

Edson Antônio Bregagnollo,
Antonio Carlos Cicogna,
Joel Spadaro,
Paulo Shiguero Saiki,
Paulo José Ferreira Tucci

PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL CAPAZ DE PRODUZIR HIPERTROFIA CARDÍACA

O objetivo do estudo foi padronizar um modelo experimental de hipertensão arterial capaz de produzir hipertrofia cardíaca. Ratos jovens da raça Wistar foram submetidos a constrição aórtica de 0,7 ou 0,8 mm de diâmetro e as repercussões da mesma avaliadas 7 a 21 e 70 a 121 dias após cirurgia simulada ou de bandagem aórtica. Os atributos analisados foram: pressão sistólica da aorta, pressão diastólica da aorta, relação peso do ventrículo esquerdo/peso do rato, relação peso do ventrículo direito/peso do rato, diâmetro celular da fibra miocárdica e exame histopatológico do coração, pulmões e fígado.

Os resultados obtidos permitiram eleger o método de constrição aórtica ao diâmetro de 0,8 mm, visto que é eficaz na produção de hipertensão arterial e conseqüente hipertrofia cardíaca e desencadeia menor mortalidade do que aquele que utiliza a constrição aórtica de 0,7 mm de diâmetro.

O modelo experimental de sobrecarga cardíaca desencadeada pela constrição aórtica é considerado apropriado para a produção de hipertrofia cardíaca e é utilizado com frequência para estudos morfológicos¹⁻³, bioquímicos⁴⁻⁷ e funcionais⁸⁻¹⁰ do miocárdio hipertrofiado.

Os níveis pressóricos e o grau de hipertrofia cardíaca que se desenvolvem após a constrição aórtica dependem de vários fatores entre os quais podemos destacar: idade e raça do animal utilizado, severidade e local da constrição aórtica e tempo decorrido após o procedimento.

Com o propósito de padronizar um modelo experimental de hipertensão arterial capaz de produzir hipertrofia cardíaca, estudamos os efeitos da constrição da aorta abdominal a nível subdiafragmático em ratos jovens da raça Wistar. Procurou-se estabelecer, para dois graus distintos de constrição aórtica, a mortalidade acarretada pelo método e sua eficiência na produção de hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados ratos jovens da raça Wistar, alimentados "ad libitum", pesando entre 150 e 220 g ao serem incluídos no experimento. Cada animal foi pesado ao ser introduzido no estudo e precedendo a obtenção dos dados experimentais.

A hipertensão arterial foi obtida pelo método de Beznak¹¹, com adaptações de Krieger¹². Os ratos eram anestesiados com éter, colocados em decúbito dorsal e submetidos a laparotomia mediana. A aorta subdiafragmática, imediatamente acima do tronco celíaco, era isolada, reparada com fio de algodão nº 10 e uma agulha hipodérmica calibre 7 ou 8 era justaposta ao vaso. Amarrando-se o fio e retirando-se a agulha, criava-se uma constrição aórtica de diâmetro aproximadamente igual ao calibre externo da agulha. A incisão abdominal era suturada e semanalmente os animais recebiam antibióticos por via intramuscular. Iguais procedimentos anestésicos, cirúrgico e pós-operatório, excetuando-se a constrição aórtica, foram efetuados em animais controles.

Grupos experimentais - A pesquisa visou a avaliar as repercussões da constrição aórtica a curto e a longo prazo. As análises a curto prazo foram realizadas 7 a 21 dias após a cirurgia e as análises a longo prazo foram efetuadas 70 a 121 dias após o procedimento cirúrgico.

A curto e a longo prazo foram estudados 3 grupos experimentais: a) grupo C - constituído por animais controles submetidos a cirurgia simulada. Para as avaliações a curto prazo foram utilizados 8 ratos que constituíram o subgrupo CC. As avaliações a longo prazo foram efetuadas em um subgrupo CL formado por 11 ratos; b) grupo A 7 - formado por animais submetidos

Trabalho realizado durante a vigência de contratos de auxílio à pesquisa com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: processo 78/1392) e com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: processo 2222.1608/78).

dos à constrição aórtica com auxílio de agulha hipodérmica de calibre 7. As repercussões a curto prazo foram estudadas em um subgrupo A7C, constituído por 13 animais e os efeitos a longo prazo foram avaliados em um subgrupo AM formado por 8 ratos e c) grupo A 8 - composto por animais submetidos à bandagem aórtica com auxílio de agulha hipodérmica de calibre R. Trinta e sete ratos formaram o subgrupo A8C para a avaliação das repercussões a curto prazo e 14 ratos foram estudados no subgrupo A8L para avaliação dos efeitos da constrição aórtica a longo prazo.

