



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA**

MESTRADO

AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

JOSÉ AUGUSTO MOUTINHO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção de título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman.

Curitiba

2005

JOSÉ AUGUSTO MOUTINHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS
EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE INFARTO
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
para obtenção de título de Mestre em Clínica
Cirúrgica.**

CURITIBA

2005

DEDICATÓRIA

A minha amada esposa Tatiana, que sempre se dedicou e me incentivou a ultrapassar qualquer obstáculo colocado à frente, mesmo que para tal, montanhas fossem removidas!

Ao meu filho Otávio Augusto, que apesar de tão novo, apenas seu olhar e sorriso me inspiram para seguir a batalha da vida!

Aos meus queridos pais, José e Vera, que me ensinaram a escrever sobre as rochas e não sobre a areia!

AGRADECIMENTOS

Ao meu mentor e orientador por seu carinho e dedicação.

A todas as pessoas que me ajudaram na prática experimental, na avaliação ecocardiográfica, na confecção e leitura das lâminas da anatomia patológica, na análise estatística, aos colegas e amigos que foram compreensivos devido a minha ausência profissional do dia a dia e a todos que me auxiliaram de alguma forma nesta pesquisa, pois sem estas pessoas, esta dissertação não estaria se concretizando.

Cada pessoa, em sua existência, pode ter duas atitudes: construir ou plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estão fazendo, então param e ficam limitados por suas próprias paredes. A vida perde o sentido quando a construção acaba. Mas existem os que plantam, esses às vezes sofrem com tempestades, as estações e raramente descansam. Mas ao contrário de um edifício, os jardins jamais param de crescer e, ao mesmo tempo que exigem atenção do jardineiro, também permite que para ele, a vida faça sentido e seja uma grande aventura. Os jardineiros se reconhecerão entre si porque sabem que na estória de cada planta está o crescimento de toda a terra.

autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 ANATOMIA DAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS DOS RATOS.....	6
2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE IAM POR LIGADURA DA CORONÁRIA ESQUERDA.....	7
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE IAM POR CRIOLESÃO.....	9
2.4 FISIOPATOLOGIA.....	11
2.5 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO IAM EM MODELOS EXPERIMENTAIS.....	15
3 MÉTODOS	17
3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	18
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	19
3.2.1 Respirador.....	19
3.2.2 Criolesão.....	20
3.2.3 Materiais Operatórios.....	21
3.2.4 Ecocardiografia.....	22
3.2.5 Microscopia.....	23
3.3 TÉCNICA OPERATÓRIA EMPREGADA.....	25
3.3.1 Determinação do Peso dos Animais.....	25
3.3.2 Obtenção da Via Aérea e Ventilação.....	25
3.3.3 Posição do Animal Durante o Experimento.....	26

3.3.4 Descrição do Procedimento.....	27
3.4 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO.....	30
3.5 PESO DO CORAÇÃO.....	33
3.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	33
3.7 ANALISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 ANATOMIA CORONARIANA.....	40
4.2 MORTALIDADE.....	40
4.3 PESO DOS ANIMAIS.....	40
4.4 PESO DO CORAÇÃO DOS ANIMAIS.....	41
4.5 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	42
4.6 ANALISE ECOCARDIOGRÁFICA.....	43
4.6.1 Grupo Controle.....	43
4.6.2 Grupo A (ligadura).....	44
4.6.2.1 Variáveis ecocardiográficas.....	44
4.6.2.2 Tipo de contratilidade da parede do VE após lesão miocárdica.....	46
4.6.2.3 Localização da área afetada após a lesão miocárdica.....	47
4.6.3 Grupo B (criolesão).....	48
4.6.3.1 Variáveis ecocardiográficas.....	48
4.6.3.2 Contratilidade da área afetada (acinesia, hipocinesia, discinesia ou normal).....	50
4.6.3.3 Localização da área afetada após lesão miocárdica.....	51
4.6.4 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas Entre o Grupo A e o B no 7º Dia Pós-infarto com o Grupo Controle.....	52

4.6.5 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas entre o Grupo A e o B no 30º dia Pós-Infarto com o Grupo Controle.....	54
4.6.6 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas nos Grupos A e B entre o 7º e 30º dia Pós-Lesão Miocárdica.....	58
4.6.7 Tipo de Contratilidade da Parede do Ventrículo Esquerdo Pós-Lesão miocárdica entre os grupos A e o B.....	59
4.6.8 Comparação da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo entre os Grupos Pós-lesão Miocárdica com o Grupo Controle.....	61
4.7 ANATOMIA PATOLÓGICA.....	62
4.7.1 Necrose Transmural.....	62
4.7.2 Necrose Epicárdica e Endocárdica.....	62
4.7.3 Extensão do Infarto Epicárdico e Endocárdico.....	63
5 DISCUSSÃO.....	64
5.1 MORTALIDADE.....	65
5.2 FISIOPATOLOGIA.....	65
5.3 MODELO EXPERIMENTAL.....	66
5.4 ANGIOGÊNESE.....	69
5.5 FIBROSE MIOCÁRDICA.....	69
5.6 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	70
5.7 PESO DO CORAÇÃO.....	71
5.8 VARIÁVEIS ECOCARDIOGRÁFICAS.....	71
5.9 TIPO DE CONTRATILIDADE.....	72
5.10 LOCALIZAÇÃO DO IAM.....	72
5.11 ANATOMIA PATOLÓGICA.....	72

6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS.....	85

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Dados ecocardiográficos dos animais do grupo C.....	44
QUADRO 2 – Variáveis ecocardiográficas dos três grupos no 7º dia pós-lesão.....	53
QUADRO 3 – Comparações múltiplas (grupos dois a dois).....	54
QUADRO 4 – Variáveis ecocardiográficas dos três grupos no 30º dia pós-lesão.....	55
QUADRO 5 – Comparações múltiplas (grupos dois a dois).....	55
QUADRO 6 – Presença ou não de lesão transmural nos grupos A e B.....	62
QUADRO 7 – Lesão epicárdica e endocárdica nos grupos A e B.....	63
QUADRO 8 – Comprimento das lesões não transmurais.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Respirador a volume.....	19
FIGURA 2 – Conjunto de criolesão.....	20
FIGURA 3 – Ponteira utilizada.....	21
FIGURA 4 – Materiais utilizados para toracotomia nos animais do grupo A e B e ligadura da CE.....	22
FIGURA 5 – Aparelho de ecocardiografia bidimensional para animais de pequeno porte.....	23
FIGURA 6 – Microscópio Óptico Olympus IX70®.....	24
FIGURA 7 - Microscópio Óptico Olympus RX 50® com transdutor de imagem acoplado à um microcomputador	24
FIGURA 8 – Animal intubado conectado ao sistema de ventilação mecânica	26
FIGURA 9 – Posição do animal e início da toracotomia lateral esquerda com 1,5cm de extensão	27
FIGURA 10 – Ilustração da exposição do coração e início da ligadura da coronária esquerda.....	28
FIGURA 11 – Aspecto do coração após a ligadura da coronária esquerda.....	28
FIGURA 12 – Modo de aplicação da ponteira com nitrogênio líquido.....	29
FIGURA 13 – Aspecto da lesão miocárdica após a criolesão.....	30
FIGURA 14 – Transdutor sobre o tórax do animal	31
FIGURA 15 - Imagem ecocardiográfica com monitorização eletrocardiográfica.....	31
FIGURA 16 – Imagem ecocardiográficas mostrando a área do ventrículo esquerdo.....	33

FIGURA 17 – Os quatro cortes coronais dividindo o coração em quatro cortes (base, médio proximal, médio distal e ápex).....	34
FIGURA 18 – Lâminas com as três colorações citadas.....	35
FIGURA 19 – Imagem de necrose não transmural (endocárdica) na coloração hematoxilina eosina no aumento de 40x.....	36
FIGURA 20 – Imagem de necrose transmural com afinamento da parede do VE em coloração tricrômio de Gomori no aumento de 40x.....	37
FIGURA 21 – Imagem de lesão epicárdica na coloração de Sirius-Red com aumento de 40x.....	37
FIGURA 22 – Imagem de coração sem lesões miocárdicas em um animal do grupo controle na coloração de Sirius-Red com aumento de 40x....	38
FIGURA 23 – Média \pm dp de pesos nos grupos do experimento.....	41
FIGURA 24 – Média \pm dp dos pesos dos corações nos grupos do experimento....	42
FIGURA 25 – Média da freqüência cardíaca dos três grupos.....	43
FIGURA 26 – Variáveis ecocardiográficas no 7 ^o e 30 ^o dia pós-ligadura da CE.....	45
FIGURA 27 – Fração de ejeção no 7 ^o e 30 ^o dia pós-infarto.....	46
FIGURA 28 – Tipo de contratilidade do VE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-ligadura da CE.....	47
FIGURA 29 – Localização da área afetada após infarto.....	48
FIGURA 30 – Variáveis ecocardiográficas no 7 ^o e 30 ^o dia pós-procedimento.....	49
FIGURA 31 – FE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-lesão miocárdica.....	50
FIGURA 32 – Tipo de contratilidade do VE após o 7 ^o e 30 ^o dia pós-lesão.....	51
FIGURA 33 – Localização da área afetada após infarto.....	52
FIGURA 34 – ADFVE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-lesão.....	56
FIGURA 35 – VDFVE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-procedimento.....	56
FIGURA 36 – ASFVE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-procedimento.....	57
FIGURA 37 – VSFVE no 7 ^o e 30 ^o dia pós-lesão miocárdica.....	57

FIGURA 38 – FEVE no 7º e 30º dia pós-procedimento.....	58
FIGURA 39 – Comparação do grupo A com o B no 7º dia pós-lesão miocárdica.....	60
FIGURA 40 – Comparação do grupo A com o B no 30º dia pós-lesão.....	60
FIGURA 41 – Fração de ejeção dos três grupos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADFVE- área diastólica final de ventrículo esquerdo
ASFVE- área sistólica final de ventrículo esquerdo
C- comprimento
CE- coronária esquerda
COBEA- colégio brasileiro de experimentação animal
dp- desvio padrão
FE- fração de ejeção
FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo
HE- hematoxilina eosina
IAM- infarto agudo do miocárdio
ICC- insuficiência cardíaca congestiva
NL- nitrogênio líquido
PC- peso corpóreo
PUCPR- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
VD- ventrículo direito
VDFVE- volume diastólico final de ventrículo esquerdo
VE- ventrículo esquerdo
VS- versus
VSFVE- volume sistólico final de ventrículo esquerdo

RESUMO

INTRODUÇÃO: A insuficiência cardíaca congestiva é a maior causa de mortalidade e morbidade nos países do ocidente, tendo como sua principal etiologia o infarto agudo do miocárdio. Na tentativa de reproduzir a progressão da insuficiência cardíaca que ocorre em seres humanos por doença coronariana, modelos experimentais de isquemia miocárdica têm sido desenvolvidos por diferentes técnicas. O animal de experimentação mais utilizado para o IAM tem sido o rato.

OBJETIVO: Avaliar dois métodos de indução de lesão miocárdica em ratos; por ligadura da artéria coronária esquerda e por lesão direta da parede livre do ventrículo esquerdo através da criolesão, quantificando-se a extensão da lesão e o comprometimento da função ventricular.

MÉTODOS: Foram utilizados 50 ratos machos, da linhagem Wistar, com idade entre 6-7 meses, com o peso variando de 368-414g. Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos (A, B e C). No grupo A (n=20) os animais foram induzidos ao IAM pela técnica de ligadura da artéria coronária esquerda. No grupo B (n=20) foram submetidos à lesão miocárdica através de criolesão, e no grupo C (n=10) não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica e foram usados como controle. Para a quantificação das lesões miocárdicas foi realizada a ecocardiografia transtorácica no 7º e 30º dia pós IAM sendo confirmados pelo estudo anatomopatológico.

RESULTADOS: No 30º dia pós-lesão miocárdica, a FEVE no grupo A foi de $34,45 \pm 9,99\%$, no B foi de $37,23 \pm 8,93\%$ e o grupo controle de $44,75 \pm 5,54\%$; resultando $p=0,0096$. As variáveis ecocardiográficas utilizadas para medir as cavidades ventriculares apresentaram maior dilatação do ventrículo esquerdo no grupo da ligadura. A anatomopatologia não mostrou diferença significativa entre os dois métodos.

CONCLUSÕES: Os dois métodos são efetivos na indução da disfunção do ventrículo esquerdo, no entanto, a ligadura provoca alterações da contratilidade mais graves apresentando maior dilatação do VE. Ao estudo anatomopatológico não há diferença com relação à extensão e ao tipo de lesão.

Descritores: infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, modelos animais, coração, ratos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Congestive heart failure (CHF) is the main cause of mortality and morbidity in the Western world, and acute myocardial infarction (AMI) is the main etiology for this condition. In an attempt to reproduce the progression of CHF due to coronary artery disease observed in humans, several experimental models of myocardial ischemia have been developed with different techniques. Rat has been the most useful animal model of AMI. **AIM:** The aim of this study is to evaluate two different techniques to induce myocardial damage in rats: left coronary artery occlusion by ligation and cryoinjury of left ventricle (LV) free wall. Damage extent and deterioration of LV function were assessed. **METHODS:** Fifty Wistar male rats aging 6-7 months old, weighing 368-414, were randomly assigned to three groups. In group A, AMI was induced in 20 rats by left coronary artery ligation; in group B, 20 rats were submitted to myocardial cryoinjury. Ten rats with no intervention formed group C (control group). Echocardiography was performed on 7th and 30th day post-AMI to assess the extent of myocardium damage, which was lately confirmed by anatomopathological evaluation. **RESULTS:** After 30 days, LV ejection fraction was $34.45 \pm 9.99\%$ in group A, $37.23 \pm 8.93\%$ in group B and $44.75 \pm 5.54\%$ in control group ($p=0.0096$). Echocardiographic assessment of ventricular volumes demonstrated greater left ventricular dilation in the group where myocardial infarction was performed by artery ligation. Anatomic pathology evaluation showed no significant difference between both methods. **CONCLUSION:** The two methods were both effective in inducing ventricular dysfunction, however ligation of left coronary damage causes more dysfunction and dilation of LV. Anatomopathological evaluation showed no difference between both methods in regard to the damage extent and injury type.

Key words: myocardial infarction, congestive heart failure, animal models, heart , rats.

1 INTRODUÇÃO

O coração é um órgão único que possui alta taxa metabólica e consumo de oxigênio. Possui seu próprio sistema vascular que supre o miocárdio com nutrientes e oxigênio para a manutenção de suas funções e integridade estrutural. O coração recebe sangue diretamente da aorta através de duas coronárias: a esquerda e a direita. Da coronária esquerda, o ramo descendente anterior é particularmente o mais importante, pois este vaso, na grande maioria dos casos, supre uma grande parte do ventrículo esquerdo.

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocorre quando há uma interrupção do fluxo sanguíneo a uma região do músculo cardíaco, tendo como consequência a necrose devida à morte dos cardiomiócitos que são altamente sensíveis a privação de oxigênio. A necrose miocárdica é acompanhada por processo inflamatório onde há infiltração de neutrófilos e macrófagos no tecido morto. Durante o processo de cicatrização, capilares e fibroblastos povoam o miocárdio danificado e formam o tecido de granulação. Os fibroblastos produzidos aumentam a quantidade de colágeno, o ventrículo infartado torna-se remodelado e muitas semanas depois o miocárdio é substituído por tecido fibrótico de baixa celularidade. Este remodelamento é um efeito dos miócitos sobreviventes, pois tentam compensar a função das células perdidas por uma hipertrofia compensatória.¹ Estas mudanças estruturais levam à alterações funcionais como o aumento do volume final do ventrículo esquerdo e a diminuição da fração de ejeção.^{2,3}

O que se teme depois do infarto do miocárdio são as complicações. As mais letais são as arritmias, que podem ocorrer num prazo de 24 horas após o infarto. Dentre outras encontramos: a pericardite, o hemopericárdio, a ruptura do septo interventricular, a ruptura da parede livre do ventrículo esquerdo, a ruptura de cordoalhas tendíneas, a ruptura de músculos papilares, o aneurisma de ventrículo esquerdo, o choque cardiogênico, a insuficiência cardíaca e a formação de trombos no átrio, na aurícula e no ventrículo esquerdos.

Modelos experimentais de IAM são importantes para estudo da fisiopatologia, assim como para o desenvolvimento de novas terapêuticas para seu tratamento. Transplante cardíaco, dispositivos de assistência ao ventrículo esquerdo, corações artificiais e técnicas de implante celular necessitam de modelos animais para testes e otimização de seu uso para a aplicação em seres humanos. Diversas espécies (cachorros, gatos, porcos, coelhos e ratos) têm sido usadas, cada uma mostrando vantagens e desvantagens sobre a outra.

O animal de experimentação mais utilizado para o IAM tem sido o rato, tanto para estudos estruturais, bioquímicos, alterações hemodinâmicas, indução da insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e os efeitos da terapêutica.⁴ A necrose tecidual pode ser induzida de diferentes maneiras. Uma delas é o modelo de oclusão, ao qual se liga definitivamente a artéria coronária esquerda.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17} Existem dois tipos de ligadura: a ligadura permanente da artéria descendente anterior ou a temporária chamada de isquemia de reperfusão. O modelo de ligadura é similar ao que ocorre no IAM natural. No entanto, o sistema de circulação colateral difere muito entre as diversas espécies e em cada animal, e, portanto o tamanho do infarto criado pela ligadura da coronária esquerda resulta em uma grande variável de resultados.¹⁸ Outra técnica de indução de IAM é chamada de crioterapia ou criolesão. Este tipo de lesão no miocárdio por hipotermia local é induzido com uma haste metálica congelada em nitrogênio líquido, o que produz uma lesão controlada e de tamanho previsível.¹⁹ Ainda que não seja um modelo de IAM fisiológico, o padrão de cicatrização celular é similar ao do infarto agudo do miocárdio.²⁰

A insuficiência cardíaca congestiva é a maior causa de mortalidade e morbidade nos países do ocidente, tendo como sua principal etiologia o IAM, porém outras causas podem desencadear esta grave doença. O tratamento clínico tem aumentado a sobrevida destes doentes em 50% nos primeiros 5 anos. O modelo experimental perfeito para reproduzir a insuficiência cardíaca e todos os aspectos da evolução natural da doença não existe. Modelos de ICC aguda e crônica têm sido desenvolvidos, reproduzindo diferentes aspectos de sua fisiopatologia.

Na tentativa de reproduzir a progressão da insuficiência cardíaca que ocorre em seres humanos por doença coronariana, modelos experimentais de isquemia

miocárdica têm sido desenvolvidos por diferentes técnicas: microembolização, ligação da artéria coronária, constritores ameróides, rolos de esponja de “gelfoam” por via percutânea e crionecrose.²¹

Existem alguns métodos para quantificar a falência miocárdica induzida pelo IAM em animais de pequeno porte. Tradicionalmente, a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo tem sido um critério usado em ratos, no entanto, é necessária a canulação de uma das artérias carótida, podendo a presença do cateter afetar de forma significativa à contratilidade do ventrículo esquerdo. Devida às dificuldades técnicas apresentadas pelo método citado, a opção pela ecocardiografia transtorácica bidimensional representa um método eficaz e seguro. Existem diversas variáveis ecocardiográficas que podem ser usadas no diagnóstico do IAM e na quantificação da disfunção ventricular, tais como: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, fração de ejeção, presença ou não de contratilidade nas diversas paredes do VE, entre outras.¹²

Outro método utilizado para quantificação do IAM é pela medida planimétrica do total da área infartada sobre a circunferência total do ventrículo esquerdo²², realizada pós-morte.

1.1 OBJETIVO

Avaliar dois métodos de indução de lesão miocárdica em ratos; por ligadura da artéria coronária esquerda e por lesão direta na parede livre do ventrículo esquerdo utilizando a criolesão, quantificando-se a extensão da lesão e o comprometimento da função ventricular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA DAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS EM RATOS

As artérias coronárias dos ratos podem ser vistas a olho nu em corações intactos como uma fina linha vermelha sobre a superfície do coração, no entanto, não são mais visíveis na autópsia naturalmente. Duas artérias coronárias (direita e esquerda) surgem da aorta e descem para o ápex do coração. A coronária esquerda é predominante e irriga o ventrículo esquerdo com seus ramos. Não existe uma verdadeira artéria circunflexa como é vista em espécies maiores.¹⁸

Rodriguez et al.²³ produziram trinta modelos anatômicos de corações de vertebrados com o intuito de estudar as artérias coronárias esquerda e direita de diversas espécies. Um dos mamíferos estudados foi o rato albino da variedade Wistar. A anatomia cardíaca encontrada neste animal evidenciou dois átrios, dois ventrículos, valvas atrioventriculares e aorta saindo do ventrículo esquerdo. A anatomia coronariana apresentou artéria coronária direita emergindo de óstio próprio, dirigindo-se para a margem direita do ventrículo direito, com seu ramo interventricular posterior e a artéria coronária esquerda emergindo de óstio próprio, bifurcando-se, em seguida, em artéria circunflexa e artéria interventricular anterior com ramo diagonal.

