupo controle

O grupo controle (denominado G5) foi composto por 9 (nove) animais, sendo 3 (três) destes submetidos à eutanásia previamente ao início da fase de indução do modelo experimental de insuficiência cardíaca pela epinefrina (denominado T0), 3 (três) animais submetidos à eutanásia após o término da fase de indução (denominado T3) e antes do início da fase de tratamento (denominado T4) os 3 (três) restantes ao final da fase experimental terapêutica (denominado T9) (Figura 1). Todas as eutanásias foram realizadas para controle histológico.

As provas neuroendócrinas e funcionais cardíacas (Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA), Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) e Proteína C-Reativa (PCR) e Eletrocardiografia) foram realizadas em todos os animais disponíveis neste grupo de acordo com o momento em que o experimento se encontrava.

Para controle do experimento, os animais do G5 foram mantidos em condições idênticas aos do grupo experimental abaixo descrito, recebendo, em média, 2 ml de Cloreto de Sódio 0,9%¹ (sem adição de adrenalina) por via intravenosa, em infusão contínua, através da veia marginal da orelha.

As amostragens e observações neste grupo foram realizadas respeitando-se o mesmo cronograma de amostragem (Figura 1) estabelecido para os animais que participaram das demais fases do experimento.

¹ Cloreto de Sódio a 0,9%. Laboratório Sanobiol LTDA. Av. das Quaresmeiras, s/n. Pouso Alegre – MG.

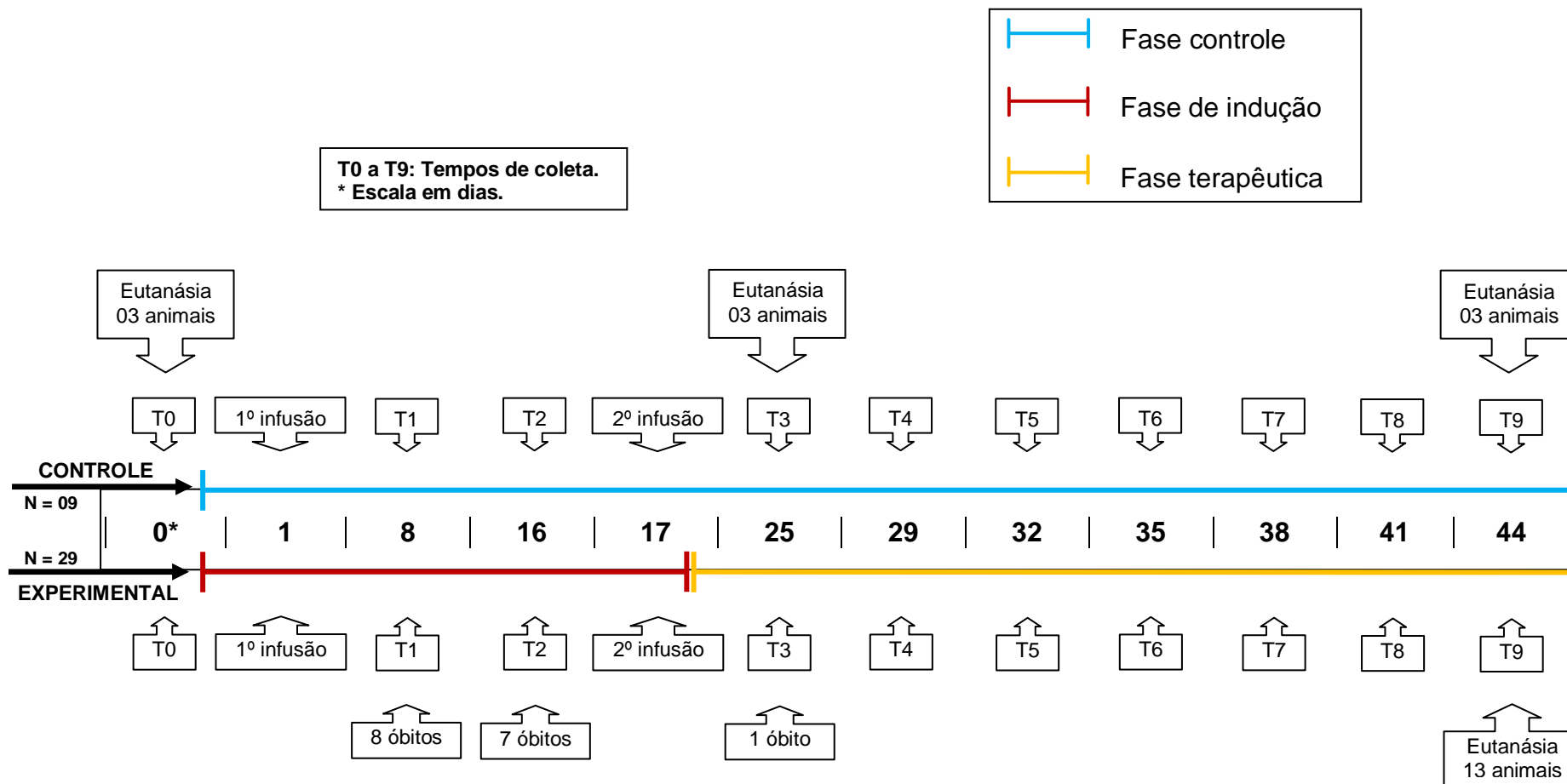


Figura 1 – Delineamento experimental e cronograma de amostragem. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

3.5. Estabelecimento do modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva

O modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva adotado neste ensaio foi o proposto por Downing e Chen (1985), Muders et al. (1999), Zhang et al. (2010), sendo as metodologias adaptadas para este estudo.

Nesta adaptação do modelo consagrado, 29 animais foram submetidos a duas infusões subseqüentes de epinefrina¹ em intervalos de 16 dias. A primeira infusão foi realizada utilizando-se a dose de 5 µg/kg/minuto e a segunda infusão utilizando-se a dose de 3 µg/kg/minuto, por um período de 60 minutos. Este período de infusões foi denominado “fase de indução” (G1).

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

Para a infusão contínua, a dose total da epinefrina foi diluída em solução de Cloreto de Sódio 0,9% e administrada durante o período de 60 minutos preestabelecido por Muders et al. (1999). Durante as infusões, os animais foram mantidos em caixas de contenção do tipo guilhotina, apropriadas para a espécie (Figura 2).

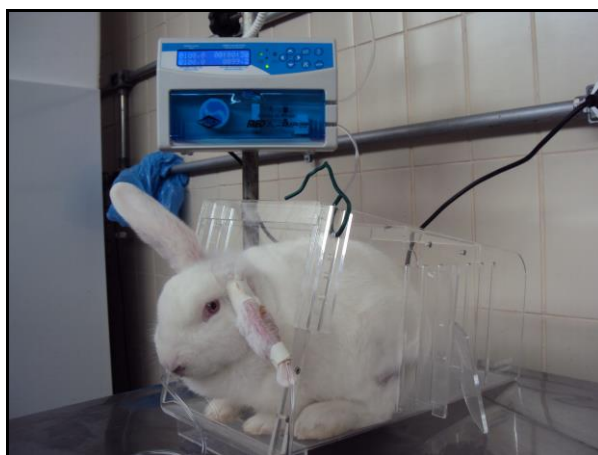


Figura 2 – Contenção física e administração de adrenalina em infusão contínua em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

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

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

3.6. Validação do modelo experimental

Ao término da fase de indução, em T3, foram coletados dados histológicos de todos os animais que vieram a óbito durante esta fase e estas informações foram comparadas com dados de três animais do grupo controle escolhidos aleatoriamente e submetidos à eutanásia em momento equivalente ao T3 deste grupo.

Estes dados foram comparados descritivamente para comprovação e validação histopatológica do modelo experimental proposto para seqüência da pesquisa.

3.7. Manejo farmacológico da insuficiência cardíaca congestiva

Após a fase de indução, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos distintos para o controle farmacológico da insuficiência cardíaca congestiva, conforme elencado a seguir.

- Grupo 2 (G2): Maleato de Enalapril¹ 0,25mg.k⁻¹, associado a Espironolactona 20mg/kg, via oral (PO), uma vez ao dia (SID), por 15 dias. N = 5 animais.
- Grupo 3 (G3): Pimobendan¹ 0,2mg.k⁻¹, PO, SID, por 15 dias. N = 5 animais.
- Grupo 4 (G4): Cloreto de Sódio 0,9%² 2 ml, PO, SID, por 15 dias. N = 4 animais.

Este período foi denominado “fase terapêutica”.

¹ Vetpharma Manipulação Veterinária LTDA. Rua Barão de Santa Tecla, 774. Pelotas – RS.

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

As doses acima descritas foram adaptadas de AHMIDA et al., (2001) e PAIRAUT (2009), especificamente para coelhos.

Os fármacos para os Grupos 2 e 3 foram manipulados a partir de bases químicas farmacêuticas fornecidas pela Vetpharma Manipulação Veterinária®, em apresentações orais na forma de suspensão, das quais os volumes administrados foram de cerca de 2ml. Após abertos, todos os frascos foram mantidos sob refrigeração, a 4°C até o fim do experimento.

Os animais receberam o fármaco respectivo ao seu grupo uma vez ao dia, sempre pela manhã. Para tal, os animais foram contidos fisicamente pelas orelhas, em posição bipedal e em seguida os compostos foram administrados por via oral com auxílio de uma sonda de gavagem de alumínio, específica para a espécie, conectada a uma seringa de 5ml (Figura 3).



Figura 3 – Administração oral de fármacos por sonda de gavagem em coelho. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

3.8. Avaliação funcional e neuroendócrina miocárdica

As avaliações funcionais e neuroendócrinas foram realizadas conforme descrito nos tópicos seguintes e seguiram o cronograma de execução proposto na Figura 1.

3.8.1. Avaliação eletrocardiográfica

A avaliação eletrocardiográfica convencional foi realizada com os animais posicionados em decúbito esternal conforme preconizado por PARIAUT (2009) e os eletrodos conectados segundo padrão apresentado por SZABUNIEWICZ et al., (1971) e LORD et al. (2010) (Figura 4).

Empregou-se um módulo de aquisição de eletrocardiografia ECG TEB - ECGPC TEB®¹ com o qual foram 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 análises foram realizadas em calibração padrão de 25mm/s e 2N.

As avaliações eletrocardiográficas foram realizadas conforme cronograma de amostragem na Figura 1, totalizando 10 (dez) observações por animal, sendo uma previamente a fase de indução (T0), 3 (três) durante a fase de indução e 6 (seis) durante a fase de tratamento (fase terapêutica).

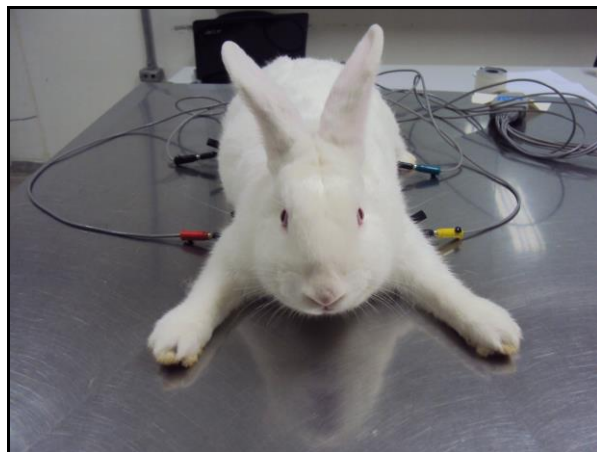


Figura 4 – Eletrocardiografia em coelho. Posicionamento dos eletrodos e decúbito esternal. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

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

3.8.2. Coleta e preparo de material para processamento dos biomarcadores

A quantificação e avaliação dos biomarcadores foram realizadas a partir da obtenção de um volume mínimo de 3ml de sangue venoso por animal, em cada tempo de coleta, conforme cronograma de amostragem apresentado na Figura 1.

Para tal, os animais foram contidos fisicamente sobre uma mesa de procedimento, em decúbito dorsal. 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 (Figura 5).

O material coletado foi repassado a tubos siliconados específicos para centrifugação sangüínea, que ocorreu a 1000G (3000rpm), durante 20 minutos. O sobrenadante (soro sangüíneo) foi repassado a microtubos tipo “ependorf” e mantidos congelados a -70°C em período inferior a 30 dias até o momento do processamento bioquímico conforme protocolos descritos a seguir.

As amostras sangüíneas foram coletadas totalizando 10 (dez) observações por animal, sendo uma previamente a fase de indução (T0), 3 (três) durante a fase de indução e 6 (seis) durante a fase de tratamento (fase terapêutica).



Figura 5 – Contenção física e coleta sangüínea para avaliação sérica dos biomarcadores. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

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

Para a mensuração dos biomarcadores Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) foram utilizados kits comerciais específicos para cada biomarcador (Kamiya Biomedical¹: ACE Cat# KT-51711, ANP Cat# KT-51718 e hs-CRP Cat# KT-097). A metodologia empregada para os ensaios foi o método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

O protocolo para ambos biomarcadores é descrito a seguir de forma conjunta, uma vez que apresentam-se de forma idêntica.

Inicialmente todas as amostras e componentes dos kits foram colocados à temperatura ambiente, 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-1027²) 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-Reader³), 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 por meio de regressão linear.

Para o PNA empregou-se uma curva de concentração entre 0 e 100pg/ml, enquanto para o ECA utilizou-se uma curva de concentração entre 0 e 25ng/ml.

¹ Kamiya Biomedical, 12779 Gateway Drive, Seattle, WA 98168, USA.

² Fluxo Tecnologia LTDA. Rua Ferreira Cardoso, 76, Maria da Graça, Rio de Janeiro – RJ.

³ 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, 2012.

3.8.2.2. Proteína C Reativa de alta sensibilidade (PCR)

Para a avaliação do comportamento da Proteína C Reativa (PCR) foram utilizados kits comerciais específicos para este biomarcador (Kamiya Biomedical®¹). A metodologia empregada neste ensaio foi o método de ELISA.

Primeiramente, as amostras foram diluídas em 600 vezes e todos os componentes do kit colocados a temperatura ambiente, entre 18 e 25°C.

Em seguida, foram adicionados 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, durante 10 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente, os poços foram lavados com solução de lavagem por quatro 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 novamente por cinco 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 por meio de regressão linear.

¹ Kamiya Biomedical. 12779 Gateway Drive, Seattle, WA 98168, USA

Para o PCR empregou-se uma curva de concentração entre 0 e 200ng/ml.

3.9. Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de um protocolo composto por cetamina¹ (40 mg.kg⁻¹) associado a diazepam² (10 mg.kg⁻¹) e a xilazina³ (5 mg.kg⁻¹), todos por via intramuscular (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 µ.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).

3.10. Análise histopatológica

Imediatamente após a eutanásia, foi realizada necropsia dos animais para colheita de material e avaliação histopatológica.

Durante a necropsia os órgãos foram avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies.

Fragmentos de tecidos pulmonar, nervoso, hepático, renal, esplênico e intestinal, com até um centímetro de espessura foram colhidos e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%. O coração foi colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente na altura dos ventrículos e átrios para fixação de fragmentos destas câmaras.

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 histológicos

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 Stevaux, 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.

⁶ Leica - Rua Afonso Celso, 1244. São Paulo – SP.

para posterior processamento em processador automático (Leica®⁶ 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 histossete 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®¹ 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®¹).

3.10.1. 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®).

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

3.11. Análise estatística e interpretação dos dados

Os resultados foram anotados em fichas individuais e as diferenças entre os tempos e tratamentos foram analisadas com programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS), por meio do teste de análise de variância para dados desbalanceados (GLM) e teste T de Student para dados não pareados, ambos com

¹ Hayamax Distribuidora. Rua Angelo Sarabia, Pq. Ind. Castelo Branco, Ibioporã – PR.

² Olympus Optical do Brasil, LTDA. Rua do Rócio, 430 - 2º andar, Vila Olímpia, São Paulo – SP.

$p < 0,05$; regressão linear e correlação de Pearson, considerando-se significativos R^2 e $r > 0,60$, respectivamente.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação do modelo experimental

O modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina conforme proposto para o presente ensaio mostrou-se eficiente, uma vez que foram observadas alterações clínicas e histopatológicas compatíveis com a síndrome. Estas alterações foram observadas em todos os animais que vieram a óbito durante as fases de indução e terapêutica, em maior ou menor intensidade. Ademais, os animais que sobreviveram durante todo o ensaio experimental também demonstraram sinais clínicos (item 4.2) de insuficiência cardíaca congestiva, comprovada ao exame necroscópico ao final do experimento.

A avaliação histológica para validação do modelo experimental foi realizada em todos os animais que vieram a óbito durante a fase de indução e seus achados, somados aos sinais clínicos, permitiram concluir pela eficiência do modelo.

As características histopatológicas são apresentadas na Tabela 1 e Figura 7.

Estes achados são bastante similares às informações disponíveis na literatura sobre este tipo de modelo de insuficiência cardíaca induzida por catecolaminas. De acordo com vários autores, momentos 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. Em poucos dias puderam ser observados focos hemorrágicos, edemas e congestões em diversos órgãos, sobretudo pulmões e o desenvolvimento de tecido fibroso e lesões cicatriciais (VLEET e FERRANS, 1986; JIANG e DOWNING, 1990; MUDERS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

Os achados apresentados para os demais órgãos são similares aos descritos por WILKES et al. (1963) ao descreverem os efeitos da adrenalina sobre diversos órgãos de coelhos recém nascidos. Chama-se a atenção para um achado em particular não listado na Tabela 1 devido ao fato de ter sido observado exclusivamente em um animal e apenas no baço, durante a fase de indução, que é a presença de pontos de calcificação esplênica (Figura 7D). Este foi um achado comum no estudo de WILKES et al. (1963), atribuído a ação da adrenalina neste órgão, além dos demais achados comuns a este experimento, como a congestão e áreas de necrose.

Algumas destas alterações estão ilustradas na Figura 7.

Tabela 1 – Achados histopatológicos em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Orgãos	Achados histopatológicos	Frequência
Coração	Áreas de tecido conjuntivo (Fibrose)	*
	Edema perivascular	*
	Hipertrofia cardiomiócito	**
	Aumento massa ventricular	***
	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	*
	Degeneração centrolobular	**
	Edema	*
	Congestão	**
Rim	Edema perivascular	*
	Congestão	*
Baço	Congestão	*
	Cirroze	*
Intestino	Edema na região submucosa	**

Onde: * regiões discretas e em pequeno número de observações; ** regiões evidentes e freqüentes, *** regiões acentuadas e observadas em grande número de animais.

Estes 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 na avaliação clínica descritiva, no item 4.2.).

