

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**A CARDIOMIOPLASTIA PASSIVA NA
FUNÇÃO VENTRICULAR DE RATOS
INFARTADOS E NA FORMAÇÃO DE FLUXO
COLATERAL EXTRAMIOCÁRDICO
INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE VEGF₁₆₅**

Kátia De Angelis Lobo d'Avila

**Orientação: Dra. Maria Cláudia da Costa Irigoyen
Dra. Idágene Aparecida Cestari**

Tese submetida ao Curso de Pós-
Graduação em Ciência Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas: Fisiologia

Porto Alegre
2001

*“As dificuldades fizeram-se
para serem vencidas”*

Barão de Mauá

*Ao Prof. Dr. Antonio Andréa
Belló (in memorium) pelas lições
de ciência e de vida*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen* pelas lições de ciência e de vida, pelo constante apoio e incentivo durante meu Bacharelado, Mestrado e Doutorado, fatores fundamentais para a minha formação profissional.

À minha orientadora, *Profa. Dra. Idágene Aparecida Cestari* pelos ensinamentos, apoio e incentivo durante a realização do meu Mestrado e Doutorado.

À técnica *Tânia Regina Gatelli Fernandes* do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS e aos técnicos *Edson Dias Moreira, Vera Lúcia Longo de Oliveira e Fumio Ida* do Laboratório de Hipertensão Experimental e *Maria de Lourdes Junqueira e Glória Mota e Joelcimar da Silva* do Laboratório de Cardiologia Molecular do InCor-HCFMUSP pela colaboração e amizade.

Aos engenheiros *Dr. Mauro Ushizima e Marcelo Mazzeto* da Divisão de Bioengenharia do InCor-HCFMUSP pelo apoio na execução destes experimentos.

A projetista *Gina Yamamoto* da Divisão de Bioengenharia do InCor-HCFMUSP pelo constante acessoria na elaboração de apresentações deste trabalho

Ao *Prof. Dr. Xavier Neto* do Laboratório de Cardiologia Molecular do InCor-HCFMUSP pelo intercâmbio e apoio na realização dos experimentos de imunohistoquímica.

A *Profa. Dra. Fernanda Consolim-Colombo* da Unidade de Hipertensão do InCor-HCFMUSP pelos conhecimentos e críticas na elaboração da redação desta tese.

Aos funcionários *Cira Delduque Peixoto, Leonilda Oliveira, Dimas Jesuino da Silva* da Divisão de Bioengenharia do InCor-HCFMUSP pelo apoio técnico e pela amizade.

A minha colega e amiga *Profa. Dra. Vera Farah* pelo constante incentivo e apoio.

Aos colegas e amigos de laboratório *Alexandre Ceroni, Álvaro Oliveira, Ângela Harthmann, Celso Maeda, Eneida Rabelo, Fabiana Evangelista, Fernanda Zamo, Gina Yamamoto, Gustavo Silva, Jaciara Lacerda, Katya Rigatto, Lígia Arruda, Mara Pires, Marcelo Rubira, Mauro Ushizima, Natale Rolin, Patrícia Fiorino, Pedro Dall'Ago, Pedro Paulo Soares, Rogério Wichi, Ruth Leite, Silvia Lacchini, Tânia Ogawa, Valbia Gama e Vera Farah* pela amizade e incentivo durante este período de doutoramento.

Aos *professores do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia* pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao *Prof. Dr. Antonio Andréa Belló*, fundador de nosso laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pelos ensinamentos de fisiologia, de didática, de ética e de vida.

Ao *Prof. Dr. Adolfo Leirner* e ao *Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger*, diretores da Divisão de Bioengenharia e Unidade de Hipertensão do InCor-HCFMUSP, pela possibilidade de execução deste trabalho.

A *Genentch Inc.*, pela doação do VEGF utilizado nos presentes experimentos à Divisão de Bioengenharia do InCor-HCFMUSP.

A *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* e as agências financiadoras *CNPq, FAPERGS e FAPESP* pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Aos *meus pais, irmãos e familiares, meus amores*, por tudo.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABELAS..... | XVII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XX |
| RESUMO..... | XXII |
| ABSTRACT..... | XXVI |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 02 |
| 1.1 A cardiomioplastia..... | 03 |
| 1.2 A cardiomioplastia na isquemia miocárdica..... | 08 |
| 1.3 Remodelamento ventricular pós-isquemia miocárdica..... | 10 |
| 1.4 Alterações celulares e genéticas no remodelamento ventricular | 12 |
| 1.5 Revascularização do coração como alternativa no tratamento da isquemia miocárdica..... | 14 |
| 1.6 Angiogênese terapêutica..... | 16 |
| 1.7 O VEGF..... | 20 |
| 1.8 Hipótese..... | 22 |
| 1.9 Objetivos..... | 23 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 2.1 Animais..... | 25 |
| 2.2 Grupos e seqüência experimental..... | 25 |
| 2.3 Infarto do miocárdio..... | 27 |
| 2.4 Administração do VEGF..... | 29 |
| 2.4.1 Considerações anatômicas..... | 29 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.2 | Padronização da infusão de VEGF..... | 31 |
| 2.4.3 | Protocolo de infusão do VEGF..... | 31 |
| 2.5 | Cardiomioplastia..... | 31 |
| 2.6 | Avaliações hemodinâmicas..... | 34 |
| 2.6.1 | Procedimentos cirúrgicos..... | 37 |
| 2.6.2 | Registro de pressão arterial e de pressão ventricular esquerda..... | 37 |
| 2.6.3 | Método das microesferas coloridas..... | 38 |
| 2.6.3.1 | Microesferas..... | 38 |
| 2.6.3.2 | Infusão das microesferas azuis no ventrículo esquerdo..... | 39 |
| 2.6.3.3 | Infusão das microesferas amarelas no grande dorsal esquerdo.... | 40 |
| 2.6.3.4 | Digestão e processamento dos tecidos..... | 41 |
| 2.6.3.5 | Extração do corante e medição de absorbância..... | 43 |
| 2.6.3.6 | Determinação do número de microesferas e do fluxo sangüíneo. | 43 |
| 2.6.4 | Determinação do débito cardíaco..... | 45 |
| 2.6.5 | Determinação do índice cardíaco..... | 46 |
| 2.6.6 | Determinação do fluxo colateral..... | 46 |
| 2.6.7 | Reprodutibilidade do método..... | 48 |
| 2.6.8 | Determinação da resistência vascular regional..... | 49 |
| 2.6.9 | Determinação do volume sistólico..... | 49 |
| 2.6.10 | Determinação da resistência vascular sistêmica..... | 49 |
| 2.7 | Análise dos sinais..... | 49 |
| 2.7.1 | Pressão arterial e freqüência cardíaca..... | 49 |
| 2.7.2 | Derivada de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo..... | 50 |
| 2.7.3 | Pressão ventricular..... | 50 |
| 2.8 | Avaliações morfométricas..... | 50 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.8.1 | Determinação do peso corporal..... | 50 |
| 2.8.2 | Determinação do peso ventricular..... | 51 |
| 2.8.3 | Determinação da razão do peso ventricular/peso corporal..... | 51 |
| 2.9 | Avaliações histológicas..... | 51 |
| 2.9.1 | Avaliação da adesão pós-cardiomioplastia..... | 51 |
| 2.9.2 | Determinação do tamanho do infarto do miocárdio..... | 52 |
| 2.9.3 | Imunohistoquímica..... | 53 |
| 2.10 | Análise estatística..... | 53 |
| 2.10.1 | Teste T de Student..... | 54 |
| 2.10.2 | Análise de variância de uma via (ANOVA one way)..... | 54 |
| 2.10.3 | Análise de variância de duas vias (ANOVA two way)..... | 54 |
| 2.10.4 | Correlação e regressão linear..... | 54 |
| 3. | RESULTADOS..... | 56 |
| 3.1 | Alterações temporais do infarto do miocárdio..... | 56 |
| 3.1.1 | Avaliações hemodinâmicas sistêmicas..... | 56 |
| 3.1.2 | Avaliações hemodinâmicas regionais..... | 60 |
| 3.1.3 | Avaliações morfométricas..... | 62 |
| 3.1.4 | Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio..... | 63 |
| 3.2 | Efeitos da cirurgia fictícia: comparação entre os grupos C-56 e S- IMCDM..... | 66 |
| 3.2.1 | Avaliações hemodinâmicas sistêmicas..... | 66 |
| 3.2.2 | Avaliações fluxos regionais..... | 67 |
| 3.2.3 | Avaliações morfométricas..... | 68 |
| 3.3 | Efeitos da cirurgia fictícia: comparação entre os grupos IM-56 e IM- SCDM..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas..... | 69 |
| 3.3.2 Avaliações dos fluxos regionais..... | 70 |
| 3.3.3 Avaliações morfométricas..... | 71 |
| 3.3.4 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio..... | 71 |
| 3.4 Efeitos da cardiomioplastia: comparação entre os grupos C-56, C- CDM, IM-56 e IM-CDM..... | 72 |
| 3.4.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas..... | 72 |
| 3.4.2 Avaliações hemodinâmicas regionais..... | 76 |
| 3.4.3 Avaliações morfométricas..... | 79 |
| 3.4.4 Avaliação da adesão pós-cardiomioplastia..... | 81 |
| 3.4.5 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio..... | 81 |
| 3.5 Efeitos do VEGF: comparação entre os grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 83 |
| 3.5.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas..... | 83 |
| 3.5.2 Avaliações hemodinâmicas regionais..... | 86 |
| 3.5.3 Avaliações de fluxo sanguíneo colateral..... | 89 |
| 3.5.4 Avaliação da adesão pós-cardiomioplastia..... | 93 |
| 3.5.5 Avaliações morfométricas..... | 103 |
| 3.5.6 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio..... | 105 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 108 |
| 4.1 Considerações metodológicas..... | 109 |
| 4.1.1 Os modelos experimentais utilizados..... | 109 |
| 4.1.2 A utilização do VEGF ₁₆₅ | 110 |
| 4.1.3 O método das microesferas coloridas..... | 111 |
| 4.1.4 A determinação do tamanho do infarto do miocárdio..... | 113 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 Alterações temporais do infarto do miocárdio..... | 113 |
| 4.2.1 Alterações hemodinâmicas..... | 113 |
| 4.2.2 Alterações morfométricas e do tamanho do infarto do miocárdio.... | 117 |
| 4.3 Efeitos da cardiomioplastia..... | 119 |
| 4.3.1 Alterações hemodinâmicas..... | 120 |
| 4.3.2 Alterações morfométricas e do tamanho do infarto do miocárdio..... | 123 |
| 4.4 Efeitos do VEGF..... | 128 |
| 4.4.1 Alterações hemodinâmicas..... | 129 |
| 4.4.2 Fluxo colateral..... | 132 |
| 4.4.3 Alterações morfométricas e do tamanho do infarto do miocárdio.... | 139 |
| 5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES..... | 143 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 147 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Ilustração esquemática da cardiomioplastia..... | 04 |
| Figura 2– Diagrama ilustrando o processo dinâmico pelo qual possivelmente a cardiomioplastia estabiliza o remodelamento ventricular..... | 07 |
| Figura 3– Diagrama ilustrando o processo dinâmico que pode contribuir para a insuficiência ventricular esquerda após o infarto agudo do miocárdio..... | 12 |
| Figura 4- Fotografia mostrando a oclusão da artéria coronária esquerda no miocárdio do rato..... | 28 |
| Figura 5- Localização anatômica esquemática do grande dorsal no rato..... | 30 |
| Figura 6- Vascularização do grande dorsal a partir da artéria axilar..... | 30 |
| Figura 7- Esquema do ramo circunflexo subescapular que vasculariza o grande dorsal no rato..... | 31 |
| Figura 8–Fotografia mostrando o início da injeção de azul de Evans na artéria principal do grande dorsal. As linhas tracejadas delimitam as bordas laterais do grande dorsal..... | 33 |
| Figura 9– Fotografia do grande dorsal após dissecação das bordas laterais, com preservação da inserção proximal e eletrodos para estimulação implantados..... | 35 |
| Figura 10- Fotografia mostrando o tórax aberto e tracionado para o início da cardiomioplastia..... | 35 |
| Figura 11- Fotografias mostrando a seqüência de fixação do grande dorsal ao coração na cardiomioplastia..... | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 12– Fotografia mostrando o sistema de registro de pressão arterial no rato..... | 38 |
| Figura 13– Ilustração esquemática do fluxo colateral entre o grande dorsal e o miocárdio..... | 47 |
| Figura 14- Absorbância (AU, 370 nm) de 5000 microesferas brancas nos padrões comerciais e experimentais e nos tecidos digeridos..... | 48 |
| Figura 15– Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-14, IM-14 C-56 e IM-56..... | 58 |
| Figura 16– Débito Cardíaco (ml/min) nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 58 |
| Figura 17– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 59 |
| Figura 18– Fluxo coronariano (ml/min/g) nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 60 |
| Figura 19– Peso ventricular (g) nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 62 |
| Figura 20– Razão peso ventricular/ peso corporal nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 63 |
| Figura 21– Fotografia mostrando cortes histológicos do ventrículo de corações normal e infartado..... | 64 |
| Figura 22– Tamanho do infarto (% do VE) nos grupos IM-14 e IM-56..... | 65 |
| Figura 23- Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-56, IM-56, CCDM e IM-CDM..... | 73 |
| Figura 24– Débito cardíaco (ml/min) nos grupos C-56, IM-56, CCDM e IM-CDM..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 25– Registros da pressão ventricular esquerda em ratos dos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM..... | 75 |
| Figura 26– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 76 |
| Figura 27– Fluxo sanguíneo coronariano (ml/min/g) nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 76 |
| Figura 28– Fluxo sanguíneo renal médio (ml/min/g) nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 77 |
| Figura 29– Resistência vascular coronariana (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 79 |
| Figura 30– Peso ventricular (g) nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 80 |
| Figura 31– Razão peso ventricular/ peso corporal nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 80 |
| Figura 32- Cardiomioplastia após 8 semanas em um rato do grupo IM-CDM. | 82 |
| Figura 33– Seqüência de fotografias mostrando a separação do grande dorsal do coração após 8 semanas de cardiomioplastia em um rato do grupo IM-CDM..... | 82 |
| Figura 34- Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 83 |
| Figura 35– Débito cardíaco (ml/min) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 84 |
| Figura 36– Registro da pressão ventricular esquerda em um rato do grupo IMCDM-VEGF..... | 85 |

| | |
|--|----|
| Figura 37– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 86 |
| Figura 38– Fluxo sanguíneo coronariano (ml/min/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 86 |
| Figura 39– Resistência vascular coronariana (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 88 |
| Figura 40- Percentual de ratos avaliados que desenvolveram fluxo colateral nos grupos C-CDM, IM- CDM e IMCDM-VEGF..... | 90 |
| Figura 41 – Fluxo colateral absoluto (%) no sentido do grande dorsal para o coração (GD→CORACÃO) e do coração para o grande dorsal (CORACÃO→GD) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 91 |
| Figura 42– Fluxo colateral normalizado por grama de tecido (%/g) no sentido do grande dorsal para o coração (GD→CORACÃO) e do coração para o grande dorsal (CORACÃO→GD) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 92 |
| Figura 43- Correlação positiva entre o fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração com o volume sistólico (ml)..... | 93 |
| Figura 44- Correlação positiva entre o fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração com o fluxo coronariano (ml)..... | 93 |
| Figura 45– Fotografia mostrando a cardiomioplastia em um rato do grupo C-CDM após 8 semanas..... | 94 |
| Figura 46– Fotografia mostrando a cardiomioplastia em um rato do grupo IM-CDM após 8 semanas..... | 94 |
| Figura 47- Fotografias mostrando vasos na região de adesão do grande dorsal ao miocárdio em um rato do grupo C-CDM..... | 95 |

| | |
|---|-----|
| Figura 48- Fotografia mostrando vasos na região de adesão do grande dorsal ao miocárdio em um rato do grupo IM-CDM..... | 96 |
| Figura 49- Fotografia mostrando a parede ventricular esquerda infartada de um rato do grupo IM-CDM após a separação do grande dorsal do coração..... | 97 |
| Figura 50- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo C-56..... | 99 |
| Figura 51- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo IM-56..... | 99 |
| Figura 52- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo VEGF-IMCDM..... | 100 |
| Figura 53- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo C-56..... | 101 |
| Figura 54- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo IM-56..... | 101 |
| Figura 55- Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda de um rato do grupo VEGF-IMCDM..... | 102 |
| Figura 56- Peso ventricular (g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 103 |
| Figura 57- Razão peso ventricular/ peso corporal nos grupos C-CDM, IM-CDM, IMCDM-VEGF..... | 104 |
| Figura 58- Correlação positiva entre a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF, mmHg) e o razão peso ventricular/peso corporal (pv/pc, mg/Kg)..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| Figura 59- Tamanho do infarto do miocárdio (% do VE) nos grupos IM-56, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 105 |
| Figura 60- Correlação inversa entre a área infartada (%) e o volume sistólico (ml)..... | 106 |
| Figura 61- Correlação inversa entre a área infartada (%) e o fluxo colateral extramiocárdico entre o grande dorsal e o coração..... | 106 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Estudos clínicos com a cardiomioplastia..... | 05 |
| Tabela 2– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-14, IM-14, C-56, IM-56..... | 57 |
| Tabela 3– Avaliações das pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 59 |
| Tabela 4– Fluxos sanguíneos (ml/min/g) coronariano e renal nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 60 |
| Tabela 5 – Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 61 |
| Tabela 6– Resistências vasculares no coração e nos rins nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56..... | 61 |
| Tabela 7– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-56 e S- IMCDM..... | 66 |
| Tabela 8– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-56 e S-IMCDM..... | 67 |
| Tabela 9– Fluxos sanguíneos (ml/min/g) coronariano e renais nos grupos C-56 e S-IMCDM..... | 67 |
| Tabela 10– Avaliações morfométricas nos grupos C-56 e S-IMCDM..... | 68 |
| Tabela 11– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos IM-56 e IM-SCDM..... | 69 |
| Tabela 12– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos IM-56 e IM-SCDM..... | 70 |

| | |
|---|----|
| Tabela 13– Fluxos sangüíneos (ml/min/g) coronariano e renais nos grupos IM-56 e IM-SCDM..... | 70 |
| Tabela 14– Avaliações morfométricas nos grupos IM-56 e IM-SCDM..... | 71 |
| Tabela 15- Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-56, IM-56, C-CDM, IM-CDM..... | 73 |
| Tabela 16– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM..... | 74 |
| Tabela 17- Fluxos sangüíneos renais (ml/min/g) nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM..... | 77 |
| Tabela 18- Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM..... | 78 |
| Tabela 19– Resistência vascular renal nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM..... | 78 |
| Tabela 20- Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 84 |
| Tabela 21– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 85 |
| Tabela 22- Fluxos sangüíneos renais (ml/min/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 87 |
| Tabela 23– Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-CDM, IM-CDM e IM-CDM-VEGF..... | 87 |
| Tabela 24– Resistência vascular renal nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 88 |
| Tabela 25- Percentual de ratos avaliados que desenvolveram fluxo colateral nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... | 90 |

Tabela 26- Fluxo colateral no sentido do coração para o grande dorsal
(FCO CORAÇÃO→GD) e do grande dorsal para o coração (FCO
GD→CORAÇÃO) em valores absolutos (%) e normalizados (%/g)
nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------|---|
| CDM | cardiomioplastia |
| DC | débito cardíaco |
| + dP/dt | derivada de contração |
| -dP/dt | derivada de relaxamento |
| ECA | enzima conversora de angiotensina |
| GD | grande dorsal |
| FC | freqüência cardíaca |
| FCO _{coração→GD} | fluxo colateral do coração para o grande dorsal |
| FCO _{GD→coração} | fluxo colateral do grande dorsal para o coração |
| FGF | fator de crescimento de fibroblastos |
| IC | índice cardíaco |
| ICC | insuficiência cardíaca congestiva |
| IM | infarto do miocárdio |
| PAD | pressão arterial diastólica |
| PAM | pressão arterial média |
| PAS | pressão arterial sistólica |
| PVE | pressão ventricular esquerda |
| PVS | pressão ventricular sistólica |
| PDF | pressão diastólica final |
| pv/pc | razão peso ventricular/peso corporal |
| Q | débito |
| RVP | resistência vascular periférica |
| SRA | sistema renina angiotensina |

| | |
|------------|---|
| VE | ventrículo esquerdo |
| VEGF | fator de crescimento do endotélio vascular |
| VS | volume sistólico |
| C-14 | grupo controle (14 dias) |
| C-56 | grupo controle (56 dias) |
| C-CDM | grupo controle com cardiomioplastia |
| IM-14 | grupo infartado (14 dias) |
| IM-56 | grupo infartado (56 dias) |
| IM-CDM | grupo infartado com cardiomioplastia |
| IMCDM-VEGF | grupo infartado com cardiomioplastia e VEGF |
| MI-SCDM | grupo infartado sham de cardiomioplastia |
| S-IMCDM | grupo sham de infartado e de cardiomioplastia |

RESUMO

A cardiomioplastia (CDM) tem sido proposta com uma alternativa de tratamento cirúrgico para pacientes em estado avançado de cardiomiopatia dilatada e isquêmica. Os resultados clínicos e experimentais demonstram que este procedimento atenua o processo de remodelamento ventricular, através da compressão dinâmica ou passiva do miocárdio pelo grande dorsal (GD). Além disso, estudos observaram formação de vasos colaterais do GD para o coração após a CDM. O infarto do miocárdio (IM) induz disfunção e remodelamento ventricular e tem sido muito utilizado na literatura como modelo experimental de isquemia miocárdica. A aplicação de fatores angiogênicos diretamente no miocárdio isquêmico tem mostrado resultados positivos na estimulação da formação de colaterais. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da CDM associada ao tratamento com VEGF₁₆₅ na função ventricular e no desenvolvimento de fluxo colateral extramiocárdico em ratos infartados.