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE IAM POR LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA

Gross et al.²⁴ realizaram a ligadura da artéria coronária descendente anterior por toracotomia lateral esquerda em 53 cachorros, com 28 deles evoluindo para o óbito. Fauteux²⁵ realizou experimento semelhante em 15 animais, dos quais 14 faleceram e Stanton et al.²⁶ operaram 50 cachorros, 35 morreram no período de três minutos a duas semanas após a oclusão coronariana. Dos 15 sobreviventes, sete evoluíram com grande área infartada, quatro com média e quatro com pequena.

Johns e Olson¹⁸ realizaram um estudo experimental sobre infarto agudo do miocárdio induzido por ligadura da artéria coronária esquerda em roedores de pequeno porte, identificando de imediato, mudanças da coloração e da contratilidade do ventrículo esquerdo. O mesmo procedimento foi realizado em cachorros, no entanto com uma taxa de sobrevivência menor e com áreas de infarto com pouca extensão. Outro dado importante encontrado foi a quase ausência de arritmia ventricular grave pós-infarto agudo do miocárdio em roedores, apresentando apenas um caso dentre mais de duzentos, que se reverteu após massagem cardíaca. Em contrapartida, os cachorros apresentaram uma alta incidência de arritmia ventricular grave com pouca tolerância a interrupção do fluxo coronariano.

Seguindo o modelo de Johns e Olson¹⁸, outros autores como Pfeffer et al.⁵, Mill et al.⁶, Pfeffer et al.⁷, Ytrehus et al.⁸, Leor et al.⁹, Scorsin et al.¹⁰, Liu et al.¹¹, Sjaastad et al.¹², De Angelis et al.¹³, Hayakawa et al.¹⁴, Pasquale et al.¹⁵, Brofman et al.^{16,17}, realizaram o infarto agudo do miocárdio em ratos fazendo a ligadura da artéria coronária esquerda. O procedimento é realizado por toracotomia lateral esquerda após anestesia geral e obtenção de uma via aérea definitiva. O pericárdio é aberto, as artérias coronárias identificadas e então o infarto é induzido pela ligadura da artéria coronária esquerda com fio monofilamentar não absorvível 7-0. A região infartada é observada de imediato pela diferença de coloração e alteração de contratilidade do ventrículo esquerdo. Após este último procedimento, o tórax é fechado por camadas e o animal é extubado.

Johns e Olson¹⁸ usaram 355 ratos no estudo para indução de IAM por ligadura e 82 animais como grupo controle, nos quais só foi realizada a toracotomia. No grupo no qual a artéria coronária foi ligada, 21% dos animais evoluíram com óbito transoperatório, 12% com óbito tardio, 67% sobreviveram e 83% apresentaram infarto efetivo. No grupo controle, ocorreu 13% de óbitos transoperatórios, 5% de óbitos tardios e 82% de sobreviventes.

Liu et al.¹¹ realizaram um estudo com 78 ratos nos quais ligaram a artéria coronária esquerda para a indução da insuficiência cardíaca congestiva. Onze por cento dos animais faleceram nas primeiras vinte e quatro horas, nove por cento de 24 horas a seis meses (mortalidade total de 20%) e apenas três por cento dos animais não apresentaram sinais de infarto agudo do miocárdio. Pesaram os corações dos animais infartados na primeira e na segunda semana pós-ligadura, e no primeiro, segundo, terceiro, quarto e sexto mês, sendo que só houve diferença significativa da massa cardíaca a partir do primeiro mês em diante. Com os dados citados acima, adicionados de parâmetros ecocardiográficos, os autores mostraram disfunção ventricular e desenvolvimento de dilatação do ventrículo esquerdo já na primeira semana, apresentando piora progressiva da função do ventrículo esquerdo e dilatação do mesmo entre o primeiro e segundo mês.

De Angelis et al.¹³ realizaram um estudo experimental em ratos, no qual se fazia necessário a indução do IAM por ligadura da artéria coronária esquerda. Tiveram 30% de mortalidade até 48 horas após o procedimento cirúrgico. Neste estudo, apenas ratos com vinte por cento ou mais de área do ventrículo esquerdo afetado entraram no grupo de estudo.

Etzion et al.²⁷ mostraram uma taxa de mortalidade imediata de 10% após a indução de infarto agudo do miocárdio em ratos pelo método da ligadura da coronária esquerda.

Degabriele et al.²⁸ fizeram um estudo com 46 camundongos com peso variando de 20-25g (6-10 semanas de vida). Distribuíram os animais em quatro grupos: 1º- IAM com sutura alta (proximal), ou seja, o ramo descendente anterior da coronária esquerda foi ligado logo na bifurcação da artéria; 2º- sutura média (0,3mm da junção atrioventricular); 3º- sutura baixa (0,6mm da junção atrioventricular) e 4º- grupo controle (animais sem intervenção). Não encontraram diferença na sobrevida,

em sete dias nos animais do grupo controle, sutura baixa e média apresentando as sobrevidas de 100%, 90% e 73% respectivamente. Todavia, houve baixa sobrevida (33%) nos animais do grupo da ligadura alta. Relataram 67% de mortalidade. Concluíram que a oclusão da artéria coronária descendente anterior 0,3mm distal à junção atrioventricular reproduz uma redução significativa da função ventricular com baixa mortalidade.

A oclusão da artéria coronária nesses animais tem um grande impacto na disfunção ventricular, podendo variar de alteração mínima à falência ventricular esquerda, sempre dependendo do tamanho do infarto.⁵

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE IAM POR CRIOLESÃO

Criocirurgia ou criolesão, por definição, é o uso do frio para provocar destruição de tecidos, ao contrário da crioterapia, que é o emprego do frio para tratamento de doenças diversas sem provocar destruição tecidual. Atualmente a criocirurgia utiliza dois compostos: o gás carbônico e o nitrogênio líquido. O gás carbônico (dióxido de carbono, neve carbônica, gelo seco) tem, atualmente, aplicação pouco limitada pela dificuldade de manuseio (exige treinamento para o uso de pressões adequadas) e por não possibilitar grande destruição tecidual. Ao contrário, o nitrogênio líquido possibilita grande destruição tecidual com fácil manuseio e baixo custo. A temperatura de ebulição do nitrogênio líquido é de -196°C ($-195,8^{\circ}\text{C}$) que é sua capacidade de congelamento quando aplicado. O dano tecidual dependerá da técnica utilizada.²⁹ No processo de lesão, há formação de gelo intra e extracelular, provocando alterações no equilíbrio osmótico que poderá ocasionar morte celular. Com o descongelamento, formam-se macrocristais de gelo no interior da célula que provocam o rompimento da membrana celular, de dentro para fora. Outros fatores que atuam são a estase vascular com a formação de trombos e a destruição da membrana fosfolipídica celular.^{29,30} As técnicas de aplicação do nitrogênio líquido (NL) são: estilete com algodão, jato (spray), cone e a de ponta sólida (sonda).

Outro método de indução de infarto agudo do miocárdio em ratos é o da criolesão. Uma sonda elíptica sólida medindo 8x10mm de diâmetro é imersa em nitrogênio líquido e aplicada sobre a parede livre do ventrículo esquerdo na região da coronária esquerda (acima da auriculeta esquerda) por um minuto. Este procedimento foi repedido dez vezes. Oito semanas após a lesão miocárdica, a localização e a dilatação da cavidade ventricular esquerda foi confirmada pelo estudo anatomopatológico. As paredes do ventrículo mais afetadas foram a anterior e a lateral, mostrando afinamento da parede lesada (lesão transmural) e dilatação importante da câmara ventricular esquerda.^{31,32,33}

Li et al.³¹ mostraram que a lesão sobre o miocárdio com a criolesão era homogênea e generalizada ocupando 36% da parede livre do ventrículo esquerdo nas primeiras quatro semanas e 55% em oito semanas. Também comprovaram importante aumento do peso do coração quando comparado com o grupo controle.

Zhang et al.³⁴ realizaram um estudo em 344 ratos machos da linhagem Fischer nos quais foram submetidos à lesão miocárdica com nitrogênio líquido. Utilizaram uma haste de alumínio com cinco milímetros de diâmetro. Esta haste era mergulhada em nitrogênio líquido e imediatamente colocada em contato com a parede anterior do ventrículo esquerdo por 30 segundos. Após o descongelamento do tecido, a haste era novamente mergulhada em nitrogênio líquido e colocada em contato no mesmo local por mais 30 segundos. As duas seqüências de congelamento foram o suficiente para induzir necrose transmural envolvendo 9,4% do ventrículo esquerdo.

Razvadauskaite³⁵ fez um estudo experimental em ratos Lewis, com o peso variando de 224-245g, utilizando o nitrogênio líquido para induzir o infarto do miocárdio neste grupo de animais. Utilizou uma ponteira oval com um centímetro quadrado de área. Aplicou a ponteira, após imersão em nitrogênio líquido, sobre a parede livre do VE em duas sessões de 12 a 15 segundos com um minuto de intervalo. Obteve lesões miocárdicas homogêneas com disfunção ventricular significativa, motivo pelo qual optou pelo modelo de criolesão ao de ligadura da coronária esquerda.

Monnet et al.²¹ induziram ratos e coelhos ao IAM por meio da criolesão com uma ponteira metálica com medidas de 0,18 X 1,2cm² imersa em nitrogênio líquido e

aplicada à parede livre do ventrículo esquerdo por 20 segundos 15 vezes. Concluíram que a criolesão nem sempre induz a lesões transmuralis e muitos corações que apresentavam comprometimento de toda a parede do ventrículo curaram sem desenvolver fibrose ou aneurisma de ventrículo.

2.4 FISIOPATOLOGIA

Modelos de animais pós-infarto têm sido amplamente estudados, pois a isquemia miocárdica e o infarto agudo do miocárdio são causas freqüentes de insuficiência cardíaca congestiva em humanos. No entanto, nem todos os corações pós-infarto evoluem para ICC, pois já é demonstrado que a dilatação do ventrículo esquerdo ocorre apenas em grandes infartos transmuralis.^{5,36}

Nos infartos miocárdicos transmuralis em ratos, Hochman e Bulkley³⁷ relataram que a extensão do infarto não estava relacionada apenas com o tamanho, mas também com o tempo de evolução, não havendo mudanças estruturais nos primeiros dois dias após o infarto, mostrando alterações na estrutura celular em 65% dos animais infartados no quinto ao sétimo dia pós-ligadura. Em contrapartida, Pfeffer et al.⁷ evidenciaram mudanças estruturais (aumento de volume) já nas primeiras 4-6 horas após a ligadura da coronária em 51% dos ratos com grandes infartos e em 41% dos ratos com moderados infartos.

A remodelação do miocárdio pós-infarto pode ser dividida em uma fase precoce (primeiras 72 horas) e uma fase tardia (após 72 horas). A fase precoce envolve a expansão da zona de infarto, a qual pode resultar em ruptura ventricular ou formação de aneurisma, enquanto a fase de remodelação tardia envolve o ventrículo esquerdo como um todo, ou seja, dilatação do VE, modificação da forma ventricular e hipertrofia da parede do ventrículo.³⁸

Mudanças adaptativas do ventrículo pós-infarto incluem dilatação, hipertrofia e formação de fibra colágena. A remodelação ventricular pode continuar por semanas ou mesmo meses, até que exista um contrabalanço entre as forças de distensão e a formação de colágeno. O balanço é determinado pelo tamanho do

infarto, localização, se é ou não transmural, patência ou não da artéria infartada e fatores locais.³⁹

A função do VE infartado não é apenas dependente da contratilidade do músculo viável, mas também da capacidade de formação de tecido fibrótico na área necrosada, sendo ambos os processos tempo dependentes.⁶

Em infartos miocárdicos induzidos, de moderada a grande extensão, houve mudanças significativas de pressão, volume, massa e fração de ejeção, ao contrário dos ratos que evoluíram com infarto de pequena extensão e dos animais sem infarto (grupo controle) no qual não houve mudanças significativas nos parâmetros citados acima. Em moderados e grandes infartos induzidos do ventrículo esquerdo, há processo inflamatório, desenvolvimento de edema e aumento do peso do ventrículo, o qual retorna a valores normais após hipertrofia compensatória do miocárdio residual. Durante a resolução da resposta inflamatória, ocorre dilatação do ventrículo esquerdo independente do tamanho da área infartada. Após a cicatrização completa da área afetada, ratos com pequenos infartos não evoluem com aumento da câmara cardíaca, processo demonstrado em moderados e grandes infartos, os quais apresentam dilatação de suas câmaras. Com a resolução da resposta inflamatória aguda e a formação de tecido cicatricial, a massa ventricular cai progressivamente para níveis quase normais no sétimo e décimo nono dia pós-infarto, retornando aos valores de base no centésimo sexto dia após o IAM, reflexo do mecanismo compensatório do miocárdio residual.⁷

Após o infarto do miocárdio, os cardiomiócitos da região afetada são gradativamente substituídos por tecido fibrótico com perda da função contrátil regional. O remodelamento ventricular resulta em um afinamento da parede podendo formar um aneurisma de ventrículo esquerdo, além de insuficiência cardíaca. A disfunção miocárdica é, primariamente, causada pela perda dos cardiomiócitos.^{40,41}

Anversa et al.⁴² descreveram que a hipertrofia do ventrículo direito após infarto do ventrículo esquerdo pode ser atribuída a dois fatores: à estimulação mecânica desencadeada pela hipertensão pulmonar e à ativação do sistema neuro-hormonal sistêmico ou local.

Bolognese e Cerisano⁴³ demonstraram que a hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo e direito não se deve apenas ao estímulo mecânico da elevação

da pré-carga ou da pós-carga. Estímulos mecânicos locais, via estiramento e ativação de mecanotransdutores, associados à reação inflamatória decorrente de necrose dos miócitos, promovem a liberação de fatores de crescimento que estimulam a hipertrofia e a fibrose.^{44,45}

As mudanças patológicas que ocorrem após a ligadura da artéria coronária, no rato, têm sido muito estudadas. O remodelamento ventricular desenvolvido após o IAM em ratos é similar ao que acontece em humanos.⁴ Inicialmente ocorre diminuição da espessura da parede ventricular da área infartada, enquanto há hipertrofia das paredes não afetadas em resposta ao aumento de estresse, importantes processos adaptativos de ambos os ventrículos na manutenção da função mecânica do ventrículo esquerdo. Ratos com menos de 20% de área infartada têm pouca ou nenhuma alteração hemodinâmica. Entretanto, animais com grandes infartos desenvolvem aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, mesmo que numa avaliação inicial nas três primeiras semanas não haja mudanças na função e na complacência do músculo não afetado. Todavia após seis semanas de IAM há uma disfunção contrátil, perda da complacência ventricular, hipertrofia dos miócitos e aumento das fibras colágenas no miocárdio não infartado, pois as mudanças de pressão e volume estão diretamente relacionadas ao tempo de infarto, podendo o ventrículo esquerdo continuar a dilatar por até um ano após a isquemia.^{4,6,7}

Epifanio et al.⁴⁶ fizeram um estudo com 35 ratos Wistar machos sobre a remodelação miocárdica após infarto agudo do miocárdio. O IAM acompanhou-se de hipertrofia dos ventrículos esquerdo e direito, indicando que o crescimento muscular foi altamente compensatório. A análise estatística mostrou que os pesos médios dos ventrículos corrigidos pelos pesos corporais (VE/PC), foram menores nos grupos tratados com medicação e no grupo controle quando comparados ao grupo com infarto agudo sem tratamento. O infarto agudo levou ao aumento da massa ventricular direita. Houve elevação, estatisticamente significativa, da fração do colágeno intersticial do ventrículo esquerdo do grupo não tratado em relação aos grupos controle e tratados com medicações, concluindo que a remodelação miocárdica pós-infarto é caracterizada pelo aumento da massa ventricular remanescente e aumento de colágeno intersticial.

Outro dado importante demonstrado por estes autores foi que, dependendo do tamanho da área infartada, a medida do peso do ventrículo tende a subestimar a presença da hipertrofia ventricular. Em vigência de infarto agudo do miocárdio, a medida da área celular do miócito é o melhor índice para hipertrofia do músculo cardíaco. Descreveram também aumento de fibrose intersticial em áreas remotas ao infarto, pela medida de fração do colágeno do ventrículo esquerdo.

Mesmo com o avanço dos métodos de diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, ela tem sido uma das doenças cardiovasculares com maior incidência, prevalência e alta mortalidade em nosso meio, sendo o infarto agudo do miocárdio sua principal etiologia.^{9,47}

A insuficiência cardíaca congestiva se caracteriza como uma síndrome clínica complexa na qual o coração encontra-se impossibilitado de fornecer um débito cardíaco adequado para as necessidades do organismo ou só consegue fazê-lo em condições de elevada pressão de enchimento. Pode-se dividir a insuficiência cardíaca como crônica e aguda. A caracterização como aguda relaciona-se com o modo de instalação, rápido ou súbito, geralmente apresentando-se como edema pulmonar agudo, choque cardiogênico ou combinação de ambos.⁴⁸ A insuficiência cardíaca crônica secundária a um infarto agudo do miocárdio é uma das mais sérias e importantes doenças, sendo que tais pacientes são responsáveis por 50% dos candidatos para transplante cardíaco.¹⁴

Com o intuito de estudar a remodelação ventricular da insuficiência cardíaca, Brower e Janicki⁴⁹ fizeram um modelo de ICC por meio de uma fístula aorto-cava, desenvolvendo desta maneira uma sobrecarga de volume ventricular, induzindo a insuficiência cardíaca. No decorrer de oito semanas foi evidenciada hipertrofia ventricular progressiva, dilatação, queda da complacência ventricular e diminuição da função ventricular. Na análise hepatológica evidenciaram grande quantidade de colágeno intersticial, provável causa da diminuição da complacência ventricular.

2.5 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO IAM EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Pouzet et al.⁵² propuseram estudo com o objetivo de analisar se o número de células mioblásticas transplantadas no miocárdio de ratos infartados poderia influenciar na melhora da função ventricular esquerda. Realizaram uma toracotomia lateral esquerda e induziram o infarto do miocárdio com a ligadura da artéria coronária esquerda em 44 ratos. Três dias após o infarto do miocárdio foi realizado estudo ecocardiográfico bidimensional para avaliar a função do ventrículo esquerdo, quantificando desta maneira a extensão do infarto. Obtiveram uma variante muito grande. Dez dos animais com FE<25%, dezessete entre 25-35%, nove entre 35-40% e oito considerados normais (FE>40%).

Com o objetivo da aplicabilidade clínica do transplante celular, Scorsin et al.⁵³ compararam o transplante de cardiomiócitos fetais e de mioblastos em corações de ratos infartados, procuraram identificar qual tipo de transplante apresentaria uma melhor recuperação da função ventricular esquerda, após infarto do miocárdio em 42 ratos por ligadura da coronária esquerda. A análise ecocardiográfica para a avaliação da função ventricular esquerda foi realizada no quarto dia e um mês após o IAM, tanto no grupo controle (infarto apenas) como no grupo com transplante de células. Os resultados mostraram melhora da FE dos corações do grupo tratado com cardiomiócitos fetais e do grupo tratado com células mioblásticas, pois os valores variaram de 39 para 45% e de 40 para 47%. Nos animais do grupo controle houve um decréscimo do mesmo parâmetro avaliado, de 40 para 36%.

Brofman et al.¹⁷ fizeram um estudo sobre transplante de células tronco mesenquimais e células mioblásticas esqueléticas com cultura e co-cultura no infarto agudo do miocárdio, usando como modelo experimental 72 ratos Wistar com peso aproximado de 400g. Para a avaliação dos parâmetros funcionais, utilizaram a ecocardiografia transtorácica bidimensional, usando como indicador principal a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Nos animais do grupo controle (IAM por ligadura com FE<40) houve uma diferença significativa da FE entre o 7º e o 30º dia de pós-infarto. No entanto, obtiveram melhora significativa da FE apenas nos animais com transplante de células musculares isoladas ou em co-cultura.

Li et al.²² quantificaram o tamanho do infarto induzido nos animais com a planimetria computadorizada após fixação dos corações em formalina e cortes transversais com três milímetros. O valor era obtido através da porcentagem da parede afetada dividida pelo total da parede do ventrículo esquerdo multiplicando por 100. Obtiveram com a utilização da criolesão uma média de 25% (com pouco desvio padrão) de lesão transmural da parede livre do ventrículo esquerdo.

Pasquale et al.¹⁵ quantificaram o infarto agudo do miocárdio pela planimetria do total da circunferência infartada sobre a circunferência total do ventrículo esquerdo. Para a aferição destes dados, os corações foram dissecados e separados o ventrículo esquerdo do direito. O ventrículo esquerdo foi preservado em formaldeído e quatro cortes transversais foram realizados para a aferição das circunferências. Foram classificados como: ausência de infarto (0% do ventrículo esquerdo), pequeno (até 25% do ventrículo esquerdo), moderado (25-45% do ventrículo esquerdo), e grande (acima de 45% do ventrículo). Dos trinta e nove ratos estudados a análise histológica mostrou que quinze dos animais não infartaram, sete ratos apresentaram grande infarto e dezessete ratos, infarto moderado.