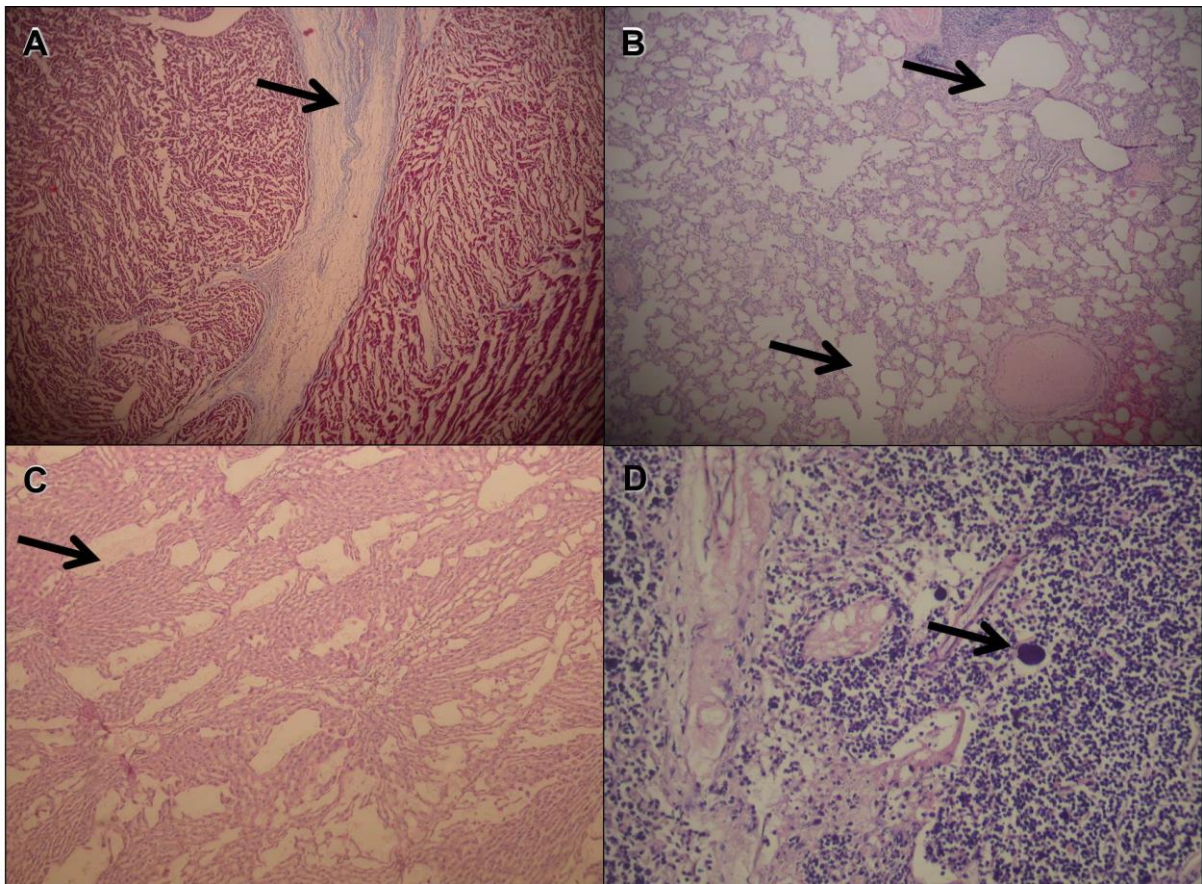


Figura 7 – Microscopia óptica de diferentes tecidos de animais com insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina. Em A, tecido cardíaco com infiltração de tecido conjuntivo fibroso (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em B, tecido pulmonar com áreas de edema pulmonar, espessamento de septo alveolar, enfisema e atelectasias (HE; Aumento 10x). Em C, tecido hepático com degeneração e edema (HE; Aumento 10x). Em D, tecido esplênico com pontos de calcificação (HE, Aumento 10x).

4.2. Avaliação clínica descritiva

A Tabela 2 apresenta de forma descritiva os principais sinais clínicos observados nos animais durante as diferentes fases do experimento. Algumas alterações de necropsia compatíveis com estes sinais clínicos (que os justificam) são apresentadas na Figura 8.

Tabela 2 – Principais sinais clínicos observados nos animais submetidos ao modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Achados clínicos	Frequência de observação							
	Fase indução				Fase terapêutica			
	G1 *n=29		G2 *n=5		G3 *n=5		G4 *n=4	
	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
Dispnéia	26	89,66	3	60	5	100	4	100
Ascite	14	48,28	2	40	4	80	1	25
Efusões (pleural e pericárdica)	11	37,93	1	20	3	60	1	25
Edema pulmonar	15	51,72	1	20	3	60	2	50
Perda de peso	16	55,17	3	60	1	20	4	100
Convulsões	4	13,79	0	0	0	0	1	25
Anisocoria	1	3,45	0	0	0	0	1	25
Paraplegia	1	3,45	0	0	0	0	0	0
Pulso jugular	1	3,45	0	0	0	0	0	0
Epistaxe	2	6,90	0	0	0	0	0	0
Inapetência	18	62,07	2	40	1	20	4	100
Óbito	15	51,72	0	0	0	0	1	25

Analisando a Tabela 2 pode-se perceber que os sinais clínicos foram altamente prevalentes durante a fase de indução, 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 como edema pulmonar, anorexia, dispnéia, ascite e efusão pericárdica, além de um alto índice de óbitos.

Estes óbitos, dispostos cronologicamente na Figura 1, ocorreram em quinze animais durante a fase de indução, sendo oito óbitos na primeira semana após a primeira infusão e sete óbitos na segunda semana após. Apenas uma morte foi observada durante a fase terapêutica, conseqüentemente após a segunda infusão, especificamente no grupo experimental não tratado (G4).

Este modelo apresentou características similares ao modelo proposto por MUDERS et al. (1999), no qual os autores trabalharam com um número de doze animais, com quatro óbitos 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.

Comparando-se momentos equivalentes entre este trabalho e o desenvolvido por MUDERS et al. (1999), pós segunda infusão, a taxa de óbitos foi de 55% contra 42%, respectivamente, tendo os referidos autores alcançado a taxa de 50% de óbitos após sua terceira infusão.

Embora a literatura apresente diversos artigos em que foram utilizados modelos experimentais empregando-se catecolaminas, como 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, de fato, e estes animais excluídos das fases seguintes de suas investigações.

Imediatamente após esta fase, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos para tratamento e a incidência dos achados clínicos em geral tendeu a variações segundo o protocolo utilizado.

De modo geral, o grupo com menor prevalência de sinais clínicos foi o G2, de animais tratados com enalapril associado à espironolactona. Em posição intermediária observa-se o G4, de animais não tratados e, por fim, com maior prevalência de sinais clínicos, observa-se o G3, de animais tratados com o pimobendan.

A melhoria clínica do G2, quando comparada aos demais grupos se deve em função dos efeitos terapêuticos do enalapril associado à espironolactona. Sabe-se que os inibidores da ECA associados aos antagonistas da aldosterona apresentam efeitos clínicos importantes, promovendo incremento da função cardíaca de pacientes com insuficiência cardíaca, reduzindo a morbidade e mortalidade de animais e humanos com ICC de diversas origens (PITT et al., 1999; LAVIOLLE et al., 2006). Estes efeitos benéficos foram observados por diversos autores. GOINEAU et al. (2003) e LAVIOLLE et al., (2006) utilizaram esta combinação em um de seus protocolos para tratamento da cardiopatia dilatada em hamsters e obtiveram resultados positivos no controle da ICC. DABROWSKI et al. (2010) observaram estes efeitos benéficos desta combinação sobre humanos com

fibrilação atrial. MADRON et al. (2011) também comentam sobre os efeitos benéficos desta combinação em cães com degeneração mixomatosa, promovendo redução da tosse, redução da intolerância ao exercício, aumento de apetite e atividade física quando comparada com terapia isoladas ou associadas a outros fármacos.

Entretanto nenhum dos autores supracitados o aplicou sobre um modelo com características similares ao presente estudo, com disfunção diastólica e não sistólica. Embora não tenham sido realizadas avaliações ecocardiográficas para avaliação da função miocárdica, pressupõe-se que este modelo apresente características de insuficiência diastólica devido às características histopatológicas apresentadas, como acentuada hipertrofia cardíaca, hipertrofia dos cardiomiócitos e redução da luz do ventrículo esquerdo e substituição de tecido muscular cardíaco por tecido fibroso. Estes achados de disfunção diastólica são corroborados por LORELL e GROSSMAN (1987).

Porém SATO et al. (2002) conduziram um estudo com pacientes com diagnóstico de hipertensão essencial, com hipertrofia ventricular esquerda e função diastólica reduzida, achados sugestivamente similares a este estudo. Seus resultados apontaram que a terapia combinada também promoveu melhorias significativas na pressão arterial e função ventricular dos pacientes, promovendo melhorias clínicas significativas.

Em oposição aos achados do G2, os animais do G3, tratados com pimobendan, apresentaram vários sinais clínicos de maior intensidade e prevalência quando comparado aos demais grupos, inclusive na fase de indução.

Isto se deve ao fato de que, embora esta droga apresente resultados clínicos excepcionais em humanos e animais com insuficiência cardíaca (FUENTES, 2004; SAYER et al., 2009; SUMMERFIELD et al., 2012), ela deve ser utilizada, e apenas possui seu uso aprovado, em casos de insuficiência sistólica, visto seu potente efeito inotrópico positivo, mesmo que outro efeito bem marcado deste fármaco seja a vasodilatação via inibição da fosfodiesterase III (CHETBOUL et al., 2007; ATKINS et al., 2009, BOSWOOD, 2010). Neste caso, ela interfere negativamente sobre a função miocárdica, aumentando ainda mais a função sistólica da musculatura cardíaca, que já apresentava-se hipertrofiada por razões do modelo experimental utilizado com adrenalina.

Assim, este fato justifica a maior incidência de alterações clínicas no G3 quando comparado ao G4, de animais enfermos não tratados.

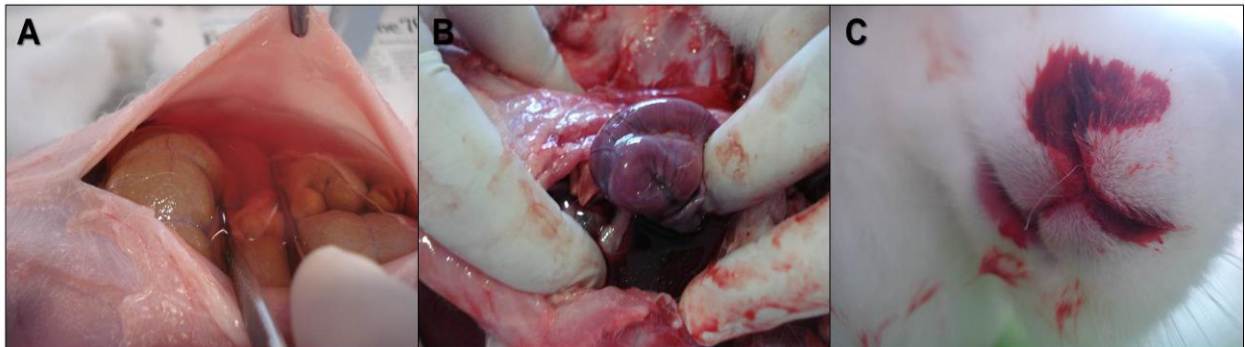


Figura 8 – Achados de necropsia compatíveis com os sinais clínicos observados no modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida pela adrenalina. Em A, observa-se ascite, em B efusão pleural e pericárdica hemorrágica, em C epistaxe. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

4.3. Peso corporal

Os resultados da avaliação do peso corporal dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 9.

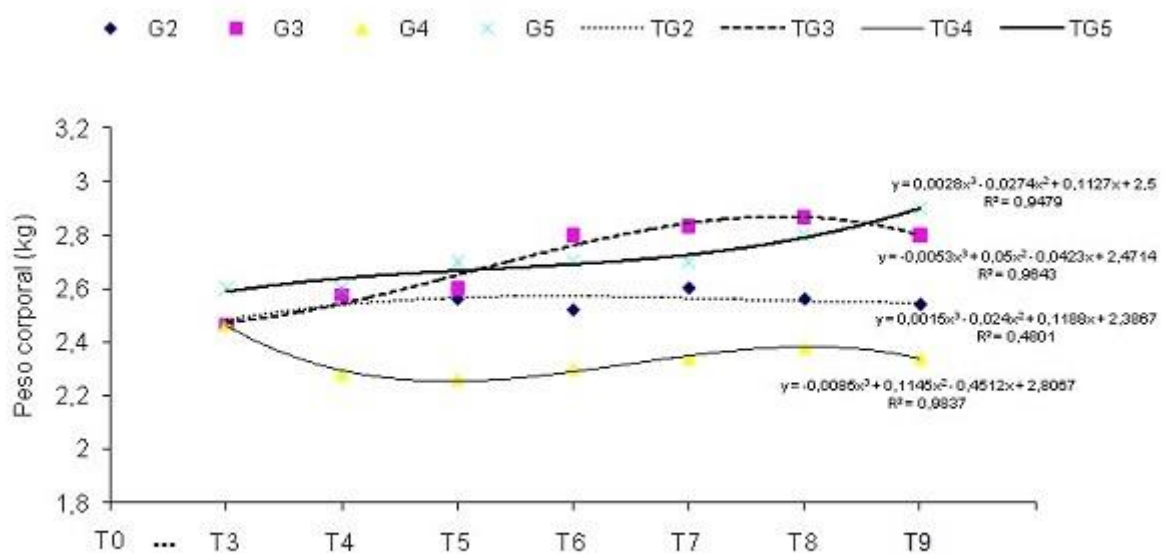


Figura 9 – Comportamento da variável peso corporal sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

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, além de

serem observadas diferenças significativas para alguns destes grupos ao longo do tempo (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise estatística para as variáveis-resposta peso corporal, peso cardíaco e morfometria das fibras cardíacas. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05		Regressão linear			
	Tratamento	Tempo	G2	G3	G4	G5
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com R2 > 0,60			
Peso corporal	*	*	0,4801	0,9643	0,9837	0,9479
Peso cardíaco	*	Ns	-	-	-	-
Morfometria	*	Ns	-	-	-	-

Analisando-se os resultados através da regressão linear observa-se que, com exceção ao G2 (R2=0,4801), todos os grupos estudados sofreram alterações significativas ao longo do tempo de estudo (R2-G3=0,9643 e R2-G4=0,9837 e R2-G5=0,9479). Ademais todos os grupos apresentaram curvas de tendência de comportamento cúbico. Isso permite inferir que a variável-resposta peso corporal apresentou um comportamento oscilante durante a investigação.

Inicialmente realizando-se uma análise isolada do ponto de partida da fase terapêutica, T3, percebe-se que os animais que receberam adrenalina apresentaram um retardo no seu desenvolvimento e ganho de peso corporal quando comparados aos animais do grupo controle. Esta situação é idêntica aos resultados de WILKES et al. (1963), ao administrarem adrenalina sucessivamente em coelhos recém nascidos durante seis semanas. Os animais que receberam o fármaco se desenvolveram consideravelmente mais que os outros.

Em uma análise dos dados ao longo da fase terapêutica, percebe-se que o G5, grupo de animais não doentes, 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 nota-se que o G4, grupo de animais doentes e não tratados, apresentou uma tendência de perda de peso nos momentos subseqüentes a instalação da doença cardíaca (T4 e T5), com discreta tentativa de estabilização do peso corporal nos momentos seguintes até o fim da investigação. De acordo com a literatura, em humanos a perda de peso é um evento comum durante a insuficiência cardíaca e está relacionado à piora do estado clínico do paciente

(ATKINS et al., 2009; BOCCHI et al. 2009; LORD et al. 2011). Em animais esta situação também pode ocorrer. Esta característica foi observada por HÉLIÈS-TOUSSAINT et al. (2005) em pesquisa sobre insuficiência cardíaca através da colocação de uma bandagem aórtica em ratos e por FARIA et al. (2011) avaliando-se o efeito do infarto miocárdico sobre o peso corporal em ratos.

Atenta-se, ainda, ao fato de que o único animal que veio a óbito durante a fase terapêutica compunha o G4, e o óbito foi constatado exatamente durante o T5. Segundo LOPEZ-JIMENEZ et al. (2008) e FARIA et al. (2011) a perda de peso pode estar associada a severidade da insuficiência cardíaca, podendo ser considerada um dos elementos durante a avaliação clínica do paciente. Dessa maneira, acredita-se que o óbito observado neste ponto possa estar relacionado à evolução clínica do processo de instauração da insuficiência cardíaca.

O G2, grupo de animais tratados com o enalapril associado à espirolactona, apresentou uma tendência de estabilização do peso ao longo do tempo, sem grandes variações significativas ($R^2=0,4801$). A literatura demonstra que os inibidores da ECA aumentam a qualidade e expectativa de vida e reduzem a intolerância ao exercício em animais com esta síndrome (POUCHELON et al. 2008; ATKINS et al. 2009). Entretanto, com suas funções orgânicas parcialmente restabelecidas é contraditório o fato destes animais não terem ganhado peso ao longo da investigação. Isto se deve ao fato de que esta droga retarda o ganho de peso de animais e humanos tratados com este tipo de fármaco, por meio de uma interferência no metabolismo lipídico (MASUO et al., 2001; SANTOS et al. 2008; SANTOS et al., 2009).

Já os animais do G3, tratados com pimobendan apresentaram o maior ganho de peso dentre os grupos doentes estudados, entre T3 e T8. Este resultado poderia estar correlacionado a grande eficiência do pimobendan no controle dos sinais clínicos da insuficiência cardíaca, reduzindo o desconforto causado pela enfermidade. De acordo com a literatura, o pimobendan está relacionado à redução da intolerância ao exercício, redução do consumo de oxigênio, além de aumentar a qualidade de vida (KUBO et al., 1992; FUENTES et al., 2002), proporcionando retorno as atividades normais, como a alimentação. Entretanto seu efeito real sobre o peso corporal não está bem documentado na literatura. Em pesquisa com seis cães, adultos e assintomáticos, CHETBOUL et al., (2007) observaram que administração do pimobendan não representa alterações significativas no peso dos

animais ao longo do tempo, entretanto a comparação com a presente pesquisa deve ser feita de forma crítica, visto a diferença marcante entre as espécies, idade, estado de evolução e tipo de doença cardíaca entre as metodologias propostas.

Entretanto, especificamente neste caso, deve-se atentar ao fato de que o pimobendan, conforme descrito anteriormente, é indicado e aprovado para utilização em casos de insuficiência sistólica, e que sua utilização neste caso pode ter contribuído para maior incidência de derrames cavitários e edemas, conforme demonstrado na Tabela 2, o que também justificaria a maior elevação de peso neste grupo de animais. 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 aumento de volemia, retenção hídrica e edemas.

4.4. 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, 2012.

Análise estatística	ANOVA GLM p<0,05		Regressão linear			
	Tratamento	Tempo	G2	G3	G4	G5
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com R2 > 0,60			
ECA	*	*	0,8804	0,5831	0,8343	0,5365
PNA	ns	*	0,6193	0,6810	0,5559	0,5321
PCR	*	Ns	0,9645	0,9062	0,9333	0,5444

4.4.1. Peptídeo Natriurético Atrial (PNA)

Os resultados da avaliação do Peptídeo Natriurético Atrial (PNA) dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 10.