Foram utilizados ratos machos Wistar (n=57, 220-250g) divididos em grupos infartados e controles. As alterações temporais induzidas pelo IM (ligadura da artéria coronária esquerda) foram avaliadas aos 14 (IM-14) e aos 56 (IM-56) dias pós IM sendo comparadas com seus respectivos controles (C-14 e C-56). Animais controles (C-CDM) e infartados (IM-CDM) foram submetidos à CDM passiva (sem estimulação do GD) após 14 dias de IM e avaliados aos 56 dias. Ratos controles foram submetidos à cirurgia fictícia de IM e de CDM (S-IMCDM) e ratos infartados à cirurgia fictícia de CDM (IM-SCDM) a fim de verificar eventuais alterações induzidas pelos procedimentos cirúrgicos. Um grupo de ratos infartados recebeu a administração de uma dose de 25µg de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD imediatamente antes da CDM (14 dias de IM) e foi avaliados aos 56 dias (IMCDM-VEGF). Ao final do protocolo os animais foram

anestesiados (pentobarbital sódico, 40mg/Kg) e a artéria carótida direita foi canulada para registro da PA. Logo após, esta cânula foi inserida no ventrículo esquerdo (VE) para registro da pressão ventricular. O registro e processamento dos sinais de pressão foram realizados utilizando-se um sistema de aquisição de sinais (CODAS, 1 Khz). O débito cardíaco (DC) e os fluxos regionais (coração e rins) foram avaliados através da infusão de 300 000 microesferas azuis no ventrículo esquerdo. Após a infusão de 50 000 microesferas amarelas na artéria principal do GD o fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração ($FCO_{GD \rightarrow \text{coração}}$) foi quantificado através da divisão do número de microesferas amarelas no coração pelo número de microesferas amarelas no GD. Após a oclusão da artéria do GD foram infundidas 300 000 microesferas azuis no VE e o fluxo colateral extramiocárdico do coração para o GD ($FCO_{\text{coração} \rightarrow GD}$) foi avaliado pela divisão do número de microesferas azuis no GD pelo número de microesferas azuis no coração.

O IM induziu hipotensão e aumento da pressão diastólica final (PDF) nos grupos IM-14 (84 ± 6 e $6,88 \pm 2,6$ mmHg) e IM-56 (98 ± 3 e $15,4 \pm 2$ mmHg) em relação aos seus respectivos controles (C-14: 102 ± 4 e $-3,2 \pm 0,5$; C-56: 114 ± 3 e $0,5 \pm 1,7$ mmHg). O débito cardíaco (DC) foi menor no grupo IM-56 ($49,5 \pm 9$ ml/min) em relação ao grupo IM-14 (72 ± 9 ml/min). A máxima velocidade de relaxamento do VE ($-dP/dt$) estava reduzida nos grupos IM-14 (-2416 ± 415 vs -4141 ± 309 mmHg/seg nos C-14) e IM-56 (-3062 ± 254 vs -4191 ± 354 mmHg/seg nos C-56) e a de contração do VE ($+dP/dt$) somente no grupo IM-56 (4191 ± 354 vs 5420 ± 355 mmHg/seg nos C-56). O IM não alterou o fluxo e a resistência vascular coronariana, no entanto, o fluxo renal estava reduzido e a resistência renal aumentada no grupo IM-56 quando comparados ao grupo C-56. Os animais com 56 dias de IM apresentaram aumento de massa ventricular (pv) e da razão peso ventricular/peso corporal (pv/pc) em relação aos controles ($1,3 \pm 0,04$ vs $0,98 \pm 0,04$

g e $3,37 \pm 0,08$ vs $2,54 \pm 0,09$ mg/g nos C-56). O tamanho do infarto foi menor no grupo IM-14 (35 ± 3 % do VE) em relação ao grupo IM-56 (44 ± 2 % do VE). Os grupos sham não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados em relação aos seus controles.

Os ratos infartados submetidos à CDM não apresentaram hipotensão (105 ± 2 mmHg), nem aumento da PDF ($4,8 \pm 1,7$ mmHg) conforme observado no grupo IM-56. O FC, o DC, a RVP e os fluxos e a resistência vascular coronariana foram semelhantes entre os grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM. A $+dP/dt$ e a $-dP/dt$ mostraram-se reduzidas nos grupos C-CDM e IM-CDM em relação ao grupo C-56. O fluxo e a resistência vascular renal estavam normalizadas nos ratos IM-CDM. O pv ($1,11 \pm 0,04$ g) e a razão pv/pc ($2,94 \pm 0,09$ mg/g) apresentaram-se similares aos valores do grupo C-56 e o tamanho do IM foi semelhante entre os grupo IM-56 e IM-CDM (44 ± 2 vs 45 ± 3 % do VE).

O grupo IMCDM-VEGF apresentou normalização dos parâmetros hemodinâmicos e morfométricos de forma semelhante aos do grupo IM-CDM quando comparados ao grupo IM-56. A resistência coronariana mostrou-se reduzida nos animais IMCDM-VEGF ($22,07 \pm 2,01$ mmHg/ml/min/g) quando comparada ao grupo C-CDM ($37,81 \pm 4$ mmHg/ml/min/g), apesar do fluxo coronariano ter sido similar entre os grupos submetidos à CDM. O $FCO_{\text{coração} \rightarrow \text{GD}}$ ocorreu predominantemente nos animais dos grupo C-CDM e IMCDM-VEGF (70% e 83,3% vs 28,6% no IM-CDM) enquanto que o $FCO_{\text{GD} \rightarrow \text{coração}}$ foi observado em todos os animais dos grupos IM-CDM e IMCDM-VEGF (20% no C-CDM). A administração de $VEGF_{165}$ aumentou o $FCO_{\text{GD} \rightarrow \text{coração}}$ em valores absolutos e normalizados por grama ($24,85 \pm 10,3\%$ e $62,29 \pm 23,27\%/g$) em relação aos grupos C-CDM ($0,88 \pm 0,89\%$ e $1,42 \pm 1,42\%/g$) e IM-CDM ($4,43 \pm 1,45$ % e $7,66 \pm 2,34$ %/g). O $FCO_{\text{GD} \rightarrow \text{coração}}$ normalizado foi maior nos animais IM-CDM em relação aos C-CDM. O grupo IMCDM-VEGF ($4,47 \pm 1,46$ %/g)

apresentou maior FCO coração→GD normalizado em comparação ao grupo MI-CDM ($2,43 \pm 1,44$ %/g). O tamanho do infarto foi menor nos animais do grupo IMCDM-VEGF (36 ± 3 % do VE) em relação aos grupos IM-56 e IM-CDM.

Correlações positivas foram obtidas entre o FCO_{GD→coração} e o volume sistólico e ($r=0,7$) e o fluxo coronariano ($r=0,7$), e entre a PDF e a razão pv/pc ($r=0,8$) e o tamanho do IM ($r=0,6$). Além disso, correlações inversas foram observadas entre o tamanho do infarto e o volume sistólico ($r=0,8$) e o FCO_{GD→coração} ($r=0,7$).

Estes resultados permitem concluir que a CDM passiva preveniu a disfunção e o remodelamento do VE em ratos infartados. A aplicação de VEGF₁₆₅ induziu diminuição do tamanho do IM que pode estar associado ao aumento do fluxo colateral extramiocárdico do GD→coração observado neste grupo tratado com VEGF. Estes achados sugerem que o uso de fatores angiogênicos, como o VEGF₁₆₅, pode induzir melhora da perfusão das regiões isquêmicas do coração infartado, limitando a perda tecidual. Este efeito associado ao da compressão passiva do VE infartado pelo GD pós CDM, pode prevenir as disfunções decorrentes de isquemias miocárdicas.

ABSTRACT

Cardiomyoplasty (CDM) has been proposed as an alternative surgical treatment for patients with severe dilated and ischemic cardiomyopathies. Clinical and experimental results have shown that this procedure attenuates the ventricular remodeling process by the dynamic or passive latissimus dorsi (LD) compression to the myocardium. Furthermore, studies observed collateral vessels formation from LD to the heart after CDM, although the muscle ischemia have been shown as a one of the principal causes of LD degeneration. Myocardial infarction (MI) induces left ventricular dysfunction and remodeling, and has been largely used like an experimental model of myocardial ischemia in the literature. The directly angiogenic factor application in the ischemic heart has shown positive results in collateral vessels formation. The aim of the present study was to assess ventricular function and extramiocardial collateral flow development in infarcted rats the effects submitted to CDM associated with VEGF₁₆₅ treatment.

Male Wistar rats (n=57, 220-250g) were divided in control and infarcted groups. The temporal alterations induced by MI (left coronary artery ligation) were evaluated on day 14 (MI-14) and on day 56 (MI-56) after myocardial infarction and were compared with their respective control groups (C-14 and C-56). Control and infarcted animals were submitted to passive CDM (non-stimulated LD) after 14 days of MI and evaluated on day 56. Control rats were submitted to MI and CDM sham procedures (S-MICDM) and infarcted rats to CDM sham procedures (MI-SCDM) to assess eventual alterations induced by surgical procedures. A group of infarcted animals received a single dose (25µg) of VEGF₁₆₅ in the latissimus dorsi main artery immediately before CDM (day 14 after MI) and were evaluated on day 56 (MICDM-VEGF). At the end of the protocol the animals were anesthasied (sodic pentobarbital, 40 mg/Kg) and the right carotid

artery was cannulated to record arterial pressure (AP). After, this cannula was positioned in the left ventricle (LV) to record ventricular pressure. Pressure signals were recorded and processed in a data acquisition system (CODAS, 1 KHz). The cardiac output (CO) and regional blood flows (heart and kidneys) were quantified by the infusion of 300 000 blue microspheres in the LV. During this infusion the main artery of LD was occluded. The extramiocardial collateral flow from LD to the heart ($FCO_{LD \rightarrow heart}$) was quantified by the ratio between of yellow microspheres in the heart and yellow microspheres in the LD. The extramiocardial collateral flow from the heart to the LD ($FCO_{heart \rightarrow LD}$) was measured by the ratio between blue microspheres in the LD and blue microspheres in the heart.

MI induced hypotension and an increase in left ventricle end diastolic pressure (LVEDP) in MI-14 (84 ± 6 and 6.88 ± 2.6 mmHg) and MI-56 groups (98 ± 3 and 15.4 ± 2 mmHg) as compared to their respective control groups (C-14: 102 ± 4 and -3.2 ± 0.5 ; C-56: 114 ± 3 and 0.5 ± 1.7 mmHg). CO was reduced in MI-56 (49.5 ± 9 ml/min) as compared to MI-14 group (72 ± 9 ml/min). Maximum rate of fall of the LV ($-dP/dt$) was lower in MI-14 (-2416 ± 415 vs -4141 ± 309 mmHg/sec in C-14) and MI-56 groups (-3062 ± 254 vs -4191 ± 354 mmHg/sec in C-56) and the maximum rate of rise of the LV ($+dP/dt$) was lower only in MI-56 group (4191 ± 354 vs 5420 ± 355 mmHg/seg in C-56). MI did not change the coronary blood flow and vascular resistance, however renal blood flow was reduced and renal vascular resistance was increased in MI-56 group when compared to C-56 group. The animals with 56 days of MI presented an increase in LV weight (LVW) and in the ratio of LV weight/body weight (LVW/BW) in comparison to the control group (1.3 ± 0.04 vs 0.98 ± 0.04 g and 3.37 ± 0.08 vs 2.54 ± 0.09 mg/g in C-56). The infarction size was smaller in MI-14 (35 ± 3 % LV) than in MI-56 group (44 ± 2 %

LV). The sham groups did not present any changes in the parameters evaluated as compared to the control groups.

The infarcted rats submitted to CDM did not show hypotension (105 ± 2 mmHg), or increase in the LVEDP (4.8 ± 1.7 mmHg), as observed in MI-56 group. Heart rate (HR), CO, total peripheral resistance (TPR), coronary blood flow and vascular resistance were similar between C-56, MI-56, and C-CDM e MI-CDM groups. The $+dP/dt$ and the $-dP/dt$ were decreased in C-CDM and MI-CDM groups when compared to C-56 group. Renal blood flow and resistance were considered normal in MI-CDM rats. LVW (1.11 ± 0.04 g) and LVW/BW (2.94 ± 0.09 mg/g) in CDM groups were similar to those in group C-56. Infarction size was similar between MI-56 and MI-CDM groups (44 ± 2 vs 45 ± 3 % LV).

MICDM-VEGF group restored hemodynamic and morphometric parameters similar to observed in MI-CDM in relation to MI-56 group. Coronary vascular resistance was reduced in MICDM-VEGF animals (22.07 ± 2.01 mmHg/ml/min/g) as compared to C-CDM group (37.81 ± 4 mmHg/ml/min/g), despite the fact that the coronary blood flow was similar between CDM groups. $FCO_{heart \rightarrow LD}$ was observed mainly in C-CDM and MICDM-VEGF rats (70% e 83,3% vs 28,6% in MI-CDM), and $FCO_{LD \rightarrow heart}$ was observed in all animals of MI-CDM and MICDM-VEGF groups (20% in C-CDM). VEGF₁₆₅ administration increased the $FCO_{LD \rightarrow heart}$ as analyzed for both absolute and normalized per gram values ($24.85 \pm 10.3\%$ and $62.29 \pm 23.27\%/g$) in comparison to C-CDM ($0.88 \pm 0.89\%$ and $1.42 \pm 1.42\%/g$) and MI-CDM groups (4.43 ± 1.45 % and 7.66 ± 2.34 %/g). Normalized $FCO_{LD \rightarrow heart}$ was higher in MI-CDM rats as compared to C-CDM rats. The MICDM-VEGF group (4.47 ± 1.46 %/g) presented higher normalized $FCO_{heart \rightarrow LD}$ when compared to MI-CDM (2.43 ± 1.44 %/g). The

infarction size was reduced in MICDM-VEGF (36 ± 3 % LV) in comparison to MI-56 and MI-CDM rats.

Positive correlations were obtained between $FCO_{LD\rightarrow heart}$ and systolic volume ($r=0.7$) and coronary blood flow ($r=0.7$), as well as between LVW/BW and LVEDP ($r=0.8$). Furthermore, inverse correlations were obtained between infarction size and systolic volume ($r=0.8$) and $FCO_{LD\rightarrow heart}$ ($r=0.7$).

In conclusion, passive CDM prevented LV dysfunction and remodeling in infarcted rats. VEGF₁₆₅ administration in the LD main artery induced reduction in myocardial infarction size, which could be associated to an increased in LD→heart extramiocardial collateral flow observed in VEGF group. These results suggest that the usage of angiogenic factors, like VEGF₁₆₅, could improve the perfusion of ischemic regions in infarcted hearts; therefore, diminishing tissue loss. This effect when combined with infarcted LV passive compression by LD after CDM can prevent dysfunctions resulting from myocardial ischemia.

1. INTRODUÇÃO

Em 1931 Jesus utilizou pela primeira vez um enxerto muscular, o músculo peitoral, para reparar um ferimento penetrante no coração de um jovem (Jesus, 1931). Dois anos depois, Leriche & Fontaine (1933) usaram este mesmo músculo para reforçar o miocárdio canino infartado. Em 1935, Beck aplicou o peitoral sobre o coração de um paciente com angina, após ter verificado em cães a formação de vasos sanguíneos colaterais do enxerto para o epicárdio (Beck, 1935). Este procedimento foi repetido em 20 pacientes, sendo utilizado também para casos de miocárdio isquêmico (Beck, 1936). Em 1959 Kantrowitz e McKinnon utilizaram, no cão, o diafragma enrolado no ventrículo para auxiliar mecanicamente o coração, no entanto, a estimulação elétrica do músculo durante a sístole cardíaca, não provocou alteração hemodinâmica (Kantrowitz & Mc Kinnon, 1959).

Estudos posteriores, revelaram melhoras hemodinâmicas com a estimulação muscular na diástole, estando o músculo envolto na aorta distal (Kantrowitz, 1960) e no átrio direito canino (Nakamura & Glenn, 1964). Seguiram-se outros trabalhos demonstrando a viabilidade de aumentar a pressão através da contração de um enxerto esquelético sobre o coração (Kusaba et al., 1973 ; Drinkwater et al., 1980; Mackoviak et al.,1981). Termet e colaboradores em 1966 utilizaram pela primeira vez o músculo grande dorsal para auxiliar o miocárdio do cão. A estimulação muscular foi capaz de gerar aumentar a pressão sistêmica aproximadamente 15 minutos, após o que o músculo apresentava fadiga (Termet et al., 1966).

1.1 A cardiomioplastia

Em 1985 foi realizada a primeira cardiomioplastia (CDM) por A. Carpentier e J. Chachques no Hospital Broussais em Paris. A estimulação do GD teve início (cinco dias após a cirurgia) na razão de uma contração muscular para cada duas sístoles cardíacas, sendo esta aumentada posteriormente para razão 1:1. Observou-se neste paciente, com a estimulação, um aumento na fração de ejeção de 56% para 69% (Carpentier & Chachques, 1985).

A figura 1, ilustra esquematicamente a CDM dinâmica. O grande dorsal esquerdo (GD) é desinserido em suas porções laterais e distal, sendo preservado o pedículo muscular, inserção proximal e o feixe neurovascular principal. Dois eletrodos são implantados, próximos ao pedículo muscular. O GD é mobilizado para o interior da caixa torácica através de uma abertura no espaço intercostal, e após a esternotomia medial, é envolvido no coração. Um terceiro eletrodo é ligado ao átrio direito ou ventrículo para captação dos potenciais cardíacos que são utilizados para sincronizar o estimulador muscular, o qual fornece trens de estímulos com duração compatível com a sístole cardíaca.

Em 1988, Chachques e colaboradores propuseram que os benefícios da CDM dinâmica na insuficiência cardíaca refratária ocorreriam por duas vias: (1) melhora da função sistólica pela contração do GD auxiliando a ejeção cardíaca e (2) limitação da dilatação ventricular progressiva. A tabela 1 ilustra alguns resultados representativos obtidos entre 1995 e 1997 com CDM dinâmica em alguns centros de estudo.

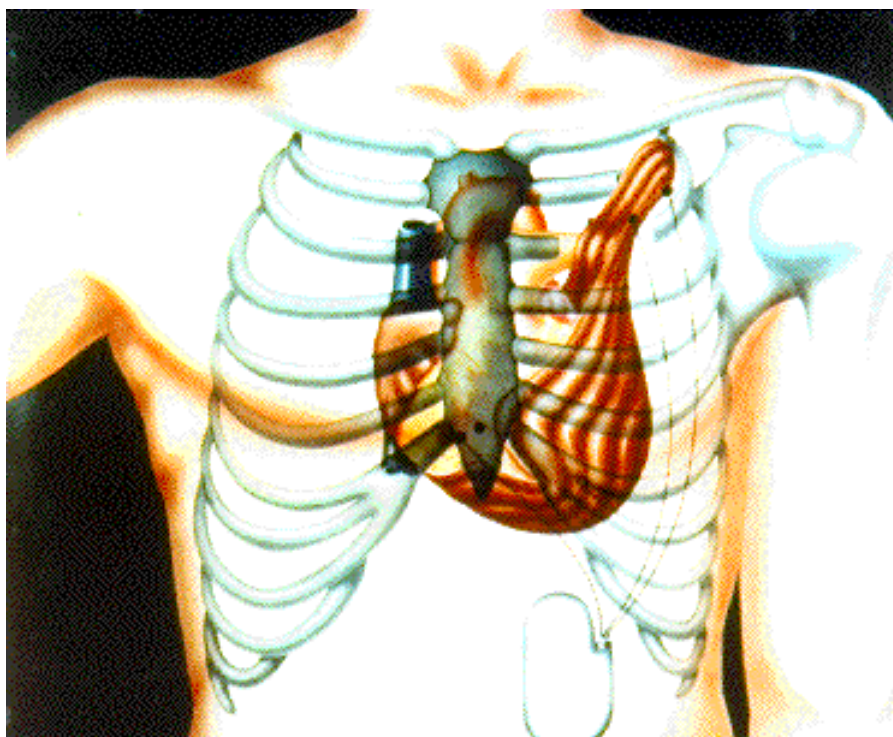


Figura 1 - Ilustração esquemática da cardiomioplastia

Apesar desses resultados favoráveis, estudos realizados no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e em outros centros no mundo revelaram que após 5 anos de estimulação crônica observava-se além do aumento da densidade capilar, degeneração do GD com infiltração de tecido adiposo e perda de contratilidade (Moreira et al., 1993; Kalil et al., 1995). De fato, Moreira e colaboradores (1993) encontraram atrofia e fibrose severas no GD em dois dos sete pacientes que faleceram no primeiro ano após a cirurgia. Kalil e colaboradores (1995) mostraram mudanças degenerativas musculares por ressonância magnética, dados estes confirmados posteriormente por autópsia. Estes achados sugerem que a melhora da função cardíaca pós CDM pode ser limitada por degeneração do GD e conseqüente diminuição da assistência circulatória.

Tabela 1 - Estudos clínicos com a cardiomioplastia

| Autor | No pacientes | Características dos pacientes | Sobrevivência | Resultados clínicos |
|--|-------------------------|---|---|---|
| Lorusso et al. 1997 (Italia) | 22 | LVEF 20±5,8 % LVEDD 75,5±7,4mm NYHA III | 4 anos: 70% | ↑ índice cardíaco - 6 meses ↑ LVEF - 6 meses ↓ LVEDD - 6 meses ↓ hospitalização (CDM direita) ↑ NYHA and QOL |
| Magovern et al. 1996 (EUA) | 16 | LVEF 26,1 ± 5,3 % | 1 ano: 63% 2 anos: 50% | ↑ NYHA |
| Moreira et al. 1996 (Brasil) | 36 | NYHA III: 28 NYHA IV: 8 | 1 ano: 82% 2 anos: 62% 5 anos: 39% | ↑ NYHA ↑ função sistólica e diastólica |
| Tasdemir et al. 1997 (Turquia) | 24 | — | 2 anos: -isquêmicos: 55% -idiopática: 85% | ↑ NYHA em todos ↑ LVEF em todos ↑ índice cardíaco - 6 meses |
| Cohen-Solat et al. 1996 (França) | 16 | NYHA III: 12 LVEF: 18 ± 8% | — | VO ₂ máximo: inalterado ↑ LVEF ↑ NYHA em 14 ↑ QOL |
| Akhmedor el at. 1995 (Russia) | 35 | — | — | ↑ NYHA revascularização do miocárdio pelo GD |
| Domenegati et al. 1995 (Itália) | 10 | NYHA III, IV (aguardando transplante) LVEF: 25 ± 9% | 1 morte na cirurgia 2 mortes súbitas tardias | ↑ NYHA |
| Chacques et | 82 | LVEF: 17 ± 6% | 7 anos: 54% | ↑ LVEF |

| | | | |
|-------------------------|-----------|--------------------------|---|
| al. 1997 (França) | NYHA: 3.2 | 7 anos: NYHA III: 66% | ↑ volume sistólico ↓ hospitalizações |
|-------------------------|-----------|--------------------------|---|

LVEDD= dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo; LVEF= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; NYHA=classe funcional da New York Heart Association; QOL= qualidade de vida; VO₂ máximo= máximo consumo de oxigênio durante o exercício. (modificado de Jessup, 2000)

A busca de novos protocolos de estimulação para melhorar a função hemodinâmica associada à preservação do GD, bem como o estudo dos processos degenerativos pós transposição e pós CDM, levaram a utilização experimental de diferentes modelos animais. Estudos no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo caracterizaram o GD com relação as suas propriedades de contração isométrica e isotônica em cães (Cestari et al., 1995). Kratz e colaboradores (1994) demonstraram que a estimulação crônica por seis semanas em porcos aumentava as proteínas contráteis e a resistência à fadiga, mas provocava atrofia e fibrose principalmente na região distal do GD. Soltero e colaboradores (1996), estudando cães em um protocolo de estimulação aguda, concluíram que baixas frequências de estimulação podem preservar a função do GD e melhorar os resultados clínicos, sem comprometer o benefício hemodinâmico da CDM.