Para investigação das áreas afetadas ou não em modelo experimental por criolesão, Razvadauskaite et al.³⁵ fizeram três cortes histológicos com três milímetros cada segmento. Usaram as colorações de hematoxilina eosina e Tricrômio de Gomori. A área de infarto foi identificada em todos os animais do grupo de infarto. As áreas de fibrose foram identificadas com maior frequência nos segmentos médio e distal do VE. A porcentagem da área lesada foi determinada por um programa de computador (Metamorph 5.0r software). Dos seis animais estudados, obtiveram 16,8% de área do VE afetada no décimo segundo dia, 17,6% no vigésimo oitavo dia e 25,4% no quinquagésimo sexto dia pós-infarto.

3 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, após ter sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (registro na CEPAPUCPR nº 33), com animais provenientes do biotério da PUCPR, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999).

Na realização deste projeto de pesquisa foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus. rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idade entre seis e sete meses, com o peso variando de 368 a 414g, e mantidos alojados em gaiolas com no máximo cinco animais em cada. Foi fornecida água *ad libitum* e ração padronizada para a espécie.

3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (A, B e C). No grupo A foram estudados 20 animais nos quais foi induzido o IAM pela técnica da ligadura da artéria coronária esquerda. No grupo B, 20 ratos foram submetidos a lesão miocárdica por criolesão, enquanto no grupo C, 10 animais não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica e foram usados como controle.

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

3.2.1 Respirador

Foram utilizados dois respiradores a volume (HARVARD®, Inc., respirador modelo 683, Massachusetts, USA) para animais de pequeno porte com oxigênio a 21% (ar ambiente)(Figura 1).



Figura 1- Respirador a volume

3.2.2 Criolesão

A aplicação do nitrogênio líquido foi por meio de uma ponteira sólida com formato circular medindo três milímetros de diâmetro. É um sistema fechado em que o nitrogênio líquido circula, congelando a ponteira metálica acoplada ao aplicador. Possui a vantagem de evitar o contato direto do nitrogênio com o tecido e produzir uma lesão mais homogênea. O aparelho utilizado (MINI CRYOSUN®) possui a capacidade de armazenar 500 mililitros do líquido (Figuras 2 e 3).



Figura 2 - Conjunto de criolesão



Figura 3 – Ponteira utilizada para fazer a criolesão

3.2.3 Materiais Operatórios

Os materiais utilizados para a ligadura da coronária esquerda e a toracotomia dos animais do grupo A e B foram: pinças vasculares, porta-agulhas, tesouras, afastador auto-estático pequeno, fios de polipropileno sete zeros e fio monofilamentar de náilon quatro zeros, seringas, agulhas, gases, luvas de látex, polivinilpirrolidona-iodo e solução salina 0,9% (Figura 4).



Figura 4 - Materiais utilizados para toracotomia nos animais do grupo A e B e ligadura da coronária esquerda

3.2.4 Ecocardiografia

Os animais foram analisados com equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo Sonos 5500 (Hewlet Packard, USA), com transdutores setorial S12 (5-12 mHz) e linear 15L6 (7-15 mHz)(Figura 5).



Figura 5 - Aparelho de ecocardiografia bidimensional para animais de pequeno porte

3.2.5 Microscopia

O microscópio óptico utilizado para identificação do infarto, como sendo transmural ou não, foi um Olympus IX 70® (Figura 6) no aumento de 40 vezes e de 100 vezes. No entanto, para a leitura da extensão do infarto quando sendo epicárdico ou endocárdico foi utilizado um microscópio óptico (Olympus RX50®)(Figura 7) que é acoplado a uma câmera digitalizadora que transfere as imagens para um computador.



Figura 6 - Microscópio Óptico Olympus IX70®



Figura 7 - Microscópio Óptico Olympus RX 50® com transdutor de imagem acoplado a um microcomputador

3.3 TÉCNICA OPERATÓRIA EMPREGADA

Todos os ratos do experimento foram submetidos à anestesia geral com a associação de ketamina (sedativo e bloqueador neuro-muscular) na dose de 50mg/kg/peso e xylazina (sedativo e analgésico) na dose de 10mg/kg/peso, ambos via intramuscular.

3.3.1 Determinação do Peso dos Ratos

Após a indução anestésica, mantendo-se os animais em nível III nos critérios de Guedel e Hecker⁵⁰, todos os animais foram pesados em uma balança eletrônica (Marte AS500, Br) de alta precisão com três casas decimais e sensibilidade de 0,01g aferida pelo Imetro.

3.3.2 Obtenção de Via Aérea e Ventilação

Aguardava-se a instalação da anestesia; observada pela ausência do reflexo ocular palpebral. Com o relaxamento do animal, obtinha-se uma via aérea definitiva através da intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14 (Figura 8). Após cada procedimento, certificava-se da patência da via aérea conectando o cateter ao sistema de ventilação mecânica com volume de 2,5ml, com frequência de 50 ciclos por minuto observando-se a expansão dos pulmões.

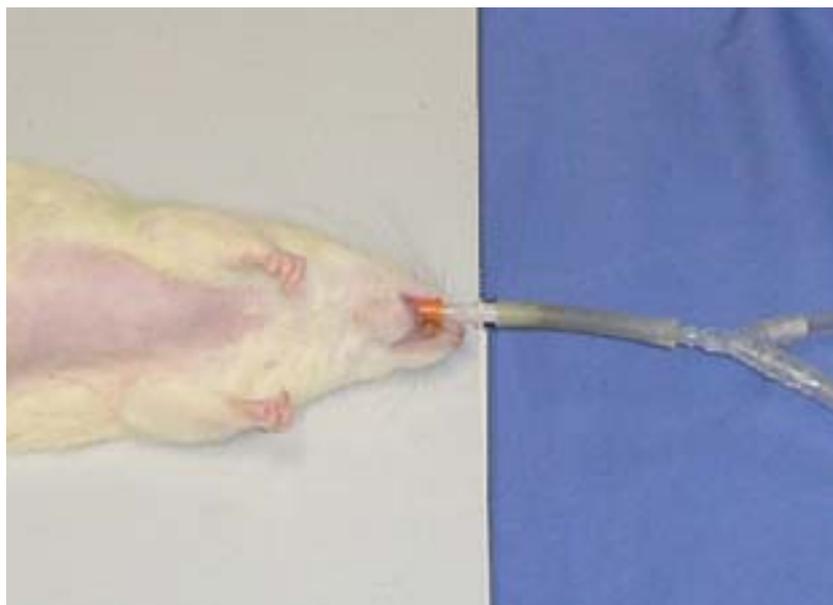


Figura 8 - Animal intubado conectado ao sistema de ventilação mecânica

3.3.3 Posição do Animal Durante o Experimento

Todos os animais foram submetidos à tricotomia na região ventral do abdômen e do tórax, na porção ântero-lateral esquerda, imediatamente antes do procedimento operatório. Posicionou-se em decúbito dorsal com uma leve inclinação para a direita, facilitando desta maneira a exposição da área a ser abordada, fixando-se os membros anteriores e posteriores com fita adesiva (Figura 9).

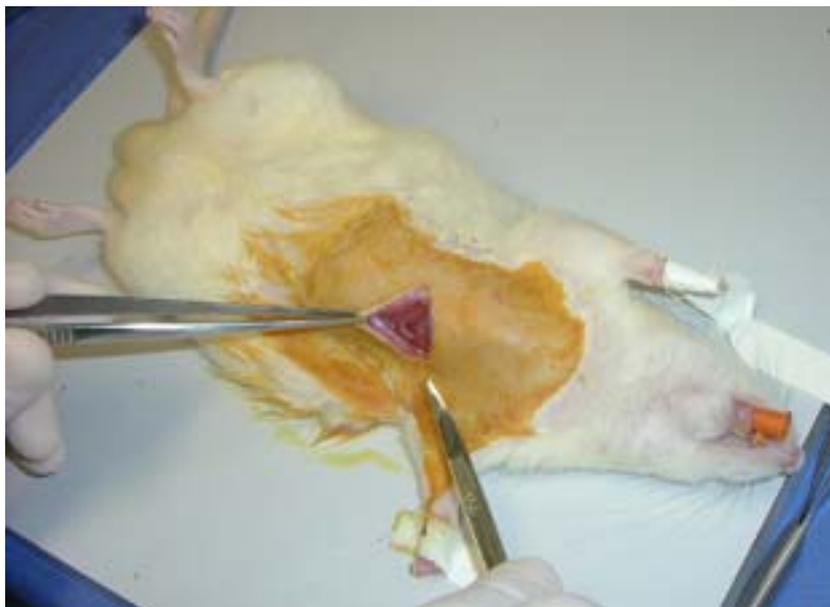


Figura 9 - Posição do animal e início da toracotomia lateral esquerda com 1,5 cm de extensão

3.3.4 Descrição do Procedimento

Foi feita a anti-sepsia da área depilada com iodopovedina tópico e foi realizada a toracotomia lateral esquerda no terceiro espaço intercostal nos animais do grupo A e B. Após a abertura da pleura esquerda, o animal era conectado ao sistema de ventilação mecânica. O pericárdio era retirado para a luxação e melhor visibilização da área a ser abordada. No grupo A, após a exteriorização do coração, a aurícula esquerda era afastada e a artéria coronária esquerda ligada com fio de polipropileno azul monofilamentar não absorvível 7.0 entre a via de saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo (Figura 10). A região infartada era imediatamente verificada pela diferença de coloração da área afetada (Figura 11). Em seguida, o coração era retornado ao tórax e a parede torácica fechada por planos com fio monofilamentar de náilon 4.0, com sutura contínua. Após a recuperação da anestesia, os animais foram extubados e mantidos em gaiolas, alimentados com ração comercial padrão e tiveram livre acesso à água.

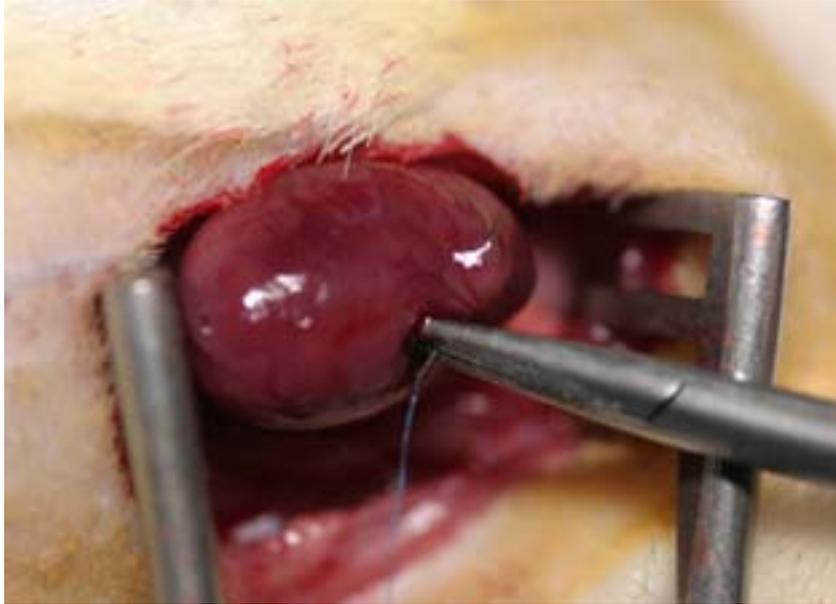


Figura 10 – Ilustração da exposição do coração e início da ligadura da artéria coronária esquerda

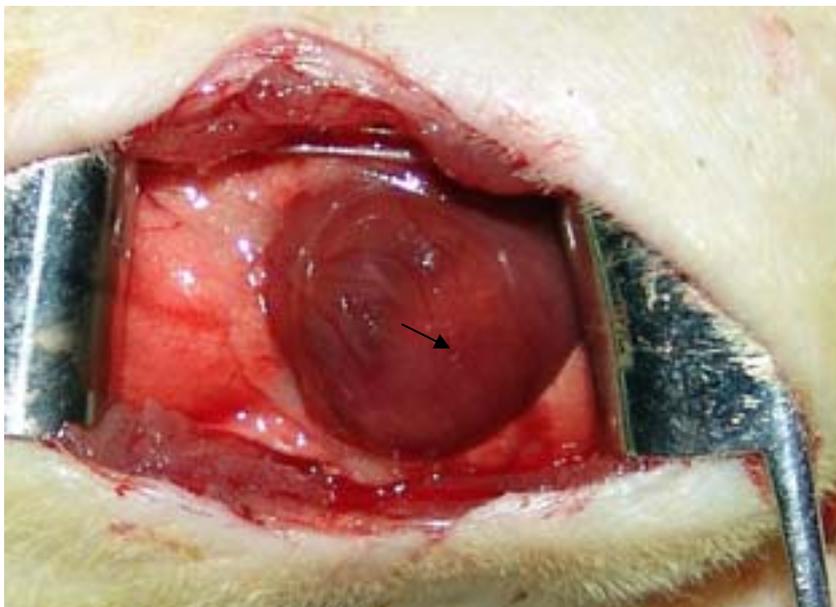


Figura 11 - Aspecto do coração após a ligadura da coronária esquerda demonstrando diferença de coloração na região isquêmica

Nos animais do grupo B, foi utilizado nitrogênio líquido aplicado com uma ponteira sólida sobre o coração (para criar lesão miocárdica). O local abordado foi a região da artéria coronária esquerda, mais especificamente a artéria descendente anterior e seus ramos. Com ângulo de 90 graus entre a ponta sólida e o coração (Figura 12), cinco sessões, com aplicação direta da ponteira sobre o miocárdio foram realizadas. O contato com o coração era mantido até o momento em que a ponteira se soltasse espontaneamente do tecido. O intervalo entre cada aplicação foi de 10 segundos. Imediatamente após a retirada da ponteira, foi visibilizada uma área circular esbranquiçada (região congelada) (Figura 13) no ventrículo esquerdo que desaparecia em torno de três segundos. Após o término do procedimento, da mesma maneira que os animais do grupo A, o coração foi retornado ao tórax e a parede torácica fechada por planos com o mesmo tipo de fio de sutura. Após a recuperação da anestesia, os animais foram extubados e mantidos em gaiolas, alimentados com ração comercial padrão e tiveram livre acesso à água.



Figura 12 - Modo de aplicação do probe com nitrogênio líquido

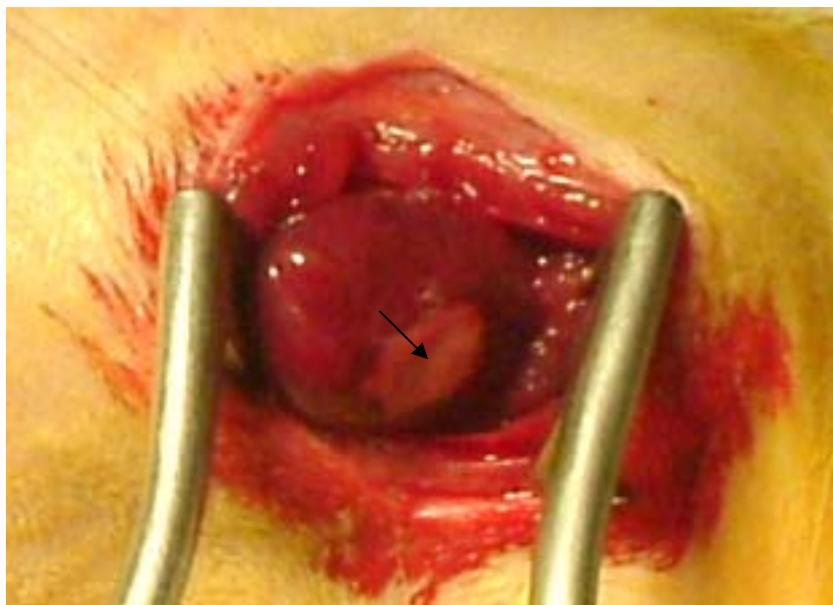


Figura 13 - Aspecto da lesão miocárdica após a criolesão

Os animais do grupo C não foram submetidos a qualquer intervenção cirúrgica, foram tratados apenas com ração padronizada e água à livre demanda.

3.4 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO

Foi utilizada a ecocardiografia transtorácica bidimensional com o intuito de avaliar a função ventricular, a extensão e a localização lesões miocárdicas e o tipo de contratilidade das paredes do ventrículo esquerdo.



Figura 14 - Transdutor sobre o tórax do animal

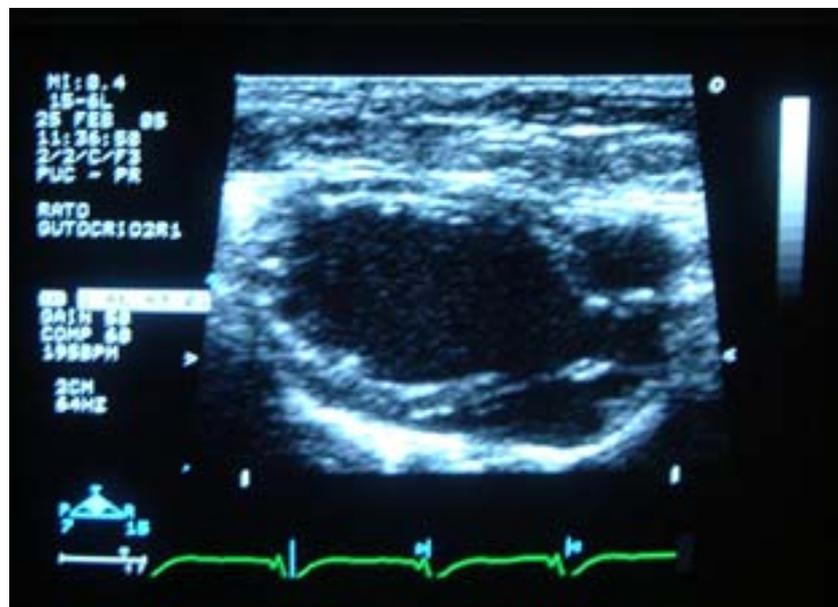


Figura 15 - Imagem ecocardiográfica com monitorização eletrocardiográfica

Todos os animais, independente do grupo a que pertenciam, foram anestesiados com ketamina e xylazina na dose de 25mg/kg/peso e 5mg/kg/peso, via intramuscular, para a realização do exame. Os animais do grupo A e B fizeram o ecocardiograma no 7º e 30º dia pós-lesão miocárdica com o intuito de acompanhar a evolução da lesão. Como os ratos do grupo C não foram submetidos a nenhuma intervenção, foi realizado apenas um ecocardiograma com as mesmas medidas para servir de controle aos outros dois grupos. Todos foram monitorizados nas derivações periféricas com eletrodos pediátricos, obtendo-se a frequência cardíaca com visualização cardiscópica. Colocando o transdutor na porção ântero-lateral esquerda da parede torácica, as imagens foram vistas em duas dimensões, e as câmaras ventriculares observadas em dois cortes, o transversal e o longitudinal. No longitudinal se tinha uma visão axial do ventrículo esquerdo incluindo a valva mitral, a valva aórtica, a parede anterior, a posterior e o ápex do VE; enquanto no corte transversal, se observava a parede septal, a anterior, a lateral e a posterior na região basal média e na apical do VE. Foram analisados os parâmetros: fração de ejeção, volume diastólico final do VE, volume sistólico final do VE, área diastólica final do VE e área sistólica final do VE. Outro dado avaliado pelo ecocardiografista foi o tipo de contratilidade nas paredes do VE (normal, hipocinesia, acinesia ou discinesia). Foi considerado normal: quando não havia alteração de contratilidade em nenhuma das paredes do ventrículo esquerdo, hipocinesia: quando existia diminuição da contratilidade global ou de um segmento, acinesia: quando havia ausência de contratilidade no segmento afetado e discinesia: quando da presença de área com distensibilidade contrátil na sístole. A área do ventrículo esquerdo, o comprimento e o volume foram medidos pelo método de Simpson, utilizando o software do computador, tanto na sístole como na diástole. O comprimento sempre em seu maior eixo (da base para o ápex) e a área por delimitação das paredes do ventrículo esquerdo. Todas as medidas foram feitas três vezes pelo mesmo profissional, tendo como resultado final a média das três.

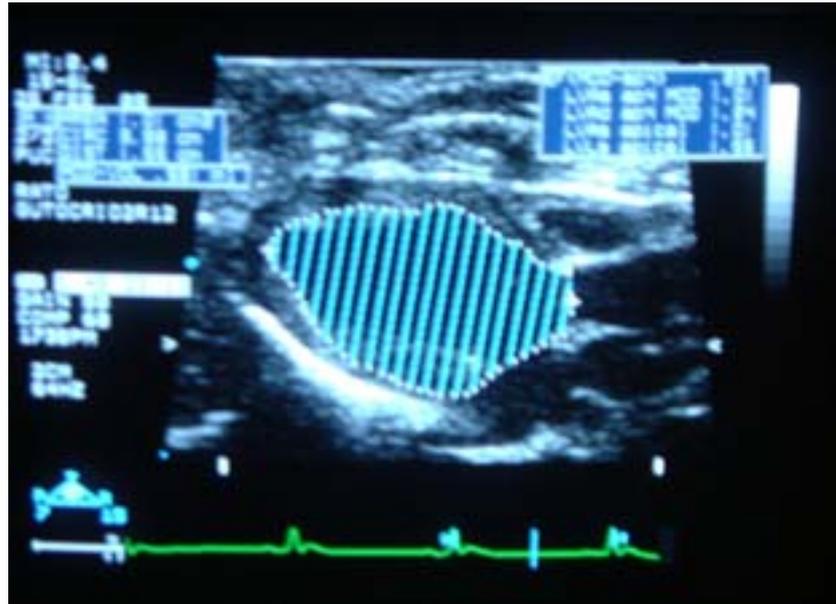


Figura 16 – Imagem ecocardiográfica mostrando a área do ventrículo esquerdo

3.5 PESO DO CORAÇÃO

Depois do segundo ecocardiograma, no trigésimo dia de pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal 50 de ketamina na dose de 148 mg/kg⁵¹ todos os corações foram pesados em uma balança eletrônica (Marte AS500, Br) de alta precisão com três casas decimais e sensibilidade de 0,01g.