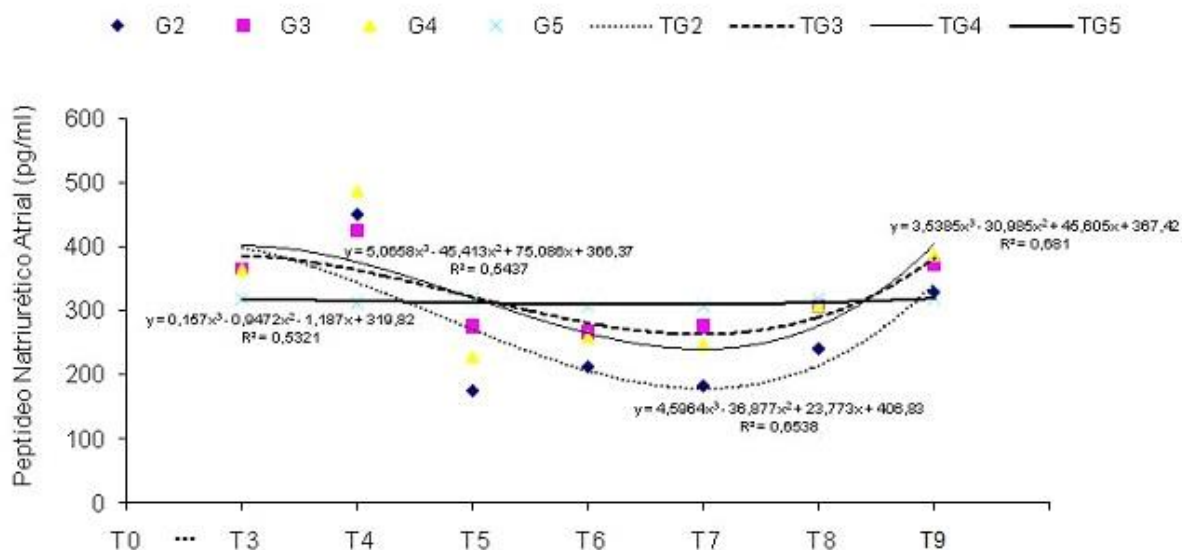


Figura 10 – Comportamento da variável Peptídeo Natriurético Atrial sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

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. Entretanto, estudando o comportamento destes grupos ao longo do tempo, foram observadas alterações significativas (Tabela 3).

Por meio da regressão linear pôde-se identificar que estas variações de comportamento individualizado ao longo do tempo ocorreram em G2 e G3, onde $R^2 = 0,6538$ e $R^2 = 0,681$, respectivamente. Estas variações foram consideradas significativas embora apresentem um R^2 relativamente baixo.

Em oposição, G4 e G5 não apresentaram variação de comportamento significativa, com $R^2 = 0,5437$ e $R^2 = 0,5321$, respectivamente.

Conforme observado na Figura 10, em valores reais, ao longo de todo o experimento, o PNA do grupo 5 manteve um valor médio de $313,71 \pm 4,99$ pg/ml, sem

grandes variações, sendo, então, tomado como base para inferências sobre os demais grupos.

Os grupos 2, 3 e 4 apresentaram uma curva resposta bastante similar, o que justifica não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ao longo do tempo, entretanto as amplitudes destas curvas resposta foram bem diferenciadas.

Observa-se que no momento inicial da fase terapêutica, T3, o valor médio da concentração de PNA para os grupos de animais enfermos foi de $364,05 \pm 123,34$ pg/ml, acima daquele obtido para o grupo 5 no mesmo tempo de investigação, de $318,16 \pm 12,74$ pg/ml. Observa-se, de fato, um elevado desvio-padrão neste ponto, o que corrobora a não observância de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Entretanto, esta elevação da concentração sérica de PNA nos grupos 2, 3 e 4 quando comparados ao G5, em T3, ocorreu em virtude das infusões prévias de adrenalina, desencadeando taquicardia, insuficiência cardíaca e alterações cardíacas estruturais importantes. De acordo com ABASSI et al. (2004), SEIXAS-CAMBÃO e LEITE-MOREIRA (2009), 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. Esta liberação ocorre mediante aumento e distensão atrial (CROZIER et al., 1987; SAGNELLA, 1998), elementos observados nesta investigação (Item 4.1.).

Segundo a literatura, a concentração sérica de PNA pode elevar-se devido à 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 aumento da pressão atrial e disfunção ventricular (FYHRQUIST E TIKKANEN, 1988; STEVENS et al., 1995; SAGNELLA, 1998; ABASSI et al., 2004). Estes autores relatam, ainda, que a proporção desta elevação está relacionada à severidade da enfermidade. Estas informações da literatura corroboram os achados nesta pesquisa, visto a observação tanto de insuficiência cardíaca com disfunção diastólica, como elevação na concentração sérica de PNA nos animais estudados.

Estas informações originam-se de pesquisas, até certo ponto, similares a este estudo. RANKIN et al. (1986) estudaram em coelhos o comportamento da

concentração sérica de PNA durante a taquicardia induzida por estimulação elétrica no átrio direito, observando um aumento significativo da concentração deste peptídeo.

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.

As informações anteriores elucidam o comportamento sérico do PNA em T3 para os três grupos de animais que receberam adrenalina para indução do modelo experimental de insuficiência cardíaca. Entretanto, deste ponto em diante, pode-se observar na Figura 10 que houve uma redução destes valores nos momentos subsequentes em todos os grupos estudados, tendendo, ao fim do experimento, a uma aproximação dos valores do grupo controle.

Especificamente no G4, com animais doentes não tratados, esta redução da concentração dos níveis de PNA está de acordo com os achados de MUDERS et al (1999), que propuseram um modelo semelhante de insuficiência cardíaca induzida por adrenalina em coelhos e avaliaram seu efeito sobre o PNA. Estes autores relatam que após cada infusão de adrenalina os níveis de PNA aumentavam consideravelmente, provavelmente por causa da distensão atrial e taquicardia, porém decresciam e aproximavam-se dos valores basais cerca de dez dias após, de forma parecida com os resultados observados neste estudo, entretanto não esclarecem o motivo deste comportamento. Pressupõe-se que neste estudo as elevações transitórias das concentrações de PNA tenham ocorrido em virtude da distensão atrial, em virtude do aumento das pressões intracardíaca e vascular periférica causada pela adrenalina.

Este comportamento sérico do PNA do G4 não diferiu estatisticamente do comportamento do G2 e G3, entretanto foi possível observar, através das amplitudes de resposta, que fisiologicamente elas apresentaram certa variação.

Quando comparados os grupos 2, 3 e 4 ao grupo 5, nota-se que o grupo 2 apresentou uma variação de maior amplitude quando comparada aos grupos 3 e 4, tomando-se como base a maior área virtual delimitada pelos dois pontos de interseção entre as curvas de tendência destes grupos e a curva de tendência do grupo 5 (Figura 10).

Esta área virtual referente ao G2 permite inferir que dentre os três grupos estudados na fase terapêutica, utilizando-se especificamente o PNA como biomarcador, a associação enalapril/espironolactona foi a mais eficiente no controle da síndrome de insuficiência cardíaca causada pela adrenalina, por ter reduzido de forma mais rápida sua concentração, mantido em valores mais baixos por um maior período de tempo e, finalmente, por tê-la aproximado mais dos valores do G5 ao final do experimento, em T9, quando comparado aos demais grupos estudados (Tabela 5). Infere-se tal afirmativa pela ação sinérgica do protocolo enalapril/espironolactona no tocante a redução da pré-carga e, conseqüentemente, das pressões venosas e intracardíaca.

Um estudo clínico realizado em humanos por BENEDICT et al. (1995) demonstrou que os pacientes com insuficiência cardíaca tratados com enalapril ao longo de 40 meses de investigação apresentaram melhorias clínicas, associadas a redução dos níveis de PNA. Neste estudo, inclusive aqueles que receberam placebo também tiveram os níveis de PNA decrescidos, entretanto de forma menos significativa que os que receberam o inibidor da ECA. Este resultado coincide com os observados no presente trabalho, onde os animais tratados com o enalapril melhoraram clinicamente e mostraram evidente queda nos níveis de PNA, enquanto o grupo de animais enfermos não tratados também apresentou redução dos níveis do peptídeo, entretanto de forma menos vertiginosa que os que receberam o enalapril.

Ainda de acordo com BENEDICT et al. (1995), este efeito ocorre devido ao enalapril reduzir a pressão intracardíaca e nas vias de saída ventriculares, proporcionando redução da sobrecarga e distensão atrial, conseqüentemente reduzindo a liberação de PNA na corrente sanguínea.

Outros autores também observaram resultados similares acerca do PNA em pacientes tratados com inibidores da ECA.

KATOH et al. (1986) observaram a eficiência dos inibidores da ECA sobre a concentração de PNA em pacientes com insuficiência cardíaca. Em sua experiência

em caso clínico humano, os autores observaram que após a administração de captopril o paciente apresentou melhoras clínicas significativas, associada à redução dos níveis séricos de PNA, previamente elevados. Uma vez controlada a síndrome, a terapia foi suspensa e os sinais clínicos voltaram a aparecer, associado a um novo aumento do PNA. Por fim, reintroduziram a mesma terapia, com sucesso clínico e nova redução sérica do PNA, suportando a idéia de associação entre os níveis plasmáticos do peptídeo e a severidade da doença.

BOLDT et al. (1995) observaram este mesmo comportamento de redução dos níveis de PNA em pacientes submetidos a um *bypass* aorto-coronário que receberam o enalaprilato (forma ativa intravenosa do enalapril) previamente a cirurgia.

Embora a redução dos níveis séricos de PNA no Grupo 2 estejam evidentes em função da utilização do enalapril, deve-se atentar ao fato de que a associação da espironolactona também pode ter colaborado de maneira importante neste resultado. Segundo TSUTAMOTO et al. (2001), pacientes com insuficiência cardíaca congestiva apresentam redução nos níveis de PNA quando tratados com espironolactona também. Os autores descrevem que este mecanismo está associado à redução da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo e a prevenção da fibrose associada ao remodelamento ventricular desencadeado pelas ações deletérias da aldosterona no miocárdio.

Tabela 5 – Concentração sérica média de Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml) nos tempos 3 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	364,05±123,34	364,05±123,34	364,05±123,34	318,16±12,74
MÉDIAS / T9	328,48±99,98	372,22±102,61	387,02±95,97	317,5797±42,46

Utilizando-se o mesmo princípio gráfico, deduz-se que o pimobendan mostrou-se pouco eficiente no controle da insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina, observando-se o PNA como biomarcador, uma vez que a área virtual produzida pela interseção de sua curva de tendência com o grupo controle foi muito próxima, embora maior do que aquela observada na interseção entre o grupo doente não tratado e o grupo 5. Ademais, ao final do experimento, sua média de

concentração absoluta mostrou-se mais próxima da média dos animais doentes não tratados (G4) do que do grupo controle (G5).

Este evento de redução dos níveis séricos de PNA em pacientes tratados com pimobendan é similar aos achados de SHIMIZU et al (1998), quando estes autores investigaram os efeitos deste fármaco em pacientes humanos com insuficiência cardíaca assintomática. Esta informação é corroborada por um estudo do grupo EPOCH (2002), que avaliou os efeitos do pimobendan sobre o PNA em pacientes com insuficiência cardíaca leve a moderada. Da mesma forma, FUENTES et al. (2002) relatam este efeito de redução do PNA em pacientes caninos com cardiomiopatia dilatada tratados com o pimobendan. Estes autores apenas informam este achado, sendo a hipótese explicativa descrita por SASAKI et al. (1999), atribuindo este efeito a redução do volume cardíaco causada pelo fármaco, em vistas ao seu efeito vasodilatador através da inibição da fosfodiesterase III. Com a redução do volume cardíaco, ocorre, por consequência, redução da pressão atrial e da distensão de suas paredes, inibindo ou reduzindo liberação do PNA pelos grânulos especializados ali localizados.

4.4.2. Proteína C Reativa (PCR)

Os resultados da avaliação da concentração sérica da Proteína C Reativa (PCR) dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 11.

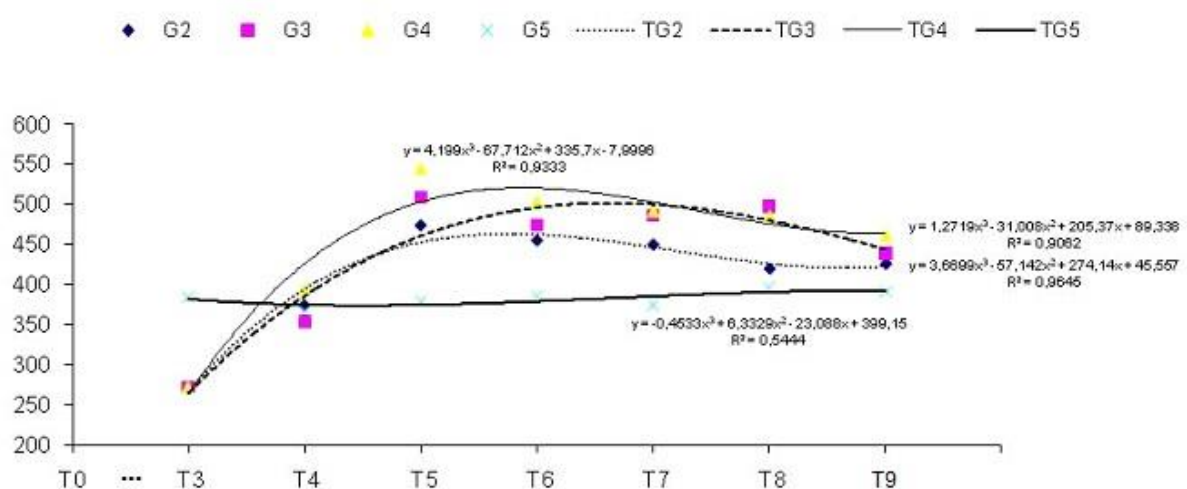


Figura 11 – Comportamento da variável Proteína C Reativa de alta sensibilidade sob diferentes

tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta PCR 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 3).

Todavia, por meio de uma avaliação subsequente por meio da regressão linear pode-se perceber novamente uma tendência de alteração nos valores da variável-resposta em questão no momento final do estudo em relação ao momento inicial da fase terapêutica. Por meio desta regressão linear pôde-se identificar que estas variações de comportamento individualizado ao longo do tempo ocorreram nos grupos G2, G3 e G4, com $R^2=0,9645$, $R^2=0,9062$ e $R^2=0,9333$. Já o grupo controle (G5) não observou alteração significativa pela regressão, com $R^2=0,5444$.

Pontualmente, a primeira característica do comportamento desta variável-resposta que chama a atenção é o fato da concentração sérica deste biomarcador nos grupos 2, 3 e 4 estar com valores abaixo daqueles observados no grupo controle no primeiro tempo de avaliação da fase terapêutica (T3) (Tabela 6).

Entretanto, ao longo do experimento, na fase de indução, este comportamento de baixa concentração não foi o mesmo observado, tendo este biomarcador apresentado um pico (resultados não demonstrados) em T1, cerca de sete dias após a primeira infusão de adrenalina, reduzindo-se constantemente por até vinte dias após a primeira infusão. 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 uma vez após a primeira infusão de adrenalina. Neste caso, o que demarcadamente chama a atenção é o fato desta concentração sérica de PCR ter mantido-se elevada por um período demasiadamente longo quando comparada a sua meia-vida em pacientes infartados.

Coincidentemente observa-se que em T3 (já na fase terapêutica), cerca de oito dias após a segunda infusão, estes valores séricos voltaram a elevar-se em todos os quatro diferentes grupos estudados, atingindo um novo pico em T5,

cronologicamente quinze dias após a segunda infusão de adrenalina. Após este segundo pico, estes valores voltaram a decrescer, em menor velocidade, até o final do experimento.

Tabela 6 – Concentração sérica média de Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml) nos tempos 3, 5 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Proteína C reativa de alta sensibilidade (ng/ml)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	45,40	45,40	45,40	64,04
MÉDIAS / T5	79,87	84,72	90,85	63,23
MÉDIAS / T9	71,19	73,15	77,72	65,27

Acerca da concentração sérica de proteína C reativa, a literatura é unânime ao descrever que em situações de isquemia miocárdica aguda (infarto agudo do miocárdio) em humanos os valores séricos de PCR aumentem vertiginosamente em até seis horas após evento isquêmico propriamente dito. Esta elevação sérica ocorre devido ao processo inflamatório e remodelamento arterial e cardíaco desencadeado pela morte tecidual pós isquêmica. Entretanto, 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).

Estas informações da literatura acerca do comportamento sérico desta proteína divergem dos resultados observados no presente estudo, visto que classicamente em processos cardíacos isquêmicos sua concentração eleva-se e declina-se rapidamente, enquanto no estudo em tela esta variação (elevação e redução) ocorreu de forma mais lenta, sendo observados os picos cerca de sete a quinze dias após o insulto cardíaco promovido pela administração de adrenalina, seguidos de uma redução tardia.

Sugere-se que este comportamento diferenciado possa estar correlacionado às diferenças fisiopatológicas observadas entre o infarto agudo do miocárdio e o modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva através da administração de adrenalina. O primeiro caso cursa com uma obstrução abrupta do fluxo sanguíneo coronariano, proporcionando um quadro isquêmico agudo pontual, enquanto no segundo pressupõe-se o envolvimento de vasoconstrição progressiva das coronárias pela ação da adrenalina, causando, assim, um quadro de hipóxia miocárdica transitória. Soma-se a este fato a questão tóxica tecidual direta da

adrenalina 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 desta droga administrada de forma excessiva.

Em relação as discretas alterações observadas no comportamento da concentração sérica de PCR entre os grupos 2, 3, 4 ao longo do tempo, cabe destacar, principalmente, que o grupo que apresentou menor tendência de elevação sérica de PCR na fase terapêutica foi o grupo 2. Novamente torna-se importante a interpretação deste comportamento por meio da observação de uma menor área virtual delimitada pelos dois pontos de interseção entre as curvas de tendência dos grupos 2 e controle, quando comparadas àquelas áreas virtuais geradas pela interseção das linhas dos demais grupos com o grupo controle (Figura 11). Desta maneira, pode-se inferir que o grupo 2 (enalapril/espironolactona) foi aquele que apresentou menor variação sérica de PCR entre os grupos estudados, mesmo que sua concentração também tenha se elevado.

De acordo com PRASAD (2006) e ARGANI et al. (2008) o sistema renina-angiotensina-aldosterona é responsável, dentre outras importantes funções, pela produção de angiotensina II, uma importante molécula com propriedades pró inflamatórias. Este processo inflamatório é considerado mecanismo chave para o início, progressão e seqüelas clínicas das doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, nefropatias e cardiomiopatias. Neste princípio, vários estudos foram conduzidos observando a eficiência de diversos inibidores da enzima conversora de angiotensina sobre a redução das concentrações séricas de PCR.

Assim, segundo PRASAD (2006), resultados positivos foram observados com o emprego de drogas como o ramipril, quinapril, fosinopril, captopril em pacientes com infarto miocárdico, insuficiência cardíaca, humanos e coelhos com aterosclerose.

Por outro lado, PRASAD (2006), corroborado por ARGANI et al. (2008) e ZAMANI et al. (2012), ainda observam que drogas como trandolapril e enalapril não mostram-se eficientes para a redução sérica de PCR em pacientes com infarto miocárdico ou renais transplantados, atribuindo esta ineficiência do enalapril a sua característica de baixa penetrabilidade tecidual, seja em utilização em curto ou longo prazo, mesmo contrapondo os resultados positivos obtidos por TAKEDA et al. (2003), que afirmam que o enalapril possui certa atividade antiinflamatória, avaliada pela redução dos níveis de PCR em pacientes com doença cardíaca isquêmica.