Em nosso laboratório evidenciamos prejuízo da função contrátil do GD em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina durante contrações isométricas (d'Avila et al., 1997). Também neste modelo experimental, realizamos a CDM aguda e observamos diminuição do auxílio mecânico durante estimulação do GD de animais diabéticos (De Angelis et al., 2001b). Tais alterações estavam acompanhadas de diminuição da

atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e da $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ (De Angelis et al., 2001b) além de aumento do estresse oxidativo (De Angelis et al., 2000) e alterações na reatividade vascular do GD (De Angelis et al., 2001a). Além disso, Ianuzzo e colaboradores (1996) estudando a degeneração GD pós CDM demonstraram que a isquemia é o evento inicial na perda de contratilidade deste músculo, sugerindo que a manutenção de uma perfusão adequada do GD poderia preservar o desempenho muscular na CDM.

Apesar de originalmente ser um método de assistência mecânica durante a sístole ventricular, aumentando a fração de ejeção, o volume sistólico e o débito cardíaco, nem todos os trabalhos demonstraram resultados convincentes da importância clínica na função hemodinâmica. No entanto, observaram melhora de classe funcional dos pacientes estudados (Jatene et al., 1991; Schreuder et al., 1995; Kass et al., 1995). A diminuição do estresse da parede do ventrículo esquerdo (VE) tem sido cada vez mais demonstrada como o mecanismo primário de ação da CDM dinâmica (com estimulação do grande dorsal) ou passiva (sem estimulação do grande dorsal). Os trabalhos clínicos e experimentais evidenciam que o enxerto muscular diminui o estresse da parede miocárdica e atenua a dilatação e o remodelamento ventricular, mecanismos estes associados com a progressão da insuficiência cardíaca congestiva. (Kass et al., 1995; Patel et al., 1997a; Patel et al., 1997b; Capouya et al., 1993; Carpentier et al., 1993). A figura 2 ilustra as prováveis ações da CDM para limitar o remodelamento ventricular progressivo no processo de insuficiência cardíaca.

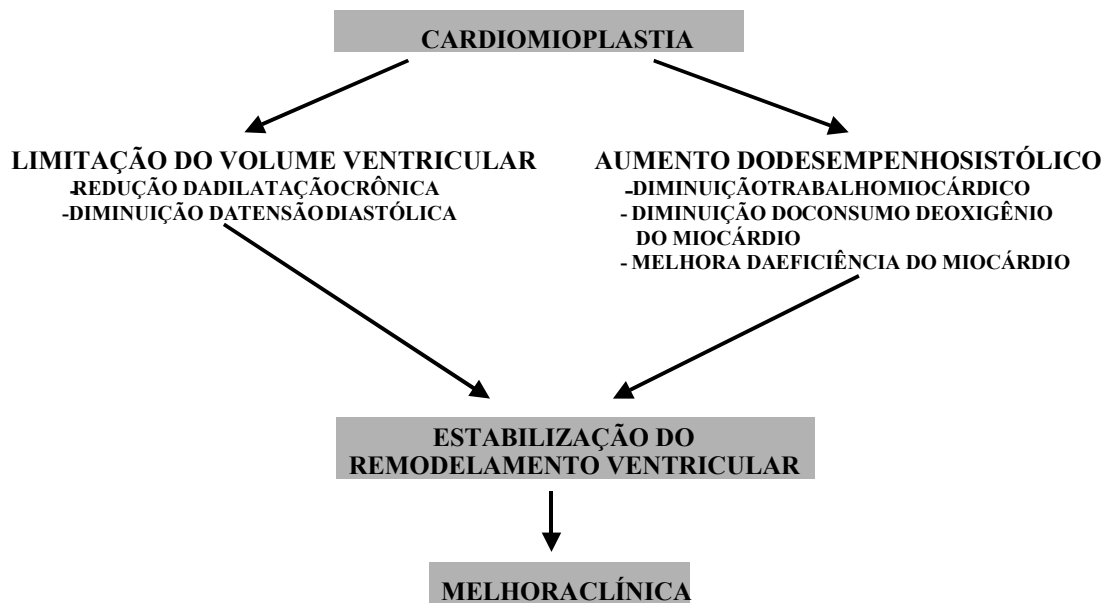


Figura 2 – Diagrama ilustrando o processo dinâmico pelo qual a cardiomioplastia possivelmente estabiliza o remodelamento ventricular (Modificado de Acker, 1999).

A experiência clínica internacional com cerca de 1000 pacientes, demonstra que este tipo de assistência pode ser empregado com sucesso em um grupo bem definido de indivíduos com cardiomiopatia severa (Chachques et al., 1997, Jessup, 2000, Moreira & Stolf, 2001). Atualmente a CDM dinâmica permanece como alternativa cirúrgica para utilização em pacientes com estágio avançado de insuficiência cardíaca, embora ainda não se tenha estabelecido na literatura sua eficiência como tratamento (Acker, 1999; Moreira & Stolf, 2001). Estima-se que aproximadamente 15 milhões de pessoas apresentem ICC no mundo (Parcker, 1987). Apesar dos recentes avanços na terapia medicamentosa e cirúrgica, a insuficiência cardíaca continua sendo uma das maiores causas de morte na sociedade moderna. (Smith, 1985; Furberg et al., 1985; Opie, 1988; Massie & Conway, 1987). O prognóstico para o estágio final da ICC é ruim e os pacientes tem poucas opções uma vez que, apesar do progresso e da evolução do

conhecimento, as cirurgias convencionais e o tratamento medicamentoso tem sido insuficientes no manejo desta patologia (Wilson et al., 1983; Bomtemps et al., 1991). Os resultados clínicos da CDM demonstram que a mortalidade após esta cirurgia foi significativamente alta em pacientes com ICC de classe IV segundo a NYHA, evidenciando que este procedimento deve ser realizado antes da indicação para o transplante cardíaco (Moreira & Stolf, 2001).

1.2 A cardiomioplastia na isquemia miocárdica

A CDM tem sido indicada especificamente no tratamento de cardiomiopatias dilatada e isquêmica (Moreira & Stolf, 2001). Por exemplo, dos 84 pacientes submetidos à CDM de janeiro de 1985 a dezembro de 1995 no Hospital Broussais em Paris, 45 pacientes apresentavam isquemia miocárdica por terem sofrido infarto do miocárdio (IM), sendo que destes 7 já haviam realizado revascularização da artéria coronária. Além disso, nesta mesma experiência clínica, 33 pacientes apresentavam cardiomiopatia dilatada, 5 apresentavam tumores cardíacos e 1 tinha malformação congênita (ref).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) foi considerado uma das doença mais preocupantes do século XX. Apesar da evolução no tratamento do IM, ainda existem dúvidas com relação as diferentes abordagens terapêuticas. Estudos com humanos e animais de experimentação vem buscando alternativas para o tratamento desta patologia que consigam abordar da forma mais abrangente possível as múltiplas disfunções desencadeadas após o IM, tentando evitar, desta forma, que cronicamente muitos pacientes evoluam para um quadro de insuficiência cardíaca (Bassand, 1995).

A isquemia miocárdica ocorre quando o fluxo sanguíneo arterial é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas do coração. Se uma grande massa ventricular for submetida à lesão isquêmica, a função de bomba do VE torna-se

deprimida, e o débito cardíaco, o volume sistólico, a pressão arterial e o pico de dp/dt diminuem, e a pressão diastólica final do VE aumenta (Pfeffer et al., 1979, De Felice et al., 1989). A depressão da função cardíaca pós IM está diretamente relacionada à extensão da lesão isquêmica no VE e o grau de aumento da pressão diastólica final do VE é talvez o melhor preditor da mortalidade após o infarto agudo do miocárdio (IAM) (White et al., 1987). No entanto, a medida da função miocárdica mais utilizada clinicamente na fase crônica do IM é a fração de ejeção do VE, sendo esta avaliação utilizada para a estratificação de risco dos pacientes (White et al., 1987).

Assim, a sobrevida pós IAM depende de vários fatores, cujo mais importante é a função ventricular esquerda (Madsen et al., 1983; De Busk, 1989). Importância adicional deve ser dada também a severidade e a extensão das lesões obstrutivas remanescentes na perfusão coronariana dos tecidos viáveis do coração (Taylor et al., 1980; Norris et al., 1984).

A localização específica da área infartada do ventrículo esquerdo (VE) é de grande importância nas respostas hemodinâmicas observadas. Embora haja grande variação anatômica na distribuição das artérias coronárias, no homem, a oclusão da artéria coronária descendente anterior resulta em IM da parede antero-lateral, e a oclusão da artéria circunflexa produz principalmente infarto do miocárdio da parede inferior. A oclusão da artéria coronária direita causa infarto ínfero-posterior do VE e, muitas vezes, infarto do ventrículo direito (Corr & Gillis, 1978).

Na fase crônica do IM a severidade dos sintomas na isquemia crônica do coração com disfunção do VE parece estar associada com a sobrevida do paciente (Califf et al., 1982). Os mecanismos compensatórios utilizados cronicamente para manter a perfusão sistêmica após o IM são: utilização da reserva sistólica (aumento da contratilidade) e/ou diastólica (mecanismo de Frank-Starling) e alterações neurohumorais; que ao mesmo tempo que são benéficas, podem induzir alterações na massa, volume e complacência

ventricular, além de disfunção ventricular, levando a um quadro de insuficiência cardíaca. Portanto, o prejuízo da função hemodinâmica pós IM é a causa mais comum da hipertrofia da massa ventricular remanescente e do remodelamento ventricular (Pfeffer, 1991).

1.3 Remodelamento ventricular pós isquemia miocárdica

Entre os fatores determinantes da função ventricular esquerda após o IAM pode-se citar: o tamanho do infarto, a localização do infarto, a disfunção isquêmica, a contratilidade do miocárdio normal, a complacência ventricular, a isquemia subendocárdica, a impedância aórtica e a capacitância venosa (pré-carga) (Cohn, 1989).

O IM inicia um processo de remodelamento ventricular, o qual é caracterizado pela progressiva dilatação do VE, rearranjo da estrutura da parede ventricular, hipertrofia ventricular e aumento na massa muscular sem um aumento na espessura da parede (hipertrofia excêntrica) (Pfeffer et al, 1990). O remodelamento ventricular pós IM em primeiro momento é benéfico para o sistema, possibilitando a manutenção da demanda; no entanto, cronicamente torna-se progressivamente prejudicial levando a disfunção e hipertrofia ventricular. Este processo inicia-se no momento do IAM e continua, na maioria dos casos por meses ou anos, até que seja atingido um estado hemodinâmico estável ou progressivamente ocorram severas descompensações cardíacas, levando a insuficiência cardíaca. Muitas questões sobre este processo ainda não estão perfeitamente esclarecidas pelos métodos atuais. Todavia, os trabalhos das áreas básica e clínica tem evidenciado que (1) este processo é progressivo e afeta adversamente o prognóstico, (2) o processo é modificado pela intervenção terapêutica e, (3) a patogênese é multifatorial (Cohn, 1989).

A perda da força contrátil na zona infartada afeta a função sistólica do VE, mas o aumento na pressão diastólica final do VE provavelmente também reflete um prejuízo do relaxamento ventricular. Esta disfunção pode exercer efeitos adversos na perfusão subendocárdica que podem levar a progressiva disfunção sistólica. O aumento da pressão diastólica final do VE induzido pela disfunção diastólica impedirá a perfusão subendocárdica (Cohn, 1989). Este ciclo vicioso iniciado por estes fatores está ilustrado na Figura 3.

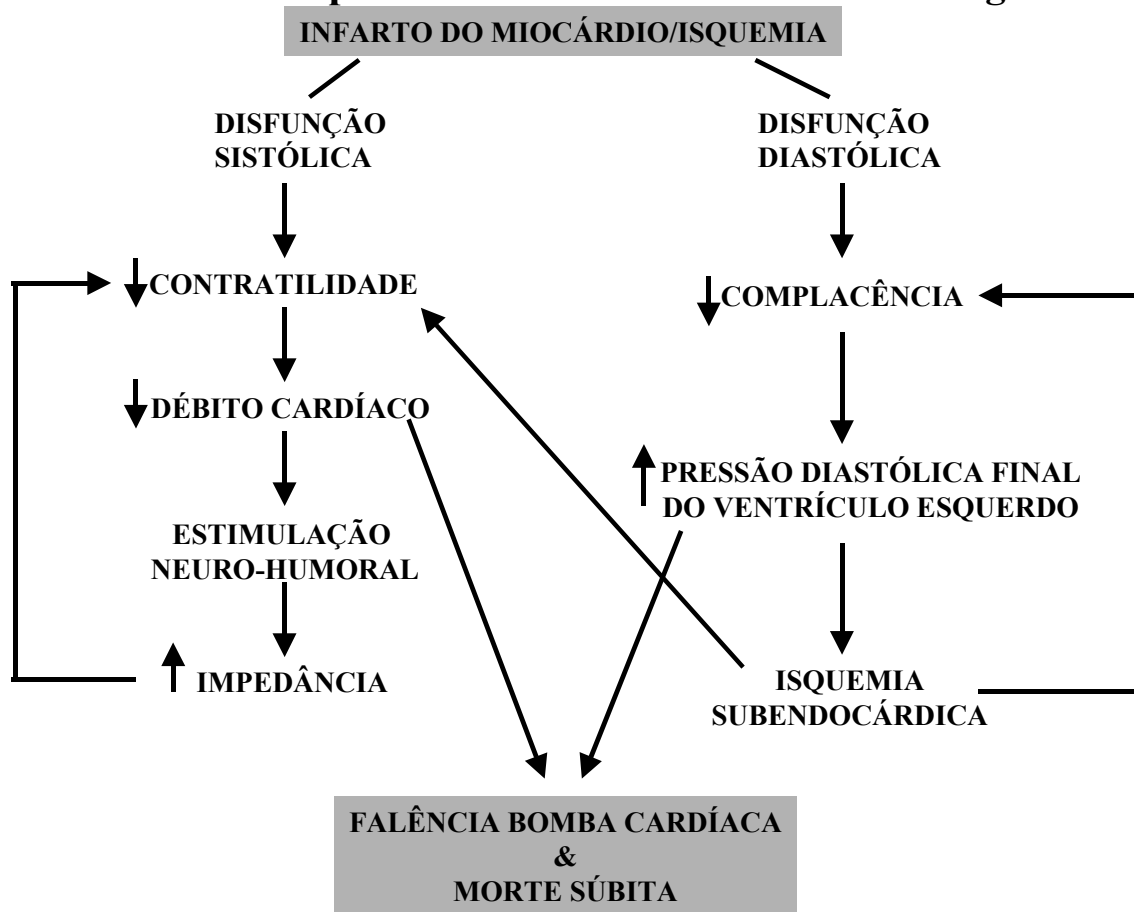


Figura 3 – Diagrama ilustrando o processo dinâmico que pode contribuir para a insuficiência ventricular esquerda após o infarto agudo do miocárdio (Reproduzido de Cohn, 1989).

1.4 Alterações celulares e genéticas no remodelamento ventricular

O processo de remodelamento pós IM tem sido associado com alterações da matriz extracelular, do citoesqueleto dos miócitos e da orientação das proteínas contráteis, os quais modificam a geometria e a função dos miócitos (Spinale, 1996; Eichhorn & Bristow, 1996). Na cardiomiopatia isquêmica (Beltrami et al., 1994) e dilatada (Beltrami et al., 1995) um aumento de 2 vezes na massa miocárdica é associada com um aumento de mais de 4 vezes no volume da câmara ventricular, resultando em uma significativa redução na relação massa-volume do VE

De acordo com a Lei de Laplace, o estresse diastólico por miócito pode aumentar a tal nível que induza morte destas células, o que explica a irreversibilidade desta patologia. Olivetti e colaboradores (1997) verificaram um aumento de 232 vezes na apoptose de miócitos de pacientes no estágio final da ICC. Além disso, na cardiomiopatia isquêmica uma média de aumento de 28% e 13% no acúmulo de colágeno foi verificada no ventrículo esquerdo e direito, respectivamente. Estes níveis de tecido fibroso indicam uma grande perda de miócitos, podendo explicar a limitada possibilidade de melhorar a função cardíaca nestes corações.

A hipertrofia em resposta ao estresse mecânico é um fenômeno bem conhecido, mas como este estímulo mecânico altera a regulação da função celular e da expressão gênica ainda não está totalmente esclarecido. Sadoshima e colaboradores (1994), estudando cultura de miócitos, demonstraram que o estímulo de estresse mecânico causa a liberação de angiotensina II que atua como mediador inicial na hipertrofia induzida em resposta ao estresse. A evolução temporal da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) vem sendo bastante estudada na literatura. Pinto e colaboradores (1993) demonstraram que paralelamente à disfunção diastólica e sistólica a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) mostrou-se aumentada no coração 3 dias após IM. Outros resultados experimentais confirmam um aumento de 7 e 8 vezes no estresse de parede na fase aguda e após 1 mês de IM, respectivamente, e foram associados a um aumento na expressão do SRA (Olivetti et al.,

1990; Olivetti et al., 1991). Dessa forma, ratos infartados tratados com inibidores da ECA e bloqueadores específicos da angiotensina II apresentaram diminuição da angiotensina II no coração e prevenção da dilatação ventricular (Pfeffer et al. 1985ab; Yamagishi et al., 1993), sugerindo um importante papel do SRA na dilatação ventricular pós IM.

Boluyt e colaboradores (1994), estudando as alterações na expressão gênica cardíaca durante a transição da hipertrofia estável para a insuficiência cardíaca, demonstraram que a mais notável característica que distingue um coração insuficiente de um normal foi o aumento de três a cinco vezes na expressão de proteínas da matriz extracelular e um aumento na proteína do fator de crescimento regular B1 (Boluyt et al., 1994), sugerindo uma contribuição desta proteína na elaboração da matriz extracelular, resultando em deterioração da função característica da ICC. Além disso, alterações na função do retículo sarcoplasmático tem sido evidenciadas ao longo dos anos e estudos demonstraram alterações na expressão gênica de transportadores de cálcio do retículo sarcoplasmático em animais e humanos (Arai & Matsui, 1994). Modificações na expressão de genes envolvidos na vias de sinalização adrenérgicas também foram documentadas (Sadoshima et al., 1994) e evidenciam mais uma causa para a disfunção cardíaca na ICC.

1.5 Revascularização do coração como alternativa no tratamento da isquemia miocárdica

O procedimento de Vineberg, no qual realiza-se a revascularização do miocárdio indiretamente com a artéria mamária interna, foi o primeiro procedimento cirúrgico padronizado para revascularizar o miocárdio isquêmico de pacientes. Pouco tempo depois, esta cirurgia foi abandonada com o advento da revascularização miocárdica direta pela cirurgia de ponte coronariana (Favaloro, 1968). No entanto, antes mesmo da técnica de Vineberg, muitos estudos com revascularização indireta do miocárdio haviam sido realizados (Beck, 1935; O'Shaughnessy, 1936; Vansant & Muller, 1960; Vineberg,

1946; Vineberg, 1949; Vineberg, 1952). Evidências anatômicas demonstraram significativa formação de vasos colaterais entre os tecidos extramiocárdicos e o coração, sugerindo um importante papel destas técnicas na preservação do fluxo sanguíneo para áreas isquêmicas do miocárdio, diminuindo o risco de eventos de isquemia e morte tecidual (Beck, 1935; Provan et al., 1966; Barner et al., 1968; Criollos et al., 1968; Begg et al., 1975).

Em pacientes com cardiomiopatia isquêmica foi demonstrado pela autópsia um aumento do fluxo colateral entre o GD e o coração para as áreas isquêmicas do ventrículo pós CDM (Mott et al., 1996). Mannion e colaboradores (1996) mostraram evidências de fluxo do GD para o coração em cães infartados submetidos à CDM, sugerindo um papel adicional da CDM como uma possível forma de induzir a revascularização das áreas miocárdicas isquêmicas.

A formação de circulação miocárdica colateral é uma importante resposta adaptativa para a patologia isquêmica, sendo que a intensificação deste processo natural está sendo alvo de investigação e representa uma estratégia que pode servir de alternativa para a angioplastia ou a cirurgia de ponte (Unger et al., 1990). De fato, White e colaboradores (1992) demonstraram que a isquemia do miocárdio promove intensa síntese de DNA nas células endoteliais e do músculo liso vascular refletindo um processo de neovascularização (White et al., 1992). A neovascularização é, portanto, um importante componente no desenvolvimento de vasos colaterais, cujo grau de formação está entre os principais determinantes da extensão da necrose após a isquemia das artérias coronarianas (Habib et al., 1991; Sabia et al, 1992; Yanagisawa-Miwa et al., 1992; Sasayama & Fujita, 1992). As novas colaterais coronarianas melhoram o fluxo sanguíneo para o miocárdio e ajudam a preservar a função cardíaca, reduzindo as disfunções em decorrência da isquemia (White et al., 1992; Sabia et al., 1992)

1.6 Angiogênese terapêutica

Em 1971, Folkman demonstrou a importância da neovascularização para o desenvolvimento de tumores e sugeriu que este processo possivelmente estaria correlacionado com fatores de crescimento angiogênicos específicos do neoplasma (Folkman, 1971). Estudos subsequentes estabeleceram a viabilidade do uso de fatores angiogênicos para formar e/ou aumentar o desenvolvimento de artérias colaterais em modelos experimentais de isquemia miocárdica ou de membros. Esta nova estratégia para o tratamento da insuficiência vascular foi denominada angiogênese terapêutica (Takeshida et al., 1994).