3.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Para a preparação das peças para o estudo histopatológico, quatro cortes coronais dividiram as peças em quatro pedaços que foram fixadas em solução de formol a 10% por 48horas (Figura 17). O tecido foi então incluído em parafina líquida

formando blocos, dos quais obteve-se cortes histológicos coronais de cinco micra, que foram montados em lâminas.



Figura 17 - Os quatro cortes coronais dividindo o coração em quatro peças (base, médio proximal, médio distal e ápex)

Os animais do grupo controle foram submetidos a um estudo ecocardiográfico e logo em seguida à eutanásia pelo mesmo método utilizado nos outros grupos, dando-se aos corações o mesmo tratamento.

As colorações utilizadas foram a hematoxilina-eosina, o Tricrômio de Gomori e o Sirius Red. De cada peça foram feitas três lâminas com quatro cortes obtidos da divisão do coração em quatro segmentos (base, médio proximal, médio distal e ápex) (Figura 17 e 18).

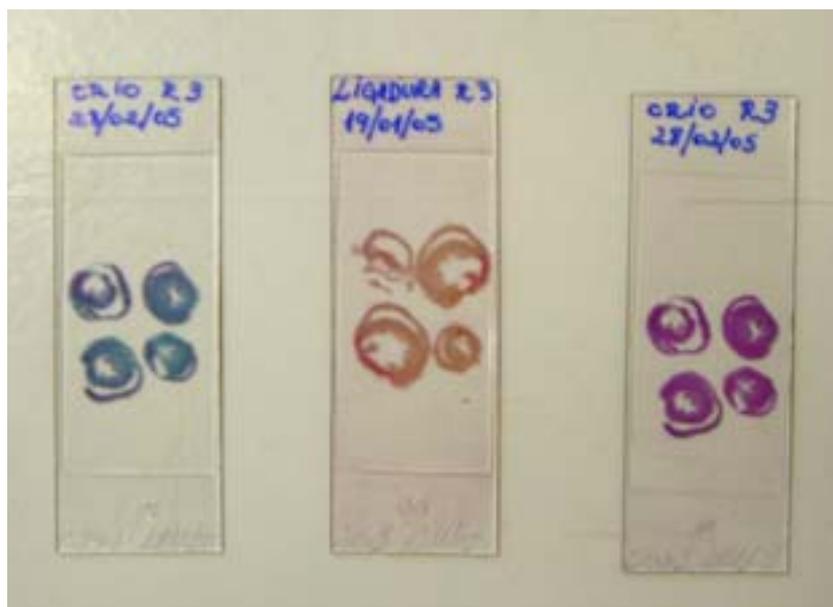


Figura 18 - Lâminas com as três colorações citadas

Os cortes histológicos corados pelo hematoxilina-eosina foram usados para uma visão panorâmica, identificação da provável área afetada com ou sem afinamento de suas paredes ou até mesmo hipertrofia compensatória.

Os cortes histológicos corados com Sirius-Red foram utilizados para identificação da região infartada por sua especificidade para observação do colágeno, confirmando ou não a imagem já inicialmente identificada pela coloração citada anteriormente. Quando houvesse qualquer dúvida na leitura microscópica das lâminas, confirmaram-se os achados com os cortes corados com Tricrômico de Gomori. Na análise destas lâminas utilizou-se um microscópio OLIMPUS® IX70 nos aumentos de 40 vezes e de 100 vezes.

Após a primeira leitura, as lâminas foram separadas em dois grupos. As que apresentavam cortes com infarto transmural e as que não apresentavam infarto transmural. Foram classificadas como transmural aquelas em que pelo menos em um dos cortes realizados (ápex, médio distal, médio basal e base) existia deposição de colágeno em toda a extensão de uma ou mais das paredes do ventrículo esquerdo. As classificadas como não transmural foram reestudadas e divididas como endocárdicas e epicárdicas. O reestudo foi realizado em outro microscópio óptico (Olympus® RX50) por estar acoplado a uma câmera de vídeo que enviava a

imagem digital a um computador dotado de um programa de análise de imagens *Image Pro-plus®* (Média Cybermetics, Silver Spring, Mayland, USA). Com este programa foi possível analisar a extensão (comprimento) do infarto não transmural. Foi medido o comprimento total da parede do ventrículo esquerdo e o comprimento da área fibrosada na região onde a necrose foi mais homogênea. As medidas foram feitas em micra.

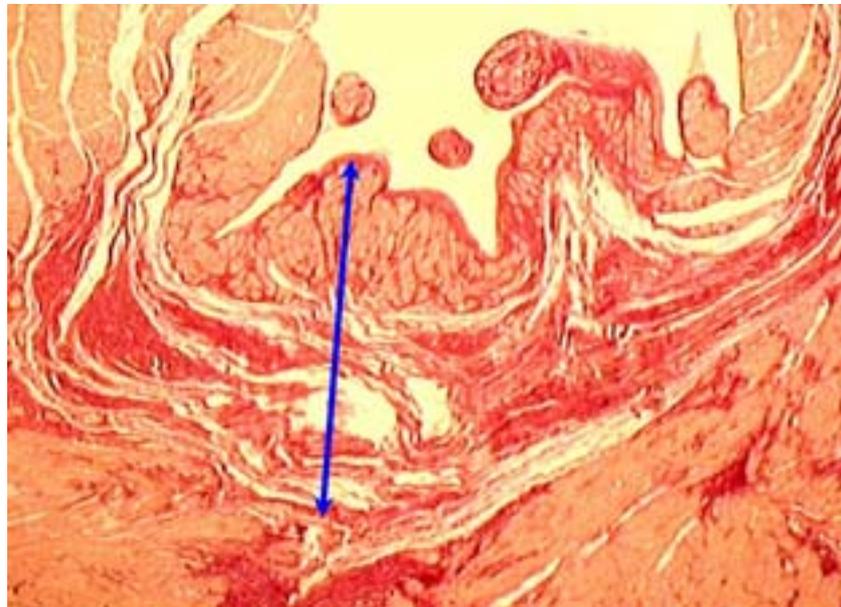


Figura 19 – Fotomicrografia demonstrando necrose não transmural (endocárdica) na coloração hematoxilina eosina, com aumento de 40 vezes

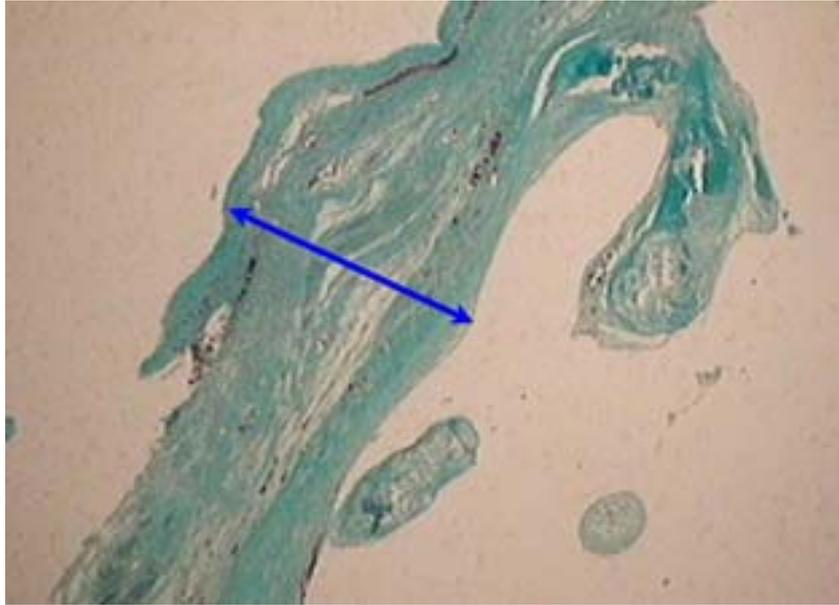


Figura 20 – Imagem de necrose transmural com afinamento da parede do VE em coloração tricrômio de Gomori, com aumento de 40 vezes

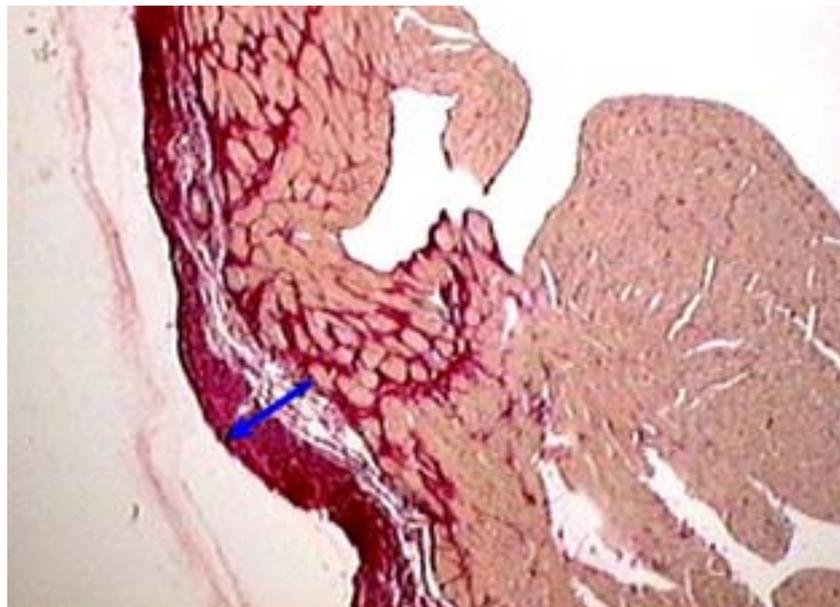


Figura 21 - Fotomicrografia de lesão epicárdica na coloração de Sirius-Red com aumento 40 vezes

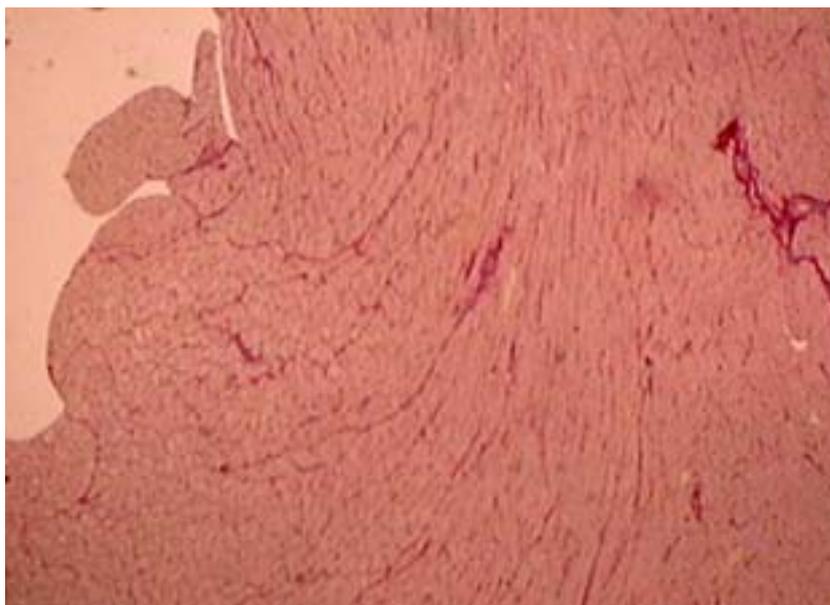


Figura 22 – Imagem de coração sem lesões miocárdicas na coloração Sirius-Red com aumento 40 vezes

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos grupos, em relação às variáveis quantitativas, foi usada a Análise de Covariância, considerando-se o peso do rato como co-variável. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene e a normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov. Para as comparações múltiplas foi usado o teste de Newman-Keuls. Variáveis que não atenderam aos pressupostos de homogeneidade das variâncias foram analisadas após a aplicação da transformação raiz quadrada sobre os dados ou usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a comparação dos momentos de avaliação, foi usado o teste t de Student para amostras dependentes. A comparação dos grupos em relação a variáveis dicotômicas foi feita usando-se o teste exato de Fisher. Em todos os testes, valores de $p \leq 0,05$ indicaram significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 ANATOMIA CORONARIANA

Os achados a olho nu da anatomia coronariana dos animais foram: presença do ramo interventricular anterior na parede anterior com um ou mais ramos diagonais e um ou mais ramos marginais na parede lateral do ventrículo esquerdo, provenientes da artéria circunflexa. A coronária direita foi pouco visibilizada devido a via de acesso (toracotomia lateral esquerda).

4.2 MORTALIDADE

Dos 20 ratos submetidos à lesão miocárdica por criolesão 4 foram a óbito (20,00%), e dos 20 animais submetidos a ligadura da coronária esquerda 5 foram a óbito (25,00%). Com estes resultados não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p=1$).

4.3 PESO DOS ANIMAIS

A média do peso dos animais do grupo A (ligadura) foi de $390,20 \pm 21,32g$, enquanto a do grupo B (criolesão) foi de $397,065 \pm 17,52g$ e a do grupo C (controle) de $385,70 \pm 17,23g$. Comparando-se os três grupos não houve diferença significativa resultando $p=0,3157$, o que demonstra a homogeneidade dos grupos em relação ao peso (Figura 23).

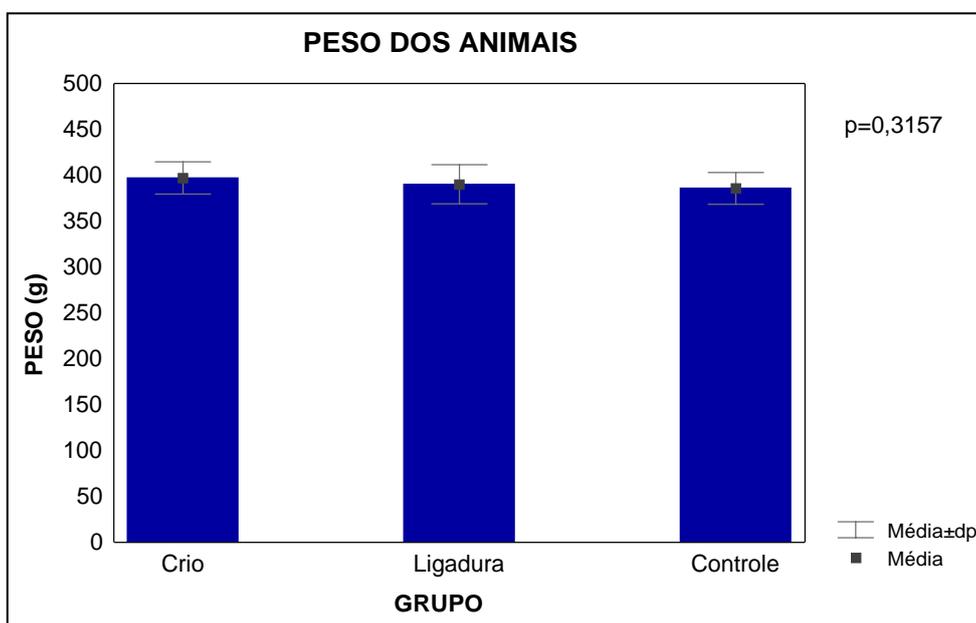


Figura 23 – Média±desvio padrão de pesos nos grupos do experimento

4.4 PESO DO CORAÇÃO DOS ANIMAIS

Tanto o grupo A (ligadura) quanto o grupo B (criolesão) mostraram significância estatística no trigésimo dia de pós-infarto em relação ao peso dos corações dos animais quando comparados com o grupo controle (grupo A com $1,48 \pm 0,13g$, grupo B com $1,41 \pm 0,08g$ e o grupo C com $1,32 \pm 0,10g$; $p = 0,0040$). Na análise comparativa entre os dois grupos experimentais (criolesão e ligadura) não houve diferença estatisticamente representativa ($p = 0,1106$) (Figura 24).

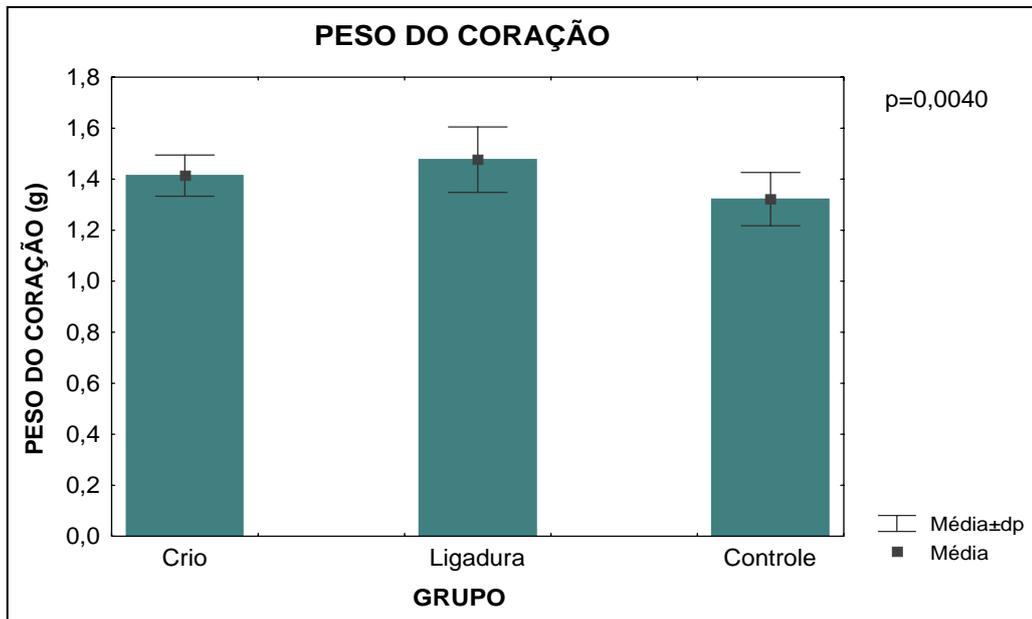


Figura 24 – Média±desvio padrão dos pesos dos corações nos grupos estudados

4.5 FREQUÊNCIA CARDÍACA

Nos três grupos (A, B e C) não foram observadas diferenças significantes em relação à frequência cardíaca, a qual foi medida em batimentos por minuto (bpm). Os batimentos cardíacos foram equivalentes tanto nos ratos normais quanto nos com lesões miocárdicas. O grupo A teve como média $216,47 \pm 25,63$ bpm, o grupo B $208,81 \pm 34,61$ bpm e o grupo C $220,00 \pm 19,42$ bpm ($p=0,5388$) (figura 25).

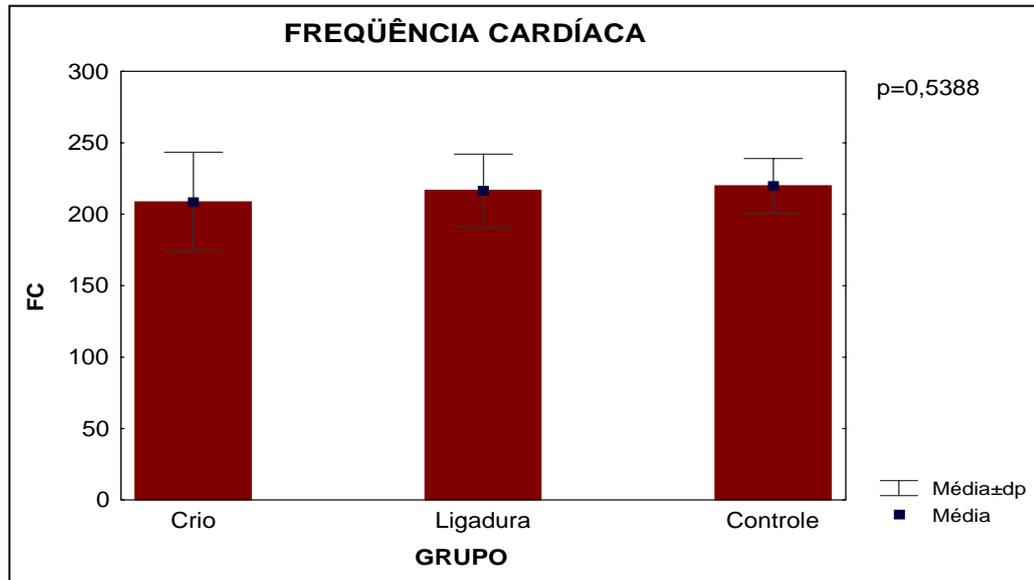


Figura 25 – Media da frequência cardíaca dos três grupos

4.6 ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA

4.6.1 Grupo Controle

No quadro 1 são apresentados os resultados dos valores mínimos, valores máximos, medianas, médias e desvios padrões das variáveis ecocardiográficas avaliadas no grupo controle (10 ratos). As variáveis estudadas foram a área diastólica final do ventrículo esquerdo (ADFVE) em centímetros quadrados (cm²), o volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) em mililitros (ml), a área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASFVE) em centímetros quadrados (cm²), o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) em mililitros (ml) e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) em porcentual (%).