No presente estudo, nota-se claramente que, mesmo na presença de enalapril, a concentração sérica de PCR elevou-se novamente após a segunda infusão de adrenalina, fato que corrobora as informações anteriormente apresentadas por PRASAD (2006), ARGANI et al. (2008) e ZAMANI et al. (2012) sobre a possível ineficiência do enalapril frente ao controle sérico de PCR, entretanto é relevante destacar que esta concentração de PCR não se elevou como a concentração sérica dos demais grupos, cabendo a insinuação de que esta droga possa, sim, interferir, sobre a concentração sérica de PCR, mesmo que em menor proporção quando comparada a outros inibidores da ECA.

Por fim, pode-se, também suscitar a idéia de envolvimento da espironolactona sobre a redução dos níveis séricos de PCR, visto que o bloqueio à aldosterona sobre o miocárdio também possa contribuir de forma significativa sobre a instauração do processo inflamatório cardíaco. Entretanto, GODFREY et al. (2007) avaliaram os efeitos da utilização da espironolactona sobre a concentração sérica de PCR em pacientes com insuficiência cardíaca, concluindo o estudo afirmando a não evidência de que a espironolactona possua propriedades antiinflamatórias em pacientes com insuficiência cardíaca crônicos estáveis ou angina. Entretanto, novamente no caso da presente pesquisa, não se pode descartar tal possibilidade, visto que o grupo composto pelo enalapril associado à espironolactona foi aquele que apresentou a tendência de manutenção dos valores séricos de PCR mais próximos daqueles observados no grupo controle, além do fato de que o processo inflamatório desencadeado neste caso não ter sido, exclusivamente, em função da angiotensina II ou da aldosterona, mas, em grande parte, pela ação tóxica direta da adrenalina sobre os tecidos.

4.4.3. Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

Os resultados da avaliação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 12.

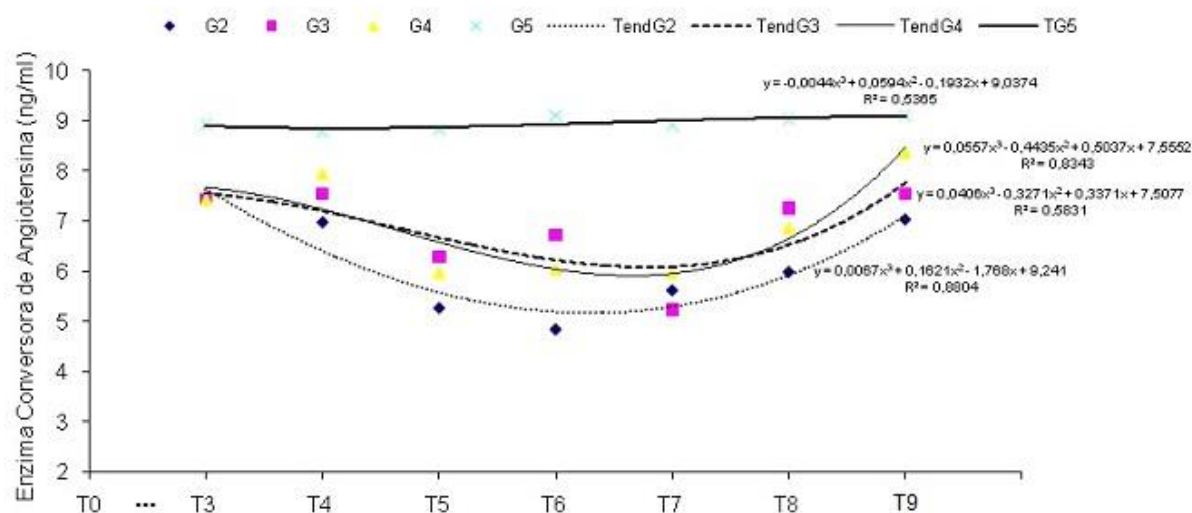


Figura 12 – Comportamento da variável Enzima Conversora de Angiotensina sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Por meio 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, além de serem observadas diferenças significativas para alguns destes grupos ao longo do tempo (Tabela 3).

Analisando-se os resultados por meio da regressão linear observa-se que G2 e G4 apresentaram alterações significativas ao longo do tempo de estudo ($R^2=0,8804$ e $R^2=0,8343$, respectivamente), enquanto para G3 e G5 não foram observadas alterações significativas ao longo do tempo ($R^2=0,5831$ e $0,5365$).

Em valores absolutos percebe-se que as médias de concentração sérica de ECA nos grupos 2, 3 e 4 apresentaram valores inferiores àquele observado para a concentração sérica de ECA em G5 (controle) (Tabela 7). Excetuando-se o grupo controle, os demais grupos estudados apresentaram um comportamento similar durante a investigação, caracterizado por um decréscimo contínuo até um início de recuperação em T7. Estes valores estiveram abaixo dos valores observados no

grupo controle por quase todo o período de experimentação, apresentando uma tendência de elevação a partir de T7.

Tabela 7 – Concentração sérica média de Enzima Conversora de Angiotensina (ng/ml) nos tempos 3, 7 e 9 da fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Enzima Conversora de Angiotensina (ng/ml)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	7,44	7,44	7,44	8,93
MÉDIAS / T7	5,62	5,24	5,97	8,91
MÉDIAS / T9	7,04	7,55	8,36	9,11

Avaliando-se de forma objetiva as amplitudes de resposta ao longo do tempo dos grupos estudados tomando-se como base a área virtual delimitada pelos dois pontos de interseção entre as curvas de tendência destes grupos e a curva de tendência do grupo 5 (Figura 12), percebe-se que o grupo que apresentou a maior tendência de redução destes valores foi o G2, caracterizado, ainda, por uma recuperação inferior àquela observada nos demais grupos.

De acordo com a literatura, 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 demonstrados neste estudo (item 4.1) demonstraram graves lesões pulmonares durante a instauração do modelo experimental de ICC induzida pela adrenalina 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 grupos estudados.

Em oposição a esta redução, a partir de T7 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 e CARVALHO, 2000; SISSON, 2004).

Por fim, a maior amplitude na variação do comportamento sérico da ECA do G2 em relação aos demais grupos justifica-se pela utilização de um inibidor da ECA, justamente um fármaco que bloqueia a atividade desta enzima, de forma similar aos resultados de HOSHIDA et al. (1997) em estudo sobre os efeitos do enalapril sobre a atividade da ECA em coelhos sob dieta rica de colesterol.

4.5. 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: Frequência cardíaca, ritmo cardíaco, amplitude e duração de P e QRS.

Tabela 8 – Análise estatística para as variáveis-resposta eletrocardiográficas. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Análise estatística	ANOVA GLM $p < 0,05$		Regressão linear			
	Tratamento	Tempo	G2	G3	G4	G5
	* = Significativo ; ns = não significativo		Interação variável x tempo. Significativo com $R^2 > 0,60$			
Frequência cardíaca	*	ns	0,9973	0,9474	0,9800	0,4339
Duração P	*	ns	0,5298	0,9744	0,5309	0,7437
Amplitude P	*	*	0,9582	0,7622	0,4879	0,6634
Duração QRS	*	ns	0,9450	0,1997	0,3593	0,5936
Amplitude QRS	*	*	0,8810	0,9520	0,8164	0,9737
Intervalo PR	*	ns	0,8157	0,8822	0,4554	0,8184
Intervalo QT	*	ns	0,7032	0,9630	0,1415	0,8172
Amplitude T	Ns	ns	0,9850	0,4875	0,1526	0,9253

4.5.1. Freqüência cardíaca

Os resultados da avaliação da freqüência cardíaca (FC) dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 13.

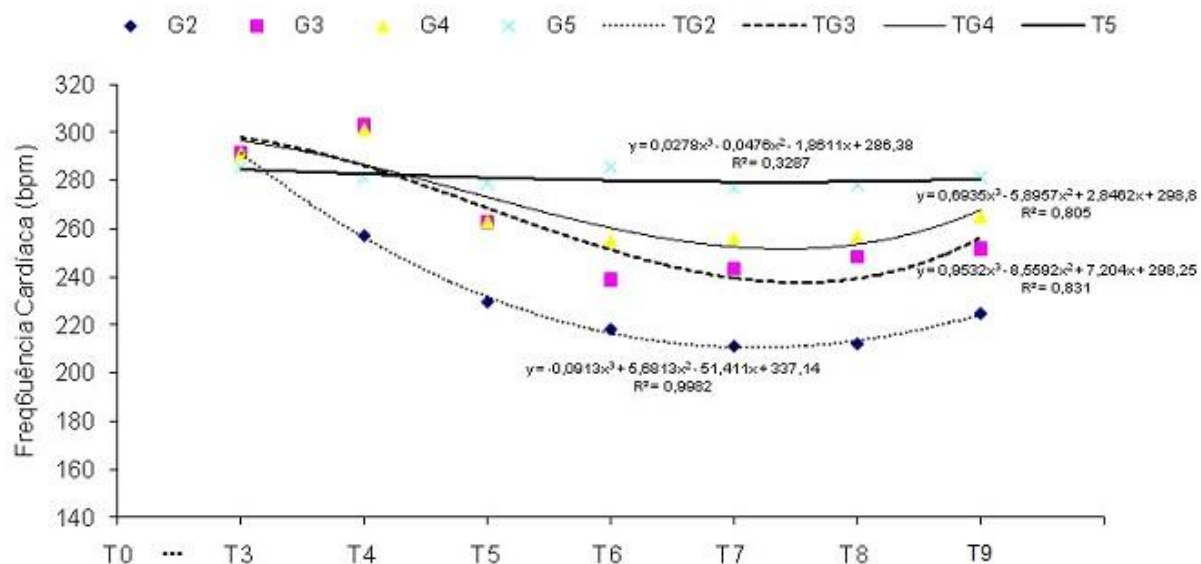


Figura 13 – Comportamento da variável Freqüência cardíaca sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta freqüência 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 3).

Todavia, por meio de uma avaliação subsequente através da regressão linear pode-se perceber novamente uma tendência de alteração nos valores da variável-resposta em questão no momento final do estudo em relação ao momento inicial da fase terapêutica (Tabela 9).

Por meio da regressão linear pôde-se identificar que estas variações de comportamento individualizado ao longo do tempo ocorreram nos grupos G2, G3 e G4, com $R^2=0,9973$, $R^2=0,9474$ e $R^2=0,9800$. Já o grupo controle (G5) não observou alteração significativa pela regressão, com $R^2=0,4339$.

Tabela 9 – Frequência cardíaca média nos tempos 3, 4 e 9 para todos os grupos estudados na fase terapêutica. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Frequência cardíaca (bpm)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	302,44	302,44	302,44	276
MÉDIAS / T4	257,12	302,80	301,25	283,33
MÉDIAS / T9	224,80	251,62	265,33	281,29

A análise dos resultados apresentados na Figura 13 e Tabela 9 permite observar que no início da fase terapêutica (T3) a frequência cardíaca apresentava-se mais elevada nos animais dos grupos experimentais 2, 3 e 4, quando comparados aos animais do grupo controle (G5).

Atribui-se esta elevação da frequência cardíaca nestes grupos, neste momento, a instauração e progressão do processo de insuficiência cardíaca.

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 e 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 e 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, requerendo estratégias terapêuticas adequadas (PALATINI, 2011; AKYÜZ et al., 2013).

Neste estudo, a partir dos tempos seguintes já é possível observar uma redução da frequência cardíaca, de diferentes intensidades, em cada um dos grupos estudados.

Notadamente esta redução foi mais rápida e intensa em G2 quando comparado aos demais grupos, observando-se uma queda brusca neste grupo já em T4, enquanto os demais grupos iniciaram algum tipo de resposta, mesmo que reduzida, apenas em T5.

Novamente faz-se relevante ressaltar o emprego do enalapril no grupo 2. De acordo com a literatura, em situações de insuficiência cardíaca que curse com frequência elevada, faz-se necessário o controle farmacológico adequado desta, seja com o uso de betabloqueadores ou inibidores da ECA. Entretanto, embora os betabloqueadores possam parecer mais indicados para este fim, devido ao efeito cronotrópico negativo direto conferido pelo bloqueio dos receptores β às catecolaminas, os inibidores da ECA apresentam um importante papel no controle da frequência cardíaca, visto as características de ação inibitória vagal da angiotensina II (COWIE E DAVIDSON, 2012; HORI e OKAMOTO 2012) e de promover uma redução dos níveis plasmáticos de norepinefrina (GÜRLEK et al., 1994).

De acordo com HORI e OKAMOTO (2012) e AKYÜZ et al. (2013) este controle farmacológico da frequência cardíaca reduz o consumo de energia pelo miocárdio, aumenta o suprimento sanguíneo e de oxigênio à musculatura cardíaca, incrementa a diástole e reduz a pós-carga ventricular, reduzindo, conseqüentemente, a mortalidade associada a insuficiência cardíaca. Assim, acredita-se que esta possa ser, inclusive, uma das justificativas para a não observação de óbitos no grupo 2 deste experimento (item 4.2) , ao contrário do observado nos demais grupos de animais.

Em relação ao grupo 3, observa-se que a frequência cardíaca permaneceu mais elevada quando comparada ao grupo 2 ao longo da fase terapêutica, entretanto esta diferença entre a frequência destes grupos não foi de grande amplitude. Tal fato pode ser atribuído ao fraco efeito cronotrópico positivo do pimobendan, descrito por DUNCKER e al. (1987) e KITZEN et al. (1988), da ordem de aproximadamente 30%.

Entretanto, percebe-se que, mesmo na presença do pimobendan, e ainda sendo mais elevada que no grupo 2, a frequência cardíaca no grupo 3 reduz a partir de T4, similarmente ao grupo 4, de animais doentes não tratados. Isto permite inferir que, independentemente do tipo de tratamento adotado, a tendência de comportamento da frequência cardíaca neste estudo foi de taquicardia momentos após a infusão de adrenalina, porém uma taquicardia que, controversamente, mesmo com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, não se sustentou durante os demais tempos de investigação. Como anteriormente descrito, esta taquicardia

inicialmente observada é um reflexo mediado por barorreceptores (HORI e 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).

4.5.2. Ritmo cardíaco

A Tabela 10 apresenta de forma descritiva as principais alterações de ritmo cardíaco observadas nos animais durante a fase terapêutica do experimento.

Tabela 10 – Principais alterações de ritmo cardíaco em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Arritmia cardíaca	Frequência de observação					
	Fase terapêutica					
	G2 *n=5		G3 *n=5		G4 *n=4	
	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
Complexo ventricular prematuro (isolado)	1	20	0	0	0	0
Complexo ventricular prematuro (multifocal)	0	0	1	20	0	0
Taquicardia ventricular paroxística	0	0	2	40	0	0
Complexo atrial prematuro	0	0	1	20	0	0
Taquicardia supraventricular	1	20	2	40	1	20
Taquicardia ventricular sustentada	0	0	1	20	1	0

Por meio da análise desta tabela pode-se perceber que as arritmias cardíacas ocorreram em todos os grupos estudados, em menor ou maior intensidade e frequência, observando-se eventos demarcadamente atriais, ventriculares e taquicardias.

Segundo GÜRLEK et al. (1994), ZIMERMAN e LIBERMAN (2000) e BOCCHI et al. (2009) o surgimento de arritmias cardíacas não é um evento 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.

Entretanto, em uma análise mais detalhada da tabela, pode-se observar que as arritmias foram menos freqüentes e graves no grupo 2 quando comparado aos demais grupos. Esta observação é justificada pelo emprego do enalapril na composição terapêutica deste grupo. De acordo com GÜRLEK et al. (1994) e GONZÁLEZ-JUANATEY et al. (1998), os inibidores da ECA (enalapril) são fármacos com grande potencial terapêutico para o tratamento da insuficiência cardíaca, com atuação também sobre as arritmias cardíacas, principalmente as ventriculares. Segundo estes autores, estas drogas promovem uma maior disponibilização de oxigênio ao miocárdio, além de reduzirem os níveis plasmáticos de norepinefrina, reduzindo, assim, a incidência de arritmias em pacientes tratados com esta classe de fármacos.

Ainda em relação ao grupo 2, sugere-se que esta menor incidência de arritmias cardíacas também possa estar correlacionada a utilização da espironolactona. Como descrito por SATO et al., (1999), SATO et al. (2002), GOINEAU et al. (2003) e MILLIEZ et al. (2005) a associação da espironolactona bloqueando receptores específicos da aldosterona retardaria o processo de hipertrofia e remodelamento cardíaco, assim como preveniria a instauração do processo de fibrose. Dessa maneira, pode-se pressupor que o sistema de condução elétrico cardíaco também possa ser preservado e a incidência de arritmias cardíacas reduzida.

Em contrapartida, pode-se perceber que o grupo 3 foi o mais acometido pelas arritmias cardíacas, sobretudo aquelas consideradas formas mais graves, como as arritmias ventriculares (taquicardia e diferentes formas de apresentação de complexos ventriculares prematuros). Acredita-se que estas tenham ocorrido em maior freqüência e intensidade neste grupo seja pela não utilização de um inibidor da ECA, seja pelo emprego do pimobendan. Entretanto a literatura descreve que não há evidências de que o pimobendan possa desenvolver e/ou agravar tais arritmias (HAUF et al., 1985; BEAUFRÈRE e PAIRAUT, 2009), sobretudo pelo fato de tratar-se de uma droga que atua aumentando o inotropismo cardíaco sem aumentar o consumo de oxigênio pelo miocárdio (PERRONE e KAPLINSKY, 2005).

Porém no caso do presente estudo, é relevante ressaltar que esta droga foi empregada em um caso com insuficiência diastólica, em uma situação que cursava com hipertrofia ventricular e fibrose miocárdica instaurada (resultados demonstrados no item 6). Ademais, foi observado por CHETBOUL et al. (2007), em estudo

histológico de animais com insuficiência valvar mitral que os animais que foram tratados apenas com pimobendan, apesar de apresentarem melhorias clínicas bem marcadas e aumento na qualidade e tempo de sobrevivência, também apresentaram lesões valvares e subendocárdicas mais acentuadas do que aqueles tratados isoladamente com benazepril.

Por tais motivos, incluindo o uso do pimobendan em animais com hipertrofia e fibrose miocárdica avançada, associado a possibilidade desta droga predispor e/ou pronunciar lesões endocárdicas preexistentes, não se pode excluir a possibilidade de o emprego deste inodilatador neste caso ter agravado as lesões miocárdicas e do sistema de condução elétrico cardíaco induzidas anteriormente pela adrenalina.

4.5.3. Demais variáveis eletrocardiográficas

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

A partir da análise desta tabela pode-se perceber que a maioria das variáveis-resposta, excetuando-se a amplitude da onda T, apresentou alterações significativas entre os grupos estudados (tratamentos), entretanto apenas as variáveis amplitude P e amplitude QRS apresentaram alterações significativas entre os grupos ao longo do tempo. Mesmo tendo sido realizada a regressão linear posterior 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 ao longo do tempo.