No entanto, estudos recentes sugerem que a neovascularização terapêutica não está restrita apenas a angiogênese, mas inclui a vasculogênese. No embrião o processo de formação vascular, envolve vasculogênese, responsável pelo estabelecimento dos plexos vasculares primários a partir da agregação de angioblastos no mesoderma e a angiogênese, que estende e remodela a vasculatura embriogênica primária, sendo necessária para o crescimento normal do tecido embrionário. Na maturidade, a angiogênese, que compreende a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, raramente tem importância em indivíduos adultos saudáveis, mas pode ser ativada em certas circunstâncias patológicas. (Conway et al., 2001).

Em 1991 Schaper e colaboradores demonstraram que a angiogênese resulta de vários eventos que envolvem ruptura da membrana basal vascular, migração e proliferação de células endoteliais diferenciadas e subsequente formação e maturação de novos vasos sanguíneos. A vasculogênese, no entanto, envolve a participação de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea as quais, circulando pelos sítios de

neovascularização, se diferenciam em células endoteliais formando novos vasos (Isner et al., 1999).

A proliferação neovascular, a partir de microvasos pré-existentes possui importante papel fisiológico em estados inflamatórios e no crescimento de tumores. Dessa forma, Battegay (1995) revisando dados da literatura concluiu que as células do tecido conectivo, estados de hipóxia e inflamação são estímulos para a geração de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento dependente do endotélio (VEGF-*Vascular endothelial grown factor*), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-*Fibroblast growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-*Platelet-Derived growth factor*) entre outros.

A terapia de formação de novos vasos tem sido utilizado em casos de infarto do miocárdio, isquemia periférica e retinopatia diabética conforme descrito na revisão de Battegay (1995). Resultados recentes mostram que fatores de crescimento como FGF e o VEGF aumentam o desenvolvimento de fluxo colateral em diferentes modelos de isquemia em animais, através da neovascularização e da recuperação da função endotelial na circulação colateral (Bauters, 1996). Além disso, existem dados conclusivos de que a angiogênese e a vasculogênese ocorrem em vários modelos animais (White & Bloor, 1992; Wolf et al., 1998) bem como em pacientes com doença coronariana (Rentrop et al., 1989; Sasayama et al., 1992; Gibson et al., 1999). O processo de vasculogênese geralmente ocorre próximo ao território isquêmico (Ito et al., 1997), enquanto que observa-se angiogênese primariamente nos tecidos isquêmicos e em resposta a hipóxia (Schaper et al., 1999; Yu et al., 1999). Teoricamente a angiogênese terapêutica pode ser realizada pela utilização de proteínas de fatores de crescimento ou pela introdução de genes que codificam esta proteína (Simons et al., 2000).

A síntese e liberação sustentada de fatores de crescimento através da terapia gênica pode superar a instabilidade inerente das proteínas angiogênicas (Melillo et al., 1997; Giordano et al., 1996; Tsurumi et al., 1996) e neste aspecto pode ser mais indicada. Entretanto, apesar da presença prolongada destes fatores de crescimento ainda não existem dados conclusivos na literatura que sustentem a hipótese de que seja mais eficiente. De fato, evidências preliminares sugerem que a prolongada síntese local de potentes fatores de crescimento como o VEGF-A (Schwarz et al., 2000) e o FGF-2 (Ribatti et al., 1999) podem causar formação de hemangiomas (Brown et al., 1996). Além disto, a teórica vantagem das técnicas de terapia gênica com respeito a exposição a longo prazo à fatores angiogênicos depende da efetiva expressão gênica local, a qual normalmente não é completamente realizada devido a grande variabilidade nos níveis e na duração da expressão genética (Epstein et al., 2001; Post et al., 2001).

Os vários vetores de terapia gênica diferem na eficiência de promover a transdução celular, no tipo de células que promovem a transdução (proliferativas ou não-proliferativas), e na duração e extensão da expressão gênica. Plasmídeos de DNA e os primeiros vetores adenovirais induzem expressão por curto prazo (dias a semanas), enquanto que outros vetores virais (retrovirus, lentivirus, adenovirus associados) podem promover expressão por longos períodos (meses). A limitada duração da expressão gênica (~ 1-2 semanas) evidenciada em corações transfectados com os primeiros vetores adenovirais sugere que possam ser ideais para a terapia gênica (Giordano et al., 1996; Muhlhauser et al, 1995).

No entanto, este tempo limitado de expressão tem sido pelo menos em parte atribuído a uma resposta imune contra as proteínas adenovirais (Yap et al., 1997; Gilgekrantz et al., 1995) podendo ser realmente reduzido em pacientes com anticorpos neutralizadores pré-existentes. Além disto, tem sido demonstrada resposta inflamatória

a este vetores em alguns tecidos (Chan et al., 1999). As respostas imunes e inflamatórias desencadeadas por estes adenovirus pode ser superada pelo uso de vetores virais alternativos como os adenovirus associados (Bueler, 1999), todavia estes levam a expressão transgênica por longos períodos com os concomitantes problemas desta prolongada estimulação. Portanto, o paradoxo da terapia gênica é que os vetores que não desencadeiam respostas imunes e inflamatórias causam uma estimulação angiogênica prolongada que é potencialmente deletéria. Além disso, outro problema da terapia gênica é o nível inconstante de expressão atingida com a mesma dose em diferentes pacientes (Roivainen et al., 2000). Dessa forma, sistemas de vetores capazes de regular a expressão gênica terapêutica estão sendo atualmente desenvolvidos (Bueler, 1999).

A terapia utilizando a proteína angiogênica codificada não apresenta respostas inflamatórias, não sofre a influência da sorologia do paciente e permite uma melhor definição da resposta à dose do fator angiogênico. A maior limitação da terapia com proteínas deve-se a limitada meia-vida das proteínas angiogênicas nos tecidos. No entanto, algumas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar a meia-vida destas proteínas nos tecidos. De momento, sabe-se que a meia-vida do FGF-1 em presença de heparina pode ser aumentada de horas para dias (Roivainen et al., 2000). Além disto, é possível aumentar o tempo de exposição dos tecidos à proteína através de uma série de formas de liberação lentas (Edelman et al., 1991). Atualmente, as maiores vantagens da técnicas terapêuticas com proteínas estão na determinação da dose aplicada, na possibilidade de combinação de muitas proteínas em uma única formulação terapêutica e no resultado relativamente previsível e seguro (Post et al., 2001).

1.7 O VEGF

O fator de crescimento dependente do endotélio vascular (VEGF), também denominado fator de permeabilidade vascular (VPF), foi descoberto no início da década de 1980 por Dvorak e colaboradores como um fator que fazia os vasos sanguíneos “vazarem”. No final dos anos 80 vários grupos demonstraram que o VEGF estimulava a migração e a replicação das células endoteliais, sendo um importante fator angiogênico *in vivo* (Senger et al., 1983; Dvorak et al., 1995; Ferrara & Henzel, 1989; Connolly et al., 1989; Ferrara et al., 1992).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 34-42 kD produzida por diferentes tipos celulares, incluindo o músculo liso vascular (Ferrara et al., 1991). Processamentos alternativos ocorrem na transcrição do gene do VEGF de humanos originando quatro tipos diferentes de mRNA que codificaram polipeptídeos de 206, 189, 165 e 121 aminoácidos (Houcl et al., 1991). Uma seqüência de 28 pares de bases foi identificada na região promotora do gene do VEGF do rato como mediadora de transcrição induzível em situações de hipóxia (Levy et al., 1995). A ação biológica do VEGF é mediada por dois receptores tirosina quinase transmembranas denominados flt-1 e flk-1/KDR que são expressos predominantemente nas células do endotélio vascular e nos seus progenitores embriogênicos (angioblastos). Vários estudos indicam que a expressão de VEGF e de seus receptores, flk-1 e flt-1, estão relacionados à condições de hipóxia (Levy et al., 1995; Tunder et al., 1995), exercendo papel fundamental na formação de vasos colaterais em patologias isquêmicas.

Estudos experimentais e clínicos vem demonstrando a importância do VEGF na formação de neovasos em tecidos isquêmicos. Annex e colaboradores (1998) trabalhando com estimulação crônica do nervo motor de músculos glicolíticos de coelhos mostraram aumento na concentração de proteína do VEGF após a estimulação, demonstrando um importante papel do VEGF nas alterações e na manutenção da

densidade capilar. A administração de VEGF no músculo isquêmico do coelho restabeleceu o fluxo dependente de colaterais (Bauters et al., 1995) e melhorou a função muscular (Walder et al., 1996). Além disto, Asahara e colaboradores (1995) verificaram que a aplicação local do VEGF acelerou a reendotelização após a angioplastia. Recentemente foi demonstrado que a transfecção intramuscular do plasmídeo de DNA que codifica o VEGF (phVEGF 165) em músculos isquêmicos aumenta a capilarização e o fluxo sanguíneo muscular, promovendo angiogênese terapêutica em pacientes diabéticos (Baumgartner et al., 1998).

O VEGF é o fator angiogênico mais estudado no sistema cardiovascular (Post et al., 2001). A síntese de VEGF mostrou-se aumentada no miocárdio isquêmico de porcos (Banai et al., 1994a) e ratos (Hashimoto et al., 1994), sugerindo que o VEGF é um mediador natural do processo de neovascularização induzido pela isquemia. Além disso, a administração sustentada ou uma única injeção intracoronariana de VEGF₁₆₅ melhoraram o fluxo e a função do miocárdio isquêmico em porcos (Lopez et al., 1998) e cães (Banai et al., 1994b). No entanto, a administração endovenosa ou injeções intra-atriais repetidas de VEGF₁₆₅ não foram eficientes no desenvolvimento de fluxo colateral em modelos experimentais (Lazarous et al., 1996).

Os primeiros estudos clínicos (Fase I e II) com administração intracoronariana e endovenosa de VEGF₁₆₅ demonstraram que esta terapêutica é viável e induz melhora na capacidade de exercício e nos sintomas de angina (Henry et al., 1998; Hendel et al., 2000). Todavia, os resultados de trabalhos elaborados na Fase II, randomizados, duplo-cego e com placebo controlado, com duas dosagens diferentes de VEGF₁₆₅, foram negativos (Henry et al., 1999).

1.8 Hipótese

O IM determina respostas adaptativas que levam ao remodelamento ventricular. Apesar das novas opções no tratamento do IM, em muitos casos a disfunção ventricular sistólica e diastólica evolui na fase crônica para um quadro de insuficiência cardíaca, cuja terapêutica é alvo de intensa investigação. O uso de enxertos musculares como na CDM é uma alternativa cirúrgica para o tratamento de um grupo bem definido de pacientes com cardiomiopatia, cuja melhora na função sistólica e no remodelamento ventricular ainda não foram bem estabelecidos na literatura. A degeneração do enxerto muscular pós CDM levou muitos investigadores a questionarem este tratamento cirúrgico, cuja eficiência poderia ser limitada pela disfunção isquêmica do GD. No entanto, os estudos clínicos e experimentais demonstram estabilização do remodelamento ventricular independente da estimulação elétrica do GD pós CDM.

Vários trabalhos demonstraram ao longo de décadas que a revascularização do miocárdio infartado por técnicas diretas e indiretas representa um importante limitador da extensão da isquemia miocárdica. Assim, a aplicação de VEGF₁₆₅ no GD poderia ser uma forma de revascularização do GD, impedindo a disfunção isquêmica muscular, e ao mesmo tempo, de indução do crescimento de vasos colaterais extramiocárdicos do GD para regiões isquêmicas do miocárdio infartado submetido à CDM.

A hipótese a ser testada no presente trabalho é que a CDM associada à administração do VEGF₁₆₅ na artéria principal do grande dorsal poderia induzir revascularização miocárdica e limitar a disfunção ventricular após o IM em ratos.

1.9 Objetivos

Para testar esta hipótese os objetivos do presente trabalho foram:

- 1- estabelecer e padronizar um modelo de cardiomioplastia crônica em ratos;
- 2- estudar as alterações ao longo do tempo nos parâmetros hemodinâmicos, morfométricos e no tamanho do infarto após o infarto do miocárdio em ratos (14 e 56 dias);
- 3- avaliar os efeitos da cardiomioplastia nos parâmetros hemodinâmicos, morfométricos, no desenvolvimento de fluxo colateral extramiocárdico e no tamanho do infarto de ratos controles e infartados (56 dias);
- 4- avaliar os efeitos da administração de VEGF₁₆₅ na artéria principal do grande dorsal nos parâmetros hemodinâmicos, morfométricos, no desenvolvimento de fluxo colateral extramiocárdico e no tamanho do infarto de ratos infartados submetidos à cardiomioplastia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 57 ratos machos Wistar (220-250 g) provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com serragem no fundo, ração e água “ad libitum”. A temperatura ambiente foi mantida entre 20° e 25 °C com ciclos de claro-escuro de 12 horas.

2.2 Grupos e seqüência experimental

Os ratos foram divididos nos grupos descritos a seguir:

- 14 dias de controle** (C-14, n=6): avaliados após 14 dias de acompanhamento
- 14 dias de infarto do miocárdio** (IM-14, n=6): avaliados após 14 dias de IM
- 56 dias de controle** (C-56, n=6): avaliados após 56 de acompanhamento
- 56 dias de infarto do miocárdio** (IM-56, n=8): avaliados após 56 dias de IM
- controle com cardiomioplastia** (CCDM, n=8): submetidos a CDM após 14 dias de acompanhamento e avaliados após 42 dias desta cirurgia
- infarto do miocárdio com cardiomioplastia** (IMCDM, n=8): submetidos a CDM após 14 dias de IM e avaliados após 42 dias desta cirurgia
- infarto do miocárdio com VEGF e cardiomioplastia** (MICDM-VEGF, n=5): infusão de VEGF na artéria principal do grande dorsal imediatamente antes da CDM, realizada 14 dias após a cirurgia de IM, sendo avaliados após 42 dias deste procedimento

-sham de infarto do miocárdio e de cardiomioplastia (S-IMCDM, n=5):

submetidos a cirurgia fictícia de CDM após 14 dias de cirurgia fictícia de IM e avaliados 42 dias após este procedimento

-infarto do miocárdio com sham de cardiomioplastia (IM-SCDM, n=5):

submetidos a cirurgia fictícia de CDM após 14 dias de IM e avaliados 42 dias após esta cirurgia.

As seqüências cirúrgicas e das avaliações hemodinâmicas de cada grupo são resumidas no quadro a seguir:

| GRUPO/DIAS | 0 | 14 | 56 |
|------------|-------------|---|---|
| C-14 | - | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas | |
| IM-14 | IM | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas | |
| C-56 | - | - | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
| IM-56 | IM | - | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
| C-CDM | - | CDM | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
| IM-CDM | IM | CDM | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
| IMCDM-VEGF | IM | 1) VEGF no GD 2) CDM | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
| S-IMCDM | IM fictício | CDM fictícia | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |

| | | | |
|---------|----|--------------|---|
| IM-SCDM | IM | CDM fictícia | Registro da PA e da PVE Infusão de microesferas |
|---------|----|--------------|---|

A seqüência experimental de avaliação dos ratos consistiu de:

- 1) determinação do peso corporal**
- 2) anestesia (pentobarbital sódico, 40 mg/Kg)**
- 3) canulação da artéria femoral**
- 4) canulação da artéria carótida**
- 5) registro da pressão arterial (PA)**
- 6) registro da pressão ventricular esquerda (PVE)**
- 7) determinação de fluxo sanguíneos regionais e do débito cardíaco pela técnica de microesferas coloridas**
- 8) sacrifício dos animais**
- 9) coleta de tecidos**
- 10) determinação da área de IM nos animais infartados**
- 11) processamento dos tecidos com microesferas coloridas**

2.3 Infarto do miocárdio

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal. Foram colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais foram afastados. O animal foi submetido a respiração artificial (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP, Brasil) e foi realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as

costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para visualização da artéria coronária esquerda. Esta foi ligada (fio mononylon 6.0) provocando a isquemia miocárdia (Pfeffer et al., 1979) (Figura 4).

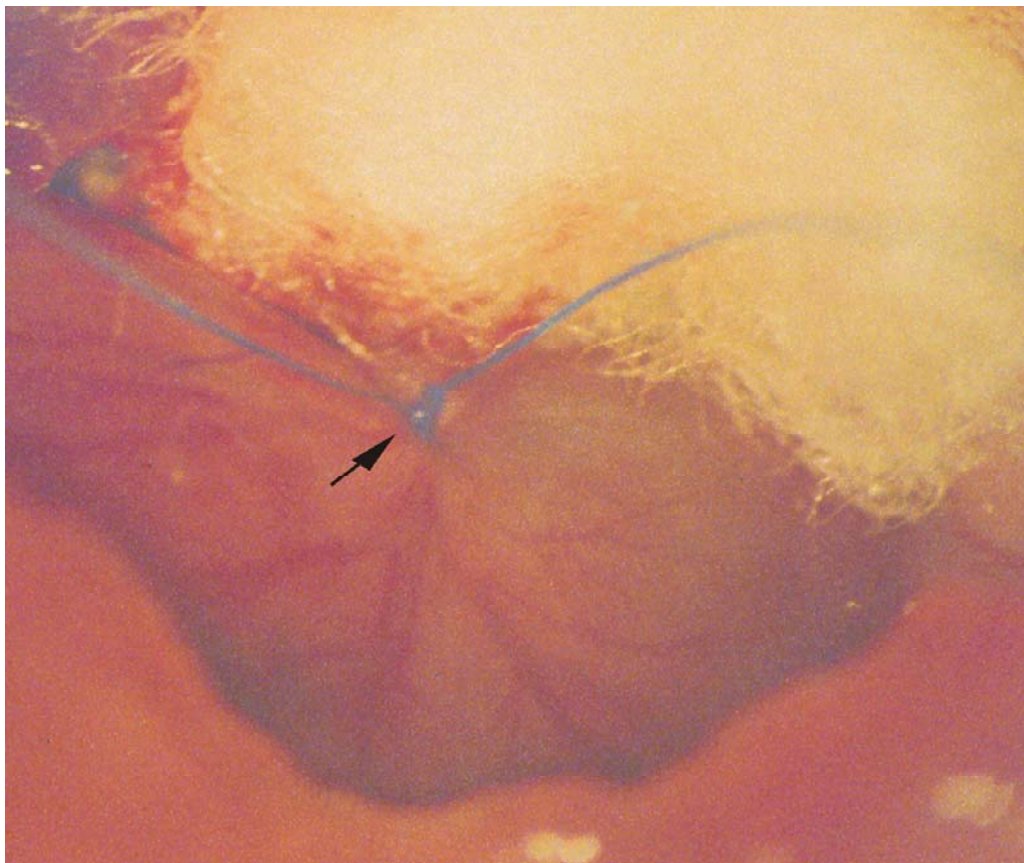


Figura 4- Fotografia mostrando a oclusão da artéria coronária esquerda no miocárdio do rato

Após a ligadura da coronária a incisão torácica foi fechada (fio mononylon 5.0) e o pneumotorax foi retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10ml. Logo após, o animal foi retirado da ventilação artificial e estimulada a respiração. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele suturada (fio mononylon 4.0). Os animais receberam 30000 UI de benzilpenicilina benzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, i.m.) e foram colocados em ambiente aquecido para recuperação.

Os animais nos quais o procedimento de IM não produziu um IM detectável evidenciando falha na oclusão coronariana foram excluídos do estudo. Os animais do grupo S-IMCDM foram submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos, incluindo a passagem do fio ao redor da coronária, no entanto, não foi realizada a oclusão deste vaso.

2.4 Administração do VEGF

2.4.1 Considerações anatômicas

A figura 5 ilustra a localização do grande dorsal (GD) no rato. O GD é um dos músculos superficiais do dorso que conectam o apêndice anterior à coluna vertebral, localizado abaixo do *cutaneus maximus*. Possui forma trapezoidal e comprimento das bordas laterais desiguais. Origina-se da oitava a décima segunda espinha das vértebras. Desta origem extensa suas fibras musculares convergem e entram na axila entre os músculos extensores e flexores, dando um contorno superficial conhecido como tendão dorsal da axila. O músculo é continuado por um fino tendão que passa medialmente ao úmero e se insere na crista do deltóide abaixo do bíceps braquial.

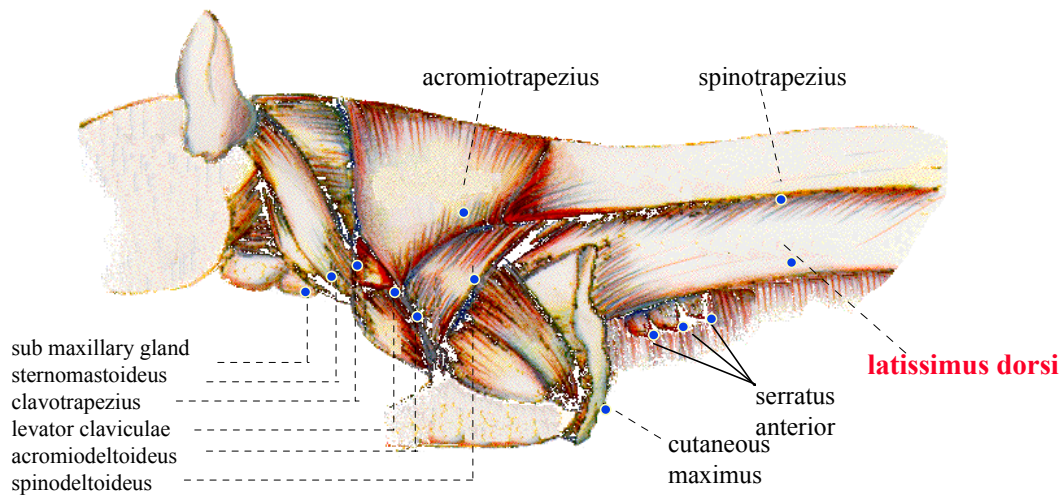


Figura 5- Localização anatômica esquemática do grande dorsal (*latissimus dorsi*) no rato.

A inervação do GD se dá pelo nervo toracodorsal da sexta e sétima vértebra cervical. A vascularização principal do GD se dá por um ramo da artéria axilar (Figura 6). O ramo braquial subscapular dá origem ao ramo circunflexo toraco-dorsal, conforme indicado na Figura 7.