Quadro 1 - Dados ecocardiográficos dos animais do grupo C (controle)

Variável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão
ADFVE(cm ²)	1,020	1,330	1,215	1,188	0,087
VDFVE (ml)	0,551	0,794	0,716	0,702	0,073
ASFVE(cm ²)	0,688	0,921	0,819	0,808	0,073
VSFVE(ml)	0,307	0,457	0,399	0,390	0,057
FEVE(%)	37,200	56,900	44,700	44,750	5,539

4.6.2 Grupo A (ligadura)

4.6.2.1 Variáveis ecocardiográficas

Neste grupo de animais houve diferença significativa entre o 7º e o 30º dia pós-infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária esquerda em quase todas as variáveis ecocardiográficas, com exceção da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

A área diastólica final do ventrículo esquerdo foi de $1,26 \pm 0,13 \text{ cm}^2$ no 7º dia e $1,40 \pm 0,14 \text{ cm}^2$ no 30º dia, mostrando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0003$).

Com relação ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo, também mostrou resultados estatisticamente significantes entre o 7º e 30º dia de pós-infarto, com valores de $0,76 \pm 0,14 \text{ ml}$ no 7º dia e de $0,95 \pm 0,19 \text{ ml}$ no 30º dia ($p = 0,0003$).

A área sistólica final do ventrículo esquerdo foi de $0,96 \pm 0,20 \text{ cm}^2$ no 7º dia pós-ligadura da coronária esquerda e $1,07 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ no 30º dia ($p = 0,0058$).

O volume sistólico final do ventrículo esquerdo mostrou diferença significativa nos dias em que foram avaliados, com $0,50 \pm 0,17 \text{ ml}$ no 7º dia e de $0,64 \pm 0,21 \text{ ml}$ no 30º dia ($p = 0,0013$) (Figura 26).

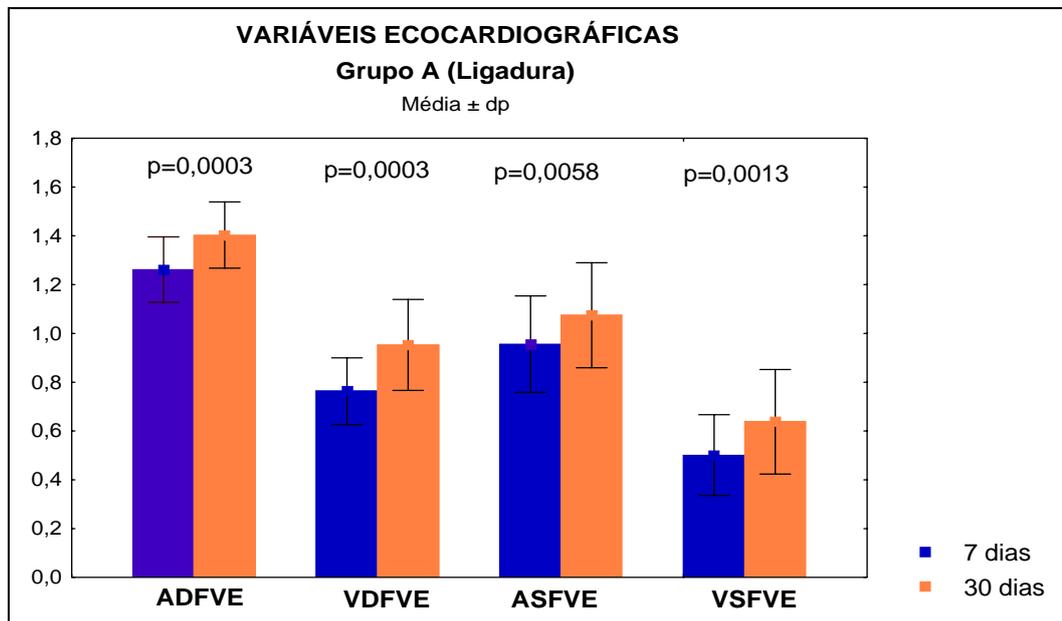


Figura 26 - Variáveis ecocardiográficas no 7º e 30º dia pós-ligadura da CE

A variável que não demonstrou diferença significativa foi a fração de ejeção do VE que se manteve em $35,45 \pm 10,39\%$ no 7º dia após a lesão miocárdica e $34,45 \pm 9,99\%$ no 30º dia ($p = 0,5546$) (Figura 27).

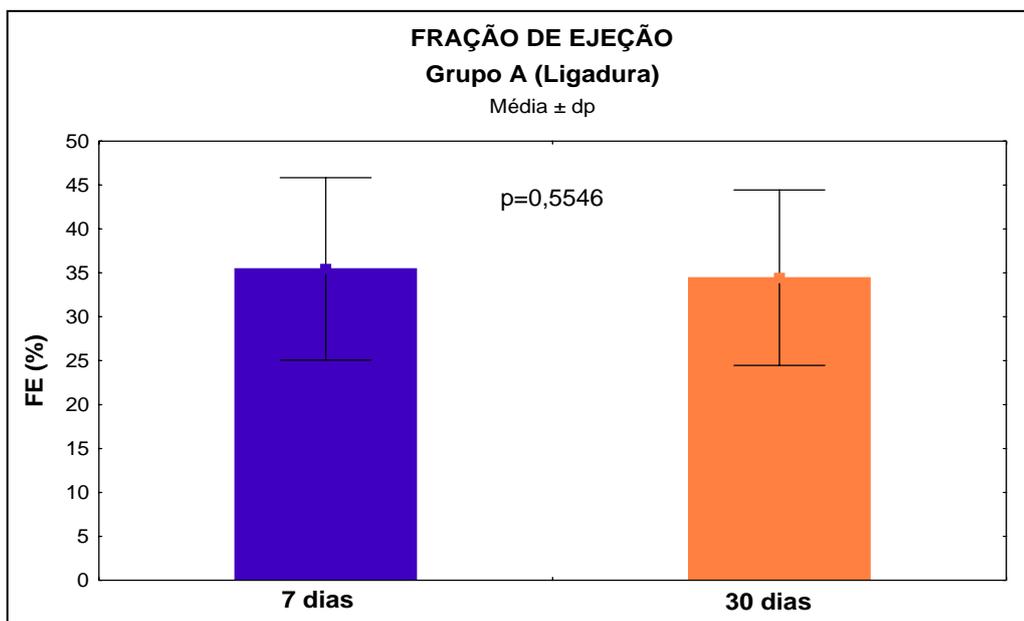


Figura 27 – Fração de ejeção no 7º e 30º dia de pós-infarto

4.6.2.2 Tipo de Contratilidade da Parede do VE Após Lesão Miocárdica

Foi avaliada pela ecocardiografia o tipo de contratilidade do VE no 7º e 30º dia de pós-infarto. Foram identificados ventrículos com contratilidade normal, com hipocinesia, acinesia e discinesia de uma ou mais paredes. Para não se ter um número de variáveis muito grandes, foi considerado o tipo de contratilidade predominante na área que sofreu lesão.

No 7º dia pós-infarto, quatro corações (26,67%) apresentaram hipocinesia, 10 (66,67%) acinesia, nenhum com discinesia e um (6,67%) com contratilidade normal. No 30º dia, dois evoluíram de acinesia para discinesia enquanto os demais animais mantiveram-se com o mesmo tipo de contratilidade. Dos vinte animais, apenas 15 entraram para o estudo, pois cinco foram a óbito no transoperatório ou no pós-operatório (Figura 28).

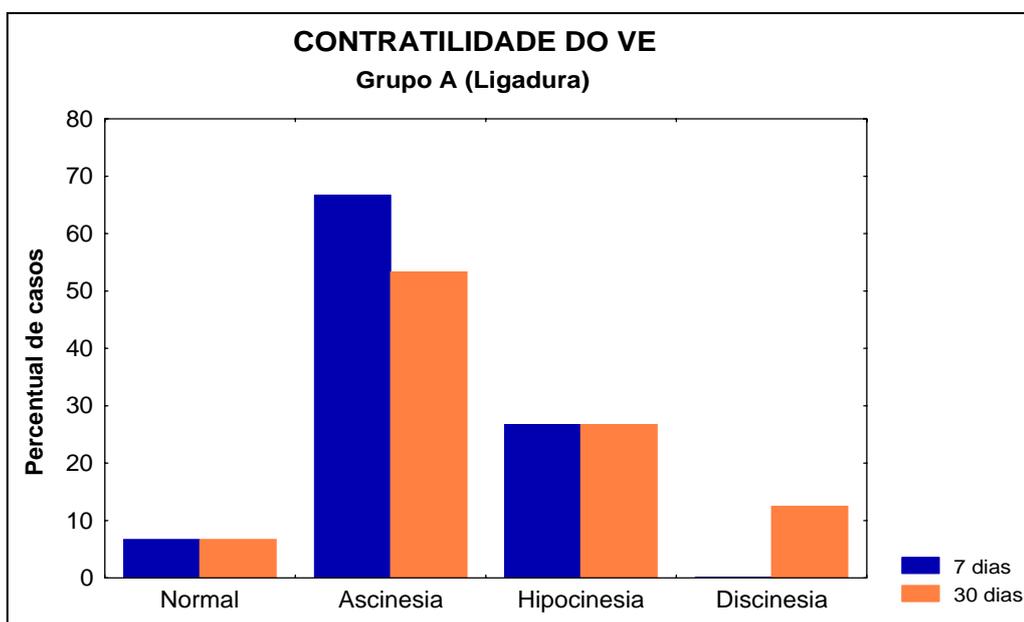


Figura 28 - Tipo de contratilidade do VE no 7^o e 30^o dia pós-ligadura da CE nos animais do grupo A

4.6.2.3 Localização da Área Afetada Após a Lesão Miocárdica

Não houve mudanças entre o 7^o e 30^o dia de pós-infarto. Um (6,67%) dos animais não apresentou qualquer alteração da contratilidade do miocárdio em nenhuma das paredes ventriculares, 11 (73,33%) apresentaram comprometimento da parede anterior e 3 (20%) da parede lateral do ventrículo esquerdo (Figura 29).

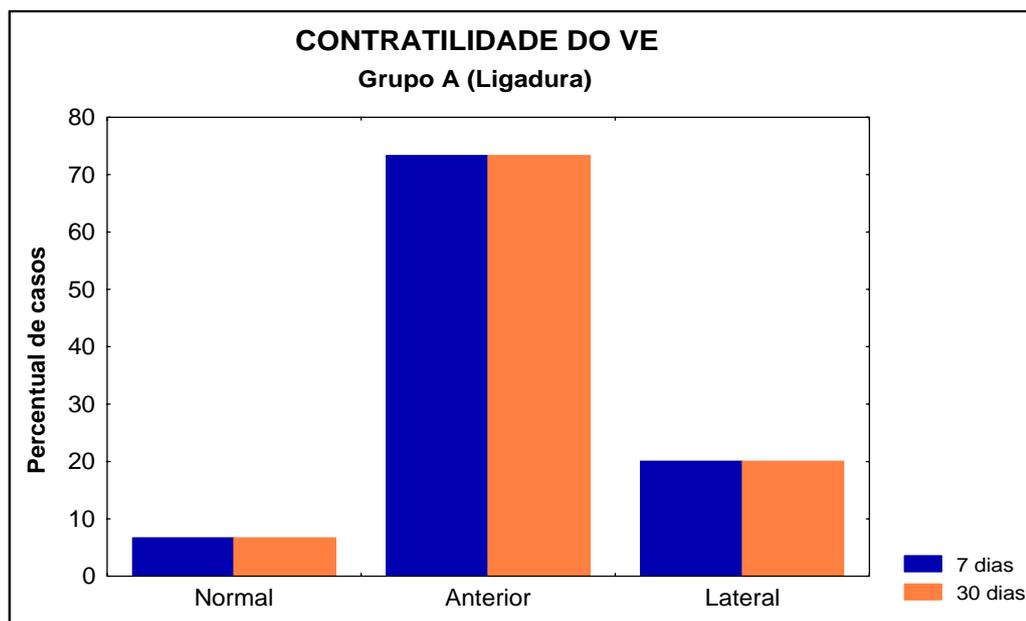


Figura 29 – Localização da área afetada após infarto

4.6.3 Grupo B (criolesão)

4.6.3.1 Variáveis ecocardiográficas

Com relação à área diastólica final do ventrículo esquerdo, não houve diferença entre o 7º e o 30º dia (ADFVE= $1,33 \pm 0,19 \text{cm}^2$ no 7º dia e $1,30 \pm 0,08 \text{cm}^2$ no 30º dia; $p=0,5087$).

Na análise da área sistólica final do ventrículo esquerdo nos dois dias estudados, os valores obtidos não foram estatisticamente significantes (ASFVE= $1,01 \pm 0,18 \text{cm}^2$ no 7º dia e $0,90 \pm 0,24 \text{cm}^2$ no 30º dia; $p=0,2241$).

Avaliado o volume diastólico final do ventrículo esquerdo, também não houve significância entre o 7º e o 30º dia (VDFVE= $0,87 \pm 0,22 \text{ml}$ no 7º dia e $0,83 \pm 0,08 \text{ml}$ no 30º dia; $p=0,5277$).

O volume sistólico final do ventrículo esquerdo não mostrou diferença significativa nos dias em que foram avaliados (VSFVE= $0,56 \pm 0,15$ ml no 7º dia e $0,52 \pm 0,10$ ml no 30º dia; $p=0,4529$) (Figura 30).

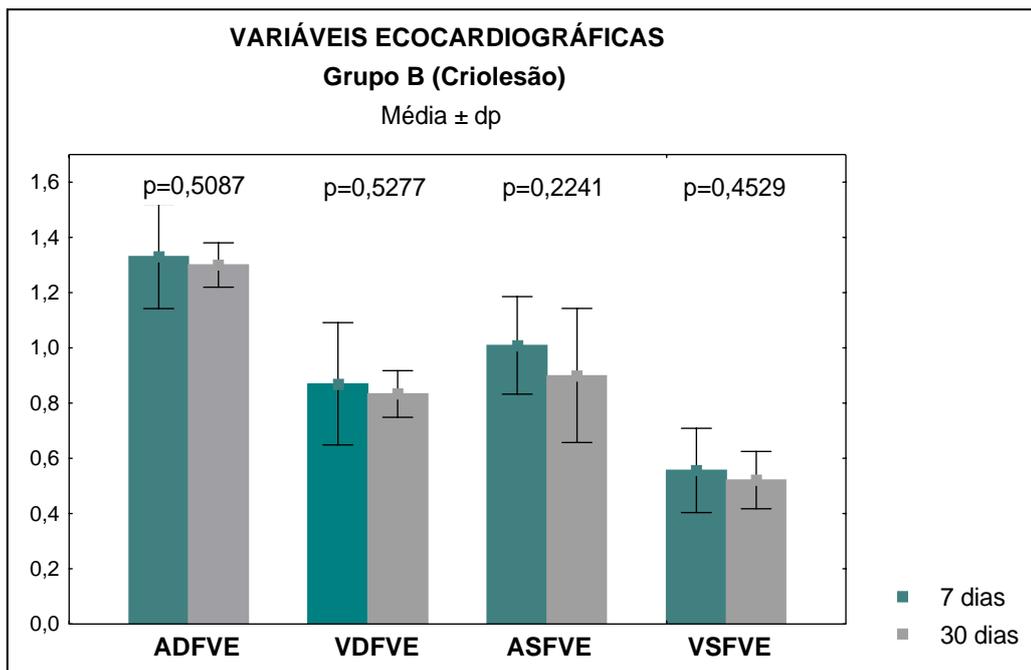


Figura 30 – Variáveis ecocardiográficas no 7º e 30º dia pós-procedimento

As frações de ejeções no 7º e 30º dia pós-procedimento não evidenciaram resultados estatisticamente significativos (FEVE= $35,81 \pm 7,27\%$ no 7º dia e $37,23 \pm 8,93\%$ no 30º dia, $p= 0,5919$) (Figura 31).

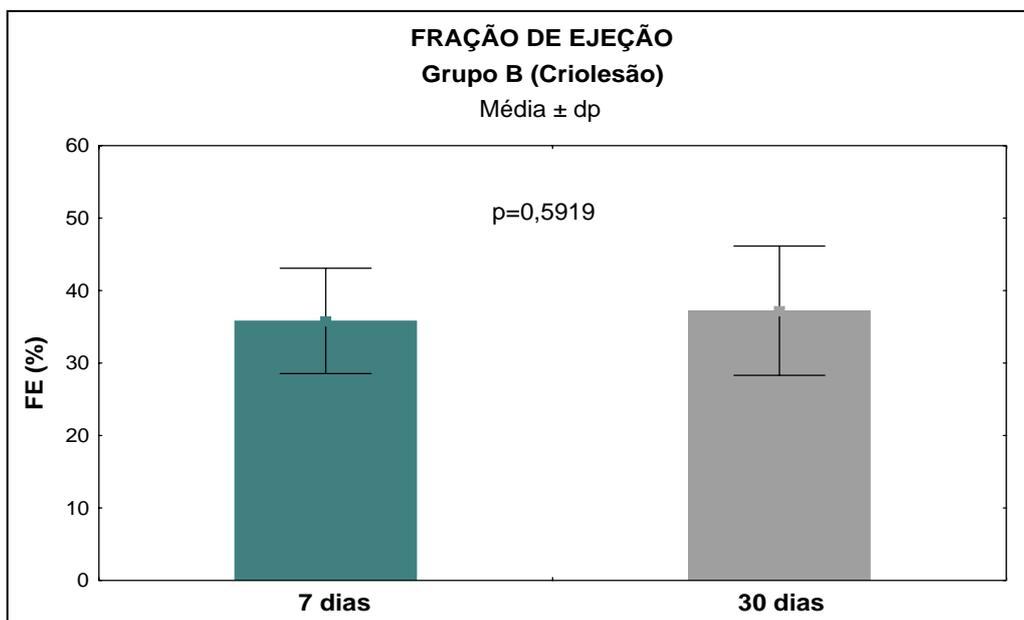


Figura 31 – Fração de ejeção no 7º e 30º dia pós-lesão miocárdica

4.6.3.2 Contratilidade da área afetada (acinesia, hipocinesia, discinesia ou normal)

Da mesma maneira que os animais do grupo A, foi avaliada pelo ecocardiografista o tipo de contratilidade do VE no 7º e 30º dia de pós-lesão miocárdica. Foram achados ventrículos com contratilidade normal, com hipocinesia, acinesia e discinesia de uma ou mais paredes. Dos vinte animais, apenas 16 entraram para o estudo, pois quatro foram a óbito no transoperatório ou no pós-operatório.

No 7º dia 12 (75%) corações apresentaram hipocinesia, quatro (25%) acinesia e nenhum com discinesia e contratilidade normal. No 30º dia, o coração de um rato (6,25%) voltou a apresentar contratilidade normal, três (18,75%) evoluíram de acinesia para discinesia e 12 (75%) mantiveram-se com hipocinesia (Figura 32).

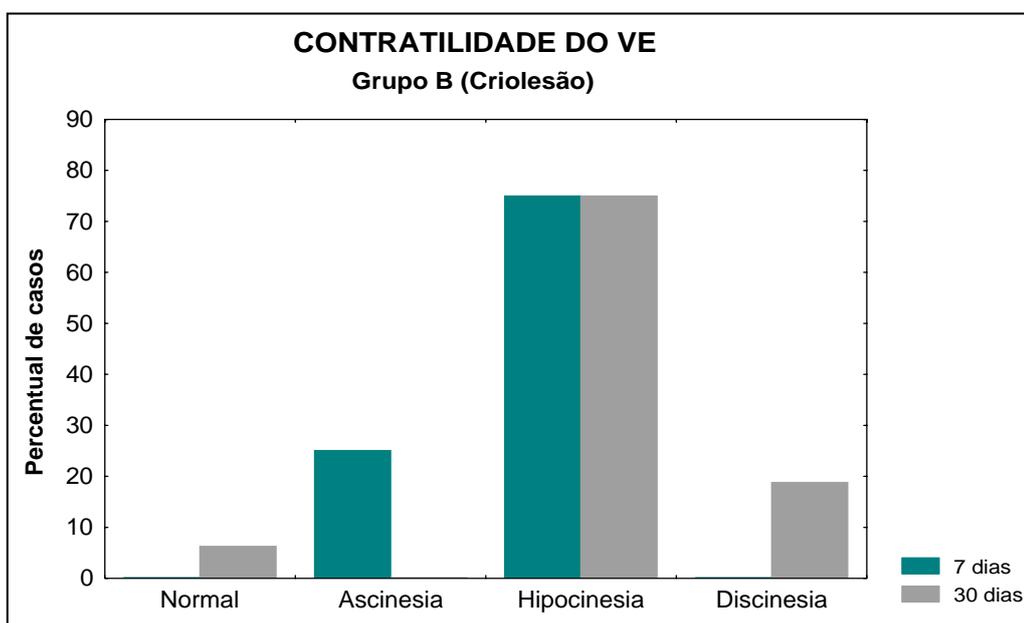


Figura 32 – Tipo de contratilidade do VE após o 7º e 30º dia de pós-lesão miocárdica nos animais do grupo B

4.6.3.3 Localização da área afetada após lesão miocárdica

Pela análise ecocardiográfica, observou-se a localização da parede do VE afetada após a lesão miocárdica no 7º e 30º dia pós-procedimento (Figura 33). Dos dezesseis animais estudados deste grupo, 6,67% não apresentaram nenhum tipo de anormalidade em nenhuma das paredes do ventrículo esquerdo, 73,33% com comprometimento da parede anterior e 20% da parede lateral. Em um dos animais (6,25%), que apresentava alteração da contratilidade da parede anterior no 7º dia, apresentou melhora no 30º dia.