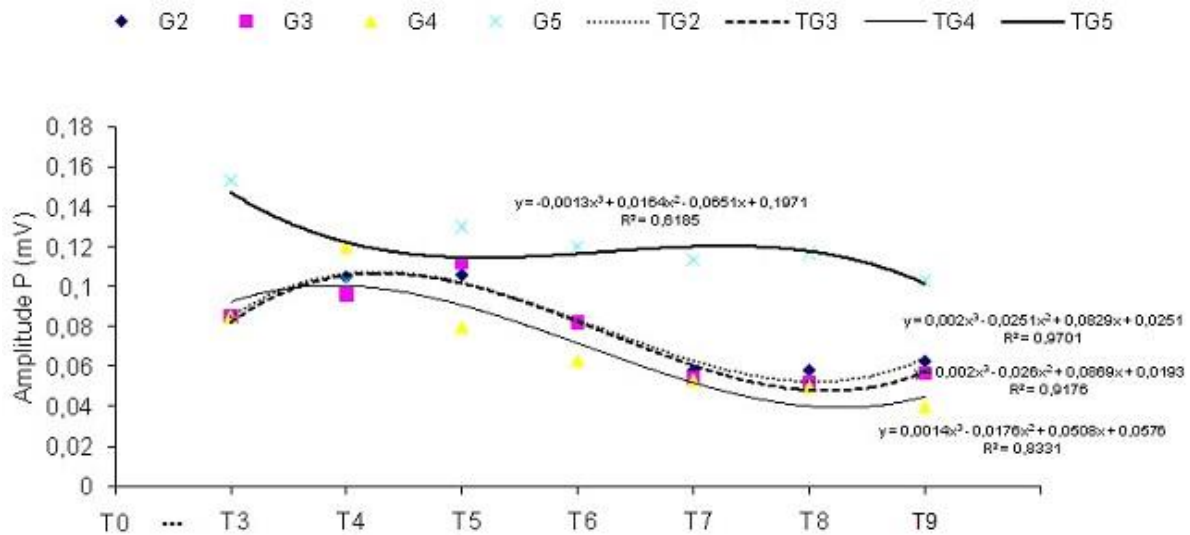


Figura 14 – Comportamento da variável amplitude da onda P sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Conforme observado na Tabela 11 e na Figura 14, no tempo 3, em valores absolutos, a amplitude e duração média da onda P no G5 (animais sadios) foi mais reduzida quando comparada aos animais dos demais grupos, compostos por animais doentes em fase inicial de tratamento. De acordo com a literatura, em coelhos saudáveis a amplitude e a duração média da onda P pode ser variável segundo diversos parâmetros, como a idade, peso e a raça do animal. Em geral, PAIRAUT (2009) e LORD et al. (2010) apresentam valores de referência similares, abrangendo um intervalo de 0,04 a 0,07mV, podendo se estender até 0,08mV para a amplitude, enquanto o valor médio de duração da onda P é de 0,03s, podendo variar de 0,02 a 0,04s.

O fato dos animais dos grupos 2, 3 e 4 apresentarem valores superiores aos supracitados e superiores aos valores do G5 nas Figuras 14 e 15 pode ser explicado pelo desenvolvimento da doença cardíaca induzida pela adrenalina. Embora PAIRAUT (2009) recomende que, devido a reduzida amplitude natural das ondas, 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, outros autores (NOSZCZYK-NOWAK et al., 2009; LORD et al., 2010; LORD et al. 2011) informam que estes achados de aumento de amplitude e duração da onda P podem ser observados em coelhos com insuficiência cardíaca.

Tabela 11 – Valores absolutos médios para as variáveis-resposta amplitude e duração da onda P nos tempos 3 e 9. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Amplitude P (mV)				Duração P (s)			
	G2	G3	G4	G5	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	0,120	0,120	0,120	0,090	0,034	0,034	0,034	0,028
MÉDIAS / T9	0,063	0,077	0,120	0,103	0,033	0,042	0,036	0,025

Especificamente em relação ao comportamento da amplitude da onda P ao longo de toda a fase terapêutica, percebe-se que esta variou ao final desta fase quando comparada ao tempo inicial de avaliação (T3).

O grupo que apresentou a maior variação foi o G2, seguido pelo G3 e G5. O G4 apresentou uma tendência de manutenção dos valores absolutos ao longo do tempo de estudo, informações corroboradas pelos respectivos R2 observados na Tabela 8.

Observa-se que os grupos 2 e 3 apresentaram reduções significativas na amplitude da onda P, sendo a redução do grupo 2 mais intensa do que a do grupo 3. Segundo a literatura, este fato é explicado pela característica do protocolo composto pelo enalapril associado a espirolactona. Em seus estudos, MILLIEZ et al. (2005) atribuem a redução da amplitude da onda P do eletrocardiograma ao efeito antifibrótico e anti-remodelamento cardíaco conferido pela espirolactona sobre o miocárdio, promovendo redução desta câmara. DABROWSKI et al. (2010) e FRANCO et al. (2011) corroboram esta informação, mas acrescentam que soma-se a este fato o efeito redutor de pré-carga conferido pelo enalapril, promovendo redução da tensão das paredes atriais e redução cameral.

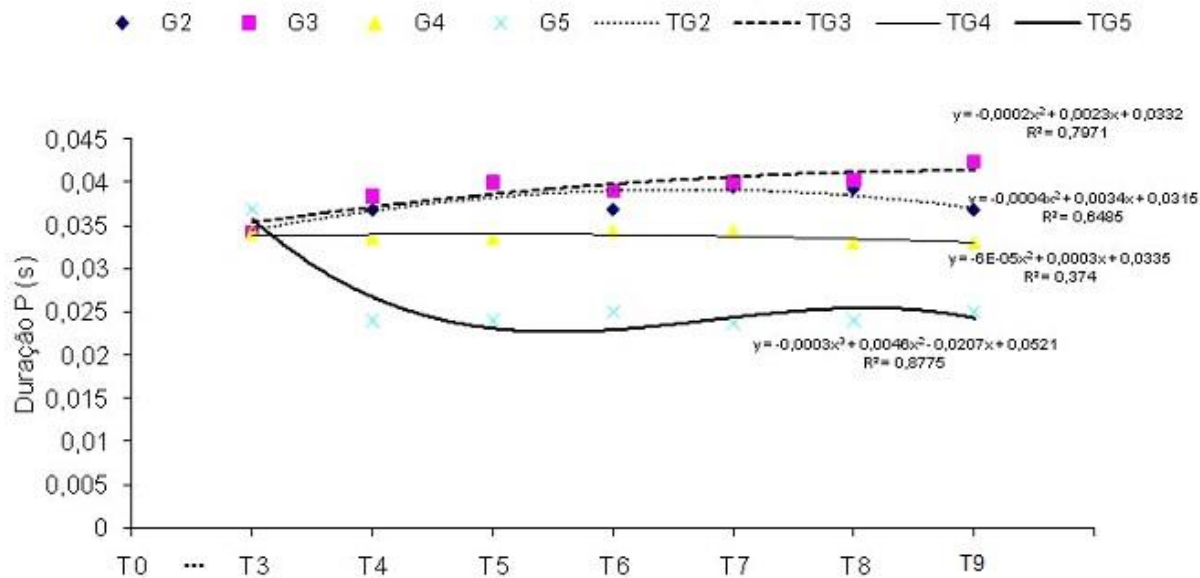


Figura 15 – Comportamento da variável duração da onda P sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Por meio da análise da Figura 16 e da Tabela 12 pode-se perceber que a amplitude do complexo QRS também apresentou variação entre os grupos estudados ao longo do tempo experimental.

Esta variação significativa ao longo do tempo é comum a todos os grupos estudados, sendo, em todos os casos, com tendência de redução ao longo do tempo.

Por mais que esta tendência possa ser justificada pelo emprego do enalapril associado à espirolactona no grupo 2, trazendo consigo o mesmo comportamento e justificativas para redução das câmaras atriais supracitadas, esta conclusão não deve ser extrapolada aos demais grupos, visto que este mesmo comportamento também foi observado no grupo que recebeu o pimobendan e no grupo controle, grupos com características completamente distintas. Assim, descreve-se este comportamento de redução de amplitude do complexo QRS em todos os grupos estudados hipoteticamente por um desvio de eixo cardíaco.

De forma contrária, pontualmente observa-se que no tempo 3, momento inicial da fase terapêutica, a amplitude média do complexo QRS dos grupos 2, 3 e 4 era marcadamente maior do que aquela observada no grupo 5 (controle). Segundo a literatura, a amplitude média do complexo QRS de coelhos é de aproximadamente 0,20mV, entretanto estes valores também podem variar amplamente de acordo com

a idade, peso e a raça do animal (SZABUNIEWICZ et al. 1971; LORD et al., 2010). Os valores observados no grupo controle são bastante similares ao padrão descrito na literatura para esta espécie, enquanto os demais grupos apresentam um valor médio de quase o dobro daquele observado pela literatura e pelo grupo controle nesta pesquisa.

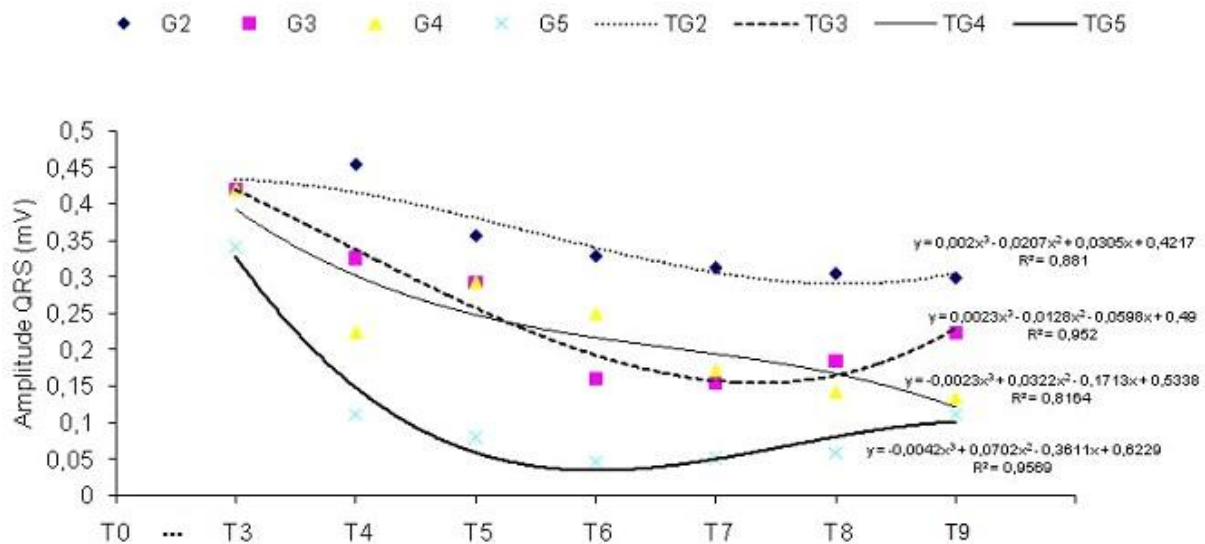


Figura 16 – Comportamento da variável amplitude do Complexo QRS sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Tabela 12 – Valores absolutos médios para a variável-resposta amplitude do Complexo QRS nos tempos 3 e 9. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Amplitude QRS (mV)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	0,42	0,42	0,42	0,24
MÉDIAS / T9	0,30	0,22	0,14	0,11

Embora ainda seja marcante a recomendação de PAIRAUT (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 (TILLEY, 1992; FOX et al. 1999; TILLEY e GOODWIN, 2002), justificado pelo aumento e remodelamento ventricular em decorrência da instauração do processo de insuficiência cardíaca.

4.6. Avaliação histopatológica da fase terapêutica

Imediatamente ao término da fase terapêutica, todos os animais sobreviventes ao experimento foram submetidos à eutanásia para observação dos resultados histopatológicos dos protocolos farmacológicos empregados.

As características histopatológicas são apresentadas na Tabela 13.

Analisado-se inicialmente o grupo controle, G5, percebe-se que este não apresentou quaisquer alterações histopatológicas compatíveis com qualquer enfermidade, excetuando-se o único evento observado, de congestão, em órgãos como coração, pulmões, fígado e baço. Este achado também foi observado com frequência nos demais grupos estudados, variando de intensidade leve a severa. De acordo com JONES et al. (1997) e BOCCHI 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 presente caso, pode-se até inferir que o processo congestivo tenha aumentado em decorrência da lesão cardíaca produzida pela adrenalina, porém devido ao fato da mesma ter sido observada nos animais do grupo controle, sem quaisquer indicio 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.

A análise dos dados presentes na Tabela 13 permite concluir que os achados histopatológicos entre os grupos experimentais são semelhantes variando apenas em frequência e intensidade.

Avaliando-se de forma mais detalhada, pode-se perceber que, em geral, os achados foram mais incidentes e de maior intensidade no grupo 3, quando comparado aos demais grupos experimentais, seguido pelo grupo 4 e de forma menos incidente e de menor intensidade em G2.

Dentre os achados de necropsia e histopatológicos, chama-se a atenção para alguns deles.

Em relação aos achados gerais, incluindo ascite, efusões pleural e pericárdica e padrão hepático rendilhado (fígado em noz moscada), percebe-se que todos estes foram menos freqüentes e significativos no G2 quando comparado aos demais grupos.

Acerca do coração, os achados dignos de nota foram a hipertrofia e degeneração dos cardiomiócitos, o infiltrado mononuclear e a fibrose miocárdica, sobretudo em ventrículo esquerdo.

A hipertrofia e degeneração dos cardiomiócitos foram observadas em 100% dos animais estudados, independentemente de divisão por grupo. O primeiro evento está associado ao aumento da atividade cardíaca e hipertensão causados pela adrenalina, com vistas a atender as demandas metabólicas do organismo, conforme documentado pela literatura (DiPALMA e MASCATELLO, 1951; LORELL e GROSSMAN, 1987; RAWLINS et al., 2009). O segundo evento está de acordo com o descrito por RONA (1985), TODD et al. (1985) e JIANG e DOWNING (1990) acerca da cardiotoxicidade da adrenalina. RONA (1985) explica que esta degeneração ocorre devido à depleção da reserva energética das células miocárdicas causada pela adrenalina, levando a alterações celulares bioquímicas complexas e alterações estruturais subseqüentes, caracterizadas como degeneração irreversível ou necrose.

O infiltrado mononuclear foi observado de forma mais evidente no G2 quando comparado aos demais grupos. Conforme descrito anteriormente, a presença deste infiltrado é comum e representa um processo inflamatório mediado por células mononucleares permeadas em meio ao tecido cardíaco. Este evento inicia-se em até 10 horas após a infusão da adrenalina. Estas células promovem não somente uma injúria tecidual em curto prazo, mas também são responsáveis por desenvolver angiogênese e deposição de colágeno futuramente. 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 e FERRANS, 1986; JIANG e DOWNING, 1990; MUDERS et al., 1999; KANIA et al., 2009).

No presente estudo a fase terapêutica teve início sete dias após a segunda infusão de adrenalina, o que representa que já haveria um processo de fibrose similar desencadeado de forma generalizada em todos os grupos estudados, segundo a cronologia do processo de reparação tecidual descrito por VLEET e FERRANS, (1986) e JIANG e DOWNING (1990). Ao término do experimento, cerca de 20 dias após a segunda infusão de adrenalina foi possível perceber que a fibrose, de fato, evidenciou-se, corroborando as informações de MUDERS et al. (1999) SATO et al. (1999) e ZHANG et al. (2010) de que esta pode demorar de uma a duas semanas para ocorrer.

Entretanto, a incidência e intensidade dessa fibrose miocárdica variaram de acordo com cada grupo estudado (Figura 17). O grupo 2 foi justamente o que apresentou os menores índices quando comparado aos demais grupos. Este fato pode ser explicado devido às características farmacológicas do protocolo utilizado.

Segundo PFEFFER e PFEFFER (1988), a utilização dos inibidores da ECA em modelos animais hipertensos e com insuficiência cardíaca promove não apenas os benefícios clínicos já demonstrados desta classe de fármacos, mas também é capaz de atenuar o remodelamento ventricular esquerdo, retardando o surgimento de processos fibróticos no miocárdio. Entretanto, STRUTHERS (1995) demonstrou que embora a terapia com inibidores da ECA reduza de forma significativa os níveis de aldosterona, estes voltam a elevar-se posteriormente mesmo com a manutenção da terapia vasopressora, o que foi denominado “escape da aldosterona”. Esta molécula, por sua vez, atuando sobre receptores miocárdicos específicos, está associada à síntese de colágeno e desenvolvimento de fibrose neste órgão (LAVIOLE et al. 2006). Desta forma, foi demonstrado que a associação de um fármaco que atue bloqueando estes receptores específicos da aldosterona, como a espironolactona, inibiria de forma ainda mais efetiva o processo de hipertrofia e remodelamento cardíaco e a instauração do processo de fibrose (SATO et al., 1998; SATO et al., 2002; GOINEAU et al., 2003).

Desta maneira, acredita-se que a combinação destes fármacos neste experimento tenha retardado o desenvolvimento da fibrose miocárdica, fato corroborado, ainda, pela presença de um maior infiltrado mononuclear, evento que caracteriza um estágio mais inicial da lesão miocárdica em si.

Por fim, percebe-se que o grupo 3, que recebeu o pimobendan apresentou um índice de fibrose miocárdica semelhante, embora um pouco mais elevado, que o grupo doente não tratado, entretanto com lesões mais graves e extensas. Isto se deve ao fato do emprego de um fármaco com características inotrópicas bem marcadas, que deve ser utilizada apenas em casos de insuficiência sistólica (CHETBOUL et al., 2007; ATKINS et al., 2009, BOSWOOD, 2010), e não diastólica como na presente pesquisa. Assim, acredita-se que seu uso tenha contribuído para uma depleção ainda mais acentuada da reserva energética das células miocárdicas, previamente esgotadas devido ao efeito intrínseco da adrenalina, promovendo maiores lesões miocárdicas e fibrose.