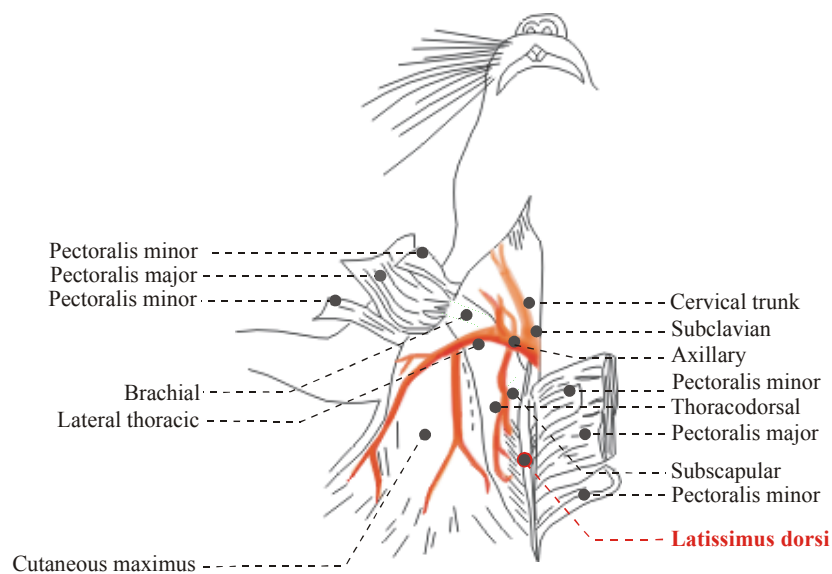


Figura 6- Vascularização do grande dorsal (*latissimus dorsi*) a partir da artéria axilar.

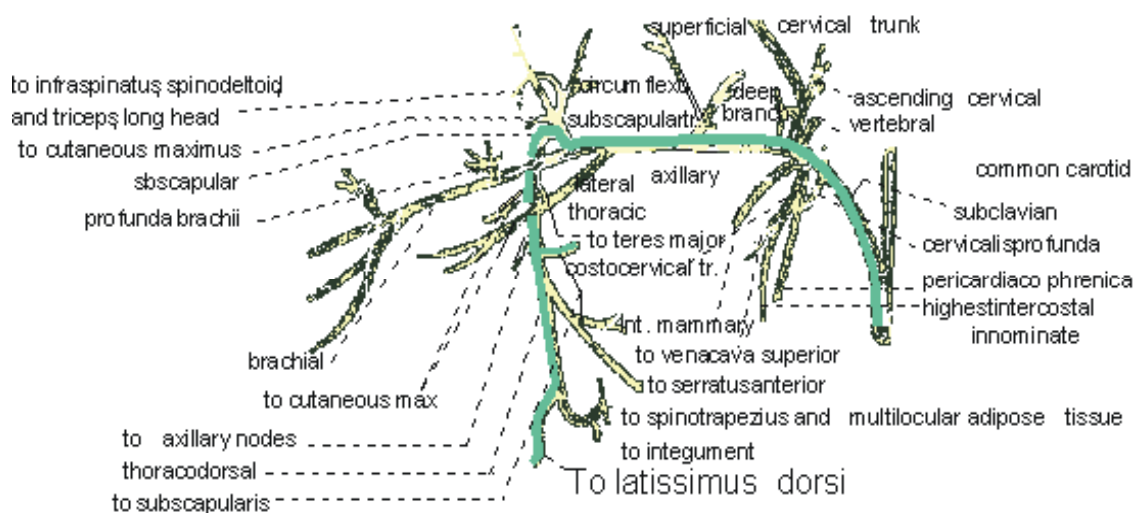


Figura 7- Esquema do ramo circunflexo subescapular que vasculariza o grande dorsal (*latissimus dorsi*) no rato.

2.4.2 Padronização da infusão de VEGF

Para protocolar a infusão do VEGF₁₆₅ foram utilizados 3 ratos. Nestes animais o ramo da artéria circunflexa subescapular foi canulado após a ramificação para o grande dorsal e injetou-se azul de Evans, para determinação do volume e da velocidade de injeção do VEGF₁₆₅.

A figura 8 ilustra o início da injeção de azul de Evans na artéria principal do GD (A) e sua distribuição pelas ramificações arteriais (B).

2.4.3 Protocolo de infusão do VEGF

O VEGF foi injetado 14 dias após o infarto do miocárdio diretamente na artéria principal do GD. Animais infartados (14 dias) foram pesados, anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal e entubados (Gelko-14G).

a) canulação

O ramo da artéria circunflexa torácica foi canulado logo após sua ramificação para o grande dorsal com um catéter de polietileno P10. O catéter foi previamente aquecido e distendido a fim de diminuir sua espessura. Foi preenchido com salina e um segmento de aproximadamente 4 mm da cânula foi inserido na artéria do músculo. O fluxo arterial foi interrompido após a ramificação do grande dorsal, permitindo a irrigação deste durante o procedimento de canulação. O catéter foi então fixado (fio algodão 4.0) à parede do vaso.

b) concentração de VEGF

A solução comercial de VEGF₁₆₅ (5mg/1ml) fornecida pela Genentech (Genentech Inc, USA) foi conservada a 4°C e aliquotada para obter-se a concentração desejada para infusão no animal. Foram retirados 50 µl da solução mãe em ambiente estéril e colocadas em um eppendorf. Adicionou-se 950 µl de solução salina contendo 0,1 % de albumina bovina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), obtendo-se a concentração de 250 µg de VEGF em 1 ml de solução, mantida a 4°C. Foram injetados 100 µl desta solução, contendo, portanto, 25 µg de VEGF diretamente na artéria do GD.

c) infusão do VEGF

Um catéter P50 com comprimento de 41,6 cm foi preenchido com 100 µl da solução de VEGF (25µg de VEGF por rato) e conectado diretamente a cânula posicionada na artéria principal do grande dorsal. A veia toraco-dorsal foi seccionada logo após sua ramificação para o GD, a fim de permitir a vazão durante a infusão do VEGF. A circulação (artéria e veia) para o músculo foi interrompida e realizou-se a infusão do VEGF a uma taxa de 250 µl/min durante 45 segundos, conforme padronizado nos experimentos pilotos com Azul de Evans. Logo após, a circulação foi restabelecida e a cânula arterial foi retirada, sendo a artéria e a veia, após a ramificação para o músculo, ligadas.

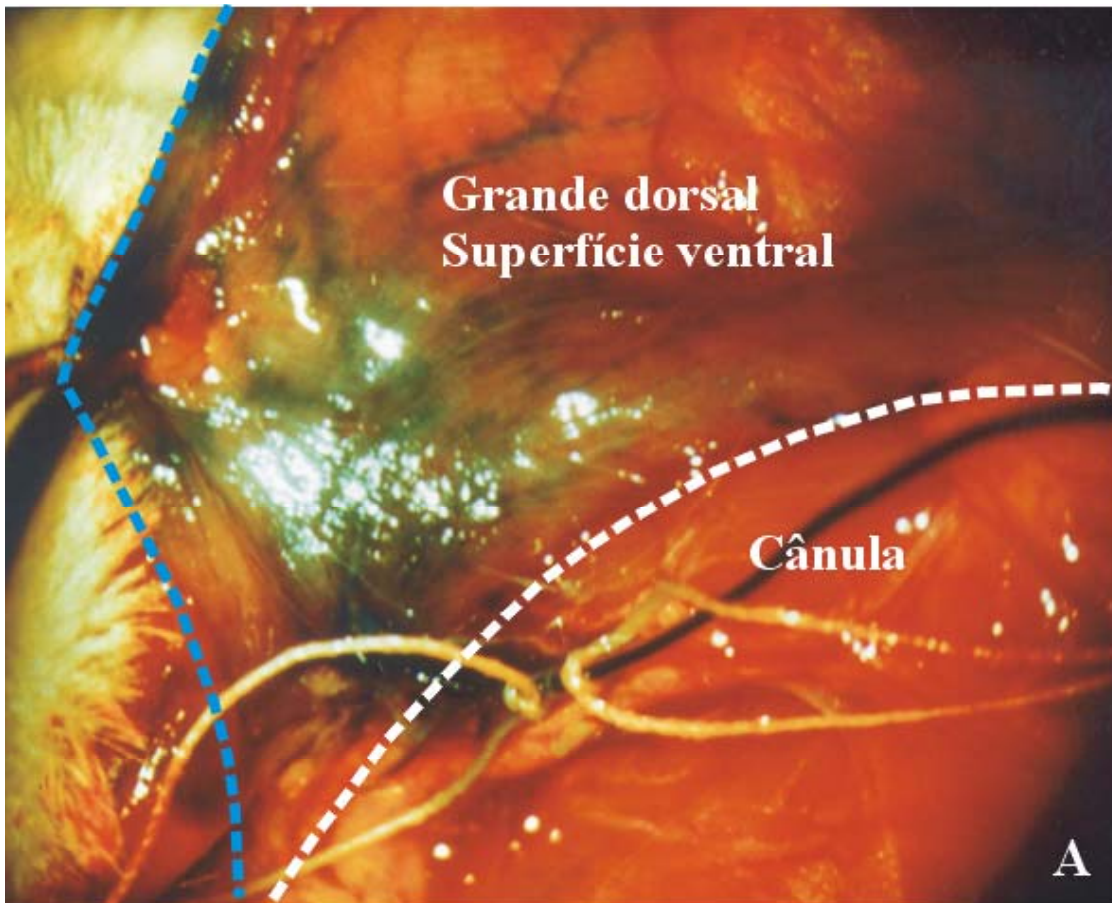


Figura 8 - Fotografia mostrando o início da injeção de azul de Evans na artéria principal do grande dorsal. As linhas tracejadas delimitam as bordas laterais do grande dorsal.

2.5 Cardiomioplastia

Os animais controles ou infartados (14 dias) foram pesados, anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal e entubados (Gelko-14G). Os ratos do grupo VEGF, receberam suplementação do anestésico, 20% da dose inicial, após a infusão do VEGF e foram submetidos a cardiomioplastia conforme descrito a seguir.

Os ratos foram colocados em decúbito lateral e foi realizada uma incisão de 3cm no sentido transversal e próximo ao membro anterior esquerdo. O músculo *cutaneus maximus* foi seccionado e o músculo grande dorsal localizado. A porção medial do grande dorsal foi desinserida e o ramo da artéria toraco-dorsal que irriga o grande dorsal localizado. Um fio (mononylon 6.0) foi passado ao redor da artéria toraco-dorsal e fez-se um nó, sem oclusão, para marcação do vaso. Logo a seguir, as porções lateral e distal do músculo foram desinseridas e o tecido conectivo cuidadosamente removido do músculo (Figura 9). O rato foi colocado em ventilação artificial e uma pequena incisão foi realizada ao nível do segundo espaço intercostal para translocação do grande dorsal para o interior da caixa torácica. Uma segunda abertura foi realizada em nível do quarto espaço intercostal e um afastador foi colocado para melhor visualização (Figura 10). O pulmão foi afastado, o pericárdio seccionado e o músculo tracionado e colocado sobre o ventrículo esquerdo. Um primeiro ponto foi realizado ligando o grande dorsal e a parede do ventrículo direito seguido de um ponto no ápice do miocárdio e na porção medial do grande dorsal. O coração foi tracionado através do ponto do ápice e dois pontos foram realizados na parede do ventrículo esquerdo e na porção distal do grande dorsal (Figura 11). Nos animais infartados, cuidados extras foram

tomados devido as adesões observadas após o infarto e também para que o músculo fosse posicionado sobre a região infartada.

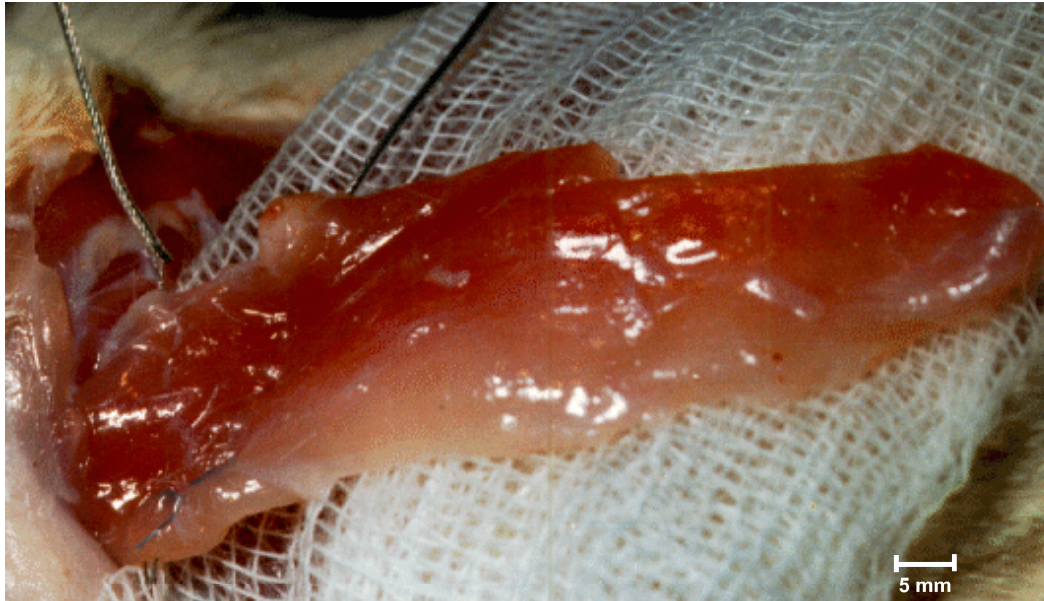


Figura 9 - Fotografia do grande dorsal após dissecação das bordas laterais, com preservação da inserção proximal e eletrodos para estimulação implantados.

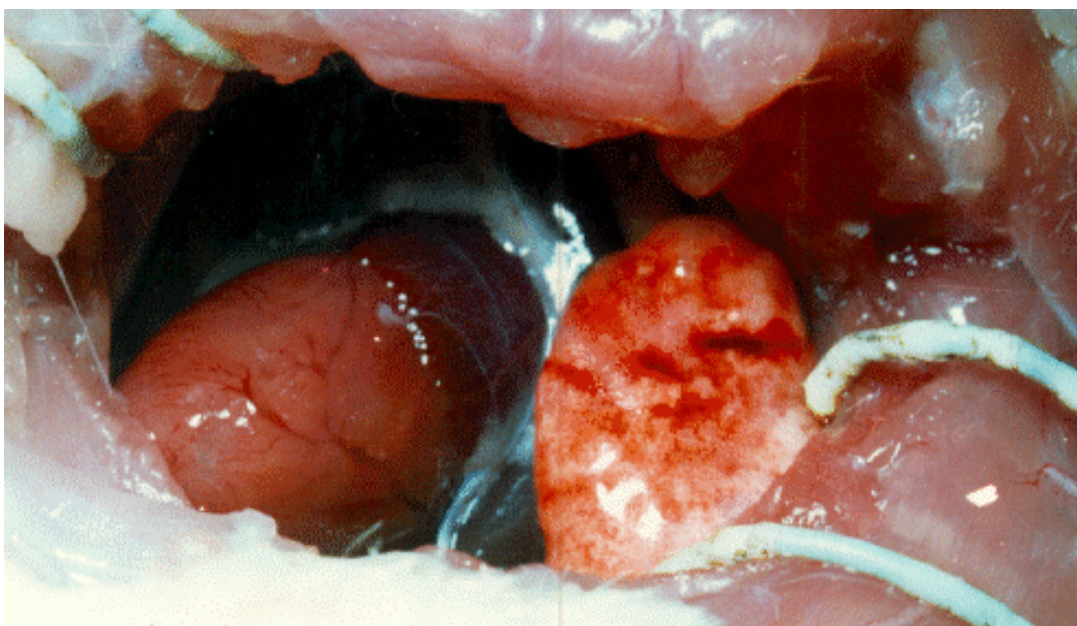


Figura 10- Fotografia mostrando o tórax aberto e tracionado para o início da cardiomioplastia.

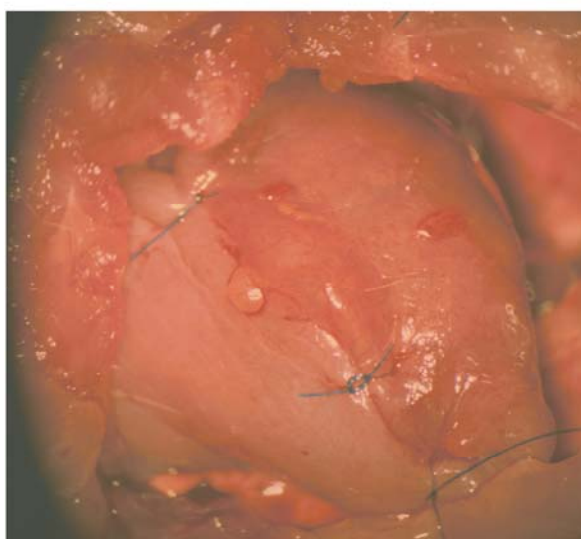
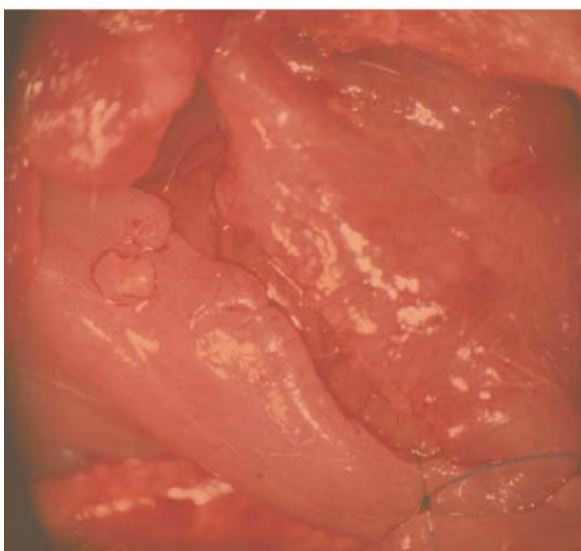
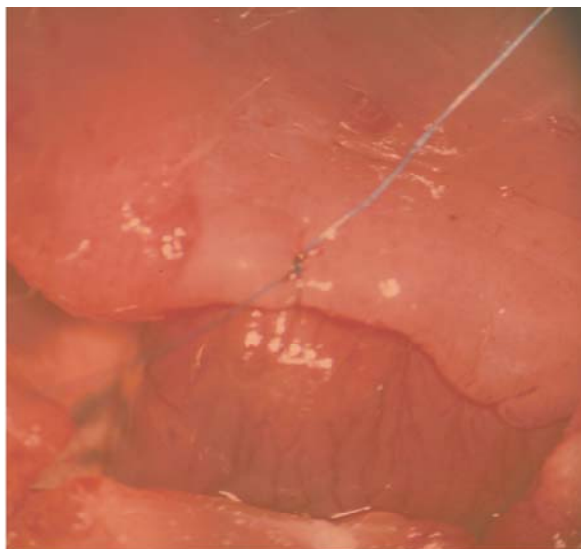


Figura 11- **Fotografias mostrando a seqüência de fixação do grande dorsal ao coração na cardiomioplastia.**

As incisões torácicas foram fechadas (fio polipropilene 5.0) e o pneumotorax foi retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10ml. O animal foi retirado da ventilação artificial e estimulado a respirar. Os músculos seccionados foram suturados e a abertura na pele fechada (fio mononylon 4.0). Foram administradas 30000 UI de benzilpenicilina benzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, i.m.) e os animais foram colocados em ambiente aquecido para recuperação.

Os animais dos grupos S-IMCDM e IM-SCDM foram submetidos aos mesmos procedimentos operatórios descrito acima, exceto a transposição do GD para o interior da caixa torácica e o envolvimento do coração pelo GD.

2.6 Avaliações hemodinâmicas

2.6.1 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, ip) e entubados (Gelko – 14G). Um cateter de tygon P10 preenchido de salina foi utilizado para a canulação da aorta abdominal via artéria femoral direita.

Um segundo cateter de polietileno P50 foi utilizado para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria carótida direita. O cateter foi inserido até o ventrículo e sua posição foi determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular e confirmada por necropsia (Figura 12).

2.6.2 Registro de pressão arterial e de pressão ventricular esquerda

Antes da colocação do cateter P50 no ventrículo, a pressão arterial da carótida foi registrada durante 5 minutos através da conexão da canula arterial a um transdutor de pressão (Strain-Gauge - Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155,

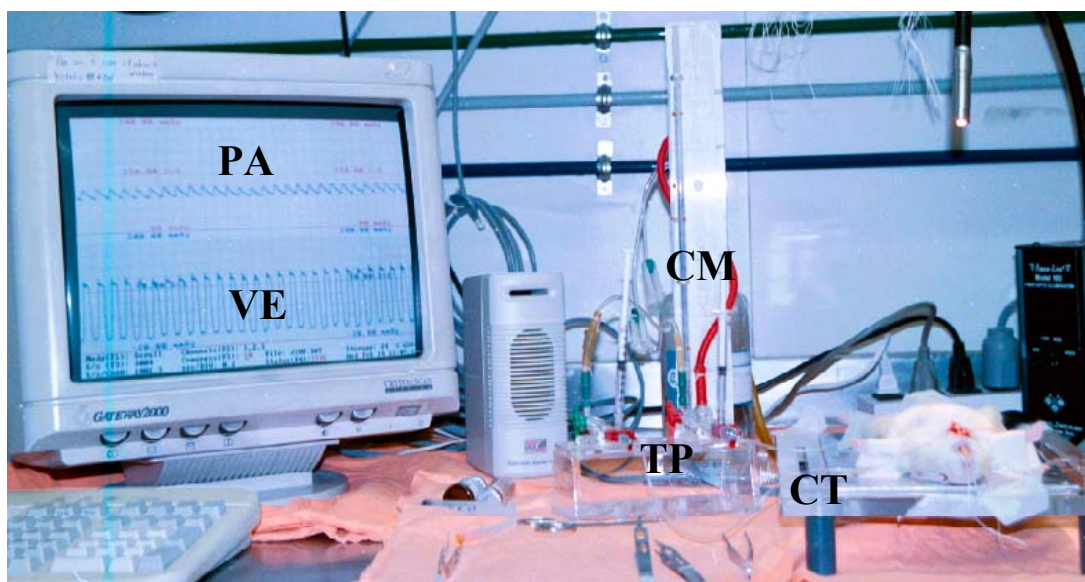


Figura 12 – Fotografia mostrando o sistema de registro de pressão arterial no rato. (PA) pressão arterial sistêmica; (VE) pressão ventricular esquerda; (TP) transdutores de pressão; (CM) coluna de mercúrio para calibração do sistema; (CT) cama térmica

Houston, Texas, USA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Logo após este registro, a canula foi posicionada no ventrículo esquerdo e após 5 minutos de estabilização, a pressão ventricular foi registrada durante 3 minutos. Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (CODAS - Dataq Instruments, Akron, OH, USA) com taxa de amostragem de 2000 Hz.