Manometria - Para avaliação da pressão arterial os animais eram novamente anestesiados com éter, a artéria carótida direita dissecada e por ela introduzido um cateter de polietileno PE-50 conectado diretamente a transdutor de pressão Statham P23Db. O nível médio do tórax foi tomado como ponto de referência zero. As pressões sistólica (PSA) e diastólica (PDA) da aorta foram registradas em polígrafo DR-8 da Electronics for Medicine.

Atributos indicadores da hipertrofia cardíaca - Para se avaliar a hipertrofia cardíaca foram analisados atributos relacionados com a massa miocárdica e com o tamanho das fibras musculares cardíacas.

Após a manometria, os corações dos animais eram retirados, os vasos da base cortados rente à sua origem e o pericárdio e os átrios extirpados. A musculatura ventricular foi dividida em parede livre do ventrículo direito e massa muscular do ventrículo esquerdo, que incluía o septo interventricular. O peso das massas musculares do ventrículo direito e ventrículo esquerdo foi avaliado e normalizado para o peso corporal dos animais. Esse procedimento possibilitou a determinação das seguintes relações expressas em mg/kg: peso do ventrículo esquerdo mais septo interventricular/peso do rato (VE/R) e peso do ventrículo direito/peso do rato (VD/R).

O tamanho das fibras cardíacas foi estudado determinando-se os diâmetros celulares (DC). A musculatura do ventrículo esquerdo era fixada em solução de formol 10% e fragmento do terço médio da sua parede livre era incluído em parafina. Os cortes histológicos eram realizados perpendicularmente ao plano muscular, de forma a possibilitar posteriormente a análise de seções transversas das fibras cardíacas. A coloração pelo PAS foi utilizada para permitir a visualização nítida dos contornos das fibras musculares.

A fibra miocárdica foi considerada cilíndrica¹³ e o DC determinado, usando-se sistema de projeção óptica formado

por câmara clara acoplada a microscópio óptico Carl Zeiss. Os cortes histológicos ampliados 400 X eram projetados a uma distância constante, de forma que 3,3 micra (μ) do corte histológico correspondessem a 1 mm da imagem projetada. Em cada coração, 15 contornos de fibras musculares eram copiados, os diâmetros menores medidos e o DC calculado pela média aritmética dos valores obtidos.

Complementando o exame histopatológico, fragmentos da musculatura ventricular esquerda, do pulmão e do fígado eram analisados rotineiramente em microscópio óptico após u. são em parafina e coloração com hematoxilinaeosina.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o teste "t" de Student para amostras independentes, considerando-se 5% o nível de significância.

RESULTADOS

A mortalidade acarretada pelo método foi avaliada nos ratos cujos atributos foram estudados a curto prazo (subgrupos CC, A7C e A8C) e encontra-se relacionada na tabela I. Todas as mortes ocorreram durante a primeira semana após o procedimento cirúrgico; a maioria nas primeiras 24 h. Ao exame necroscópico foram encontrados sinais de congestão, edema e hemorragias pulmonares. Congestão venosa hepática, derrame pleural e ascite foram observados em algumas ocasiões.

Os resultados da manometria e dos atributos indicadores de hipertrofia cardíaca obtidos nos grupos estudados a curto e a longo prazo encontram-se relacionados na tabela II. Os atributos dos animais do subgrupo A7C não foram analisados por ter sobrevivido apenas um animal. Os valores observados no subgrupo A8C foram confrontados com os obtido no subgrupo CC e são apresentados na figura 1. A análise estatística evidenciou que os valores dos atributos estudados foram significante maiores que os observados no subgrupo controle.

TABELA I – Mortalidade acarretada pelo método de constrição aórtica, avaliada em 58 ratos estudados 7 a 21 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupos	(n)	Mortalidade (%)
CC	8	0%
A7C	13	92%
A8C	37	54%

CC: grupo controle. A7C: ratos cujas aortas foram constringidas ao diâmetro da agulha calibre 7. A8C: animais submetidos à constrição aórtica com auxílio da agulha calibre 8.

TABELA II – Médias \pm erros-padrão das médias dos atributos estudados nos animais avaliados a curto e a longo prazo.