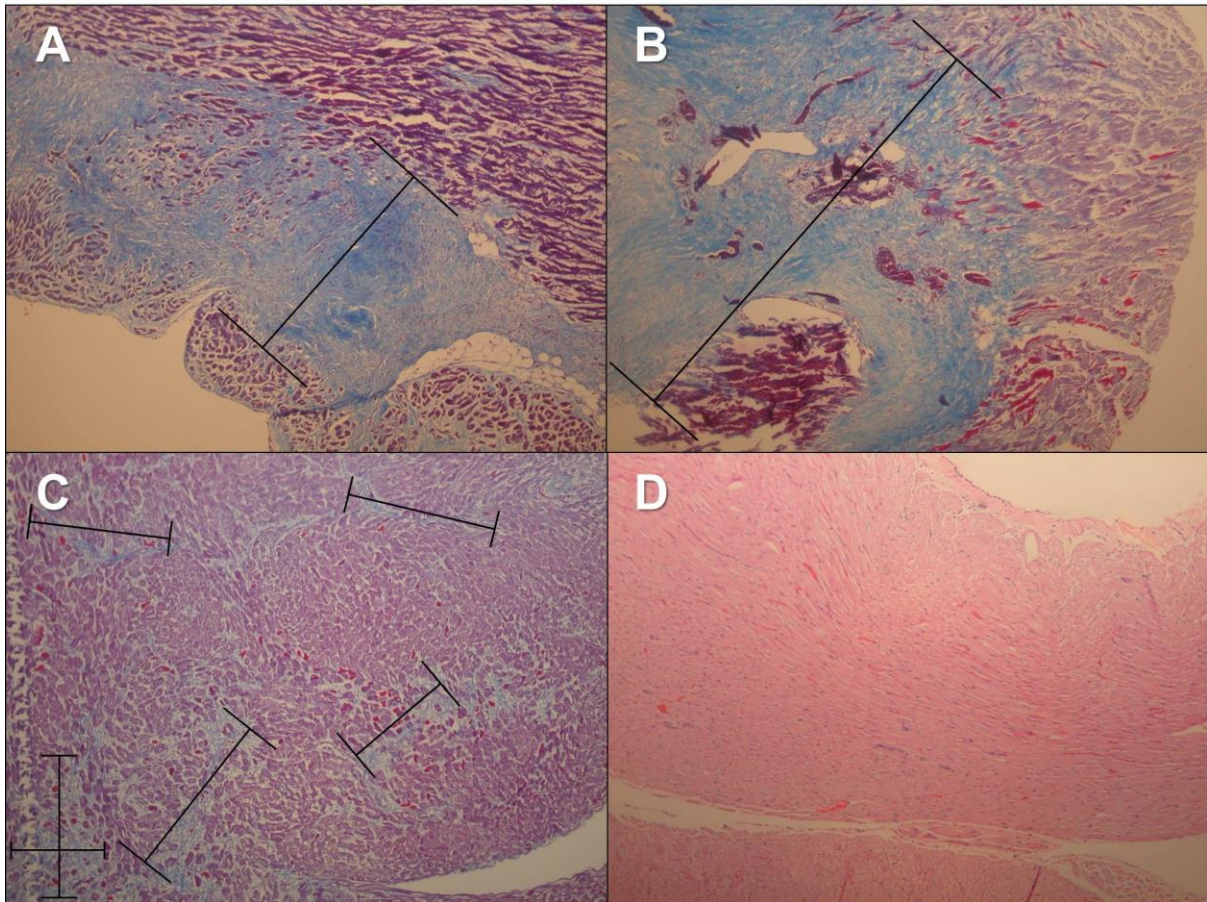


Figura 17 – Microscopia óptica de tecido cardíaco de animais sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Em A, tratamento com enalapril associado a espironolactona: tecido conjuntivo fibroso localizado em região subendocárdica (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em B, tratamento pimobendan: tecido conjuntivo fibroso em região subendocárdica avançando ao endocárdio (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em C, animais não tratados: tecido conjuntivo fibroso disperso por todo o endocárdio (Tricrômico de Gomori; Aumento 10x). Em D, grupo controle: ausência de quaisquer indícios de tecido conjuntivo fibroso (HE; Aumento 10x).

Os achados histopatológicos pulmonares mais marcantes incluem freqüentes e extensas áreas de atelectasias, enfisema e edema pulmonar, sendo este último consideravelmente mais reduzido no G2, enquanto os demais achados apresentaram-se de forma similar entre os três grupos estudados (Figura 18). Todos estes achados são comuns quando da utilização de adrenalina em altas doses, conforme demonstrado por diversos modelos animais de edema pulmonar induzido pela adrenalina, incluindo ratos, coelhos e cães (HATAKEYAMA e SHIGEI, 1968; WORTHEN et al., 1969a; CHENG et al., 1973). O mecanismo que leva a este edema causado pela adrenalina inclui vasoconstrição arterial e venosa promovendo

desvio do sangue da circulação periférica para a pulmonar, aumento da pressão capilar pulmonar, redução da pressão oncótica, alteração na permeabilidade capilar. Esta combinação de eventos resulta em edema intersticial, alveolar, atelectasias, hemorragias e invasão tecidual de células inflamatórias (WORTHEN et al., 1969b; BERK et al., 1973; ISHIKAWA et al., 1975).

Em relação ao fígado dos animais dos três grupos, independentemente de diferenças de tratamento, estes apresentavam características histológicas semelhantes, incluindo padrão rendilhado, “fígado em noz moscada”, e degeneração centrolobular, além de uma congestão bem marcada (Figura 18). Segundo JONES et al. (1997) 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 descrito por BINDOLI et al. (1992).

Outro importante achado histológico comum aos grupos estudados foi em relação ao rim dos animais. Microscopicamente foram observadas alterações como congestão, esclerose glomerular e processo inflamatório, sem grandes diferenças de frequência e intensidade entre os grupos (Figura 18). Segundo CAETANO e PRAXEDES (1998) e CASTRO et al. (2010), 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 e transmissão da hipertensão sistêmica para o capilar glomerular. Assim, o órgão torna-se hipoperfundido e começa a apresentar alterações compatíveis com um processo inflamatório e degenerativo tecidual.

Embora a literatura concorde com a informação de que a utilização de estratégias terapêuticas anti-hipertensivas, seja com um inibidor da ECA ou outras classes de fármacos, possa promover renoproteção (RODICIO, 1996; BERNADET-MONROZIES et al., 2002; KANAZAWA et al., 2004), esta situação não foi observada na presente pesquisa no grupo 2. Sugere-se que esta não tenha ocorrido devido ao fato do tipo de insuficiência cardíaca induzida neste caso ter sido de forma aguda e através do emprego de um fármaco com características de toxicidade tecidual, sobretudo cardíaca, diferentemente do processo fisiopatológico

de instauração da insuficiência cardíaca adquirida por fatores naturais, o qual é um processo lento e que progride para a lesão renal de forma menos agressiva, o que possibilitaria, então, a conduta terapêutica objetivando a renoproteção.

Assim como os demais órgãos, o intestino e o baço também apresentaram regiões de infiltrado mononuclear e em alguns casos estes órgãos também apresentavam características de degeneração. No baço estas alterações encontravam-se dispersas por todo o tecido, enquanto no intestino apresentavam-se mais na área submucosa. Tais achados são compatíveis com aqueles descritos por WILKES et al. (1963) em coelhos após a administração de sucessivas doses de adrenalina. Entretanto não perceberam-se diferenças histológicas marcantes entre os grupos estudados, excetuando-se a presença do edema de alça intestinal a seguir descrito.

Avaliando-se de forma isolada os eventos efusivos, para tal considerando ascite, efusões pericárdica e pleural, edema pulmonar e edema de alça intestinal, nota-se que estes foram menos prevalentes nos animais do grupo 2 quando comparado aos demais. Isto se deve novamente ao fato da utilização da espironolactona, que possui efeito diurético, associada ao enalapril, reduzindo de forma conjunta a pré-carga (WILKES et al., 1963; SATO et al., 1999). Em oposição, o grupo 3 apresentou a maior incidência destas efusões, presumivelmente em decorrência do efeito inotrópico positivo do fármaco, aumentando a pós-carga, muito embora haja o componente vasodilatador da droga, insuficiente nesta situação. Este fato ratifica o maior ganho de peso nos animais deste grupo apresentado no item 4.3.

Nestas situações de insuficiência cardíaca congestiva em fase inicial, a literatura preconiza apenas a utilização de estratégias terapêuticas que visem a redução da pré e pós-carga, como vasodilatadores (inibidores da ECA ou β -bloqueadores) e diuréticos, com o emprego do pimobendan restrito a casos específicos de emergências e insuficiência sistólica (ATKINS et al., 2009).

Tabela 13 - Achados histopatológicos da fase terapêutica de modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

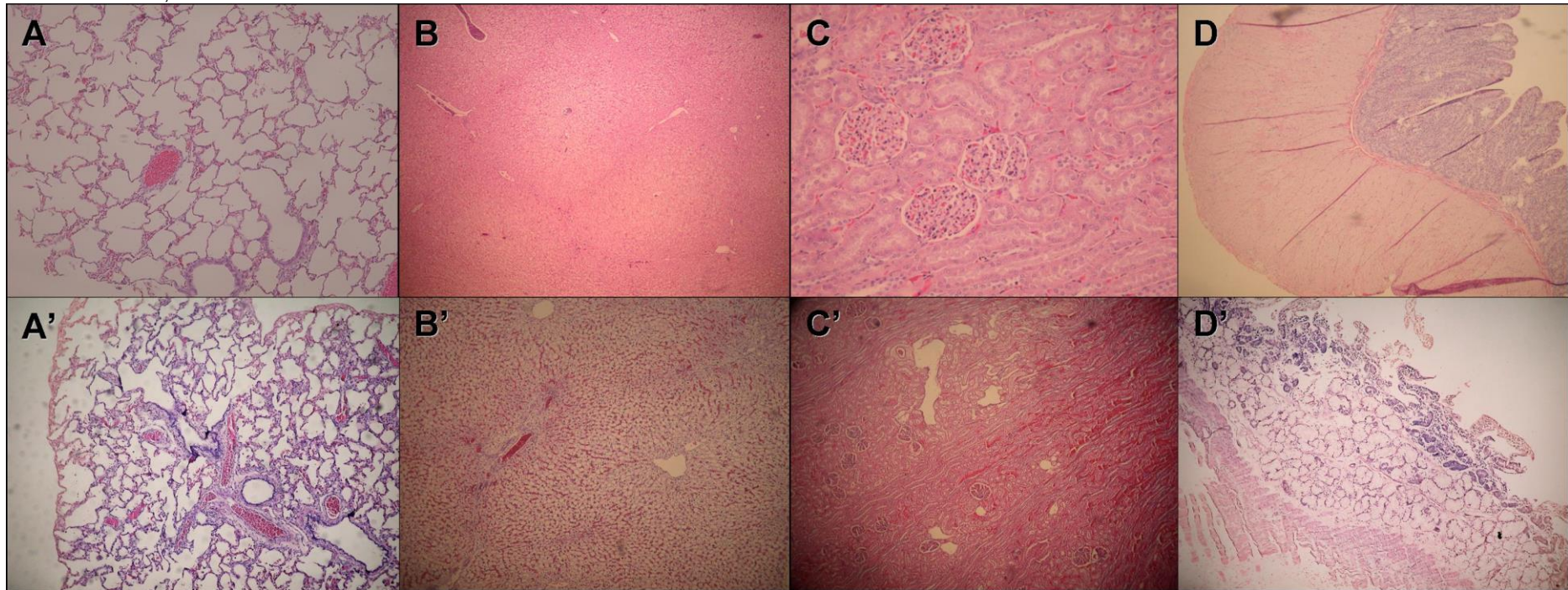


Figura 18: Microscopia óptica de diferentes tecidos animais dos grupos controle e experimental sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Em A, tecido pulmonar de animal do grupo controle. Em A', tecido pulmonar de animal do G2, observando-se espessamento de septo alveolar, áreas de atelectasia e enfisema. Em B, tecido hepático de animal do grupo controle. Em B', tecido hepático de animal do G3, observando-se degeneração centrolobular, edema e congestão. Em C, tecido renal de animal do grupo controle. Em C', tecido renal de animal do G2, observando-se congestão e esclerose glomerular. Em D, tecido intestinal de animal do grupo controle. Em D', tecido intestinal de animal do G3, observando-se grave edema na região submucosa. (Todas as micrografias em HE; Aumento 20x).

Órgãos	Achados histopatológicos e necropsia	Frequência e intensidade das lesões											
		G2 *n=5			G3 *n=5			G4* n=4			G5		
		Absoluto	Relativo	Intensidade	Absoluto	Relativo	Intensidade	Absoluto	Relativo	Intensidade	Absoluto	Relativo	Intensidade
Gerais	Ascite	1	20	*	4	80	**	2	50	**	0	0	--
	Efusões pleural e pericárdica	1	20	*	2	40	***	0	0	**	0	0	--
Coração	Edema perivascular	1	20	*	2	40	*	1	25	*	0	0	--
	Hipertrofia cardiomiócito	5	100	***	5	100	***	4	100	***	0	0	--
	Fibrose	2	40	*	3	60	***	2	50	**	0	0	--
	Infiltrado mononuclear	5	100	***	2	40	**	3	75	**	0	0	--
	Congestão	3	60	**	3	60	***	3	75	***	2	50	**
	Degeneração cardiomiócitos	5	100	***	5	100	***	4	100	***	0	0	--
Pulmões	Edema pulmonar	1	20	*	2	40	**	2	50	**	0	0	--
	Enfisema pulmonar	5	100	***	5	100	***	4	100	***	0	0	--
	Atelectasia	5	100	***	5	100	***	4	100	***	0	0	--
	Espessamento de septo alveolar	4	80	**	4	80	**	3	75	**	0	0	--
	Infiltrado mononuclear	5	100	**	4	80	**	3	75	**	0	0	--
	Congestão	4	80	**	5	100	***	2	50	***	3	75	***
Fígado	Congestão	5	100	***	5	100	***	4	100	***	2	50	**
	Degeneração centrolobular	5	100	***	4	80	***	4	100	***	0	0	--
	Edema	1	20	*	1	20	*	2	50	**	0	0	--
	Fígado noz moscada	2	40	*	4	80	**	3	75	***	0	0	--
Rim	Congestão	5	100	**	5	100	***	4	100	**	0	0	--
	Esclerose glomerular	3	60	**	2	40	**	1	25	**	0	0	--
	Processo inflamatório	1	20	*	2	40	*	3	75	*	0	0	--
Baço	Congestão	3	60	**	4	80	**	3	75	**	2	50	**
	Processo inflamatório	1	20	*	1	20	*	1	25	*	0	0	--
Intestino	Edema na região submucosa	1	20	*	5	100	***	2	50	**	0	0	--
	Congestão	2	40	*	1	20	*	1	25	*	0	0	--
	Processo inflamatório	0	0	*	2	40	**	2	50	*	0	0	--

Onde: * regiões discretas e em pequeno número de observações; ** regiões evidentes e freqüentes, *** regiões acentuadas e observadas em grande número de animais.

4.6.1. Peso cardíaco

Os resultados da avaliação do peso cardíaco dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 19.

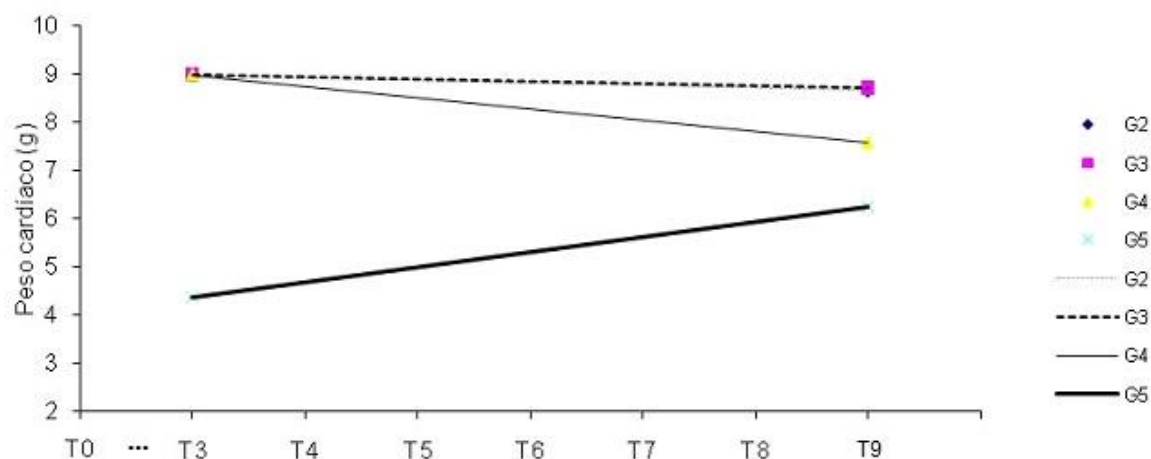


Figura 19 – Comportamento da variável peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Por meio 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, entretanto estudando seu comportamento individualizado, estes grupos não mostraram diferenças significativas ao longo do tempo (Tabela 3).

Contudo, por meio de uma avaliação subsequente por meio da regressão linear pode-se perceber claramente uma tendência de alteração nos valores da variável-resposta peso cardíaco no momento final do estudo em relação ao momento inicial da fase terapêutica.

Por meio da análise das equações de retas geradas pode-se perceber que os grupos G2 e G3 apresentaram uma discreta e semelhante tendência de redução dos valores absolutos ($y = -0,0452x + 9,0186$ e $y = -0,0549x + 9,0282$, respectivamente), enquanto o grupo G4 apresentou uma forte tendência de redução dos valores ($y = -0,2339x + 9,2072$). Em oposição, percebe-se a forte tendência de aumento dos valores absolutos do G5, onde $y = 0,3117x + 4,0483$.

A Figura 20 e a Tabela 14 permitem observar claramente o efeito do modelo experimental sobre o peso cardíaco dos animais do grupo que recebeu a adrenalina

em comparação ao controle. Em T3 observa-se que a média de peso do grupo experimental foi de $8,97 \pm 2,03g$, contra $4,36 \pm 0,38g$ do grupo controle (Figura 19).



Figura 20 – Aspecto macroscópico do coração de animal do grupo controle (direita) e de animal do grupo experimental (esquerda) em T3. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Tabela 14 – Peso cardíaco médio de animais em modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina em coelhos. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

	Peso cardíaco (g)			
	G2	G3	G4	G5
MÉDIAS / T3	8,98	8,98	8,98	4,36
MÉDIAS / T9	8,64	8,70	7,57	6,23

Esta informação é corroborada por VERKERK et al (2009) e VILARINHO et al. (2010), que afirmam por meio de seus estudos em coelhos com insuficiência cardíaca induzida experimentalmente apresentam aumento de massa cardíaca nos momentos iniciais a instauração da enfermidade, sobretudo aumento de massa ventricular.

Ao final do experimento estes valores sofreram pequenas alterações no grupo experimental, tendo o G2 passado ao peso de 8,64g, o G3 para 8,70g e o G4 para 7,57g. estas foram alterações não significativas pelo teste T para dados não pareados, com $p < 0,05$. Já o G5 apresentou uma maior amplitude de variação estatisticamente significativa pelo mesmo teste T, elevando-se para 6,23g.

De acordo com a literatura, 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 (1968) descreveram este valor normal em 3,63g, entretanto também não especificaram a raça do coelho empregado em seu estudo. CIMINI e WEISS (1990) empregaram coelhos Nova Zelândia de mesma idade, porém não informada, em seus estudos sobre hipertrofia cardíaca induzida e seu valor médio de base foi de 6,38g para esta raça.

BROWN et al. (1925) e PATEL e RAMAKRISHNAN (1968) relatam, ainda, que em condições normais o peso cardíaco está relacionado ao peso corporal, o que corrobora os achados na presente pesquisa para o G5, onde percebe-se um aumento tanto de peso corporal quanto de peso cardíaco ao longo do experimento (Figura 21).

O mesmo comportamento de dependência entre as variáveis se aplica ao G4, onde ao longo do tempo se observou uma perda de peso cardíaco associada à perda de peso corporal (Figura 21).

Neste caso, em relação à perda de peso cardíaco observada no G4, esta está diretamente relacionada à evolução do quadro de insuficiência e remodelamento cardíaco, conforme descrito por HAGGSTROM et al. (2008) e MONTERA et al., (2009), onde corações inicialmente hipertrofiados tendem a iniciar um processo de perda de massa cardíaca.