2.6.3 Método das microesferas coloridas

2.6.3.1 Microesferas

Para determinação do fluxo sanguíneo e do débito cardíaco foram utilizadas microesferas coloridas azuis, amarelas e brancas (Dye-Trak microspheres, Triton

Technology, San Diego, CA, USA) segundo o protocolo previamente descrito por Hakkinen e colaboradores (1995). As microesferas são compostas de polystyrene (98%) e divinilbenzeno (2%) tendo diâmetro de $15,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e concentração comercial de 3000 esferas/ml.

Para determinação da concentração de esferas nas soluções injetadas e padrões, amostras destas diluições e da solução padrão foram colocadas em uma câmara de Neubauer ($0,0025\text{mm}^2$) e as esferas foram contadas através da visualização em um microscópio. A concentração média das esferas foi utilizada como base para o cálculo do número de esferas infundidas. Para a determinação da absorbância média das esferas, amostras das diluições utilizadas (15.000-25.000 esferas) foram colocadas em tubos de 15 ml. Adicionou-se 2 ml de etanol (100%) a 4°C , centrifugou-se e o sobrenadante foi aspirado. As amostras foram colocadas em estufa (56°C) overnight para secagem. No dia seguinte foi adicionado dimetilformamida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e as amostras foram centrifugadas e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro. A solução comercial foi sonicada (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) durante 5 min imediatamente antes das diluições em salina contendo 0,01% de Tween 80 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Todas as amostras foram ultrasonicadas 3-5 minutos imediatamente antes da injeção.

2.6.3.2 Infusão das microesferas azuis no ventrículo esquerdo

Uma solução contendo 300.000 esferas azuis/180 μl foi infundida no ventrículo esquerdo para determinação do débito cardíaco e dos fluxos regionais e colaterais. Esta solução foi sonicada durante 3 minutos imediatamente antes da infusão e 180 μl desta foram colocados em uma extensão de cateter P50 (75 cm) a qual foi conectada a uma seringa de 1 ml com salina pré-aquecida (40°C) contendo Tween 80 (0,01%). A outra canula posicionada na aorta abdominal foi conectada a uma seringa de 1 ml, pré-

heparinizada, para retirada de sangue durante a infusão. Dez segundos antes da injeção das esferas azuis iniciou-se a retirada de sangue através de uma bomba (Infusion and Withdrawl Pump, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, USA) a um fluxo de 0,5 ml/min que continuou por 75 segundos. Foram injetadas 300.000 esferas azuis no ventrículo esquerdo a um fluxo de 0,36 ml/min durante 50 segundos (Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, USA). Desta forma, os 180 µl de solução contendo as microesferas foram injetadas nos primeiros 30 segundos.

O volume de sangue retirado foi repostado através do volume injetado durante a infusão das esferas e por um pequeno volume de salina (0,1-0,2 ml) injetado *in bolus* logo após o término do procedimento.

Após a infusão das microesferas no ventrículo esquerdo os animais foram sacrificados com uma overdose de pentobarbital sódico, injetado no peritônio e os tecidos foram retirados para análise. Coletou-se rins direito e esquerdo, grande dorsal direito, coração e grande dorsal esquerdo.

Nos animais com CDM, o grande dorsal foi cuidadosamente separado do coração, tendo-se o cuidado de retirar o tecido conjuntivo e adiposo. Para análise foi utilizado apenas a porção do grande dorsal esquerdo que estava no interior da caixa torácica.

2.6.3.3 Infusão das microesferas amarelas no grande dorsal esquerdo

Nos grupos submetidos a CDM o fluxo sanguíneo do grande dorsal para o miocárdio foi avaliado através da infusão de microesferas amarelas diretamente na artéria do grande dorsal imediatamente antes da infusão das microesferas azuis no ventrículo esquerdo.

A artéria braquial e seu ramo toraco-dorsal foram localizadas e dissecados. A ramificação da artéria toraco-dorsal que irriga o grande dorsal foi localizada e um cateter P08 foi inserido na artéria braquial e direcionado até a toraco-dorsal no sentido retrógrado. A artéria braquial e algumas ramificações foram ocluídas a fim de evitar a perda de esferas e fluxo sanguíneo para o músculo. Uma solução de 50.000 esferas amarelas/100µl foi sonicada durante 3 minutos e 100 µl desta foram colocados em 41,66 cm de uma extensão de cateter P50 conectado uma seringa com salina pré-aquecida (40°C) contendo 0,01% de Tween 80. A veia braquial foi seccionada para evitar o refluxo das esferas e 50.000 microesferas amarelas foram injetadas na artéria toraco-dorsal com uma bomba de infusão (Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, USA) a um fluxo de 0,14 ml/min durante 60 segundos.

2.6.3.4 Digestão e processamento dos tecidos

a) Reagentes

Os reagentes utilizados no processamento dos tecidos com microesferas coloridas foram feitos segundo especificações do fabricante das microesferas (Triton Technology, San Diego, CA, USA).

Reagente de digestão I (Reagente 10% Triton X-100): 900 ml de água destilada foram aquecidos a 50°C. Adicionou-se 6,06g de Trizma Base (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e 0,1g de Azida Sódica (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e o pH foi equilibrado para 8,5. Acrescentou-se 100 ml de Triton X-100 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e a solução foi armazenada em pote plástico.

Reagente de digestão II (Reagente Ácido Deoxicólico Sódico): 1 litro de água destilada foi aquecido e agitado a 50°C. Adicionou-se 6,06g de Trizma Base (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 0,5 ml de Tween 80 (Sigma Chemical Co, St.

Louis, MO, USA) e 0,1g de Azida Sódica (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e o pH foi equilibrado para 8,5. Acrescentou-se 20,73g de ácido deoxicólico sódico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), o pH foi equilibrado novamente em 8,5 e a solução foi armazenada em pote plástico.

Reagente de hemólise: adicionou-se 20 ml de etanol absoluto à 100 ml do reagente de digestão I, armazenando-se esta solução em pote plástico.

b) Sangue

A amostra de sangue retirada foi pesada e colocada em tubo de polipropilene de 15 ml. Adicionou-se 4 ml de um reagente de hemólise e a amostra foi centrifugada durante 30 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e colocou-se 2 ml de hidróxido de sódio (2N) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), sendo levado ao banho (90°C) e seguindo o mesmo procedimento dos demais tecidos.

c) Tecidos

Os tecidos foram processados segundo técnica adaptada de Hakkinen e colaboradores (1995). Os tecidos foram pesados (0,4 – 1,2 g) e colocados em tubo de polipropilene de 15 ml, previamente identificado. Após a adição de 4 ml de hidróxido de sódio (2N) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) os tubos foram tampados e colocados em banho à 90°C por aproximadamente 2 horas. As amostras foram agitadas (Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA) a cada 15 minutos até a dissolução dos tecidos. Os tubos foram removidos do banho e foi adicionado 8 ml de Reagente de Digestão I. As amostras foram misturadas por inversão (5x) e centrifugadas por 30 minutos à 2000g. Os sobrenadantes foram desprezados, adicionou-se 10 ml de Reagente de Digestão II, e as amostras foram novamente colocadas no banho (90°C) por aproximadamente 3 horas. Os tubos foram agitadas a cada 20 minutos até que se

observava visualmente a total digestão das amostras. Após retirada do banho, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2000g e o sobrenadante aspirado, permanecendo no tubo aproximadamente 100-200µl. Adicionou-se etanol absoluto (4°C) (Merck, Darmstadt, Germany), agitou-se os tubos para lavagem das amostras e centrifugou-se por 15 minutos a 2000g (4°C). O etanol foi aspirado, permanecendo 100-200µl no fundo dos tubos. As amostras foram colocados em estufa (56°C) durante aproximadamente 12 horas para evaporação.

2.6.3.5 Extração do corante e medição de absorbância

Para extração do corante, 500 µl de dimetilformamida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi colocado em cada tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas por 10 minutos à 2000g.

Colocou-se 400 µl do sobrenadante em uma cubeta de quartzo de 0.7 ml (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e realizou-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro (DU-640 Spectrophotometer, Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA). Os picos dos espectros de absorbância das microesferas brancas, amarelas e azuis são respectivamente, 370, 448 e 672 nm e utilizando-se uma largura de banda de luz <1,8 nm. A absorbância mínima aceitável foi 0,01 AU para as azuis e 0,02 AU para as brancas e amarelas. Absorbâncias menores que estas foram excluídas da análise.

2.6.3.6 Determinação do número de microesferas e do fluxo sanguíneo

Para determinação do número de microesferas nos tecidos (azuis ou amarelas) soluções com número conhecido de microesferas (15000 esferas azuis e 10000 esferas amarelas) foram processadas conforme descrito no item 2.6.3.4. A média das absorbância destas amostras permitiu determinar uma constante de leitura do espectrofotômetro para as microesferas azuis e amarelas. Desta forma, o número de microesferas nos tecidos foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ esferas na amostra} = \frac{\text{AU amostra}}{\text{AU padrão}} \times \text{N}^\circ \text{ esferas padrão}$$

AU padrão

Onde,

AU amostra: absorbância da amostra de tecido

N^o esferas padrão: número de esferas na solução padrão (10 000 azuis ou 15 000 amarelas)

AU padrão: média das absorbâncias das soluções padrões (0, 222 para as azuis ou 0,778 para as amarelas)

Para a determinação do fluxo sangüíneo para o tecido o volume de sangue foi calculado dividindo o peso da amostra de sangue coletada por 1,05 g/ml, correspondendo a constante gravitacional específica do sangue.

O tempo de retirada da amostra de sangue (min) foi calculado dividindo o volume de sangue retirado durante a infusão das microesferas azuis pela velocidade da bomba de retirada (0,5 ml/min).

A constante de retirada do sangue (Q sangue, ml/min) foi determinada pela divisão do volume de sangue (ml) pelo tempo de retirada da amostra (min).

$$\text{Q sangue} = \frac{\text{volume de sangue}}{\text{tempo de retirada}} = \frac{(\text{P sangue} / 1,05)}{(\text{V sangue} / 0,5)}$$

Onde,

Q sangue: constante de retirada de sangue em ml/min

P sangue: peso da amostra de sangue coletada em gramas

1,05: constante gravitacional do sangue em g/ml

V sangue: volume da amostra de sangue coletada em ml

0,5: velocidade da bomba de retirada em ml/min

Para cada infusão, o cociente da divisão da Q sangue pela AU da amostra de sangue a 672 nm foi utilizado como base para calcular o fluxo para os tecidos:

$$Q \text{ tecido} = AU \text{ tecido} (Q \text{ sangue} / AU \text{ sangue})$$

Onde,

Q tecido: fluxo sangüíneo para o tecido em ml/min

AU tecido: absorbância do tecido a 672 nm

Q sangue: constante de retirada do sangue em ml/min

AU sangue: absorbância do sangue a 672 nm

Os fluxos sangüíneos foram divididos pelo peso das amostras (g) para obter o fluxo em ml/min/g de tecido.

2.6.4 Determinação do débito cardíaco

O débito cardíaco foi calculado segundo a fórmula previamente descrita por Heymann e colaboradores (1977):

$$DC = \frac{N^{\circ} \text{ microesferas injetadas (300.000)} \times \text{fluxo de referência (0,5 ml/min)}}{N^{\circ} \text{ de microesferas no sangue}}$$

N° de microesferas no sangue

2.6.5 Determinação do Índice Cardíaco

O índice cardíaco foi obtido pela divisão do débito cardíaco (ml/min) pelo peso corporal (Kg) do animal.

2.6.6 Determinação do fluxo colateral

O fluxo colateral foi avaliado nos ratos submetidos à CDM. Nestes animais foram injetadas, conforme anteriormente descrito, microesferas amarelas no GD esquerdo (item 2.6.3.3) e microesferas azuis no ventrículo esquerdo. O fluxo colateral foi determinado no sentido do coração para o GD, sendo expresso em valores negativos, e no sentido do GD para o coração, sendo expresso em valores positivos. É importante salientar que durante a infusão das microesferas a artéria do GD foi ocluída e a veia seccionada, impedindo a passagem de esferas azuis ou amarelas por estas vias. Dessa forma, a passagem de microesferas entre estes tecidos só seria possível por vasos desenvolvidos pós CDM na região de contato do músculo e do miocárdio

Para calcular o fluxo colateral do coração para o GD ($FCO_{\text{CORAÇÃO} \rightarrow \text{GD}}$) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$FCO_{\text{CORAÇÃO} \rightarrow \text{GD}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ esferas azuis no GD}}{\text{N}^\circ \text{ esferas azuis no coração}}$$

Para calcular o fluxo colateral do GD para o coração ($FCO_{\text{GD} \rightarrow \text{CORAÇÃO}}$) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$FCO_{\text{GD} \rightarrow \text{CORAÇÃO}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ esferas amarelas no coração}}{\text{N}^\circ \text{ esferas amarelas no GD}}$$

As razões de fluxo colateral foram calculadas com valores absolutos de esferas encontradas nos tecidos sendo expressos em %, bem como pelos valores de número de esferas normalizados pelo peso do tecido, sendo apresentados como %/g. A figura 13 apresenta uma ilustração esquemática do fluxo colateral entre o GD e o coração. Observe nesta figura que algumas esferas amarelas injetadas no GD passam ao

miocárdio, da mesma forma que algumas esferas azuis injetadas no coração passam ao GD.

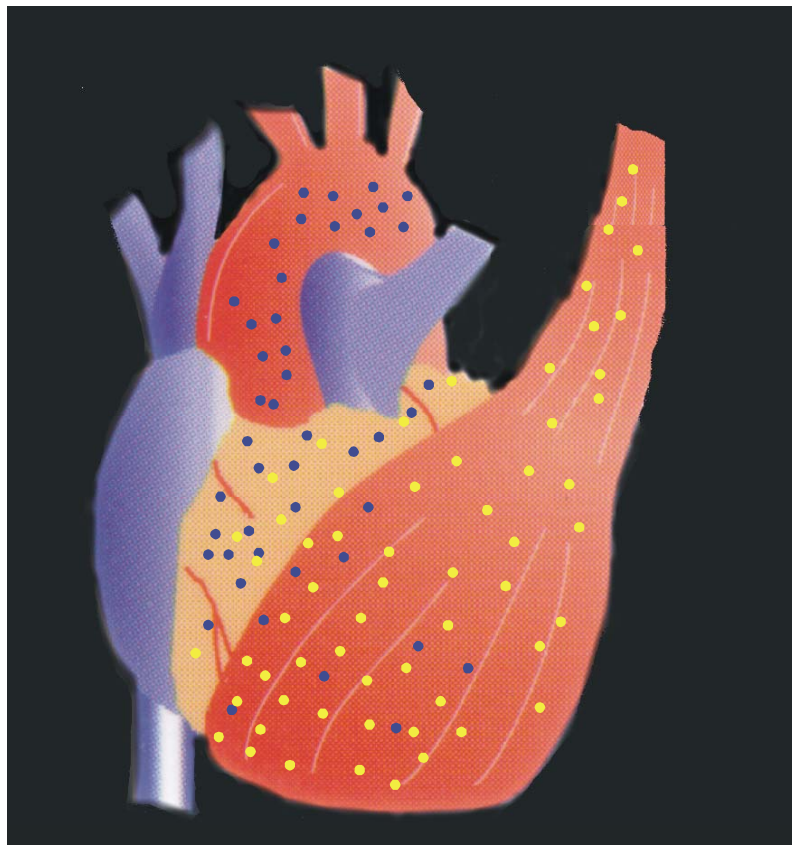


Figura 13 – Ilustração esquemática do fluxo colateral entre o grande dorsal e o miocárdio.

2.6.7 Reprodutibilidade do método

Após a adição do hidróxido de sódio, 100 μ l de uma suspensão de esferas brancas (50.000 esferas/ml) foram adicionadas em cada tubo contendo os tecidos ou o sangue. A mesma quantidade foi colocada em cinco tubos vazios para servirem como padrões. Os tecidos foram processados conforme descrito nos itens acima. Os tubos contendo apenas as esferas brancas foram lavados com 1,9 ml de etanol 100% e centrifugados por 15 minutos à 2000g. Os sobrenadantes foram aspirados restando 100-200 μ l que foram colocados em estufa para evaporação durante a noite. O corante foi extraído com 500 μ l de dimetilformamida e a absorbância das amostras e dos padrões foram lidas a 370 nm utilizando uma cubeta de 0,7 ml. A figura 14 mostra a

absorbância (370 nm) de 5000 microesferas brancas nos padrões comerciais e experimentais e nos tecidos digeridos dos animais estudados. Os valores de absorbância semelhantes obtidos entre as diferentes amostras comprovam a reprodutibilidade do método das microesferas coloridas, demonstrando que não há perda de microesferas ou problemas no processamento das amostras.

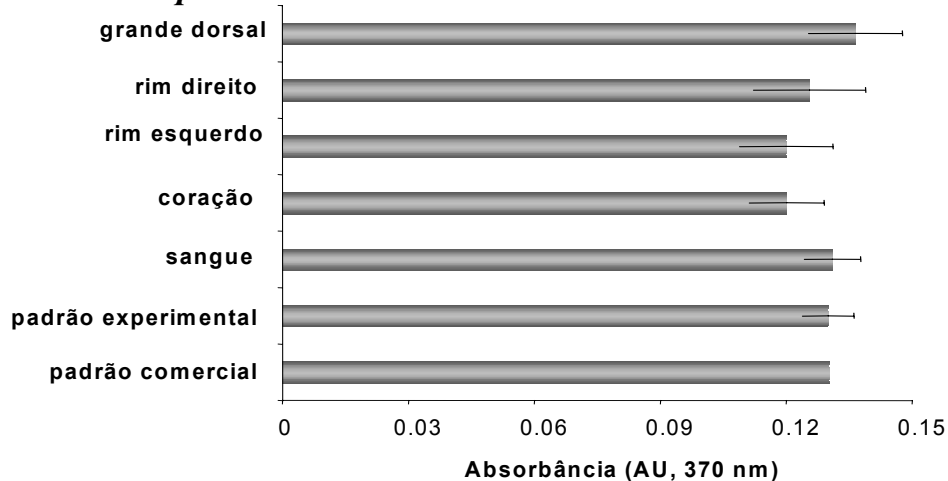


Figura 14- Absorbância (AU, 370 nm) de 5000 microesferas brancas nos padrões comerciais e experimentais e nos tecidos digeridos. Observe que não houve diferença nas medidas, demonstrando reprodutibilidade do método.

2.6.8 Determinação da resistência vascular regional

A resistência vascular regional (mmHg/ml/min/g) foi determinada para cada tecido pela razão da pressão arterial média pelo fluxo sanguíneo para o tecido.

2.6.9 Determinação do Volume Sistólico

O volume sistólico (ml) foi determinado pela razão do débito cardíaco pela frequência cardíaca do rato.

2.6.10 Determinação da Resistência Vascular Sistêmica

A resistência vascular sistêmica (mmHg/ml/min/kg) foi determinada pela razão da pressão arterial média pelo índice cardíaco.

2.7 Análise dos Sinais

2.7.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde calculou-se média e desvio padrão de PAM, PAS, PAD e FC para cada animal.

2.7.2 Derivada de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo

A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a derivação da onda de pressão ventricular esquerda e detecção de máximos e mínimos destas curvas batimento a batimento, fornecendo os valores das derivadas de contração ($+ dP/dt$) e de relaxamento ($- dP/dt$). Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrão dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde calculou-se média e desvio padrão da $+dP/dt$ e da $-dP/dt$ para cada animal.

2.7.3 Pressão ventricular

A máxima pressão ventricular sistólica foi determinada utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a

detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão ventricular sistólica (PVS).

A pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF) foi determinada pela detecção manual do ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Foram realizadas no mínimo 10 detecções por registro.

2.8 Avaliações morfométricas

2.8.1 Determinação do peso corporal

O peso corporal foi aferido no início, aos 14 e aos 56 dias do protocolo experimental utilizando uma balança (Marte Balanças e Equipamentos de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil)

2.8.2 Determinação do peso ventricular

Após a infusão das microesferas os animais foram sacrificados e os corações seccionados. O grande dorsal foi cuidadosamente mobilizado do coração nos grupos com CDM. Os átrios e o tecido vascular foram separados dos ventrículos os quais foram limpos e pesados (ABL 104, Mettler Toledo, Switzerland). A parede livre do ventrículo direito foi separada do septum e pesada. O ventrículo esquerdo e o septum foram pesados e nos animais infartados a área infartada foi identificada e separada utilizando-se um tesoura delicada. A área infartada e não infartada do ventrículo esquerdo foram pesadas.

2.8.3 Determinação da razão do peso ventricular/peso corporal

Para determinação da razão peso ventricular/peso corporal o peso ventricular (mg) foi dividido pelo peso corporal (g) do animal.

2.9 Avaliações histológicas

2.9.1 Avaliação da adesão pós-cardiomioplastia

A avaliação da adesão do grande dorsal ao miocárdio foi realizada através da observação macroscópica. Além disto, foi utilizado um sistema de análise de microscopia que consistia de um sistema óptico Leica (Image Processing and Analysis System, Leica, Cambridge, England) com objetiva que proporcionava aumento de até 200x associado ao software Quantimed 500 (Qwin 500, Leica, Cambridge, England) que permitiu a observação mais detalhada do tecido e vascularização formadas entre o miocárdio e o grande dorsal.