Grupo	N	Pesos (g)	PSA (mmHg)	PDA (mmHg)	VE/R (mg/kg)	VD/R (mg/kg)	DC (micra)
CC	8	204 \pm 3,2	112 \pm 3,5	69 \pm 2,6	2,40 \pm 0,05	0,78 \pm 0,02	17,8 \pm 1,25
A8C	13	203 \pm 8,5	137 \pm 6,1	89 \pm 8,5	3,11 \pm 0,14	0,90 \pm 0,04	21,1 \pm 0,56
CL	11	381 \pm 13,3	116 \pm 3,0	74 \pm 4,2	2,16 \pm 0,06	0,70 \pm 0,04	25,6 \pm 1,08
A7L	8	391 \pm 14,1	166 \pm 11,3	99 \pm 8,1	3,60 \pm 0,21	0,96 \pm 0,08	33,5 \pm 1,50
A8L	14	382 \pm 6,9	148 \pm 7,2	93 \pm 6,7	2,93 \pm 0,18	0,84 \pm 0,05	29,0 \pm 1,26

CC e CL: grupos controle avaliados respectivamente 7 a 21 e 70 a 121 dias após cirurgia simulada. A8C e A8L: animais submetidos à constrição aórtica com auxílio da agulha calibre 8 e estudados respectivamente 7 a 21 e 70 a 121 dias após o procedimento cirúrgico. A7L: ratos cujas aortas foram constringidas ao diâmetro da agulha calibre 7 e estudados 70 a 121 dias após a cirurgia. PSA: pressão sistólica da aorta. PDA: pressão diastólica da aorta. VE/R: peso do ventrículo esquerdo + septo interventricular/peso do rato. VD/R: peso do ventrículo direito/peso do rato. DC: diâmetro celular.

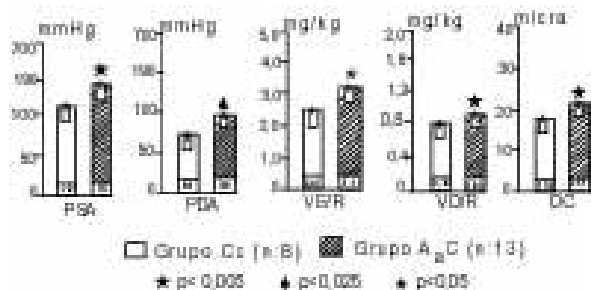


Fig. 1 - Médias ± erros-padrão das médias dos atributos estudados nos animais avaliados a curto prazo. CC: grupo controle. A8C: ratos submetidos à constrição aórtica com auxílio da agulha calibre 8. PSA: pressão sistólica da aorta. PDA: pressão diastólica da aorta. VE/R: peso do ventrículo esquerdo + septo interventricular/peso do rato. VD/R: peso do ventrículo direito/peso do rato. DC: diâmetro celular.

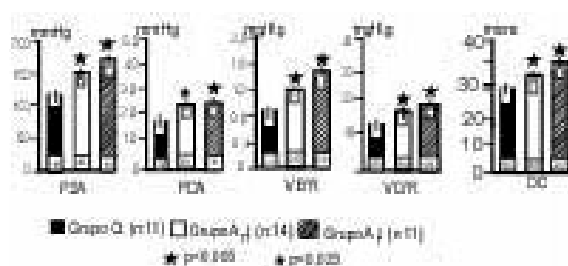


Fig. 2 - Médias ± erros-padrão das médias dos atributos estudados nos animais avaliados a longo prazo. CL: grupo controle. A8C: ratos submetidos à constrição aórtica com auxílio da agulha calibre 8. A7L: animais cujas aortas foram constrições ao diâmetro da agulha calibre 7. PSA: pressão sistólica da aorta. PDA: pressão diastólica da aorta. VE/R: peso do ventrículo esquerdo/peso do rato. VD/R: peso do ventrículo direito/peso do rato. DC: diâmetro celular.

Os valores das médias ± erro-padrão dos atributos avaliados nos animais dos subgrupos CL, A7L e A8L são mostrados na figura 2. A análise estatística evidenciou que os valores observados nos ratos dos subgrupos A7L e A8L são significativamente maiores que os encontrados nos animais do subgrupo CL. Acrescente-se que a análise estatística relativa aos níveis pressóricos e os dados dos atributos indicadores de hipertrofia cardíaca dos animais dos subgrupos A7L e A8L evidenciaram que os valores observados no subgrupo A7L são significativamente maiores ($p < 0,001$). Por outro lado, a idade do animal interfere nos valores do DC e da relação VE/R. Assim, a análise estatística mostrou haver diferença significativa entre os dados obtidos nos subgrupos CC e CL. Em função da interferência da idade, os dados verificados nos subgrupos A8C e A8L não foram comparados.