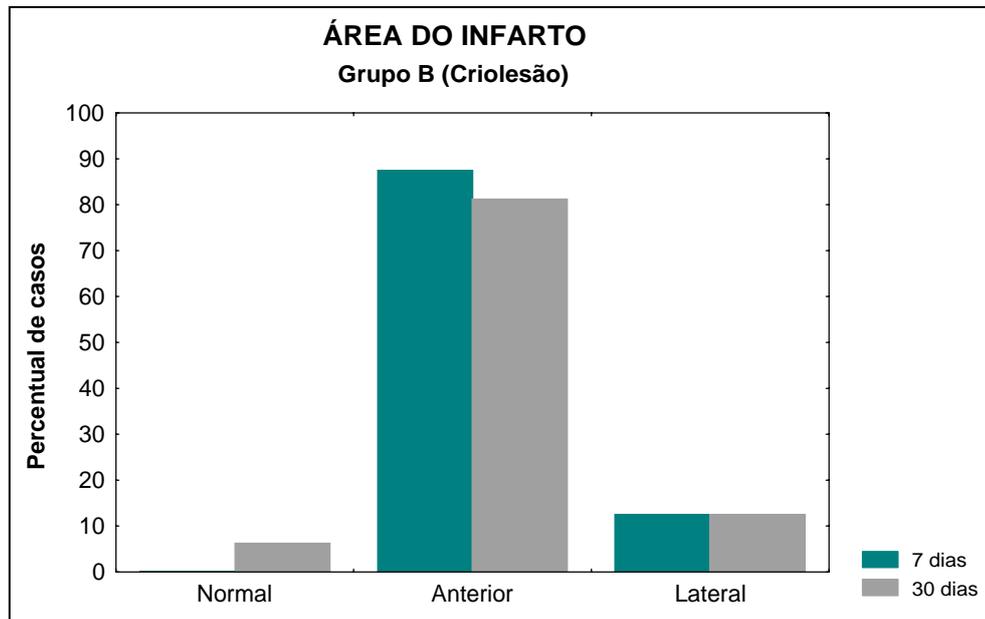


Figura 33 – Localização da área afetada após infarto

4.6.4 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas entre o Grupo A e B no 7º dia Pós-infarto com o Grupo Controle

A área diastólica final do VE (ADFVE) no 7º dia pós lesão miocárdica nos animais do grupo A foi de $1,33 \pm 0,19 \text{cm}^2$, no grupo B de $1,26 \pm 0,13 \text{cm}^2$ e no grupo C de $1,19 \pm 0,09 \text{cm}^2$ não havendo diferença significativa entre os grupos ($p= 0,1228$) (Quadro 2 e Figura 34).

Na análise do volume diastólico final do VE (VDFVE) não se evidenciou diferença significativa entre os grupos. O grupo A teve como valores $0,76 \pm 0,14 \text{ml}$, o grupo B $0,87 \pm 0,22 \text{ml}$ e o C $0,70 \pm 0,07 \text{ml}$ ($p= 0,0825$) (Quadro 2 e Figura 35) .

No entanto foi evidenciado um valor significativo quando comparados à área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASFVE) entre os três grupos. O grupo A obteve $0,96 \pm 0,20 \text{cm}^2$, o B $1,01 \pm 0,18 \text{cm}^2$ e o C $0,81 \pm 0,07 \text{cm}^2$ ($p=0,0240$) (Quadro 3 e Figura 36).

O volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) resultou em diferença significativa. O grupo A apresentou $0,50\pm 0,17$ ml, o grupo B $0,56\pm 0,15$ ml e o grupo C $0,39\pm 0,06$ ml ($p=0,0264$) (Quadro 2 e Figura 37).

Na avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, também obteve-se p significativa. O grupo A teve os valores de $35,45\pm 10,39\%$, o grupo B $35,81\pm 7,27\%$ e o grupo C de $44,75\pm 5,54\%$ ($p=0,0109$) (Quadro 3 e Figura 38).

Nas variáveis ecocardiográficas em que houve diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$) entre os três grupos (ASFVE, VSFVE e FEVE) foi feita uma análise estatística entre os grupos dois a dois.

Comparando o grupo A com o C obteve-se p significativo em duas variáveis (ASFVE e FEVE). A ASFVE resultou em $p=0,0326$, o VSFVE $p=0,0537$ e a FEVE um $p=0,0171$ (Quadro 3).

Todavia, quando comparado o grupo B com o grupo C, obteve p significativa nas três variáveis estudadas. A ASFVE resultou em um $p=0,0118$, o VSFVE um $p=0,0124$ e a FEVE ($p=0,0086$) (quadro 3).

Na comparação entre o grupo A e o B não se encontrou p significativo em nenhuma das variáveis reestudadas. A ASFVE resultou em $p=0,4164$, o VSFVE em $p=0,3104$ e a FEVE $p=0,9117$ (Quadro 3 e Figuras 36,37 e 38).

Quadro 2 - Variáveis ecocardiográficas dos três grupo no 7º dia pós-lesão

Variável	Controle (n=10)	Crio (n=16)	Ligadura (n=15)	Valor de p^* (controle x crio x ligadura)
ADFVE (cm ²)	$1,19\pm 0,09$	$1,33\pm 0,19$	$1,26\pm 0,13$	0,1228
VDFVE (ml)	$0,70\pm 0,07$	$0,87\pm 0,22$	$0,76\pm 0,14$	0,0825
ASFVE (cm ²)	$0,81\pm 0,07$	$1,01\pm 0,18$	$0,96\pm 0,20$	0,0240
VSFVE (ml)	$0,39\pm 0,06$	$0,56\pm 0,15$	$0,50\pm 0,17$	0,0264
FEVE (%)	$44,75\pm 5,54$	$35,81\pm 7,27$	$35,45\pm 10,39$	0,0109

(*) ANCOVA (peso do rato como co-variável)

Quadro 3 - Comparações múltiplas (grupos dois a dois):

Grupos comparados	ASFVE	VSFVE	FEVE
	Valor de p*	Valor de p*	Valor de p*
Controle x ligadura	0,0326	0,0537	0,0171
Controle x crio	0,0118	0,0124	0,0086
Crio x ligadura	0,4164	0,3104	0,9117

(*) Teste de Newman-Keuls

4.6.5 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas Entre o Grupo A e B no 30º dia Pós-infarto com o Grupo Controle

Todas as variáveis ecocardiográficas apresentaram resultados estatisticamente significativos no 30º dia pós-lesão miocárdica quando comparados os três grupos.

A área diastólica final do ventrículo esquerdo (ADFVE) foi de $1,40 \pm 0,14 \text{ cm}^2$ nos animais do grupo A, de $1,30 \pm 0,08 \text{ cm}^2$ no grupo B e de $1,19 \pm 0,09 \text{ cm}^2$ no grupo C com $p = 0,0001$ (Quadro 4) (Figura 34).

Quando avaliado o volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) encontrou-se os valores de $0,95 \pm 0,19 \text{ ml}$ no grupo A, $0,83 \pm 0,08 \text{ ml}$ no grupo B e $0,70 \pm 0,07 \text{ ml}$ no grupo C com $p = 0,0003$ (Quadro 4) (Figura 35).

A área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASFVE) foi de $1,07 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ no grupo A, de $0,90 \pm 0,24 \text{ cm}^2$ no grupo B e de $0,81 \pm 0,07 \text{ cm}^2$ no grupo C resultando um $p = 0,0054$ (Quadro 4) (Figura 36).

O volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) foi de $0,64 \pm 0,21 \text{ ml}$ no grupo A, $0,52 \pm 0,10 \text{ ml}$ no grupo B e de $0,39 \pm 0,06 \text{ ml}$ no grupo C, obtendo um $p = 0,0005$ (Quadro 4) (Figura 37).

Na avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo encontraram-se os valores de $34,45 \pm 9,99\%$ no grupo A, $37,23 \pm 8,93\%$ no grupo B e $44,75 \pm 5,54\%$ no grupo C, resultando $p = 0,0096$ (Quadro 4) (Figura 38).

Como todas as variáveis resultaram em valores significantes quando comparadas entre os três grupos, elas foram analisadas entre os grupos dois a dois.

Quando comparado o grupo A com o C, todas as variáveis ecocardiográficas apresentaram resultados significativos. A ADFVE obteve $p=0,0001$, a ASFVE $p=0,0046$, o VDFVE $p=0,0004$, o VSFVE $p=0,0003$ e a FEVE $p=0,0097$ (Quadro 5).

Todavia, na comparação do grupo B com o C, nem todas as variáveis apresentaram resultados significantes. A ADFVE teve $p=0,0109$, a ASFVE $p=0,2476$, o VDFVE $p=0,0011$, o VSFVE $p=0,0032$ e a FEVE $p=0,0287$ (Quadro 5).

Na avaliação das variáveis entre o grupo A e o B, duas resultaram em p estatisticamente significativo. A ADFVE obteve $p=0,0180$, a ASFVE $p=0,0322$, o VDFVE $p=0,0929$, o VSFVE $p=0,1854$ e a FEVE $p=0,4055$ (Quadro 5) (Figuras 34, 35, 36, 37 e 38).

Quadro 4 - Variáveis ecocardiográficas dos três grupos no 30º dia pós-lesão

Variável	C(contrôle) (n=10)	B(crio) (n=16)	A(ligadura) (n=15)	Valor de p^* (crio x ligadura)
ADFVE (cm ²)	1,19±0,09	1,30±0,08	1,40±0,14	0,0001
VDFVE (ml)	0,70±0,07	0,83±0,08	0,95±0,19	0,0003**
ASFVE (cm ²)	0,81±0,07	0,90±0,24	1,07±0,22	0,0054
VSFVE (ml)	0,39±0,06	0,52±0,10	0,64±0,21	0,0005**
FEVE (%)	44,75±5,54	37,23±8,93	34,45±9,99	0,0096

(*) ANCOVA (peso do rato como co-variável) e teste de Newman-Kewls para comparações múltiplas

(**) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Quadro 5 - Comparações múltiplas (grupos dois a dois):

Grupos comparados	ADFVE	VDFVE	ASFVE	VSFVE	FEVE
	Valor de p				
Controle x ligadura	0,0001	0,0004	0,0046	0,0003	0,0097
Controle x crio	0,0109	0,0011	0,2476	0,0032	0,0287
Crio x ligadura	0,0180	0,0929	0,0322	0,1854	0,4055

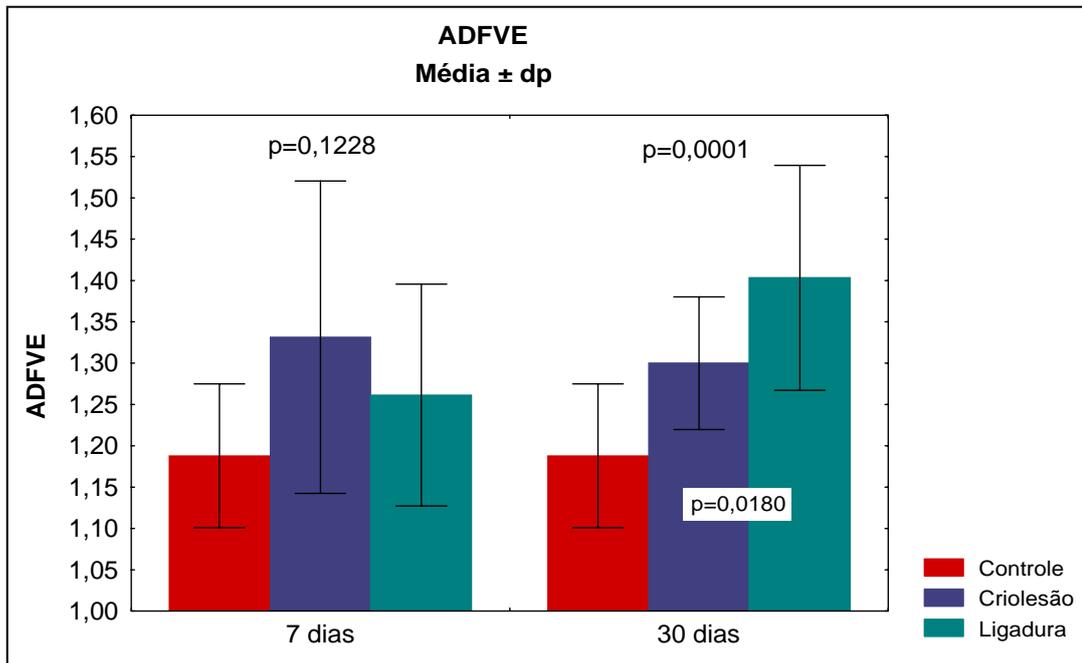


Figura 34 – ADFVE no 7º e 30º dia pós-lesão

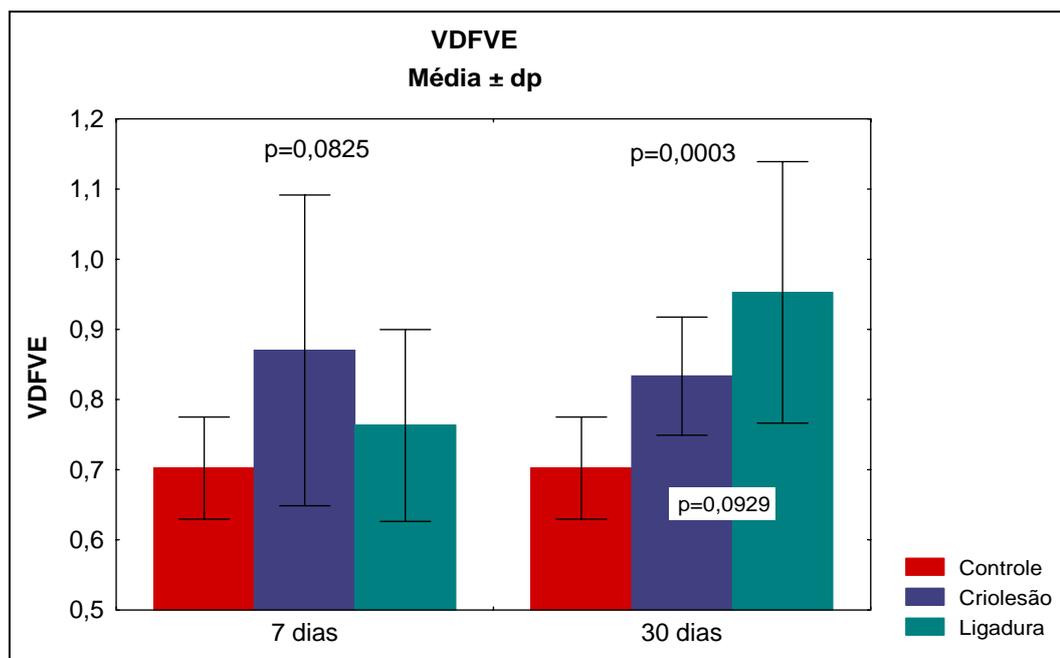


Figura 35 – VDFVE no 7º e 30º dia pós-procedimento

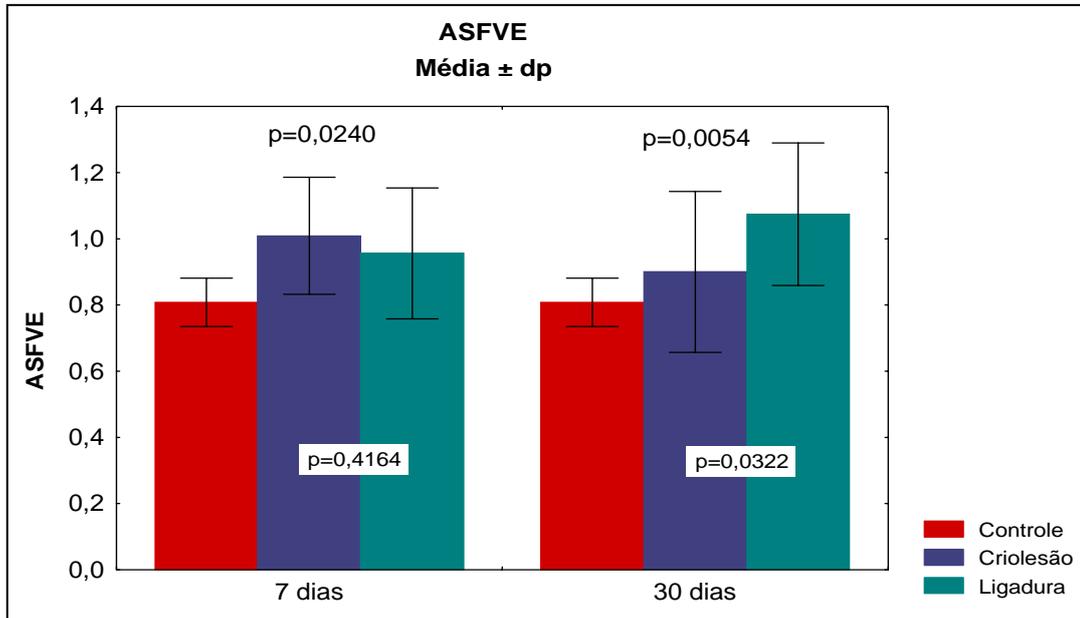


Figura 36 – ASFVE no 7º e 30º dia pós-procedimento

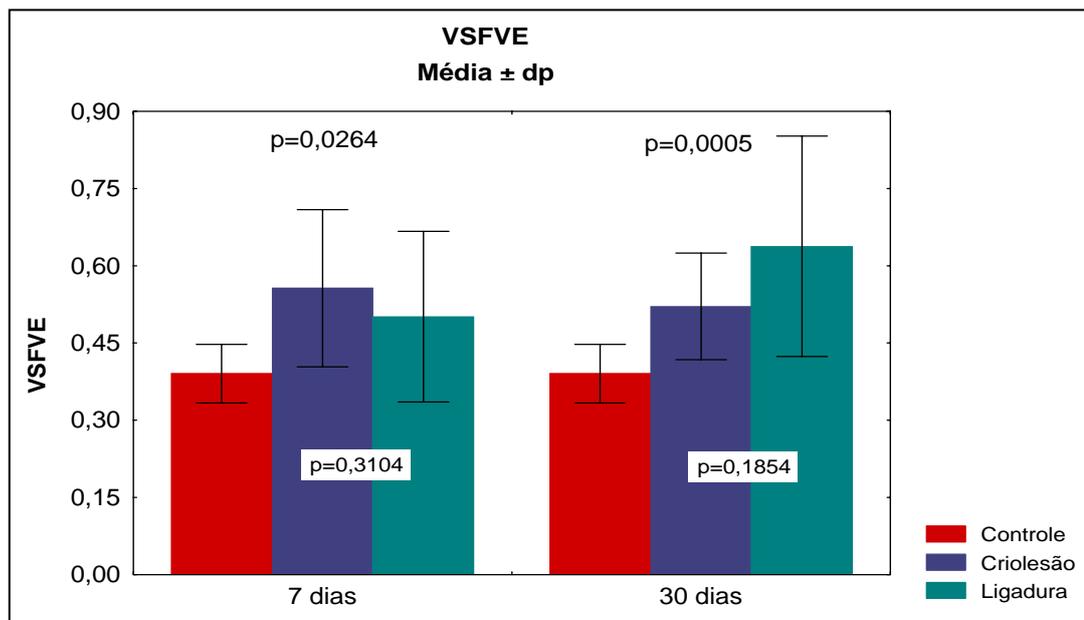


Figura 37 – VSFVE no 7º e 30º dia pós-lesão miocárdica

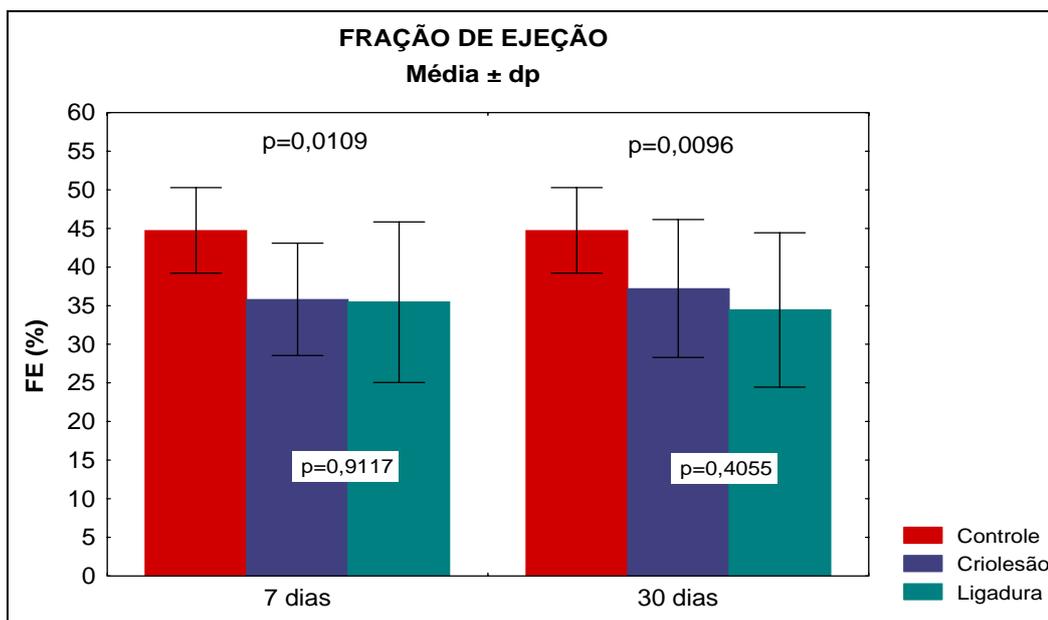


Figura 38 – FE VE no 7º e 30º dia pós-procedimento

4.6.6 Comparação das Variáveis Ecocardiográficas nos Grupos A e B entre o 7º e 30º dia de Pós-lesão Miocárdica

Foram comparados os valores das variáveis ecocardiográficas entre os grupos A (ligadura) e o B (criolesão) no 7º e 30º dia pós-lesão miocárdica.