Em relação aos grupos G2 e G3, observou-se que estes apresentaram comportamento similar ao final do experimento, com uma discreta redução destes em T9 quando comparados a T3. Em ambos os casos houve uma relação inversa entre as variáveis-resposta peso corporal e peso cardíaco, com aumento do peso corporal em ambos os grupos e pequena perda de massa cardíaca, mais evidenciada em G2.

Embora sejam nítidos neste experimento e bem descritos na literatura os benefícios clínicos de ambos os fármacos utilizados para o controle da insuficiência cardíaca (FUENTES et al., 2002; KVART et al., 2002; FUENTES, 2004; POUCHELON et al., 2008.; ATKINSON et al., 2009), sobretudo permitindo o ganho de peso dos animais, estes protocolos não impediram a perda de massa cardíaca dos animais destes grupos, porém foram importantes retardando-as quando comparadas ao G4.

Especificamente no G2, acredita-se que uma justificativa coerente para este achado seja o fato dos inibidores da ECA previnirem não apenas o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, mas também promovem a sua regressão em modelos animais hipertensos como descrito por SEIXAS-CAMBÃO e LEITE MOREIRA (2009). Sugere-se, ainda, que esta perda esteja não apenas relacionada às respostas celulares da lesão cardíaca em si, mas também relacionada ao efeito do enalapril promovendo perda de peso ao longo do tempo em indivíduos tratados com este fármaco, conforme proposto por MASUO et al., 2001; SANTOS et al. 2008; SANTOS et al., 2009. Já no G3, além da resposta fisiológica ao dano celular cardíaco, acredita-se que a perda de peso cardíaco possa estar relacionada também ao fato desta droga promover um aumento da severidade de algumas lesões cardíacas, produzindo esclerose celular, conforme observado por CHETBOUL et al. (2007).

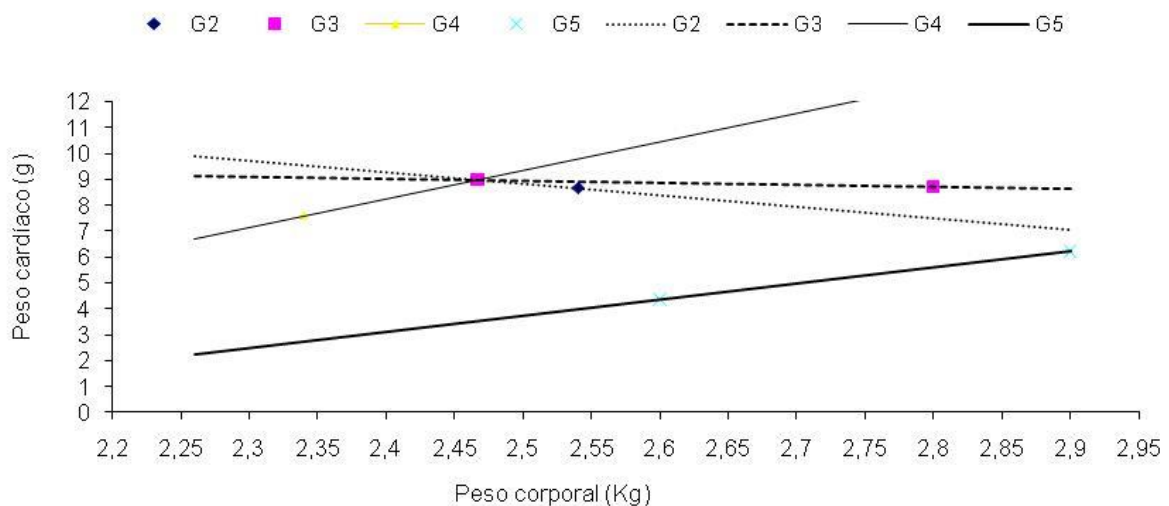


Figura 21 – Interação entre as variáveis peso corporal e peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

4.6.2. Morfometria das fibras miocárdicas

Os resultados da avaliação da morfometria das fibras miocárdicas dos animais (G2, G3, G4 e G5) ao longo da fase terapêutica são observados na Figura 22.

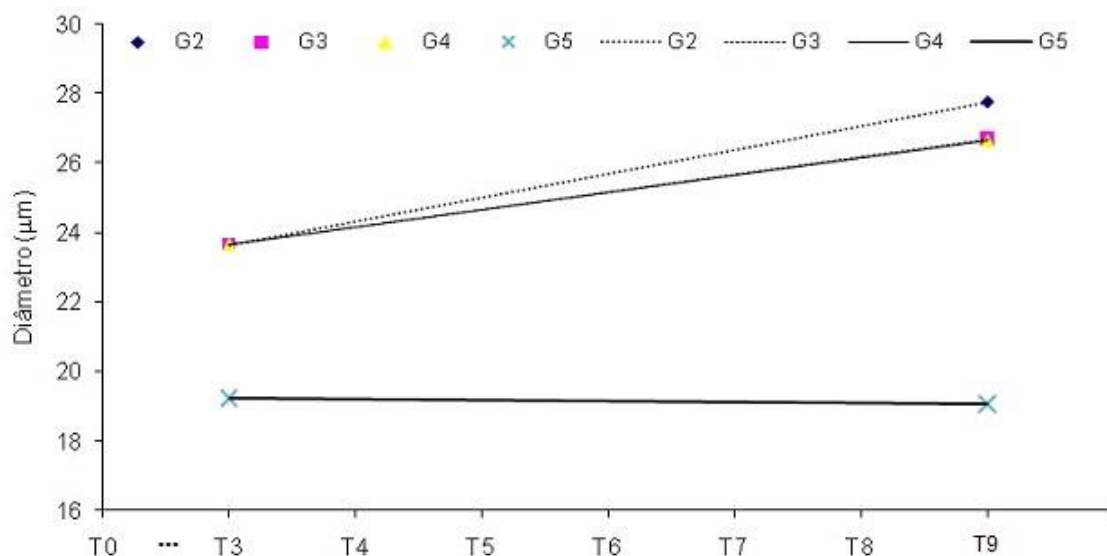


Figura 22 - Comportamento da variável morfometria das fibras miocárdicas sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Através da análise de variância para dados desbalanceados (GLM) observou-se que o comportamento da variável-resposta morfometria das fibras cardíacas 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 13).

Neste caso, embora não seja viável a aplicação da regressão linear, pode-se perceber novamente uma tendência de elevação dos valores da variável-resposta em questão no momento final do estudo em relação ao momento inicial da fase terapêutica. Este fato foi observado para os três grupos experimentais, enquanto o grupo controle não apresentou qualquer tendência de variação significativa.

Em relação aos três grupos experimentais, observa-se que a tendência de comportamento nestes foi bastante similar, evento diferente daquele observado em relação ao grupo controle, onde ocorreu uma tendência de manutenção nos valores da variável resposta morfometria das fibras miocárdicas. Os grupos 2, 3 e 4 apresentaram uma elevação, estatisticamente significativa pelo teste T para dados não pareados, de $23,64\mu\text{m}$ para $27,74\mu\text{m}$, $26,70\mu\text{m}$ e $26,62\mu\text{m}$, respectivamente, gerando uma hipertrofia miocárdica concêntrica, enquanto o G5 apresentou uma discreta variação, não significativa pelo mesmo teste T, de $19,07\mu\text{m}$ para $19,21\mu\text{m}$ ao final da fase terapêutica.

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 μ m, bastante próximo àquele observado neste experimento no grupo controle.

Ao compararem-se pontualmente os valores do grupo experimental com os valores do grupo controle, seja em T3 ou T5, percebe-se que em ambos os tempos os valores da morfometria dos cardiomiócitos são maiores no grupo experimental. Segundo RONA (1985) e MUDERS et al. (1999) este é um achado clássico e esperado, visto conhecido efeito da adrenalina de induzir hipercontratibilidade das fibras musculares cardíacas, através das suas ações inotrópicas e cronotrópicas bem estudadas.

Por fim, efetuando-se uma análise comparando-se apenas os animais do grupo experimental, percebe-se que estes apresentaram comportamento e valores similares ao longo do tempo, e especificamente em T9, os resultados observados permitem inferir que as drogas empregadas em cada grupo não produziram qualquer efeito sobre esta variável-resposta.

Em outra análise, confrontando-se os dados obtidos para a morfometria *versus* peso cardíaco, pode-se estimar graficamente o comportamento de um em função do outro, conforme ilustrado na Figura 23.

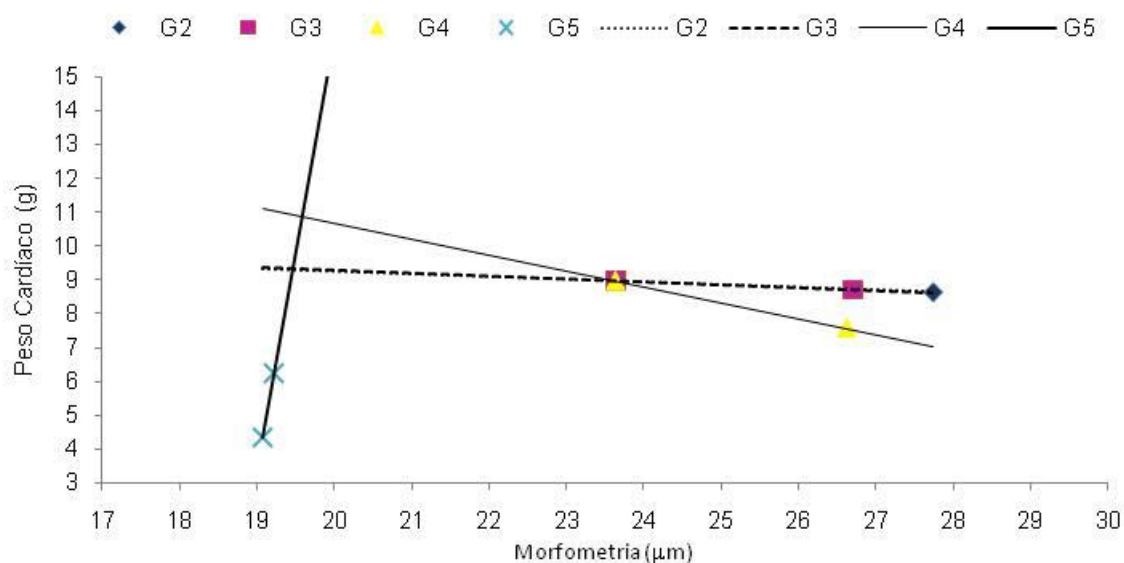


Figura 23 – Interação entre as variáveis morfometria e peso cardíaco sob diferentes tratamentos durante a fase terapêutica de coelhos com IC induzida pela adrenalina. Hospital Veterinário/UENF, 2012.

Embora um modelo matemático/estatístico não possa ser aplicado neste caso para tentativa de uma análise de correlação, pode-se perceber nitidamente na Figura 23 que há um padrão de resposta bem definido entre as variáveis.

O grupo controle (G5) apresenta uma tendência positiva de interação entre as variáveis, o que ocorre de forma fisiológica. Neste caso, quanto maior o volume e espessura das fibras cardíacas, maior o peso do coração.

Por outro lado, o grupo experimental observa uma tendência inversa, com discreta perda de peso cardíaco associado a um incremento nos valores de morfometria ao longo do tempo. À primeira luz, este resultado soa de forma controversa, entretanto RONA (1985), TODD et al. (1985), JIANG e DOWNING (1990), MUDERS et al., (1999) são unânimes ao relatarem que o modelo de insuficiência cardíaca congestiva induzida por adrenalina causa, além de hipertrofia dos cardiomiócitos, danos severos ao miocárdio, promovendo morte tecidual, perda de células miocárdicas, proliferação de tecido de reparação, sobretudo fibroso, além de poder causar congestão e hemorragia, eventos observados no presente estudo. Embora a hipertrofia muscular esteja presente, associa-se a esta a perda de tecido contrátil especializado, com áreas onde há uma substituição por um tecido de reparação, o que justifica a relativa perda de peso cardíaco em detrimento a hipertrofia dos cardiomiócitos. Esta perda celular está evidenciada na presente pesquisa em todos os grupos experimentais (G2, G3 e G4), e mostra-se ainda mais pronunciada na análise de tendência do G4 (doentes não tratados) quando comparada aos demais grupos experimentais tratados. Este achado permite inferir que os protocolos enalapril/espironolactona e pimobendan desempenharam efeitos similares sobre esta variável-resposta.

Este evento é justamente o oposto ao que ocorre em casos de hipertrofia muscular cardíaca em atletas. Nestes casos, ocorre hipertrofia da célula miocárdica e aumento da massa ventricular. Embora haja um componente adrenérgico endógeno, este é um evento controlado que permite uma adaptação cardiovascular para proporcionar um grande e sustentado débito cardíaco, afim de proporcionar um suprimento de oxigênio aos tecidos para a glicólise aeróbica (RAWLINS et al., 2009), isento das características cardiotóxicas da administração exógena de adrenalina em altas doses.

5. CONCLUSÕES

- A adaptação do modelo experimental cardiomiopatia catecolaminérgica mostrou-se eficiente para o desenvolvimento clínico e laboratorial da insuficiência cardíaca congestiva em coelhos;
- Os resultados clínicos revelam que os animais tratados com enalapril associado à espironolactona apresentaram melhoria clínica superior àqueles tratados com pimobendan;
- Os biomarcadores utilizados (Enzima Conversora de Angiotensina I, Peptídeo Natriurético Atrial e Proteína C Reativa) são viáveis e eficientes no diagnóstico e acompanhamento terapêutico da insuficiência cardíaca induzida pela adrenalina;
- O modelo de cardiopatia catecolaminérgica desencadeou o aparecimento de diferentes arritmias cardíacas, incluindo arritmias fatais;
- As arritmias cardíacas são de menor intensidade em animais tratados com enalapril associado à espironolactona quando comparado aos demais grupos;
- As lesões teciduais são menos evidentes em animais tratados com associação do enalapril associado à espironolactona;
- A associação do enalapril com a espironolactona é eficiente no retardo da progressão da fibrose de miocárdio em coelhos com miocardiopatia catecolaminérgica;
- O protocolo terapêutico composto pelo Enalapril associado à espironolactona é superior àquele composto pelo pimobendan em monoterapia em coelhos com insuficiência cardíaca secundária a miocardiopatia catecolaminérgica.

6. 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. XX, n. XX, 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*, v. 42, n. 6, p. 876-883, 1951.

ACKERMANN, U. Structure and Function of Atrial Natriuretic Peptide. *Clin. Chem*, 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. 268p. 2007.

AHMIDA, M.H.; ABDEL-GAYOUM, A.A.; EL-FAKHRI, M.M. Effect of spironolactone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Hum Exp Toxicol.*, v. 20, n. 9, p. 453-9, 2001.

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 Derg*, v. 13, 2013.

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.

ANGERMANN, C.E. ERTL, G. Natriuretic Peptides – New Diagnostic Markers in Heart Disease. *Herz*, v. 29, n. 6, p. 609–617, 2004.

ANTONACCIO, M.J. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 22, p. 57-87, 1982.

ARGANI, H.; GHORBANIHAGHJO, A.; AGHAEISHAHSAVARI, M.; NOROOZIANAVVAL, M.; RASHTCHIZADEH, N.; VEISI, P.; SAFA, J.; ABEDIAZAR, S. Effects of Losartan and Enalapril on High-Sensitivity C-Reactive Protein and Total Antioxidant in Renal Transplant Recipients With Renin-Angiotensin System Polymorphisms. *Transplantation Proceedings*, v. 40, n. 1, p. 16-21, 2008.

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.

ATKINSON, K.J.; FINE, D.M.; THOMBS, L.A.; GORELICK, J.J.; DURHAM, H.E. Evaluation of Pimobendan and N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide in the Treatment of Pulmonary Hypertension Secondary to Degenerative Mitral Valve Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 6, p. 1190-1196, 2009.

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

BARRETTO, A.C.P.; RAMIRES, J.A.F. Insuficiência Cardíaca. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 71, n. 4, p. 635-642, 1998.

BARRETTO, A.C.P.; WAJNGARTEN, M.; SERRO-AZUL, J.B.; PIERRI, H.; NUSSBACHER, A.; GEBARA, O.C.E. Tratamento Medicamentoso da Insuficiência Cardíaca em Hospital Terciário de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 69, n. 6, p. 375-379, 1997.

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. 475-80, 2005.

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

BEAUFRÈRE, H.; PARIAUT, R. Pimobendan. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 18, n. 4, p. 311-313, 2009.

BENEDICT, C.; FRANCIS, G.S.; SHELTON, B.; JOHNSTONE, D.E.; KUBO, S.H.; KIRLIN, P.; NICKLAS, J.; LIANG, C.S.; KONSTAM, M.A.; GREENBERG, B.; YUSUF, S. Effect of Long-Term Enalapril Therapy on Neurohormones in Patients With left Ventricular Dysfunction. *The American Journal of Cardiology*, v. 75, n. 16, p. 1151-1157, 1995.

BERK, J.L.; HAGEN, J.F.; KOO, R.; BEYER, W.; DOCHAT, G.R.; RUPRIGHT, M.; NOMOTO, S. Pulmonary Insufficiency Caused by Epinephrine. *Ann Surg.*, v. 178, n. 4, p. 423-435, 1973.

BERDEAUX, A. La cardioprotection pharmacologique contre l'infarctus du myocarde: réalités et actualités. *Ann Pharm Fr*, v. 65, p. 315-324, 2007.

BERNADET-MONROZIES, P.; ROSTAING, L.; KAMAR, N.; DURAND, D. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the progression of chronic renal failure. *Presse Med.*, v. 31, n. 36, p. 1714-20, 2002.

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.

BIRCK, A.J.; MIGLINO, M.A.; MACHADO, G.V.; SANTOS, T.C. Formação da veia porta-hepática em coelhos da raça Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v. 43, n. 1, p. 87-94, 2006.

BISOENDIAL, R. J.; KASTELEIN, J. J. P.; STROES, E. S. G. C-reactive protein and atherogenesis: From fatty streak to clinical event. *Atherosclerosis*, v. 195, n. 2, 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*, v. 39, n. 16, 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.

BOLDT, J.; SCHINDLER, E.; HÄRTER, K.; GIJRLACH, G.; HEMPELMANN, G. Influence of Intravenous Administration of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Enalaprilat on Cardiovascular Mediators in Cardiac Surgery Patients. *Anesth Analg*, v. 80, n.3, p. 480-5, 1995.

BOSWOOD, A. Current Use of Pimobendan in Canine Patients with Heart Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, v. 40, n. 4, p. 571-80, 2010.

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.

BOYLE, K.L.; LEECH, E. A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 22, n. 4, p. 398-408, 2012.

BROWN, W.H.; PEARCE, L.; VAN ALLEN, C.M. Organ weights of normal rabbits. *J Exp Med.*, 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.; et al. 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.

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

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

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.

CHAI, W.; GARRELD, I.M.; ARULMANI, U.; SCHOEMAKER, R.G.; LAMERS, J.M.J.; DANSER, A.H.J. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective? *British Journal of Pharmacology*, v. 145, p. 664–671, 2005.

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. XX, n. XX, 2009.