O exame dos cortes histológicos obtidos da parede livre do ventrículo esquerdo não evidenciou alterações morfológicas que permitissem diferenciar com segurança as fibras miocárdicas normais das hipertrofiadas. No exame histopatológico dos pulmões e do fígado dos animais que sobreviveram e tiveram seus atributos avaliados, não foram encontradas evidências morfológicas indicativas de insuficiência cardíaca.

COMENTÁRIOS

O trabalho visou a padronizar um modelo experimental de hipertensão arterial capaz de produzir hipertrofia cardíaca, procurando-se estabelecer para dois graus distintos de

constrição aórtica a mortalidade acarretada pelo método e sua eficiência na produção de hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca.

As mortalidades de 92% no subgrupo A7C e de 54% no subgrupo A8C contrastam com as porcentagens de 19% e 27% relatadas por outros autores^{7,14}. Essa discrepância indica a possibilidade de se conseguir maior sobrevivência dos animais submetidos à constrição aórtica e os fatores apontados na literatura como passíveis de modificar os índices de mortalidade são raça e peso dos animais e a severidade da constrição aórtica.

A eficácia do método em produzir hipertensão arterial é demonstrada pelos níveis pressóricos significativamente maiores nos animais submetidos bandagem aórtica. Os níveis pressóricos obtidos foram significativamente maiores nos animais do subgrupo A7L e esses dados estão de acordo com o trabalho de Beznak¹, que obteve pressões progressivamente maiores à medida que se acentuava a severidade do estreitamento da aorta. Em relação à patogenia da hipertensão arterial, pode-se acrescentar que, além do obstáculo mecânico criado pela constrição aórtica^{8,14,15}, há também evidências indicando a participação de substâncias pressoras liberadas pelos rins, pela diminuição do fluxo sanguíneo renal¹⁶.

O grau de hipertrofia cardíaca foi avaliado pela análise dos atributos relacionados com a massa miocárdica (VE/R e VD/R) e com o tamanho das fibras musculares cardíacas (DC). A comparação dos valores de VE/R dos animais do subgrupo A8L com os obtidos nos animais do subgrupo A7L evidenciou maior massa ventricular esquerda nos últimos e esse achado apoia a idéia de que o grau de hipertrofia miocárdica é proporcional à grandeza da obstrução aórtica¹⁵.

Estudos a curto prazo^{7,14} mostram que o valor da relação VE/R se torna estável a partir do sexto dia após a bandagem da aorta abdominal. O grau de hipertrofia cardíaca obtido nos animais dos subgrupos A8C e A8L não foram confrontados em virtude das diferenças significantes encontradas nos valores de VE/R e DC nos animais dos subgrupos CC e CL. Assim, nos estudos a longo prazo sobre hipertrofia cardíaca que envolvam a relação VE/R e o DC temos de considerar não apenas o fator tempo mas também a influência da idade e do peso dos animais sobre esses atributos.

Despertaram interesse as análises realizadas com os dados relativos à relação VD/R. Foi verificado que os animais de todos os grupos a apresentaram maior quando comparados aos respectivos controles. Considerando que não houve diferença entre os pesos corporais dos diversos grupos, asseguramo-nos de que o aumento da relação VD/R ocorreu pela maior massa muscular do ventrículo direito. Duas possibilidades de interpretação permitem justificar esse achado. Gluck e col.⁵ e Malik e col.¹⁴ consideram o aumento da massa ventricular direita, em casos de constrição aórtica, como decorrente da hipertensão pulmonar conseqüente à elevação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Por outro lado, Zellis e col.^{17,18}, estudando corações de cães, verificaram aumento

síntese protéica e de RNA na massa muscular do ventrículo esquerdo de cães submetidos à bandagem da artéria pulmonar. Esses achados sugerem que o aumento da síntese protéica que ocorre durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca se faz de modo global no coração e o ventrículo contralateral é submetido a modificações semelhantes às aquelas observadas na câmara sobrecarregada. A existência desses mecanismos permite compreender a maior massa do ventrículo direito nos ratos submetidos à constrição aórtica.

A avaliação das alterações ocorridas no DC das fibras miocárdicas foi feita no terço médio da parede livre do ventrículo esquerdo, por ser essa região considerada a mais representativa das alterações que ocorrem no ventrículo esquerdo durante o processo de hipertrofia cardíaca^{1,3,19}. Os valores do DC relacionaram-se com a severidade da constrição e a idade dos animais. Assim, valores significativamente diferentes foram observados quando se confrontaram os resultados obtidos nos subgrupos A7L e A8L e CC e CL.