2.9.2 Avaliação do tamanho do infarto do miocárdio

Um grupo de 4 ratos foi sacrificado após 14 dias de IM e coração foi retirado, lavado em solução fisiológica, pesado e fixado em solução de formol tamponado a 10 %. Os ventrículos foram dispostos em cassetes plásticos para posterior processamento. O processamento consistiu em desidratação, diafinização e parafinização do tecido analisado. Então, o material foi incluído em blocos de parafina e foram realizados cortes histológicos em micrótomo (4 µm). Os cortes foram corados com tricrômico de Masson que permite a avaliação da deposição de colágeno e o estudo da região de fibrose. Através de um sistema de microscopia que consistia de um sistema óptico da Leica (Image Processing and Analysis System, Leica, Cambridge, England) com objetiva que permitia um aumento de até 200 x associado a um software Quantimed 500 (Qwin 500, Leica, Cambridge, England) foi determinada a área e extensão do IM pelas fórmulas abaixo.

$$\text{Área do IM (\%)} = \frac{\text{Área infartada do VE (mm}^2\text{)}}{\text{Área total do VE (mm}^2\text{)}} \times 100$$

$$\text{Extensão do IM (\%)} = \frac{\text{PE infartado do VE (\%)} + \text{PI infartado do VE (\%)}}{2}$$

Onde,

$$\text{Perímetro externo (PE) infartado do VE (\%)} = \frac{\text{PE infartado do VE (mm)}}{\text{PE infartado do VE (mm)} + \text{PE não-infartado do VE (mm)}}$$

PE infartado do VE (mm) + PE não-infartado do VE (mm)

$$\text{Perímetro interno (PI) infartado do VE (\%)} = \frac{\text{PI infartado do VE (mm)}}{\text{PI infartado do VE (mm)} + \text{PI não-infartado do VE (mm)}}$$

PI infartado do VE (mm) + PI não-infartado do VE (mm)

Para determinação do tamanho do infarto a cicatriz da parede ventricular foi cuidadosamente separada do restante do ventrículo esquerdo. Ambos cortes foram carimbados em sua face externa e posteriormente delimitados em um papel milimetrado. O papel milimetrado foi cortado e pesado, sendo o tamanho do infarto (%) determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Tamanho do Infarto (\%)} = \frac{\text{Peso do papel com a área infartada}}{\text{Peso do papel com a área infartada} + \text{peso do papel com a área não-infartada}}$$

Peso do papel com a área infartada + peso do papel com a área não-infartada

2.9.3 Imunohistoquímica

Para imunohistoquímica foram utilizados corações, com ou sem cardiomioplastia, dos grupos C-56 (n=2), IM-56 (n=2) e VEGF-IMCDM (n=2). Os corações foram fixados em formalina (4 C° overnight) desidratados e embebidos em parafina. Secções transversais de 6µm foram cortadas, desparafinizadas em xileno e rehidratadas para imunohistoquímica. A presença de músculo liso vascular foi detectada através de anticorpo primário policlonal de coelho contra a actina alfa de músculo liso (Anti Alpha Smooth Muscles Actin, A-2547, Sigma, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, título 1:500). A reação foi continuada utilizando-se um “pool” de anticorpos conjugados à peroxidase (kit LSAB da DAKO) e visualizada após coloração com diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram ainda contra-coradas por 1 minuto em hematoxilina de Harris.

2.10 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foram calculadas as médias e erros padrões das médias. Diferentes testes estatísticos foram utilizados para comparação das médias dos grupos e estabelecer correlações conforme descrito abaixo. Para nível de significância estatística considerou-se $p < 0,05$.

2.10.1 Teste T de Student

O teste t de Student foi utilizado para comparação entre as médias dos grupos:

- 1) C-56 vs. S-IMCDM
- 2) IM-56 vs. IM-SCDM

2.10.2 Análise de variância de uma via (ANOVA one way)

A análise de variância de uma via foi utilizada para a comparação dos grupos submetidos a CDM, ou seja, C-CDM, IM-CDM e VEGF-IMCDM. Este teste foi utilizado também para comparar o tamanho do infarto do miocárdio.

2.10.3 Análise de variância de duas vias (ANOVA two way)

A análise de variância de duas vias foi utilizada para comparação dos grupos:

- 1) C-14, IM-14, C-56, IM-56
- 2) C-56, IM-56, C-CDM e MI-CDM.

2.10.4 Correlação e regressão linear

O teste de regressão linear foi utilizado para testar correlação entre os dados individuais.

4. DISCUSSÃO

O objetivo desta tese foi estudar os efeitos da cardiomioplastia associada ao tratamento com VEGF₁₆₅ em parâmetros hemodinâmicos, sistêmicos e regionais, e morfométricos, no desenvolvimento de fluxo colateral extramiocárdico e no tamanho do IM de ratos infartados. O modelo de estudo foi sistematizado e aplicado em diferentes tempos de IM, com ou sem cardiomioplastia, tratados ou não com VEGF. O uso da ligadura coronária permite traçar paralelos entre modelos experimentais e o IM em humanos. Alterações histológicas e formação de cicatriz após IM são comparáveis em humanos e ratos, tornando-se evidentes na fase crônica (Fishbein et al., 1978). Além disso, em ambos, humanos (Mathey et al., 1974) e ratos (21 dias de IM) (Pfeffer et al., 1979), a disfunção do VE depende do tamanho do infarto.

Ao contrário do IM que é um modelo experimental estabelecido na literatura para pequenos animais, a cardiomioplastia em ratos não havia sido padronizada, havendo apenas um trabalho na literatura que estudou o crescimento de ratos submetidos a esta cirurgia (van Doorn et al., 1996). No presente trabalho foi padronizado o modelo de cardiomioplastia crônica sem estimulação do grande dorsal. O desenvolvimento e aplicação deste modelo permitiu o estudo dos efeitos da utilização de um enxerto muscular na disfunção ventricular e na revascularização do miocárdio infartado. A aplicação de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD possibilitou a determinação do efeito deste fator angiogênico na neovascularização entre o miocárdio isquêmico e o enxerto muscular. Os principais achados deste trabalho demonstram que a

disfunção e o aumento de massa ventricular esquerda observadas em ratos com 8 semanas de IM podem ser prevenidos pela cardiomioplastia, que quando associada a uma única administração de VEGF₁₆₅ no GD induz diminuição do tamanho do IM.

4.1 Considerações metodológicas

4.1.1 Os modelos experimentais utilizados

O IM experimental pôr ligadura coronariana foi utilizado no presente estudo pois está bem estabelecido na literatura que este procedimento provoca isquemia miocárdica e inicia um processo de disfunção e remodelamento do VE, além de induzir a formação de colaterais no coração (Pfefer et al., 1991; Banai et al., 1994ab; Elsner & Riegger, 1995; Unger et al., 2001). Devido a sua relevância clínica e uma relativa facilidade metodológica, a insuficiência cardíaca induzida pelo IM é um dos modelos mais utilizados nos trabalhos com animais de pequeno porte (Elser et al. 1995). Entretanto, as desvantagens de utilizar esse procedimento experimental incluem a necessidade de toracotomia, uma mortalidade relativamente alta durante o procedimento cirúrgico e nas primeiras horas pós IM (~ 30% neste estudo), e a indução em muitos casos de uma IC moderada. A extensão do infarto dependera em grande parte da eficiência do tecido miocárdico em formar a circulação colateral, a qual oferecerá um fluxo alternativo para as regiões isquêmicas. Nestes estudo obteve-se IM (~ 35% do VE), acompanhado de um grande aumento da PDF e de disfunção contrátil no grupo de 56 dias de IM.

O uso da cardiomioplastia como modelo de enxerto muscular baseou-se no fato de estudos anteriores da literatura terem demonstrado os benefícios da compressão passiva do GD no miocárdio isquêmico, além do surgimento de vasos entre o coração

insuficiente e o GD em pacientes e em cães (Mott et al., 1996; Mannion et al., 1996; Bailey et al., 1993). Neste contexto, a aplicação da proteína VEGF₁₆₅ teve por objetivo estimular a formação de colaterais no miocárdio isquêmico de ratos.

Os grupos Sham foram realizados a fim de demonstrar que as alterações decorrentes do IM, da CDM e da aplicação de VEGF₁₆₅ não se deviam ao estresse cirúrgico ou a mudanças no índice de mortalidade dos ratos. De fato, os resultados observados nos grupos S-CDMIM e IM-SCDM, demonstram que os procedimentos cirúrgicos não afetaram os resultados obtidos nos demais grupos experimentais.

4.1.2 A utilização do VEGF₁₆₅

A opção de aplicação do VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD baseou-se na tentativa de associar o efeito passivo de “girdling” produzido pelo GD na CDM a um estímulo angiogênico para o próprio GD e também para o coração isquêmico através da formação de vasos colaterais extramiocárdicos. Além disso, a administração intracoronariana poderia induzir alterações sistêmicas como hipotensão (Hariawala et al., 1996; Lopez et al., 1997), crescimento de tumores ou exacerbação da proliferação de retinopatias (Aiello, 1997), aterosclerose (Moulton et al., 1999) e alterações ósseas e renais (Mazue et al., 1992).

O uso da terapia angiogênica tem por objetivo induzir neovascularização usando potentes fatores angiogênicos, sem provocar efeitos sistêmicos. A aplicação intravenosa ou intracoronariana de FGF-2 leva a uma deposição no miocárdio em torno de <0,6 ou 1,5 %, respectivamente, da dose total injetada no miocárdio isquêmico 1 hora após a administração (Laham et al., 1999). Após 24 horas estes valores são reduzidos para <0,1% da dose administrada. Post e colaboradores (2001), estimaram que da administração intracoronariana de 200µg de FGF-2, 200 ng (0,1%) ou 4ng/ml

(considerando que uma coronária irriga 150 gramas de tecido) permaneceriam no tecido após 24 horas. Estas doses estão próximas as concentrações eficientes utilizadas em estudos em vitro (Wang, 1996). Desta forma, se estes valores pudessem ser aplicados ao VEGF₁₆₅ e ao GD, poderíamos estimar que da dose de 25µg de VEGF₁₆₅ administradas diretamente na artéria principal do GD, 25 ng (0,1%) ou 75 ng/ml (considerando que o artéria toracodorsal irriga 1 grama de tecido) estariam depositadas no GD 24 horas após a aplicação da proteína.

Esta concentração depositada no GD seria similar à observada em cada infusão intramiocárdica de 10 µg de FGF-2, na qual evidenciou-se retenção em torno de 5% (500 ng ou 50 ng/ml) após 24 horas (Wang, 1996). A maior deposição verificada pela aplicação intramiocárdica em relação a intracoronariana, sugere uma maior eficiência da aplicação intramiocárdica, no entanto, deve-se considerar que esta administração de proteína pode causar lesões devido a sua natureza invasiva, requer equipamentos especializados e alto nível de habilidade do cirurgião (Kornowski et al., 2000), não havendo na literatura resultados convincentes com relação a sua eficiência fisiológica (Post et al., 2001).

A velocidade de infusão do VEGF₁₆₅ foi padronizada a fim de permitir o máximo tempo de contato entre proteína e receptor, evitando o estresse vascular decorrente da injeção in bolus. A dose aplicada foi determinada a partir de estudos prévios da literatura em coelhos (Bauters, 1995).

4.1.3 O método das microesferas coloridas

O uso de microesferas coloridas tem sido cada vez empregado na literatura na determinação do débito cardíaco e dos fluxos regionais. A reprodutibilidade do método exige do usuário atenção e critério em vários procedimentos

experimentais, como por exemplo, agitação com sonificador das esferas antes de qualquer procedimento; cálculo preciso do tamanho do cateter onde serão colocadas as esferas para infusão no animal; constância na infusão das esferas bem como na retirada de sangue do animal; cuidado no processamento dos tecidos a fim de evitar vazamento dos tubos onde as amostras estão sendo processadas. Além disto, deve-se realizar medidas constantes de padrões tanto no hematocítômetro como no espectrofotômetro, a fim de verificar as diluições da solução mãe que serão injetadas no rato, bem como verificar eventuais perdas de solução durante o procedimento de digestão e leitura das amostras de tecido. A comparação de medidas entre esse e o método de esferas radioativas demonstra reprodutibilidade dos valores obtidos em diferentes tecidos (Prinzen & Bassingthwaighte, 2000).

A avaliação do fluxo colateral desenvolvido entre os tecidos pós cardiomioplastia foi possível devido a padronização do número de esferas amarelas infundidas no grande dorsal, bem como a velocidade desta infusão. Em um primeiro protocolo piloto, foram infundidas 150.000 esferas azuis no GD, observando-se a presença constante destas esferas no tecido renal, o que não poderia ser verificado uma vez que a circulação para estes leitos estava ocluída. A padronização desta técnica constituiu a parte mais árdua deste protocolo, fazendo-se várias mudanças durante protocolos pilotos para que os dados foram confiáveis e reprodutíveis. Por fim, padronizou-se: 1) a infusão de esferas amarelas em vez de azuis, pois a absorbância destas esferas é maior para um mesmo número de esferas; 2) um menor número de esferas (50000 vs. 150 000 iniciais); 3) e uma velocidade de infusão também menor. A dificuldade de localização da artéria do grande dorsal pós cardiomioplastia constitui-se sem dúvida em uma limitação deste estudo. Após 6 semanas de CDM observa-se na região da ramificação da artéria toracodorsal formação de tecido de adesão, o que dificultava muito a localização do ramo do GD. Além disto, a pequena área para a

canulação e as várias ramificações desta artéria fizeram com que, mesmo com a marcação do vaso no momento da CDM, em alguns casos as esferas amarelas não fossem infundidas no vaso do GD. Por conseguinte, alguns animais que apresentam avaliação do fluxo do coração para o GD, não o apresentam no sentido inverso.

4.1.4 A determinação do tamanho do infarto do miocárdio

A determinação do tamanho do infarto foi realizada pelo método do papel milimetrado o que permitia a utilização dos corações para avaliação do fluxo coronariano. Desta forma, não foi possível se realizar medidas histológicas destes tecidos, sendo utilizado um grupo de ratos especialmente para a determinação do tamanho do infarto por planimetria. A comparação desta duas técnicas de avaliação da cicatriz do IM, no presente estudo mostra valores semelhantes obtidos pela técnica do papel milimetrado ($35 \pm 3\%$ do VE) e do tamanho do IM avaliado por planimetria (30% do VE) nos ratos com 14 dias de IM. É importante salientar que animais que apresentaram pequenas regiões infartadas, por observação visual, foram excluídos do protocolo.

4.2 Alterações temporais do infarto do miocárdio

4.2.1 Alterações hemodinâmicas

Muitos investigadores tem determinado os parâmetros hemodinâmicos de ratos em diferentes tempos de IM. Diminuição da máxima pressão do VE e da velocidade de contração (+dP/dt), hipotensão e aumento da PDF são constantes achados neste modelo (Fletcher et al., 1981). O prejuízo da função do VE varia da leve disfunção até a insuficiência cardíaca dependendo do tamanho do IM e da dilatação do VE (Dexler

et al., 1985). No presente estudo observamos que os animais infartados (14 ou 56 dias) apresentavam hipotensão em relação aos controles conforme previamente demonstrado na literatura por Mill et al. (1991), Meyrelles e colaboradores (1994) e De Felice e colaboradores (1989). A hipotensão na fase aguda do IAM pode ser devida a um comprometimento do coração isquêmico, com conseqüente redução do débito e/ou redução da atividade simpática periférica sobre os vasos de resistência. De fato, a PVS e a $-dP/dt$ mostraram-se reduzidas no grupo IM-14 em relação ao grupo C-14. Após 56 dias, observou-se uma normalização da PVS, mas a contratilidade ventricular (dP/dt) permaneceu reduzida.

Os resultados deste trabalho demonstram FC semelhantes quando comparados animais cronicamente infartados e animais controles. No entanto, na fase aguda do IAM foi previamente documentada taquicardia, sendo esta atribuída a uma ativação dos pressorreceptores arteriais em face a redução da PA (Guazzi et al., 1975). Hipotensão e taquicardia algumas horas após o IAM foram observadas também em humanos com infarto de parede anterior do VE (Webb et al., 1972).

O DC e o IC mostraram-se reduzidos no grupo IM-56 em comparação ao grupo IM-14, sugerindo maior comprometimento hemodinâmico na fase mais crônica do IM. Todavia, o VS e a RVP mostraram-se semelhantes entre os animais estudados. As modificações de DC e/ou RVP são variáveis quando se comparam diferentes estudos com ratos com tamanhos de infarto similares. Pfeffer e colaboradores (1985b) observaram diminuição do débito ventricular e inalteração da RVP em ratos com área de infarto maior que 42% após 3 semanas de IM. Todavia, Drexler e colaboradores (1985) demonstraram manutenção destes parâmetros após 6 semanas de IM. Inversamente, Pfeffer e colaboradores (1985a) detectaram alterações mais acentuadas tanto no DC como na RVP em ratos com maior tempo de IM (3 meses) e tamanho do

infarto de 40-45% do VE. De acordo com os resultados obtidos, em outro estudo, De Felice e colaboradores (1989) realizando uma avaliação temporal das alterações hemodinâmicas em ratos Sprague-Dawley determinaram inalteração do DC e do IC com 4 semanas de IM (43% do VE) seguida de redução de ambos parâmetros na 7, 10, 20, 35 semanas de IM (43-49% do VE).

Neste estudo foi observado um aumento da PDF nos animais infartados (14 ou 56 dias) em relação aos controles. Ao contrário dos demais parâmetros hemodinâmicos sistêmicos, o aumento da PDF parece ser um achado comum na literatura (Liu et al., 1997; De Felice et al., 1989; Pfeffer et al., 1991; Stefanon et al., 1994). Estudos que acompanharam o curso das alterações hemodinâmicas em ratos de 1 semana até 35 semanas (Liu et al., 1997; De Felice et al., 1989) após o IM demonstraram valores de PDF elevados já na primeira semana de IM que se mantém até a 35^a semana. Ao contrário destes trabalhos observamos que a elevação da PDF é maior no grupo com 56 dias de IM em comparação ao grupo com 14 dias de IM, sugerindo mais uma vez o agravamento da disfunção hemodinâmica com o curso temporal do IM. O aumento da PDF reflete não só uma disfunção da PSV, devido a perda de massa ventricular em função do IM, mas também um prejuízo no relaxamento cardíaco, demonstrado pela redução na $-dP/dt$. Esta disfunção diastólica é difícil de ser quantificada, mas exerce efeitos adversos na perfusão subendocárdica o que leva a uma progressiva disfunção sistólica (Cohn, 1989).

O perfil hemodinâmico compensado nos ratos com 14 dias de IM, demonstrado pelo DC, IC, VS, RVP e FC normais claramente refletem a participação de um ou mais fatores compensatórios. Fatores que podem permitir um DC basal normal incluem o mecanismo de Frank-Starling (onde um aumento da pré-carga pode atuar para sustentar a função cardíaca), aumento da contração miocárdica via aumento da liberação neuronal e adrenal de catecolaminas, hipertrofia cardíaca, diminuição da resistência

sistêmica para a ejeção ventricular, ou estimulação do SRA-aldosterona para promover manutenção de volume sanguíneo (De Felice et al., 1989).

A manutenção do DC por um ou mais destes mecanismos na fase compensada do IM em ratos preserva a perfusão de órgãos vitais como o coração, os rins, o fígado e o sistema gastro-intestinal, sendo a redução destas perfusões aparentemente influenciadas pela redução do DC (De Felice et al., 1989). Corroborando estes dados da literatura, neste trabalho os fluxos sanguíneos e resistências coronarianas e renais mostraram-se inalterados após 14 dias de IM. Inversamente, após 56 dias de IM os ratos apresentaram redução do DC e aumento mais pronunciado da PDF, fase em que foi evidenciada redução do fluxo sanguíneo renal acompanhada de aumento da resistência renal. A manutenção do fluxo e da resistência coronariana independente do tempo de IM e as alterações observadas no presente estudo são semelhantes às verificadas em humanos com insuficiência cardíaca e foram anteriormente observados em ratos Sprague-Dawley (De Felice et al., 1989).

Os fluxos do rim direito e esquerdo foram avaliados para determinar se as microesferas azuis injetadas no VE se distribuíram homoganeamente, uma vez que nesse caso se esperaria fluxo semelhante nos dois rins (Hakkinen et al., 1995; Prinzen & Bassingthwaighte, 2000). Os fluxos renais apresentados pelos diferentes grupos no presente experimento foram semelhantes entre o rim direito e o rim esquerdo, comprovando uma distribuição correta das microesferas azuis. Além disso, a ausência de microesferas amarelas (injetadas diretamente na artéria principal do GD) no tecido renal demonstrou que estas esferas ficaram totalmente fixadas na circulação proveniente do GD e o não ocorreu desvio através das anastomoses arterio-venosas sistêmicas.

4.2.2 Alterações morfológicas e do tamanho do infarto do miocárdio

Infartos severos do VE provocam um remodelamento cardíaco extenso em ratos, alteram a função e vascularização do VE e reduzem significativamente a sobrevivência (Anversa et al., 1986; Fletcher et al., 1981; Sweet et al., 1988). Todavia, já está bem estabelecido na literatura que a extensão destas alterações e os efeitos benéficos das intervenções observadas neste modelo (Dexler et al., 1985; Pfeffer et al., 1985ab; Sweet et al., 1988) podem depender do estado hemodinâmico do rato e se o animal apresenta-se na fase compensada ou descompensada da hipertrofia ventricular. Assim, a função do ventrículo infartado não depende só do tamanho e da localização do IM (Corr et al., 1976; Mathey et al., 1974), mas depende das alterações envolvidas na complacência ventricular, influências neurohumorais, resistência vascular sistêmica e complacência venosa, e da progressão e extensão da hipertrofia no miocárdio não infartado (Pfeffer et al., 1979).

No presente estudo, 14 dias de IM não alteraram significativamente o peso ventricular nos ratos estudados. No entanto, estes animais apresentaram redução do peso corporal e, conseqüente aumento da razão peso ventricular/peso corporal em relação ao grupo C-14. Liu e colaboradores (1997) demonstraram peso corporal, peso cardíaco e razão peso do coração/peso corporal semelhantes entre ratos infartados e controles até 2 semanas após o IM. Todavia, estes autores observaram aumento da massa cardíaca e de sua razão pelo peso corporal de 1 até 6 meses de IM. De fato, os dados do presente estudo corroboram estes achados, pois foi verificado maior massa ventricular nos ratos avaliados após 56 dias de IM. Além disto, o grupo IM-56 apresentou hipertrofia cardíaca, avaliada neste estudo pela razão do peso ventricular/peso corporal.