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

CHETBOUL, V.; LEFEBVRE, H.P.; SAMPEDRANO, C.C.; GOUNI, V.; SAPONARO, V.; SERRES, F.; CONCORDET, D.; NICOLLE, A.P.; POUCHELON, J.P. Comparative Adverse Cardiac Effects of Pimobendan and Benazepril Monotherapy in Dogs with Mild Degenerative Mitral Valve Disease: A Prospective, Controlled, Blinded, and Randomized Study. *J Vet Intern Med*, v. 21, n. 4, p. 742–753, 2007.

CHO, K.W.; LEE, S.J.; WEN, J.F.; KIM, S.H.; SEUL, K.W.; 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.

COSTA, K.N.; CARVALHO, W.B.; KOPELMAN, B.I.; DIDIO, R. Pacientes pediátricos submetidos à ventilação pulmonar mecânica. *Rev Ass Med Brasil*, v. 46, n. 4, p. 320-324, 2000.

COWIE, M.R.; DAVIDSON, L. Clinical perspective: the importance of heart rate reduction in heart failure. *Int J Clin Pract*, 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. *Br Heart J*, v. 58. n. 2, p. 96-100, 1987.

DABROWSKI, R.; BOROWIEC, A.; SMOLIS-BAK, E.; KOWALIK, I.; SOSNOWSKI, C.; KRASKA, A.; KAZIMIERSKA, B.; WOZNIAK, J.; ZAREBA, W.; SZWED, H. Effect of Combined Spironolactone- β -Blocker \pm Enalapril Treatment on Occurrence of Symptomatic Atrial Fibrillation Episodes in Patients With a History of Paroxysmal Atrial Fibrillation (SPIR-AF Study). *J Cardiol*, v. 106, n. 11, p. 1609 –1614, 2010.

DANESH, J.; PEPYS, M. B. C-Reactive Protein and Coronary Disease Is There a Causal Link? *Circulation*, v. 120, n. 21, p. 2036-2039, 2009.

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

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. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 101, n. 3, p. 243-248, 1951.

DOWNING, S.E.; CHEN. V. Myocardial Injury Following Endogenous Catecholamine Release in Rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, v. 17, n. 4, p. 377-387, 1985.

DUNCKER, D.J.; HARTOG, J.M.; LEVINSKY, L.; VERDOUW, P.D. Systemic haemodynamic actions of pimobendan (UD-CG 11 5 BS) and its O-demethylmetabolite UD-CG 212 C1 in the conscious pig. *Br. J. Pharmac.*, v. 91, n. 3, p. 609-615, 1987.

EPOCH Study Group. Effects of Pimobendan on Adverse Cardiac Events and Physical Activities in Patients With Mild to Moderate Chronic Heart Failure The Effects of Pimobendan on Chronic Heart Failure Study (EPOCH Study). *Circulation Journal*, v. 66, n. 2, p. 149–157, 2002.

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.

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.

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.; 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.

FRANCO, R.P.; PEREIRA, G.T.; CAMACHO, A.A. Clinical evaluation of enalapril maleate and furosemide usage in dogs with degenerative myxomatous mitral valve, chf functional class Ib. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 9, p. 791-797, 2011.

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.

FUENTES, V.L.; CORCORAN, B.; FRENCH, A.; SCHOBER, K.E.; KLEEMANN, R.; JUSTUS, C. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Pimobendan in Dogs with Dilated Cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, v. 16, n. 3, p. 255–261, 2002.

FUENTES, V.L.; Use of pimobendan in the management of heart failure. *Vet Clin Small Anim*, v. 34, p. 1145–1155, 2004.

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

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

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.

GAROFALLO, S.B.; FONSECA, C.F.D.; PORTAL, V.L. Biomarcadores Cardíacos. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio Grande do Sul*, n. 24, p. 1-8, 2012.

GODFREY, V.; FARQUHARSON, C.A.J.; MACDONALD, J.E.; YEE, K.; STRUTHERS, A.D. Effect of spironolactone on C-reactive protein levels in patients with heart disease. *International Journal of Cardiology*, v. 117, n. 2, p. 282–284, 2007.

GOINEAU S, PAPE D, GUILLO P, RAMEE MP, BELLISSANT E. Combined effects of enalapril and spironolactone in hamsters with dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 41, n. 1, p. 49-59, 2003.

GONZÁLEZ-JUANATEY, J.R.; ACUÑA, J.M.G.; POSE, A.; VARELA, A.; CALVO, C.; CABEZAS-CERRATO, J.; PEÑA, M.G. Reduction of QT and QTc Dispersion During Long-Term Treatment of Systemic Hypertension With Enalapril. *Am J Cardiol*, v. 81, n. 2, p. 170–174, 1998.

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.

HÄGGSTRÖM, J.; PEDERSEN, H.D.; KVART, C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Veterinary Clinics of Small Animals*, v. 34, p. 1209–1226, 2004.

HÄGGSTROÖM, J.; BOSWOOD, A.; O'GRADY, M.; JÖNS, O.; et al. Effect of Pimobendan or Benazepril Hydrochloride on Survival Times in Dogs with Congestive Heart Failure Caused by Naturally Occurring Myxomatous Mitral Valve Disease: The QUEST Study. *J Vet Intern Med.*, v. 22, n. 5, p. 1124–1135, 2008.

HAUF, G.F.; GROM, E.; JÄHNCHEN, E.; ROSKAMM, H. Acute and long-term hemodynamic effects of pimobendan (UD-CG 115 BS) in comparison with captopril. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 14, n. 2, p. 49-56, 1989.

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

HÉLIÈS-TOUSSAINT, C.; MOINARD, C.; RASMUSEN, C.; TABBI-ANNENI, I.; CYNOBER, L.; GRYNBERG, A. Aortic banding in rat as a model to investigate malnutrition associated with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 288, n. 5, p. R1325-31, 2005.

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.; KUZUYA, T.; TADA, M. 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.; 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.; LUO, C.; WU, Z.; TANG, L. 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. *Japan. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 681-686, 1975.

JEUNESSE, E.; WOHRLE, F.; SCHNEIDER, M.; LEFEBVRE, H.P. Effect of spironolactone on diuresis and urine sodium and potassium excretion in healthy dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 9, p. 63-68, 2007.

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. *Mol Biol Rep*, v. XX, n. XX, 2009.

JOHNSTON, C.I.; JACKSON, B.; CUBELA, R.; LARMOUR, I.; ARNOLDA, L. Evaluation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in the pharmacokinetics of ACE inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 8, supl. 1, p. 9-14, 1986.

JONES, T. C.; HUNT, D.R. and KING, N.W. *System Genital In__ Patologia Veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole, p.1169, 1997.

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.

KANAZAWA, M.; KOHZUKI, M.; KUROSAWA, H.; MINAMI, N.; ITO, O.; SAITO, T.; YASUJIMA, M.; ABE, K. Renoprotective Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Combined with α 1-Adrenergic Antagonist in Spontaneously Hypertensive Rats with Renal Ablation. *Hypertens Res*, v. 27, n. 7, p. 509–515, 2004.

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

KITZEN, J.M.; LYNCH, J.J.; DRISCOLL, E.M.; LUCCHESI, B.A. Cardiac Electrophysiologic and Hemodynamic Activity of Pimobendan (UD-CG 1 1 5 BS), a New Inotropic Agent. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 244, n. 3, p. 929-939, 1988.

KOENIG, W.; SUND, M.; FRÖHLICH, M.; FISCHER, H.; LÖWEL, H.; DÖRING, A.; HUTCHINSON, W.L.; PEPYS, M.B. 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.

KUBO, S.H.; GOLLUB, S.; BOURGE, R.; et al. Beneficial effects of pimobendan on exercise tolerance and quality of life in patients with heart failure. Results of a multicenter trial. The Pimobendan Multi-center Research Group. *Circulation*, v. 85, n. 3, p. 942–949, 1992.

KVART C, HÄGGSTRÖM, J.; PEDERSEN, H.D. et al. Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med.*, v. 16, n. 1, p. 80–88, 2002.

LAMBERT, D. W.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin–angiotensin system. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, n. 4, p. 781–786, 2008.

LAVIOLLE, B.; PAPE, D.; TURLIN, B.; BELLISSANT, E. Direct Effects of 3 Combinations of Enalapril, Metoprolol, and Spironolactone on Cardiac Remodeling in Dilated Cardiomyopathic Hamsters. *Journal of Cardiac Failure*, v. 12, n. 9, p. 752-758, 2006.

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.

LOPEZ-JIMENEZ, F.; WU, C.O.; TIAN, X.; et al. Weight change after myocardial infarction—the enhancing recovery in coronary heart disease patients (ENRICHED) experience. *Am Heart J*, 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. *JACC*, 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.; PROTTER, A.A.; RIEGGER, G.A.J.; ELSNER, D. 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. *Curr Opin Cardiol*, v. 15, p. 189-196, 2000.

MACGREGOR, J.M.; RUSH, J.E.; LASTE, N.J.; MALAKOFF, R.L.; CUNNINGHAM, S.M.; ARONOW, N.; HALL, D.J.; WILLIAMS, J.; PRICE, L.L. Use of pimobendan in 170 cats (2006 - 2010). *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 13, n.4, p. 251-260, 2011.

MADRON, E.; KING, J.N.; STREHLAU, G.; WHITE, R.V. Survival and echocardiographic data in dogs with congestive heart failure caused by mitral valve disease and treated by multiple drugs: A retrospective study of 21 cases. *Can Vet J*, v. 52, n. 11, p. 1219–1225, 2011.

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.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; RUIZ-REJÓN, 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*, v. 95, n. 2-3, p. 145–151, 2004.

MASUO, K.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T.; TUCK, M.L. Weight reduction and pharmacologic treatment in obese hypertensives. *Am J Hypertens*, v. 14, n. 6, p. 530–8, 2001.

MCDONNELL, B.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R. Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing. *Clinical Biochemistry*, v. 42 n. 7-8, p. 549-61, 2009.

MILL, J. G.; MILANEZ, M. Z.; BUSATTO, V. C. W.; et al. 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.

MILLIEZ, P.; DEANGELIS, N.; RUCKER-MARTIN, C.; LEENHARDT, A.; VICAUT, E.; ROBIDEL, E.; BEAUFILS, P.; DELCAYRE, C.; HATEM, S.N. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *European Heart Journal*, v. 26, n. 20, 2193–2199, 2005.

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. (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2006. 70p.

MONTERA, M.W.; ALMEIDA, R.A.; TINOCO, E.M.; ROCHA, R.M.; MOURA, L.Z.; RÉA-NETO, A.; et al. II Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Aguda - Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v. 93, n. 3, supl. 3, p. 1-65, 2009.

MONTERO, I.J.F. Terapéutica cardiovascular. Revista Española de Cardiologia, v. 57, n. 9, p. 899, 2004.

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. 109-116, 1999.

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.; 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 (Including other peptidergic systems), 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.

NISHIZAKA, M.K.; ZAMAN, M.A.; CALHOUN, D.A. Efficacy of Low-Dose Spironolactone in Subjects With Resistant Hypertension. AJH, v. 16, n. 11, p. 925-930, 2003.

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 Clin*, v. 5, p. 471–487, 2009.

ONDETTI, M.A.; CUSHMAN, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, p. 283-308, 1982.

PAGEL, P.S.; HAIKALA, H.; PENTIKAINEN, P.J.; TOIVONEN, M.L; NIEMINEN, M.S.; LEHTONEN, L.; PAPP, J.G.; WARLTIER, D.C. Pharmacology of Levosimendan: A New Myofilament Calcium Sensitizer. *Cardiovascular Drug Reviews*, v. 14, n. 3, p. 286-316, 1996.

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

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

PATEL, A.J.; RAMAKRISHNAN, C.V. Studies on avian and mammalian heart tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 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.

PERRONE, S.V.; KAPLINSKY, E.J. Calcium sensitizer agents: A new class of inotropic agents in the treatment of decompensated heart failure. *International Journal of Cardiology*, v. 103, n. 3, p. 248-255, 2005.

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

PFEFFER, J.M.; PFEFFER, M.A. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and ventricular remodeling in heart failure. *American journal of Medicine*, v. 84, n. 3, p. 37-44, 1988.

PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W.J.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A. et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, v. 341, n. 10, p. 709-717, 1999.

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.

POUCHELON, J. L.; JAMET, N.; GOUNI, V.; TISSIER, R.; SERRES, F.; SAMPEDRANO, C.; CASTAIGNET, M.; LEFEBVRE, H. P.; CHETBOUL, V. Effect of Benazepril on Survival and Cardiac Events in Dogs with Asymptomatic Mitral Valve Disease: A Retrospective Study of 141 Cases. *J Vet Intern Med*, v. 22, n. 4, p. 905–914, 2008.

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

RAMIREZ, E.Y.; ALONSO, J.A.M. Manual clínico de cardiología básica en el perro y el gato. Zaragoza: Servet, 2005. 286p.

RAMOS, A.M.; PELLANDA, L.C.; GUS, I.; Portal, V.L. Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease in the Elderly. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 92, n. 3, p. 221-228, 2009.

RANKIN, A.J.; COURNEYA, C.A.; WILSON, N.; LEDSONE, 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. Universidade Técnica de Lisboa. 141p.

RODICIO, J.L. Does antihypertensive therapy protect the kidney in essential hypertension? *J Hypertens Suppl.*, v. 14, n. 2, p. 69-75, 1996.

RONA, G. Catecholamine Cardiotoxicity, *J Mol Cell Cardiol*, 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. *JACC*, 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.

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

SANTOS, E.L.; SOUZA, P.K.; GUIMARÃES P.B.; REIS, F.C.G.; NETO, C.M.; LUZ, J.; et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *Int Immunopharmacol*, v. 8, n. 2, p. 247–53, 2008

SANTOS, E.L.; SOUZA K.P.; SILVA E.D.; BATISTA, E.C.; MARTINS, P.J.F.; D'ALMEIDA V.; PESQUERO, J.B. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, n. 8, p. 951–958, 2009.

SASAKI T, KUBO T, KOMAMURA K, NISHIKIMI T. Effects of longterm treatment with pimobendan on neurohumoral factors in patients with non-ischemic chronic moderate heart failure. *J Cardiol.*, v. 33, n. 6, p. 317–325, 1999.

SAS, STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1998. Inc. Care. New York.

SATO, A.; SUZUKI, Y.; SARUTA, T. Effects of Spironolactone and Angiotensin-Converting Inhibitor on Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Essential Hypertension. *Hypertens Res*, v. 22, n. 1, p. 17-22, 1999.

SATO, A.; HAYASHI, M.; SARUTA, T. Relative Long-Term Effects of Spironolactone in Conjunction with an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor on Left Ventricular Mass and Diastolic Function in Patients with Essential Hypertension. *Hypertens Res*, v. 25, n. 6, p. 837–842, 2002.

SAYER, M.B.; ATKINS, C.E.; FUJII, Y.; ADAMS, A.K.; DEFRANCESCO, T.C.; KEENE, B.W. Acute Effect of Pimobendan and Furosemide on the Circulating Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 5, p. 1003-1006, 2009.

SCHMIDT, B.M.W.; SCHMIEDER, R.E. Aldosterone-Induced Cardiac Damage: Focus on Blood Pressure Independent Effects. *AJH*, v. 16, n. 1, p. 80-86, 2003.

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

SHIMIZU, M.; MOCHIZUKI, T.; KAWAGUCHI, T.; OSADA, K.; KUROSAWA, T.; KUMKAWA, S.; TSUYUSAKI, T.; LZUMI, T. Pimobendan Therapy on Cardiopulmonary and Arterial I Baroreceptors in Patients with Asymptomatic Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*, v. 4, n. 3, supl. 2, p. 144, 1998.

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. *Vet Clin Small Anim*, 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.

STRUTHERS, A.D. Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure. *Eur Heart J*, v. 16, p. 103-106, 1995.

SUMMERFIELD, N.J.; BOSWOOD, A.; O'GRADY, M.R.; GORDON, S.G.; DUKES-MCEWAN, J.; OYAMA, M.A.; SMITH, S.; PATTESON, M.; FRENCH, A.T.; CULSHAW, G.J.; BRAZ-RUIVO, L.; ESTRADA, A.; O'SULLIVAN, M.L.; LOUREIRO, J.; WILLIS, R.; WATSON, P. Efficacy of Pimobendan in the Prevention of Congestive Heart Failure or Sudden Death in Doberman Pinschers with Preclinical Dilated Cardiomyopathy (The PROTECT Study). *J Vet Intern Med*, v. 26, n. 6, p. 1337–1349, 2012.

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. *Can. J. comp. Med.*, v. 35, n. 2, p. 107-114, 1971.

TABACOVA, S.A.; KIMMEL, C.A. Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity - A review. *Reproductive Toxicology*, v. 15, p. 467–478, 2001.

TAKEDA, T.; HOSHIDA, S.; NISHINO, M.; TANOUCHI, J.; OTSU, K.; HORI, M. Relationship between effects of statins, aspirin and angiotensin II modulators on high-sensitive C-reactive protein levels. *Atherosclerosis*, v. 169, n. 1, p. 155-158, 2003.

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.

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. *J Mol Cell Cardiol.*, 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.

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.

TSUTAMOTO, T.; WADA, A.; MAEDA, K.; MABUCHI, N.; HAYASHI, M.; TSUTSUI, T.; OHNISHI, M.; SAWAKI, M.; FUJII, M.; MATSUMOTO, T.; MATSUI, T.; KINOSHITA, M. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, v. 37, n. 5, p. 1228-33, 2001.

UZUELLI, J.A. Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães. (Tese). 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 DE WAL, R.M.A.; PLOKKER, H.W.M.; LOK, D.J.A.; BOOMSMA, F.; VAN DER HORST, F.A.L.; VAN VELDHUISEN, D.J.; VAN GILST, W.H.; VOORS, A.A. Determinants of increased angiotensin II levels in severe chronic heart failure patients despite ACE inhibition. *International Journal of Cardiology*, v. 106, n. 3, p. 367-372, 2006.

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. XX, n. XX, p. 1-7, 2009.

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

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

VILARINHO, K.A.S.; PETRUCCI, O.; BAKER, R.S.; VASSALLO, J.; SCHENKA, A.A.; DUFFY, 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.

VILAS-BOAS, F.; FOLLATH, F. Tratamento Atua da insuficiência cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, n. 3, p.369-377, 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.

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. Universidade do Porto, 2011. 12p.

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

WEBER, K.T. Aldosterona in heart failure. *N Engl J Med*, v. 245, p. 1689-1697, 2001.

WEN, J.F.; CUI, X.; AHN, J.S.; KIM, S.H.; SEUL, K.H.; KIM, S.Z.; PARK, Y.K.; LEE, H.S.; CHO, A.K.W. Distinct roles for L- and T-type Ca^{2+} channels in regulation of atrial ANP release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279, p. 2879–2888, 2000.

WILKES, T.E.; IMRIE, S.T.; BRUNSON, J.G. Effects of epinephrine on newborn rabbits. *Am J Pathol.*, 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. *Jpn Heart J.*, 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. *Jpn Heart J.*, 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. *Am Heart J*, v. 163, n. 4, p. 735-40, 2012.

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

ZHANG, T.; GAO, C.; LI, L.; Establishment of a rabbit model of congestive heart failure. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 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.