SUMMARY

The purpose of this study was to characterize an experimental model of arterial hypertension capable of developing secondary cardiac hypertrophy. Aortic constriction of 0.7 or 0.8 millimeters of diameter was made in young anaesthetized Wistar rats. The effect of the aortic constriction was evaluated within 7 to 21 and 70 to 121 days after the experimental procedure. The following parameters were analyzed: aortic systolic and diastolic pressures, the left ventricle, weight/body weight ratio, the right ventricle weight/body weight ratio, the myocardial cell diameter and the histopathology of the heart, lungs and liver.

The results showed that the aortic constriction of 0.8 millimeters was better than the constriction of 0.7 millimeters since the former was efficient in causing arterial hypertension and consequent secondary cardiac hypertrophy, leading to a lower mortality in comparison to a 0.7 millimeter-aortic constriction.

REFERÊNCIAS

1. Anversa, P.; Loud, A. V.; Giacomelli, F.; Wiener, J. - Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experi-

mental hypertension II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. *Lab. Invest.* 38, 597, 1978

2. Loud, A. V.; Anversa, P.; Giacomelli, F.; Wiener, J. - Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension I. Determination of myocyte size. *Lab. Invest.* 38: 586, 1978

3. Wiener, J.; Giacomelli, F.; Loud, A. V.; Anversa, P. - Morphometric of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension. *Am. J. Cardiol.* 44: 919, 1979.

4. Famburg, B. L.; Posner, B. I. - Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats I. Characterization and kinetics of labelling. *Circ. Res.* 23: 123, 1968.

5. Gluck, L.; Talner, N. S.; Stein, H.; Gardner, T. H.; Kulovich, M. V. - Experimental cardiac hypertrophy: concentrations of RNA in the ventricles. *Science*, 144: 1244, 1964.

6. Morkin, E.; Ashford, T. - Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 215: 1409, 1968.

7. Nair, K. G.; Cutilleta, A. F.; Zak, R.; Koide, K.; Rabinowitz, M. - Biochemical correlates of cardiac hypertrophy I. Experimental models, changes in heart weight. RNA content and polymerase activity. *Circ. Res.* 23: 451, 1968.

8. Beznak, M. - Hemodynamic changes following constriction in normal and in hypophysectomised rats. *Can. J. Biochem.* 34: 791, 1956

9. Malik, A. B.; Abe, T.; Ökane, H. O.; Geha, A. S. - Cardiac function, coronary flow and oxygen consumption in stable heart ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 255: 186, 1973

10. Malik, A. B.; Abe, T.; Ökane, H. O.; Geha, A. S. - Cardiac performance in ventricular hypertrophy induced by pressure and volume overloading. *J. Appl. Physiol.* 37: 867, 1974.

11. Beznak, M. - Effect of the pituitary and growth hormone on the blood pressure and on the ability of the heart hypertrophy. *J. Physiol (London)* 116: 74, 1952

12. Krieger, E. M. - Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *Am. J. Physiol.* 218: 486, 1970.

13. Ishikawa, S.; Fattal, G. A.; Popiewiez, J.; Wyatt, J. P. - Funcional morphometric of myocardial fibers in cor pulmonale. *Am. Rev. Resp. Disease.* 105: 358, 1972.

14. Malik, A. B.; Shapiro, J. M.; Yanics, J.; Royales, A.; Geha, A. S. - A simplified method for producing rapid ventricular hypertrophy in rats. *Cardiovasc. Res.* 8: 801, 1974.

15. Beznak, M. - The effect of different degrees of subdiaphragmatic aortic constriction on heart weight and blood pressure of normal and hypophysectomised rats. *Can. J. Biochem.* 33: 985, 1955.

16. Panades, J. N. - Hypertension and hindlimb vascular reactivity in experimental coarctation of the aorta. *Circ. Res.* 12: 3, 1963.

17. Zellis, R.; Wilkman-Coffelt, J.; Kamiyama, T.; Left ventricular RNA and protein synthesis following right ventricular stress. *Circulation*, 46 (suppl. II): 65, 1972.

18. Zellis, R.; Wilkman, Coffelt, J.; Kamiyama, T. - Acute right ventricular stress as a stimulus for left ventricular RNA and protein synthesis. In Dhalla, N. S. - *Recent Advances in Studied on Cardiac Structure Metabolism*. Vol. 3: Myocardial Metabolism. Baltimore University Park Press, 1973. p. 625.

19. Korecky, B.; Rakusank, K. - Normal and hypertrophic growth of the rat heart changes in cell dimension and number. *Am. J. Physiol.* 3: H123, 1978.