Quando comparada à área diastólica final do ventrículo esquerdo (ADFVE), encontrou-se diferença importante ($p=0,0003$) no grupo A, mostrando um aumento importante da cavidade do VE no 30º dia. No entanto, quando estudado o grupo B, o valor de p não teve significância ($p= 0,5087$).

Na avaliação da área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASFVE) também se encontrou um valor significativo no grupo A ($p= 0,0058$). Todavia, nenhum valor significativo foi encontrado no grupo B ($p= 0,2241$).

No estudo do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) verificou-se um p significativo no grupo A ($p=0,0003$). Da mesma maneira que a variável anterior, não foi encontrado resultado no grupo B ($p= 0,5277$).

Quando analisado o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE), obteve-se diferença importante no grupo A com $p= 0,0013$. No entanto, o grupo B teve um $p= 0,4529$.

A única variável no qual não se observou nenhum resultado significativo, tanto no grupo A como no B, foi a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). O grupo A teve $p= 0,5546$ e o grupo B $p= 0,5919$.

4.6.7 Tipo de Contratilidade da Parede do Ventrículo Esquerdo Pós-Lesão Miocárdica Entre os Grupos A e B

A partir da análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo, foi possível determinar a região (parede anterior, lateral ou inferior) mais afetada pelo infarto e o tipo de contratilidade (normal, hipocinesia, acinesia ou discinesia). Na análise do 7º dia pós-lesão nos animais dos grupos A (ligadura) e B (criolesão), evidenciou-se porcentagem maior de hipocinesia no grupo B (75%) quando comparado com o A (26,67%) e porcentagem maior de acinesia no grupo A (66,67%) quando comparado com o B (25%). Nenhum dos grupos apresentou área de discinesia no 7º dia (Figura 39). Na avaliação do 30º dia, o grupo B apresentou porcentagem maior de discinesia da parede do VE (18,75% vs 12,50%) (Figura 40).

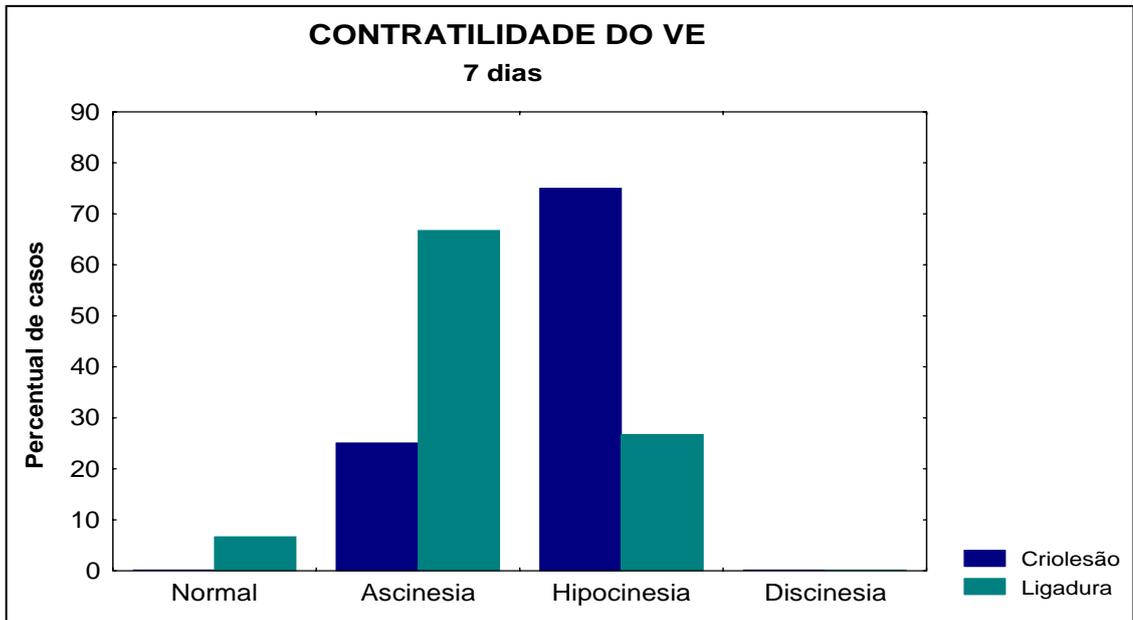


Figura 39 – Comparação do grupo A com o B no 7º dia pós-lesão miocárdica

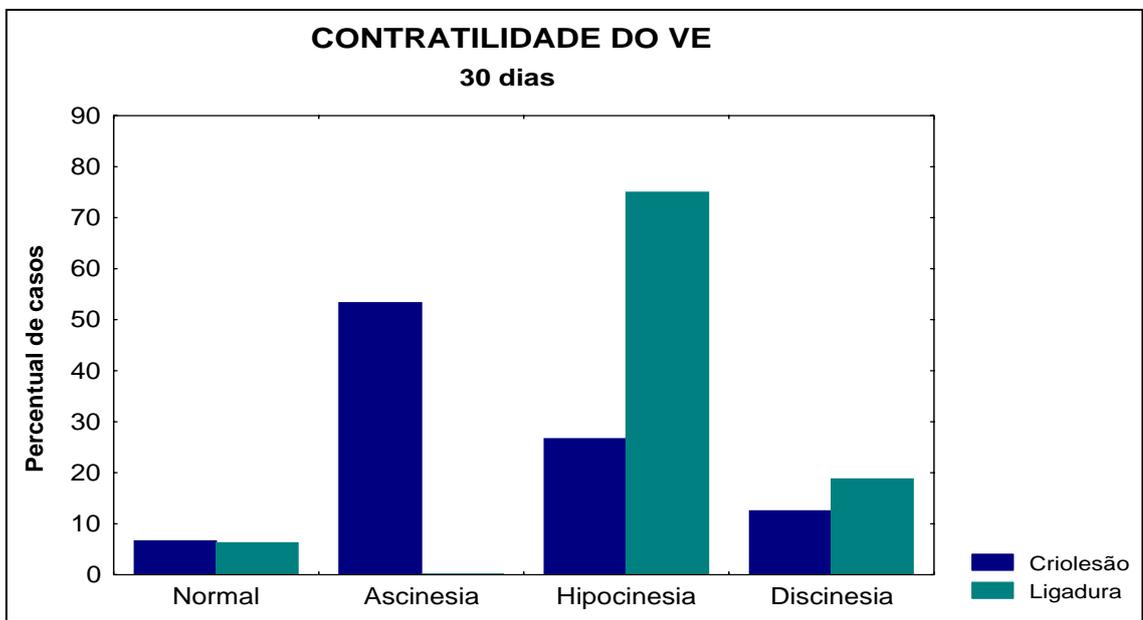


Figura 40 - Comparação do grupo A com o B no 30º dia pós-lesão

4.6.8 Comparação da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo Entre os Grupos Pós-lesão Miocárdica Com o Grupo Controle

Com a intenção de confirmar a disfunção ventricular causada pela lesão miocárdica, compararam-se os grupos (A e B) no 7º e 30º dia pós-lesão com o grupo controle (C). No 7º dia o grupo A (ligadura) apresentou FEVE de $35,81 \pm 7,27\%$, o grupo B de $35,81 \pm 7,27\%$ e o grupo C de $44,75 \pm 5,54\%$ resultando $p=0,0109$. No 30º dia o grupo A obteve como resultado $34,45 \pm 9,99\%$, o grupo B $37,23 \pm 8,93\%$ e o grupo C $44,75 \pm 5,54\%$ ($p=0,0096$) (gráfico 19).

Analisando-se a FEVE dos grupo A e B de maneira isolada no 7º e 30º dia pós lesão miocárdica não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p=0,9117$ e $p=0,4055$, respectivamente).

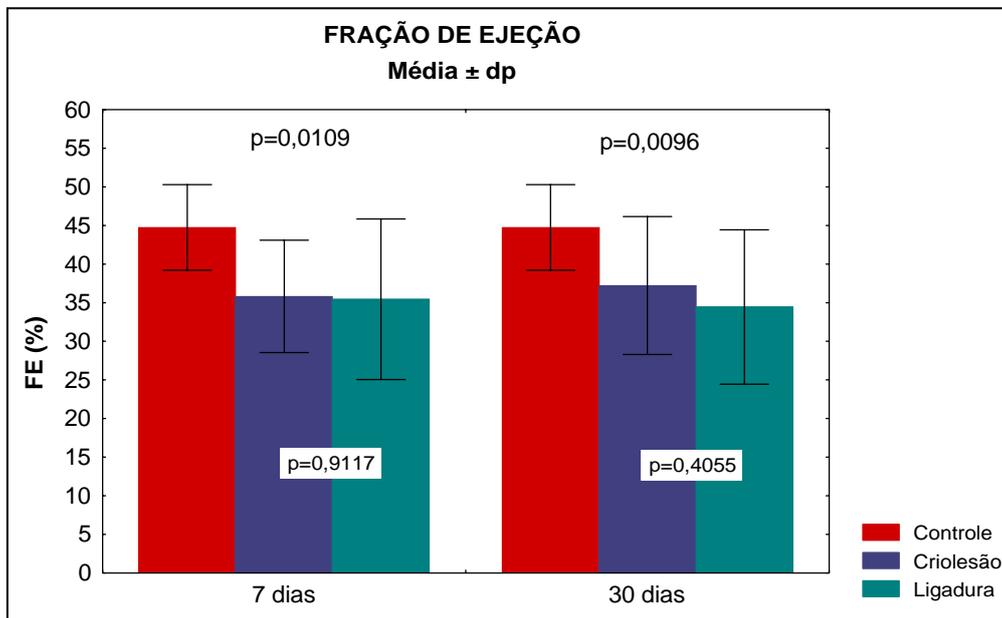


Figura 41 - Fração de ejeção dos três grupos

4.7 ANATOMIA PATOLÓGICA

4.7.1 Infarto Transmural

Todos os cortes histológicos apresentaram lesões miocárdicas, variando de pequenas a grandes. Na primeira leitura os grupos foram divididos em infartos transmuralis e não transmuralis os quais estão agrupados na tabela abaixo. Comparando o grupo da criolesão com o da ligadura, não houve diferença ($p=0,0756$) (quadro 6).

Quadro 6 – Presença ou não de lesão transmural nos grupos A e B

Infarto Transmural	Grupo	
	Crio	Ligadura
Não	N=11 68,75%	N=5 33,33%
Sim	N=5 31,25%	N=10 66,67%
Total	16	15

Valor de $p=0,0756$

4.7.2 Necrose Epicárdica e Endocárdica

Nos cortes histológicos onde o infarto evidenciado não foi transmural, ou seja, a lesão não se estendeu em toda espessura da parede do ventrículo, os animais foram subdivididos em dois grupos: os que apresentaram fibrose endocárdica e os que apresentaram fibrose epicárdica. Quando se comparou o grupo A com o B, não houve diferença ($p=0,2995$) (quadro 7).

Quadro 7 – Lesão epicárdica e endocárdica nos grupos A e B

IAM não transmural	Grupo	
	Crio	Ligadura
Epicárdico	8 72,73%	2 40,00%
Endocárdico	3 27,27%	3 60,00%
Total	11	5

Valor de $p= 0,2995$

4.7.3 Extensão do Infarto Epicárdico e Endocárdico

Nos corações, nos quais a fibrose miocárdica não se estendeu à toda a parede ventricular, foi medido o comprimento da área infartada e o comprimento da parede do ventrículo esquerdo medidos em um corte transversal. Fazendo a análise comparativa dos resultados encontrados nos animais do grupo A e do grupo B, não houveram diferenças significantes entre eles (Quadro 9).

Quadro 8 – Extensão das lesões não transmurais

Variável	CRIO (n=11)	LIGADURA (n=5)	Valor de p
Comprimento total	2732,73±822,31	2932,96±1165,91	0,6612
Comprimento do infarto	1177,22±549,84	1073,14±212,21	0,8269

5 DISCUSSÃO

5.1 MORTALIDADE

Não obtivemos diferença entre os dois grupos quanto à mortalidade (25% vs 20%, $p=1$), com resultados similares aos encontrados por Liu et al.¹¹ No entanto, neste estudo, a mortalidade foi inferior à encontrada por Jhons e Olson¹⁸ 33% e por De Angelis et al.¹³ 30%.

5.2 FISIOPATOLOGIA

A miocardiopatia isquêmica é a maior causa de insuficiência cardíaca nos dias de hoje.⁵⁴ O infarto agudo do miocárdio se inicia por uma oclusão, normalmente por trombos, e termina com necrose do local pelo qual a artéria coronária afetada era responsável pela perfusão e oxigenação tecidual. Se a artéria ocluída for de grande calibre e responsável pela irrigação de uma grande parte do coração, a não reperfusão ou reperfusão tardia acarretará em um grande infarto transmural, tendo como resultado a redução da função do ventrículo esquerdo acompanhando a remodelação cardíaca.⁵⁵

O remodelamento do miocárdio é sinônimo de “expansão do infarto” o qual pode continuar mesmo depois da necrose estabelecida, tendo como consequência a dilatação do ventrículo esquerdo. Este fenômeno é explicado pelo aumento do estresse sobre a parede do ventrículo, baseado nas leis de La Place.⁵⁶ O aumento global do ventrículo esquerdo indica e quantifica a remodelação do coração que poderá resultar em insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita. O tratamento

medicamentoso tenta prevenir o remodelamento reduzindo a pré-carga e a pós-carga, prevenindo a hipertrofia e a fibrose dos miócitos remanescentes.

A queda da função ventricular após o infarto agudo do miocárdio é um dos fatores mais determinantes da evolução clínica, demonstrando prognóstico desfavorável.³⁶

5.3 MODELO ANIMAL

Tem se dado preferência a roedores como modelo experimental devido ao baixo custo e seu curto ciclo biológico. Além disso, estas espécies são bem definidas geneticamente com alta resistência à infecção por bactérias comuns, principalmente quando comparada à animais de grande porte.

O modelo experimental de infarto agudo do miocárdio mais utilizado tem sido o da ligadura da artéria coronária esquerda, em ratos, o qual tem uma grande similaridade à evolução clínica demonstrada em humanos.⁵⁷ Resulta em grandes áreas de necrose, lesão tecidual e disfunção ventricular, muito bem mostrada por Pfeffer et al.⁵ No entanto, é associado com considerado número de desvantagens, em particular a alta taxa de mortalidade, oscilando na literatura de 10% a 67%.^{11,13,18,27,28} Outro problema encontrado tem sido a extensão e a homogeneidade da lesão que são dependentes da importância da circulação colateral, a qual é muito variável, tanto de animal para animal, como de pessoa para pessoa. Por este motivo muitos autores apresentam dificuldades na produção do modelo experimental ideal de disfunção ventricular secundária à lesão miocárdica.

O propósito de desenvolver um modelo de insuficiência cardíaca congestiva por meio da ligadura da artéria coronária esquerda, uma lesão extensa e uniforme deixou a desejar. A partir daí Liu et al.¹¹ estudaram a anatomia coronária esquerda de seis linhagens de ratos: Lewis, Sprague-Dawley, Wistar, Brown Norway, Dahl sensível a sal e Dahl resistente a sal. Os ratos Lewis apresentaram maior uniformidade na distribuição da artéria coronária descendente anterior, mostrando ser ideal para este tipo de modelo. Dividiu a anatomia coronariana em direita e

esquerda. Esta última com suas subdivisões: descendente anterior, circunflexa e os ramos septais, similar ao modelo encontrado por Rodrigues et al.²³ Diferente do citado por Johns e Olson¹⁸ os quais subdividiram em coronária esquerda e direita sem existir uma artéria circunflexa verdadeira. Apesar do nosso estudo não ser sobre anatomia coronariana de ratos, os achados a olho nu são concordantes com os encontrados por RODRIGUES et al.²³

Vários são os modelos experimentais para indução da insuficiência cardíaca congestiva, em várias espécies, como sobrecarga de volume, hipertensão arterial, frequência cardíaca elevada induzida pós marcapasso endocavitário, infarto agudo do miocárdio e uso de drogas cardiotoxícas. Modelos geneticamente alterados para cardiomiopatia são também viáveis em animais de pequeno porte.²¹ No estudo, ora apresentado, optou-se pelos modelos de lesão miocárdica (IAM), por ser a principal etiologia da insuficiência cardíaca e por ser o modelo mais utilizado para a descoberta de novos tratamentos para o IAM e a ICC. No entanto vale a pena citar a conclusão de Monnet et al.²¹:

Nenhum dos modelos experimentais reproduz completamente a progressão natural da doença. O desenvolvimento de insuficiência cardíaca esta frequentemente associado a doenças como diabetes, obesidade e hipertensão artéria sistêmica, patologias que normalmente não são encontradas em modelos experimentais. A combinação de diferentes técnicas (Por exemplo, miocardiopatia isquêmica mais frequência cardíaca elevada induzida por marcapasso) poderia produzir um modelo de insuficiência cardíaca que mais se aproxima de pacientes.

Na tentativa de se obter um modelo experimental de lesão miocárdica mais homogêneo, em que a variação da circulação coronariana não influenciasse nos resultados, Li et al.³¹ produziram um modelo experimental utilizando nitrogênio líquido. Este era aplicado sobre a parede livre do ventrículo esquerdo por uma ponteira metálica a qual era submersa no líquido e então aplicada. Obtiveram uma amostra mais homogênea com lesão transmural mais constante, tamanho de área afetada e disfunção miocárdica com menor variabilidade que as vistas nos modelos por ligadura da artéria coronária. No entanto, os resultados de Monnet et al.²¹, diferem dos achados de Li, pois em seus modelos de criolesão um grande número de animais não desenvolveu lesão transmural, e muitos dos que a apresentavam curaram-na sem desenvolver fibrose ou aneurisma de ventrículo.

Nossos resultados diferem dos encontrados por Li et al.³¹, pois o grupo dos animais submetido à lesão miocárdica por ligadura apresentou maior porcentagem

de lesões transmurais com menor índice de lesões não transmurais quando comparados com os animais submetidos à lesão miocárdica por criolesão. No entanto, obtivemos resultados similares quando o parâmetro avaliado foi a função ventricular.

Diversos modelos de lesão miocárdica (IAM) para indução de disfunção ventricular com a utilização do nitrogênio líquido, em ratos, foram realizados. LI et al.³¹ utilizaram uma haste metálica elíptica medindo 8X10 mm de diâmetro. A haste era submersa em nitrogênio líquido e aplicada sobre a parede livre do ventrículo esquerdo por sessenta segundos. O mesmo procedimento era repetido dez vezes. Já MURRY et al.⁵⁸ e ZHANG et al.³⁹ utilizaram uma haste de alumínio com 5 mm de diâmetro também submersa em nitrogênio líquido. No entanto, a haste era colocada em contato com a parede livre do ventrículo por apenas 30 segundos, repetindo o procedimento por duas vezes. HUWER et al.⁵⁹ repetiram o procedimento, no entanto, aumentando para três vezes o contato com o ventrículo. Quando avaliada a extensão da lesão miocárdica, LI et al. obtiveram 36% de necrose do total do ventrículo esquerdo, enquanto MURRY um total de 9,5%. Resultado decorrente pela provável diferença do tamanho das hastes e pelo número de vezes em que a haste foi aplicada.

O modelo de criolesão deste estudo difere de todos os citados. Não foi utilizada a haste e sim uma ponteira metálica oca com um circuito aberto pelo qual o nitrogênio líquido circulava dentro congelando-a. O tempo de contato foi de aproximadamente 60 segundos com intervalos de um minuto, sendo aplicada sobre a parede livre do ventrículo esquerdo cinco vezes.

LI et al.²² obtiveram lesão transmural em 25% dos corações submetidos à criolesão. Destes, 13% da parede livre do ventrículo esquerdo ficou comprometida na primeira semana, aumentando para 55% na quarta semana de estudo, tendo como consequência dilatação importante e diminuição da função ventricular. Os resultados do estudo em questão diferem dos de LI et al. Obteve-se 31% de lesão transmural nos animais submetidos a criolesão. No entanto, apesar de não apresentar diferença significativa entre o 7º e o 30º dia, houve uma tendência a melhorar a função ventricular.

Não se sabe exatamente qual modo ideal de se utilizar a criolesão na produção do modelo experimental, pois existem inúmeras variáveis em questão, tais como: tipo de haste ou ponteira, tempo de contato com a parede livre do ventrículo esquerdo, número de aplicações para produzir uma lesão efetiva e se há ou não hipotermia importante que aumente a mortalidade do animal. Talvez estes sejam os motivos da variabilidade de resultados nos modelos experimentais de criolesão.

5.4 ANGIOGÊNESE

Nos dois modelos experimentais de infarto poucos estudos foram realizados em relação a angiogênese e revascularização. Análises histológicas têm demonstrado a proliferação de pequenos vasos em torno de dois dias após a indução do infarto agudo do miocárdio com a ligadura da coronária.⁵⁷ Em animais submetidos à lesão miocárdica com criolesão, foi avaliada a presença de angiogênese no 7º e 28º dias de evolução por meio da microscopia fluorescente. No 7º dia houve perda total da perfusão capilar no local do infarto, ao passo que no 28º foi encontrado aumento importante da microcirculação.⁵⁹

Huwer et al.⁵⁹ demonstraram que após a criolesão sobre o miocárdio, arteríolas e vênulas com diâmetro acima de 40 µm permanecem perfundidas, ao passo que microvasos com diâmetro entre 10 e 40 µm são destruídos.

5.5 FIBROSE MIOCÁRDICA

O remodelamento ventricular tem sido caracterizado pelo afinamento e a dilatação da parede infartada, o que leva à dilatação da cavidade ventricular, em consequência da perda de miócitos pela baixa perfusão coronariana.⁶⁰ Também é caracterizada pelo depósito de colágeno endocárdico em regiões isentas de lesão

miocárdica devida à redução d perfusão miocárdica que ocorre de imediato no local de infarto.⁶¹

Guido et al.⁶² mostraram que a baixa perfusão coronariana, mesmo sem infarto transmural é responsável pelo depósito de colágeno (fibrose) endocárdico e que a sobrecarga de volume do ventrículo esquerdo tem como conseqüência o acúmulo de fibrose intersticial. Este mecanismo explica o porquê da presença de fibrose endocárdica em animais que não apresentaram lesões transmurais após os procedimentos (criolesão e ligadura da CE), sugerindo isquemia regional e sobrecarga de volume no ventrículo esquerdo os quais foram comprovados pelos resultados ecocardiográficos.

Outro modelo de indução da insuficiência cardíaca, em ratos, é por sobrecarga de volume (fístula artério-venosa) que também demonstrou acúmulo de colágeno intersticial durante a fase de remodelamento ventricular ⁴⁹, explicando a presença de colágeno em corações sem lesão transmural.

5.6 FREQUÊNCIA CARDÍACA

Não foi detectada nenhuma arritmia pré ou pós-operatória em nenhum dos grupos. A frequência cardíaca não mostrou diferença significativa em nenhuma fase do experimento, revelando-se um dado pouco importante no estudo. Estes resultados são confirmados pelos estudos de LIU, HUWER , ETZION, FRANCIS e LI.^{11,22,27,47,58}

5.7 PESO DO CORAÇÃO

O peso do coração foi uma variável importante neste estudo. Houve uma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos com lesão miocárdica. Tanto o grupo da ligadura como o da criolesão apresentaram aumento do peso do coração 30 dias após a lesão miocárdica, consequência do remodelamento ventricular, resultados equivalentes aos encontrados por Liu et al.¹¹ A remodelação foi comprovada pelos achados ecocardiográficos (ASFVE, ADFVE, VSFVE, VDFVE e FEVE). No entanto, no grupo da ligadura houve hipertrofia compensatória seguida da dilatação ventricular, enquanto que no grupo da criolesão não foram observadas todas as fases da remodelação ventricular de maneira significativa.

5.8 VARIÁVEIS ECOCARDIOGRÁFICAS

Quando comparadas as variáveis ecocardiográficas (ASFVE, ADFVE, VSFVE, VDFVE e FEVE) entre os três grupos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no 7º dia entre o grupo da ligadura e o da criolesão. No entanto, quando estudadas as mesmas variáveis no 30º dia pós-lesão miocárdica, houve maior dilatação do ventrículo esquerdo no grupo da ligadura da coronária esquerda, demonstrando maior similaridade com a fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio (remodelamento miocárdico), já citado por Mill, Pfeffer e Gaballa.^{4,6,7}

A variável ecocardiográfica que se manteve com valores similares, tanto no 7º como no 30º dia pós-lesão miocárdica no grupo da ligadura e da criolesão foi a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Este dado demonstra que apesar de serem mecanismos diferentes, os dois modelos experimentais causam disfunção ventricular importante e similar.

5.9 TIPO DE CONTRATILIDADE

Na avaliação da contratilidade do VE após as lesões miocárdicas, verificou-se grande diferença entre os dois grupos. Houve predominância de hipocinesia no grupo da criolesão, tanto no 7º como no 30º dia, enquanto que no grupo da ligadura a predominância foi de acinesia, o que leva a deferir que a ligadura da coronária esquerda resulta em lesões miocárdicas mais graves e irreversíveis. Com relação à localização das lesões miocárdicas, houve similaridade entre os dois grupos com maior acometimento da parede anterior.

5.10 LOCALIZAÇÃO DO IAM

Degabriele et al.²⁸ analisaram quatro diferentes regiões (anterior, lateral, posterior e parede septal) separadamente. A disfunção ventricular estava diretamente correlacionada com lesões nas paredes anterior e lateral, regiões que são vascularizadas, na grande maioria dos casos, pela artéria coronária descendente anterior. Nos dois modelos de lesão miocárdica, no presente estudo, a região mais afetada foi a parede anterior do ventrículo esquerdo, o que comprova a homogeneidade da localização da lesão.

5.11 ANATOMIA PATOLÓGICA

No estudo de anatomia patológica todos os corações dos animais dos grupos que sofreram lesão miocárdica mostraram algum tipo de comprometimento, ou seja, todos eles tiveram algum tipo de fibrose do ventrículo esquerdo. Apesar de não haver significância estatística, o grupo da ligadura da artéria coronária esquerda, apresentou maior número de lesões transmuralis com tendência à significância

estatística (66,67% vs 31,25%, $p=0,0756$). Quando avaliadas as lesões não transmuraís (epicárdica e endocárdica), tanto no número como na extensão (comprimento) não houve diferença significativa, mostrando homogeneidade das lesões não transmuraís dos dois grupos.

6 CONCLUSÕES

1. Os dois métodos de lesão miocárdica provocam disfunção ventricular importante, porém a ligadura da coronária esquerda provoca maior dilatação do ventrículo esquerdo, mostrando maior similaridade com a fase de remodelação ventricular após o IAM na prática clínica.
2. Não há diferença significativa nos dois grupos com relação à extensão da lesão, tanto epicárdicas, subpericárdicas e transmuralis.
3. A criolesão tende a provocar alteração da contratilidade menos grave (hipocinesia) que a provocada pela ligadura da coronária interventricular anterior (acinesia).

REFERÊNCIAS

1. Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling in the first year after acute myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 1991; 68(3): 856-69.
2. Nahrendorf M, Wiesmann F, Hiller KH, Hu K, Waller C, Ruff J, Lanz TE, Neubauer S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Serial cine-magnetic resonance imaging of left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Magn Reson Imaging.* 2001; 14(5): 547-55.
3. Nilsson JC, Groenning BA, Nilsen G, Fritz-Hansen T, Trawinski J, Hildebrand PR, Jensen GB, Larsson HB, Sondergaard L. Left ventricular remodeling in the first year after acute myocardial infarction and the predictive value of N-terminal pro brain natriuretic peptide. *Am Heart J.* 2002; 143(4): 696-702.
4. Gaballa M A, Goldman S. Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail.* 2002; 8 (6 Suppl): S476-85.
5. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 44(4): 503-512.
6. Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 1990; 24(9):748-53
7. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991; 260(5pt2): H1406-H1414.

8. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, et al. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol*. 1994; 267(6 Pt 2):H2383-90.
9. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RS. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?. *Circulation* , 1996. 94(9 suppl): II332-6
10. Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, et al. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* 1996; 94(9 Suppl):II337-40.
11. Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol* 1997; 272(2 Pt 2):H722-7.
12. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of posinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Phisiol*. 2000; 89(4): 1445-54.
13. De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs* 2001;25(11):939-43.
14. Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, et al. Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation* 2003; 108(1):104-9.

15. De Pasquale CG, Bersten AD, Doyel IR, Aylward PE, Arnolda LF. Infarct-induced chronic heart failure increases bidirectional protein movement across the alveolocapillary barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284(6): H2136-H45.
16. Souza LCG, Carvalho RG, Pouzet B, Vilquin T, Garcin I, Menasché P, et al. Transplante de células mioblásticas esqueléticas e de células cardíacas no infarto do miocárdio. *Rev Bras de Cir Cardiovasc*. 2002; 17(4): 312-322.
17. Brofman P.R.S., Carvalho, K.A., Souza, L.C.G., Rebelatto, C., Hansen, P., Senegaglia, Myague, N., Furuta, M., Francisco, J.C., Olandoski, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Rev Bras de Cirur Cardiovasc*. 2004; 19(3): 261-266.
18. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954;140(5): 675-82.
19. Hass GM, Taylor GBA. A quantitative hypothermal method for the production of local injury to tissue. *Arch Pathol* 1948; 45: 563-560
20. Jensen JA, Kosek JC, Hunt TK, Goodson WH, 3rd, Miller DC. Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. *Ann Surg* 1987;206(6):798-803.
21. Monnet E , Chachques J C. Animal Model of Heart Failure: What is New?. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:1445-53.
22. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Rao V, Jia ZQ. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg* 2001;72(6):1957-63.

23. Rodrigues TMA, Palmeira JAO, Mendonça JT, Gomes OM. Estudo evolutivo da anatomia das artérias coronárias em espécies de vertebrados com técnica de moldagem em acetato de vinil. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999. 14(4): 331-9.
24. Gross, F., Blum, L., Silverman, G. Experimental attempts to increase the blood supply to the dog's heart by means of coronary sinus occlusion. *J. Exp Med*, 1937. 65: 91-110.
25. Fauteux, M. Experimental study of the surgical treatment of coronary disease. *Surg Gynec and Obst*, 1940. 71: 151-5.
26. Stanton, E.J., Schild P., Beck, C.S. The effect of abrasion of the surface of the heart upon intercoronary communications. *Am. Heart J.*, 1941. 22: 529-38.
27. Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(7):1321-30.
28. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, et al. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 2004;89(4):497-505.
29. Sampaio, S.A.P., Rivitti, E.A. *Dermatologia*. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p1105-8.
30. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SL. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6ª ed. Toronto: McGraw-Hill, 2003. p2575-81.
31. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996;62(3):654-60; discussion 660-1.

32. Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Tomita S, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68(6):2074-80; discussion 2080-1.
33. Yau TM, Fung K, Weisel RD, Fujii, T, Mickle DAG e Li R. Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells. *Circulation* 2001; 104(suppl I):I-218-I-222.
34. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(5):907-21.
35. Razvadauskaite G. Survival and differentiation of implanted skeletal myoblasts in the native and in the cryoinjured myocardium. Degree of master of science in biotechnology. Faculty of the Worcester Polytechnic Institut 2002.
36. Pfeffer MA e Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172.
37. Hochman JS, Bulkley BH. Pathogenesis of left ventricular aneurysms: an experimental study in the rat model. *Am J Cardiol* 1982;50(1):83-8.
38. Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol* 1984;4(2):201-8.
39. Warren SE, Royal HD, Markis JE, Grossman W, McKay RG. Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1988;11(1):12-9.
40. Jugdutt BI. Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy. *Can J Cardiol* 1993;9(1):103-14.

41. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003;108(11):1395-403.
42. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol* 1985;118(3):484-92.
43. Bolognese L, Cerisano G. Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999;138(2 Pt 2):S79-83.
44. Sadoshima J, Izumo S. Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *J Recept Res* 1993;13(1-4):777-94.
45. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egidio J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):881-900.
46. Epifanio HB, Zornoff LAM, Matsubara BB, Rupp de Paiva SA, Inoue RMT, Matsubara LS. [Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade]. *Arq Bras Cardiol* 2005;84(1):10-4.
47. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(5):R1734-45.
48. Porto, C.C. *Doenças do Coração Prevenção e Tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p191-207.
49. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001. 280(2):H674-83.

50. Hecker BR, Lake CL, Difazio CA. The decrease of the minimum alveolar of the minimum alveolar anesthetic concentration produced by sulfentanil in rats. *Anesth Analg*. 1983; 62: 900-87.
51. Rebuelto M, Ambros L, Montoya L, Bonafine R. Treatment-time-dependent difference of ketamina pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int*. 2002; 19(5): 937-45.
52. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, et al. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* 2000;102(19 Suppl 3):III210-5.
53. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119(6):1169-75.
54. Bart BA, Ertl G, Held P, Kuch J, Maggioni AP, McMurray J, et al. Contemporary management of patients with left ventricular systolic dysfunction. Results from the Study of Patients Intolerant of Converting Enzyme Inhibitors (SPICE) Registry. *Eur Heart J* 1999;20(16):1182-90.
55. Ertl G, Frantz S. Wound model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(3):H981-3.
56. Aikawa Y, Rohde L, Plehn J, Greaves SC, Menapace F, Arnold MO, et al. Regional wall stress predicts ventricular remodeling after anteroseptal myocardial infarction in the Healing and Early Afterload Reducing Trial (HEART): an echocardiography-based structural analysis. *Am Heart J* 2001;141(2):234-42.

57. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978;90(1):57-70.
58. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-23.
59. Huwer H, Rissland J, Vollmar B, Nikoloudakis N, Welter C, Menger MD, et al. Angiogenesis and microvascularization after cryothermia-induced myocardial infarction: a quantitative fluorescence microscopic study in rats. *Basic Res Cardiol* 1999;94(2):85-93.
60. Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail* 1999;5(3):213-23.
61. Carvalho Frimm C, Koike MK, Curi M. Subendocardial fibrosis in remote myocardium results from reduction of coronary driving pressure during acute infarction in rats. *Arq Bras Cardiol* 2003;80(5):509-20.
62. Guido MC, Koike MK, Frimm CD. Low coronary perfusion pressure is associated with endocardial fibrosis in a rat model of volume overload cardiac hypertrophy. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59(5):228-235.

ANEXOS

Variáveis: peso, peso do coração e frequência cardíaca:

Variável	CONTROLE (n=10)	CRIO (n=16)	LIGADURA (n=15)	Valor de p
Peso do rato	385,70±17,23	397,06±17,52	390,20±21,32	0,3157
Peso do coração	1,32±0,10	1,41±0,08	1,48±0,13	0,0040
FC	220,00±19,07	208,81±34,61	216,47±25,63	0,5388

Comparações múltiplas (grupos dois a dois):

Grupos comparados	Peso do coração
	Valor de p
Controle x crio	0,0328
Controle x ligadura	0,0018
Crio x ligadura	0,1369

Variáveis ecocardiográficas dos três grupos no 7º dia pós-lesão:

Variável	Controle (n=10)	Crio (n=16)	Ligadura (n=15)	Valor de p* (controle x crio x ligadura)
ADFVE	1,19±0,09	1,33±0,19	1,26±0,13	0,1228
VDFVE	0,70±0,07	0,87±0,22	0,76±0,14	0,0825
ASFVE	0,81±0,07	1,01±0,18	0,96±0,20	0,0240
VSFVE	0,39±0,06	0,56±0,15	0,50±0,17	0,0264
FEVE	44,75±5,5 4	35,81±7,2 7	35,45±10,3 9	0,0109

(*) ANCOVA (peso do rato como co-variável)

Comparações múltiplas (grupos dois a dois):

Grupos comparados	ASFVE	VSFVE	FEVE
	Valor de p*	Valor de p*	Valor de p*
Controle x crio	0,0118	0,0124	0,0086
Controle x ligadura	0,0326	0,0537	0,0171
Crio x ligadura	0,4164	0,3104	0,9117

(*) Teste de Newman-Keuls

Variáveis ecocardiográficas dos três grupo no 30º dia pós-lesão:

Variável	Controle (n=10)	Crio (n=16)	Ligadura (n=15)	Valor de p* (crio x ligadura)
ADFVE	1,19±0,09	1,30±0,08	1,40±0,14	0,0001
VDFVE	0,70±0,07	0,83±0,08	0,95±0,19	0,0003**
AESFV	0,81±0,07	0,90±0,24	1,07±0,22	0,0054
VSFVE	0,39±0,06	0,52±0,10	0,64±0,21	0,0005**
FEVE	44,75±5,54	37,23±8,93	34,45±9,99	0,0096

(*) ANCOVA (peso do rato como co-variável) e teste de Newman-Kewls para comparações múltiplas

(**) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Comparações múltiplas (grupos dois a dois):

Grupos comparados	ADFVE	VDFVE	ASFVE	VSFVE	FEVE
	Valor de p				
Controle x crio	0,0109	0,0011	0,2476	0,0032	0,0287
Controle x ligadura	0,0001	0,0004	0,0046	0,0003	0,0097
Crio x ligadura	0,0180	0,0929	0,0322	0,1854	0,4055

Na tabela abaixo são apresentadas as medianas e os quartis das variáveis VDFVE e VSFVE, cujas comparações foram feitas usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis:

Variável	Controle (n=10)	Crio (n=16)	Ligadura (n=15)
VDFVE	0,72 (0,66 – 0,76)	0,82 (0,78 - 0,91)	0,89 (0,82 - 1,17)
VSFVE	0,40 (0,35 - 0,44)	0,52 (0,45 - 0,61)	0,58 (0,47 - 0,80)

Comparações das variáveis ecocardiográficas dos grupos A e B nos dois dias de estudo:

Variável	Grupo	7 dias	30 dias	Valor de p*
ADFVE	Crio (n=16)	1,33±0,19	1,30±0,08	0,5087
	Ligadura (n=15)	1,26±0,13	1,40±0,14	0,0003
VDFVE	Crio	0,87±0,22	0,83±0,08	0,5277
	Ligadura	0,76±0,14	0,95±0,19	0,0003
ASFVE	Crio	1,01±0,18	0,90±0,24	0,2241
	Ligadura	0,96±0,20	1,07±0,22	0,0058
VSFVE	Crio	0,56±0,15	0,52±0,10	0,4529
	Ligadura	0,50±0,17	0,64±0,21	0,0013
FEVE	Crio	35,81±7,27	37,23±8,93	0,5919
	Ligadura	35,45±10,39	34,45±9,99	0,5546

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Tipo de contratilidade do VE pós-lesão miocárdica

Área comprometida	7 dias		30 dias	
	Crio	Ligadura	Crio	Ligadura
Normal	-	1 6,67%	1 6,25%	1 6,67%
Ascinesia	4 25,00%	10 66,67%	-	8 53,33%
Hipocinesia	12 75,00%	4 26,67%	12 75,00%	4 26,67%
Discinesia	-	-	3 18,75%	2 12,50%
Total	16	15	16	15

Área do VE comprometida pela lesão miocárdica

Localização	7 dias		30 dias	
	Crio	Ligadura	Crio	Ligadura
Nenhum	-	1 6,67%	1 6,25%	1 6,67%
Anterior	14 87,5%	11 73,33%	13 81,25%	11 73,33%
Lateral	2 12,50%	3 20,00%	2 12,50%	3 20,00%
Total	16	15	16	15

Presença de lesão transmural

Transmural	Grupo	
	Crio	Ligadura
Não	11 68,75%	5 33,33%
Sim	5 31,25%	10 66,67%
Total	16	15

Valor de p: 0,0756

Lesões epicárdicas e endocárdicas

Área do infarto	Grupo	
	Crio	Ligadura
Epi	8 72,73%	2 40,00%
Endo	3 27,27%	3 60,00%
Total	11	5

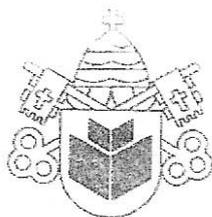
Valor de p: 0,2995

Extensão dos infartos não transmuraais

Variável	CRIO (n=11)	LIGADURA (n=5)	Valor de p
Comprimento total	2732,73±822,31	2932,96±1165,91	0,6612
Comprimento do infarto	1177,22±549,84	1073,14±212,21	0,8269

Variáveis ecocardiográficas dos ratos normais

Variável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão
A-VD	1,020	1,330	1,215	1,188	0,087
VD	0,551	0,794	0,716	0,702	0,073
A-VS	0,688	0,921	0,819	0,808	0,073
VS	0,307	0,457	0,399	0,390	0,057
FE	37,200	56,900	44,700	44,750	5,539



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 21 de dezembro de 2004.
PARECER N. 41/04/CEPA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio desta informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em reunião realizada no dia 20 de dezembro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Métodos de Infarto Agudo do Miocárdio em Ratos. Qual a Melhor Opção: Criolesão ou Ligadura", sob o registro no CEPA /PUCPR nº 33

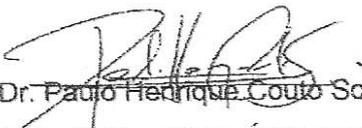
O experimento classificado como de categoria C será realizado com 45 Ratos Wistar, os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza

Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilmo Sr.

José Augusto Moutinho de Souza