A ligadura da coronária em ratos causa uma perda em torno de 40% da massa de miócitos do ventrículo esquerdo (Anversa et al., 1985a, Pfeffer et al., 1991, Stefanon et al., 1994) sendo responsável pela hipotensão e redução da fração de ejeção e

do DC após o IM. Em resposta a estas alterações hemodinâmicas, a massa ventricular remanescente se hipertrofia (Anversa et al. 1985b, Meggs et al., 1993). O aumento da PDF determina uma sobrecarga de pressão na circulação pulmonar e, conseqüentemente, um sobrecarga sistólica no ventrículo direito. Possivelmente estas alterações hemodinâmicas são responsáveis pelas hipertrofia no ventrículo direito. (Anversa et al., 1985a, Mill et al., 1992). Hipertrofia nestas câmaras cardíacas foi previamente demonstrada em todos os estudos realizados em ratos com infarto crônico. No entanto, alguns estudos também conduzidos em ratos na fase crônica do IM, falharam em detectar hipertensão pulmonar pela medida da PAS do ventrículo direito em animais anestesiados (Pfeffer et al., 1991, Capasso et al., 1993). Estes achados diferenciados sugerem que outros mecanismos além da sobrecarga sistólica, como a hiperatividade simpática, e/ou o aumento da atividade do SRA, podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Dessa forma, a depressão da hipertrofia ventricular direita após o IM em ratos submetidos a tratamentos crônicos com o β -bloqueador propranolol (Mill et al., 1992) ou captopril, ou com inibidores do SRA (Gay et al., 1990; Mill et al., 1994, Pfeffer et al., 1985ab) reforçam esta hipótese.

Na literatura, o IM é caracterizado de acordo com seu tamanho: inferiores a 20% do VE – pequenos; de 20-39% - moderados; maiores que 40% - grandes (Pfeffer et al., 1985ab, Pfeffer et al., 1991). Apesar da hipertrofia cardíaca compensar o déficit provocado pela morte dos miócitos decorrente do IM na fase inicial deste processo (aproximadamente até duas semanas pós-infarto), cronicamente a hipertrofia ventricular não resulta em melhora da função sistólica do VE avaliada em corações isolados por Mill e colaboradores (1990) e pelo método de angiografia direta para avaliar a função do VE em ratos anestesiados por Liu e colaboradores (1997).

As alterações hemodinâmicas e morfométricas observadas neste trabalho aos 14 dias de IM podem ser associadas com a fase compensada da hipertrofia ventricular. No entanto, aos 56 dias de IM, observa-se uma evolução do quadro de disfunção do VE provavelmente relacionada ao aumento do tamanho do infarto em relação aos 14 dias de IM. Além disso, a PDF atinge valores mais elevados aos 56 dias de IM em relação a 14 dias IM, reproduzindo um estado hemodinâmico compatível com a insuficiência cardíaca.

4.3 Efeitos da cardiomioplastia

Os resultados clínicos de aproximadamente 1000 pacientes submetidos à CDM em todo o mundo demonstraram melhora dos principais sintomas e da classe funcional segundo a “New York Heart Association”, além de modestas alterações nas variáveis hemodinâmicas como na fração de ejeção do VE (Furnary et al., 1996, Moreira e Stolf, 2001), frustrando os investigadores e retardando a consolidação deste procedimento no tratamento de pacientes com ICC (EIOakley & Jarfis, 1994). Inicialmente, trabalhos clínicos e experimentais concluíram que os efeitos da CDM deviam-se a compressão durante a sístole cardíaca que aumentaria a função do miocárdio enfraquecido. Posteriormente estudos sintetizaram os resultados obtidos em trabalhos clínicos e experimentais e revelaram um quadro mais complexo de mecanismos envolvidos na CDM (Oh et al., 1996; Li & Chiu, 1996), sugerindo que principal efeito seria a redução do estresse do miocárdio. Assim, a compressão dinâmica do GD durante a sístole cardíaca foi postulada como um mecanismo importante para a redução do estresse do miocárdio (Lee et al., 1991). Chen e colaboradores (1995) verificaram redução do gradiente de pressão transmiocárdica durante a contração do GD na CDM. Além do papel da CDM durante a sístole, o efeito passivo de constrição do

GD envolto ao coração restringiria a dilatação ventricular, que é um processo bem conhecido da ICC (Capoya et al. 1993). Dessa forma, a prevenção da dilatação ventricular poderia evitar o aumento da tensão miocárdica associada com o aumento do raio da cavidade ventricular de acordo com a lei de Laplace.

4.3.1 Alterações hemodinâmicas

Após 56 dias de CDM os animais controles (C-CDM) apresentaram redução das derivadas de contração e de relaxamento do VE, com manutenção dos demais parâmetros hemodinâmicos sistêmicos. Avaliações anteriores sugerem que a CDM passiva causa depressão de parâmetros dependentes da função sistólica e diastólica em corações normais (Corin et al., 1992; Furnary et al., 1993; Magovern et al., 1991). Corin e colaboradores (1992) evidenciaram inalteração da PDF, redução da $-dP/dt$ e uma redução de 8 vezes na elasticidade passiva. O grupo de Magovern verificou depressão da função do VE imediatamente após a CDM, com 27% de diminuição na PVS e 39% na dP/dt (Magovern et al., 1991). George e colaboradores (1997) demonstraram em corações β -bloqueados de cães diminuição da dP/dt do VE após o envolvimento do miocárdio pelo GD, sugerindo que o músculo GD oferece uma resistência passiva a função ventricular. Os potenciais mecanismos para a disfunção ventricular incluem redução da contratilidade miocárdica, modificações na pré-carga e na pós-carga e nas propriedades diastólicas, provavelmente devido a um aumento de massa ventricular causada pela adição passiva do GD. Dessa forma, se as forças intrínsecas do coração não se alterarem com o envolvimento do GD, o aumento dos efeitos inerciais levarão a uma diminuição da movimentação da parede do VE.

A CDM melhorou a função hemodinâmica sistêmica nos ratos infartados. A hipotensão apresentada pelo grupo IM-56 não foi observada no grupo IM-CDM. O DC

que mostrou-se reduzido no grupo IM-56 em relação ao grupo IM-14, estava normalizado nos grupo IM-CDM. De fato a redução de DC dos animais com 56 dias de IM não foi significativa em relação aos animais controles (\downarrow 26%), e a CDM nos ratos IM induziu uma normalização deste parâmetro (\uparrow 54% vs IM-56). Além disso, o aumento da PDF demonstrado nos ratos infartados (14 e 56 dias) em relação aos controles não foi evidenciado no grupo IM-CDM. Os valores de PDF nos animais infartados submetidos à CDM (\sim 4 mmHg), sugerem que este procedimento preveniu o aumento de PDF dos 14 (\sim 6mmHg) para os 56 dias (\sim 15 mmHg) de IM. No entanto, a reduzida contratilidade do VE nos ratos IM, não foi alterada pela CDM passiva. A diminuição da dp/dt no grupo IM-CDM pode ser atribuída não só a perda de massa ventricular pós-IM com também ao efeito inerte do GD na CDM sem estimulação, ambos levando a disfunção do miocárdio.

Os estudos clínicos da CDM dinâmica demonstraram um pequeno mas significativo aumento da fração de ejeção do VE e do índice de trabalho do VE (Furnary et al., 1996). Após um ano de CDM dinâmica Jatene e colaboradores (1991) verificaram em 13 pacientes aumento da fração de ejeção do VE com estimulação em relação ao período sem estimulação. Entretanto, Patel e colaboradores (1997) verificaram melhora da assistência batimento-a-batimento em corações de cães somente nos fatores independentes dos índices de contratilidade, sugerindo que mesmo na CDM dinâmica o efeito inerte do GD dificulta a melhora nos parâmetros de contratilidade do VE.

Os estudos experimentais com animais de grande porte vem evidenciando uma somatória dos efeitos dinâmicos e passivos da CDM para melhora dos parâmetros hemodinâmicos em modelos de IC (Capouya et al., 1993; Mott et al., 1998; Nakajima et al., 1994, Shirota et al., 2000, Takagi et al., 1997). Ovelhas com 10 semanas de IM submetidas à CDM e avaliadas durante a estimulação e não-estimulação do GD,

demonstraram aumento do índice de contratilidade do VE, e diminuição da área pressão-volume, a qual esta estreitamente correlacionada com o consumo de oxigênio do miocárdio (Nakajima et al., 1994). Patel e colaboradores (1997), evidenciaram que cães com IC submetidos à CDM apresentavam, durante períodos sem estimulação do GD, aumento da elastância ventricular sistólica e estabilização do volume e do índice pressão-volume final sistólico e final diastólico comparados com animais sem CDM. Mott e colaboradores (1998) demonstraram efeitos semelhantes da CDM passiva e dinâmica na função ventricular de cães com IC. A fração de ejeção do VE mostrou-se aumentada e o volume ventricular diastólico final reduzido nos animais com IC e submetidos a CDM dinâmica e passiva em relação aos cães com IC. Apesar dos parâmetros hemodinâmicos avaliados clinicamente em animais de grande porte diferirem dos quantificados no presente estudo em ratos infartados é importante salientar que de acordo com os dados da literatura estes trabalhos demonstram um efeito benéfico da CDM na homeostase sistêmica, principalmente na ejeção e no volume e pressão diastólicos finais do VE. O achado de melhora hemodinâmica neste estudo corrobora os dados da literatura que sugerem um importante papel do efeito de compressão passiva do GD no miocárdio pós- CDM, independentemente da estimulação muscular na sístole.

Clinicamente as indicações da CDM são para pacientes com ICC de classe III causada principalmente por cardiomiopatia isquêmica e idiopática. Experimentalmente a insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio e por marcapasso, vem sendo amplamente utilizados pelos pesquisadores como modelos na tentativa esclarecer os mecanismos de ação da CDM em animais de grande porte. Nestes estudos muitas avaliações da função ventricular e da hemodinâmica sistêmica corroboram os efeitos da CDM, no entanto, as alterações nos fluxos sanguíneos e nas resistências periféricas teciduais pós CDM não foram avaliadas. No

presente trabalho evidenciamos que a CDM sem estimulação do GD não alterou o fluxo sanguíneo coronariano e restabeleceu o fluxo sanguíneo renal em ratos infartados. Provavelmente conforme De Felice e colaboradores (1989) sugeriram, a diminuição do DC observada pós-IM induziu redução de fluxos sanguíneos periféricos por ineficiência da bomba em manter uma perfusão adequada. Assim, a normalização do DC e da PA apresentada pelos ratos infartados submetidos à CDM parece desempenhar um papel importante na normalização do fluxo sanguíneo e na resistência renal.

4.3.2 Alterações morfológicas e do tamanho do infarto do miocárdio

Os animais dos grupos com 56 dias de protocolo apresentaram pesos corporais semelhantes. Van Doorn e colaboradores (1996) estudaram o efeito da CDM no crescimento de ratos Sprague-Dawley, evidenciando redução de peso corporal nos ratos submetidos à CDM e a cirurgia fictícia (com toracotomia) após 20 semanas. Estes autores concluíram que a toracotomia induzia diminuição do ganho de peso corporal nos ratos submetidos a este procedimento. No presente estudo todos os grupos ao final do protocolo (56 dias) apresentaram pesos corporais semelhantes, inclusive o grupo submetido as cirurgias fictícias (S-IMCDM e IM-SCDM) com toracotomia. Apesar de van Doorn e colaboradores (1996) terem realizado avaliações mais tardias (20 semanas) em relação ao presente estudo (8 semanas), a análise do ganho de peso corporal destes ratos Sprague-Dawley evidenciam diferenças no ganho de peso a partir da 5^a semana, sugerindo que diferenças metodológicas durante a toracotomia, sejam responsáveis pelos achados contrastantes.

A CDM nos ratos controles não alterou o peso ventricular nem a razão peso ventricular/peso corporal. Todavia, estudos anteriores demonstraram menor peso do coração em ratos normais avaliados após 20 semanas de CDM (van Doorn et al., 1996).

O aumento da massa ventricular é um achado comum nos animais pós-IM. De fato, no presente estudo evidenciamos maior massa ventricular nos ratos com 56 dias de IM em relação aos controles (C-56) conforme anteriormente discutido. É interessante observar que após 14 dias de IM os animais não apresentavam alteração do peso ventricular em relação aos seus controles (C-14). No entanto, os ratos com 14 dias de IM submetidos à CDM não apresentaram aumento do peso ventricular aos 56 dias. Estes resultados são corroborados pela análise da razão peso ventricular/peso corporal, um índice de hipertrofia ventricular, que se mostrou elevado no grupo IM-56 e normalizada no grupo IM-CDM. Portanto, a CDM parece ser eficiente em impedir a dilatação do VE, apesar de não alterar a evolução da área de infarto.

O papel importante da CDM na hipertrofia ventricular tem sido bastante estudado na literatura e parece ser um dos efeitos mais benéficos e comprovados pós-CDM em humanos e animais. Carpentier e colaboradores (1993) demonstraram um diâmetro cardiorácico estável por mais de 3 anos após a CDM. Em pacientes submetidos à CDM dinâmica foi observado um deslocamento para esquerda da relação pressão-volume sistólico final e uma estabilização da relação pressão-volume diastólico final aos 6 e aos 12 meses pós cirurgia, achados que sugerem uma reversão do processo de remodelamento (Kass et al., 1995). Lorusso e colaboradores (1997) demonstraram uma redução significativa no diâmetro diastólico final em 22 pacientes com 3 anos de CDM dinâmica.

Experimentalmente Capouya e colaboradores (1993) mostraram que a CDM passiva em miocárdios normais submetidos a IC pelo marcapasso ventricular atenuou a dilatação ventricular esquerda. Em cães com CDM crônica, Patel e colaboradores (1997a) verificaram que a CDM dinâmica limita o processo de remodelamento que acompanha a insuficiência cardíaca, e que este efeito pode ser verificado mesmo sem a

assistência sistólica (Patel et al., 1997b). Shirota e colaboradores (2000) mostraram reversão do remodelamento da câmara e melhora da contratilidade do VE e da eficiência de trabalho externo miocárdico em ovelhas com IC dilatada crônica e moderada após 6 meses de CDM dinâmica. Estes achados foram correlacionados a prevenção da dilatação ventricular, o que limita o aumento da tensão de parede (efeito de compressão) com um efeito favorável no consumo de oxigênio pelo coração. O estresse de parede do miocárdio pode ter sido reduzido também pela manutenção da espessura da parede em razão da adição da massa do GD à parede do VE e pela compressão sistólica da parede do VE (Lee et al., 1991; Chen et al., 1995).

Os benefícios da CDM sem estimulação do GD também vem sendo documentados. Em alguns pacientes, o tamanho do coração aparentemente reduziu pós-CDM o que foi descrito como remodelamento reverso por Kass e colaboradores (1995). Interessante no estudo deste grupo foi que um dos pacientes estudados, por problemas técnicos com a estimulação do GD, apresentou alteração do processo de remodelamento miocárdico mesmo sem a estimulação muscular. Hagege e colaboradores (1995) verificaram em pacientes com mais de 1 ano de CDM dinâmica melhora clínica e na fração de ejeção do VE após 24 horas sem estimulação do GD. Resultados similares foram obtidos por Jondeau e colaboradores (1995). Experimentalmente uma série de protocolos realizados por Capouya e colaboradores (1993) e por Mott e colaboradores (1996), confirmaram que a CDM passiva pode atrasar a dilatação ventricular e sustentar a fração de ejeção em cães com insuficiência cardíaca. Capouya e colaboradores (1993) demonstraram que a CDM passiva atenuou a dilatação ventricular esquerda em miocárdios normais submetidos à insuficiência cardíaca pelo marcapasso ventricular. Cabe salientar que os efeitos de compressão passiva do VE podem ser reduzidos pela

atrofia do GD em função da ausência de estimulação muscular (Moreira et al., 1996; Ianuzzo et al., 1996).

Kawaguchi e colaboradores (1992 e 1994) mostraram que um dispositivo artificial de compressão semelhante a produzida pela CDM dinâmica diminuiu o estresse de parede e o consumo de oxigênio do miocárdio. Em trabalhos subsequentes estes autores demonstraram que o aumento da contratilidade e do trabalho externo ventricular pode ser atribuído a contribuição direta da compressão ventricular, diferentemente do consumo de oxigênio miocárdico e do fluxo coronariano os quais não se alteram com a compressão ventricular (Kawaguchi et al., 1997). Todavia, Lee e colaboradores (1991) afirmaram que a redução da estresse de parede do VE pós-CDM é o maior determinante do consumo de oxigênio cardíaco. Vaynblat e colaboradores (1997), estudando o efeito da compressão cardíaca com politetrafluorotilene no modelo de IC induzido por doxorubicina em cães verificaram redução da dilatação ventricular sem melhora da função cardíaca nestes animais. Resultados semelhantes, mas com melhora da fração de ejeção foram posteriormente observados em cães submetidos à contenção cardíaca com Marlex. O uso de músculos autógenos oferecem muitas vantagens em relação a outros materiais sintéticos. Músculos esqueléticos reduzem os riscos de infecção e reações fibróticas além de oferecerem um potencial possibilidade de crescimento vascular em caso de tecidos isquêmicos (Vansat & Muller, 1960; Griffith & Hbats, 1938; Weintstein & Schasiroff, 1936). Além disso, o músculo tem a capacidade de se remodelar auxiliando a manutenção da geometria do coração, o que sem dúvida terá conseqüência na função cardíaca (Oh et al., 1998).

Dessa forma, os achados do presente estudo corroboram os resultados da literatura de redução da hipertrofia cardíaca pelo efeito passivo de compressão do VE. Esta compressão passiva pode ter uma papel importante na hemodinâmica sistêmica

impedindo a disfunção do VE. Jessup, 2000 concluiu após a revisão de trabalhos clínicos e experimentais que os benefícios da CDM devem-se provavelmente a 1 ou múltiplos mecanismos: 1. assistência na sístole ventricular ou aumento sistólico, 2. suporte pressórico crônico do ventrículo esquerdo e/ou efeito do “girdling” dinâmico, 3. melhora do metabolismo energético do miocárdio. A maior parte destes parâmetros não é facilmente quantificável, tornando difícil identificar quais destas alterações participam nos benefícios funcionais observados. Em estudos clínicos, todos os pacientes são submetidos à CDM dinâmica e desta forma torna-se difícil distinguir a contribuição relativa do efeito de compressão passiva do efeito de compressão dinâmica durante a sístole assistida. Apesar disto, a melhora clínica documentada em pacientes com ICC avançada após a CDM sugere que este procedimento deve ser seriamente considerado.

Os registros da Seattle Heart Watch tem ajudado no entendimento das variáveis preditoras e redutoras de sobrevida em pacientes com doenças coronárias (Hammermeister et al., 1979). Uma análise de mais de 300 variáveis derivadas da história clínica dos pacientes demonstrou que o tamanho do VE é um dos mais potentes preditores de sobrevida. Os resultados em animais de experimentação confirmam que a dilatação ventricular é diretamente proporcional ao tamanho do infarto (Fletcher et al., 1981).

Trabalhos recentes da literatura vem pesquisando a viabilidade da cardiomioplastia celular, caracterizada pela implantação de células musculares esqueléticas autólogas para reforçar a estrutura e a função do miocárdio. Atkins e colaboradores (1999) demonstraram que a implantação de mioblastos no miocárdio lesado por congelamento em coelhos melhora as propriedades diastólicas e parcialmente compensa a perda de miócitos. Além disso, Rajnoch e colaboradores (2001) observaram que células satélites implantadas no

miocárdio lesado por cardiotoxicidade em ovelhas sobrevivem por um período de 2 meses e foram associados com um melhora funcional significativa da contração local e global do coração.

Embora no presente trabalho não tenhamos estudado os mecanismos celulares e/ou moleculares envolvidos nos efeitos funcionais da CDM passiva em ratos infartados, nossos achados demonstram a eficiência da CDM em limitar a hipertrofia ventricular e os conseqüentes benefícios hemodinâmicos (sistêmicos e regionais) obtidos com este procedimento, reforçando o papel importante da assistência com o GD na sobrevivência pós IM, conforme mostrado por diferentes autores.

4.4 Efeitos do VEGF

A primeira etapa da CDM, bem como de outros procedimentos de assistência muscular esquelética, é a mobilização do GD, que pode ocasionar isquemia muscular principalmente na porção mais distal deste músculo (Georgiade et al., 1992). Por esta razão, ao ser enrolado e fixado ao miocárdio, por vezes o GD não oferece um suporte à função cardíaca (Palmer et al., 1995). A revascularização do miocárdio pelo GD em pacientes inicia-se somente 6-8 semanas pós-CDM, o que pode ser muito tarde para o benefício de certos pacientes. Além disso, vários trabalhos experimentais demonstraram degeneração do músculo GD após a intervenção cirúrgica e estimulação crônica em cães, ovelhas e porcos (Eloakley et al., 1995; Kratz et al., 1994; Nakajima et al., 1994; Ianuzzo et al., 1996). Observações morfológicas mostram atrofia das fibras musculares, acúmulo de gorduras e de tecido conectivo e redução do diâmetro dos vasos causado por proliferação do músculo liso arterial. Todavia, Ianuzzo e colaboradores (1996) relatam que o evento inicial do processo de degeneração do GD parece ser a isquemia. Dessa forma, parece ser necessário acelerar o processo de aumento de

capilares do GD, levando a um menor trauma cirúrgico e possibilitando o aparecimento de vasos colaterais do GD para o coração (Lucas et al., 1992; Checanov et al., 1996).

No presente estudo a administração de 25 µg de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD no momento da mobilização para a CDM teve por objetivo facilitar o crescimento de novos vasos que conseqüentemente evitariam a injúria inicial tecidual do GD e possibilitariam a neovascularização do miocárdio isquêmico.

4.4.1 Alterações hemodinâmicas

Os ratos submetidos à CDM apresentaram variáveis hemodinâmicas sistêmicas semelhantes. A PA, FC, VS, DC, IC e RVP do grupo infartado que recebeu a aplicação intra-arterial de VEGF₁₆₅ no GD imediatamente antes da CDM foi similar ao observado nos demais grupos com CDM (C-CDM e IM-CDM). Da mesma forma, não foram evidenciadas diferenças significativas na função ventricular esquerda entre os animais submetidos à CDM, com ou sem a aplicação de VEGF₁₆₅. No entanto, a + dP/dt dos ratos do grupo IMCDM-VEGF estava elevada em relação aos IM-CDM (↑ 13%), apesar de reduzida quando comparada aos C-56 (↓ 23%), sugerindo uma melhora, ainda que não significativa, de contratilidade sistólica nos animais tratados com VEGF₁₆₅. Pecher & Schumacher (2000) demonstraram melhora na eficiência da contratilidade miocárdica, na fração de ejeção, e na classe funcional segundo classificação da NYHA em pacientes avaliados após 3 anos da revascularização cirúrgica e submetidos a uma injeção intramiocárdica da proteína FGF. Cabe salientar que a PA e a PDF estavam normalizados no grupo VEGF-IMCDM em relação ao grupo IM-56. A observação dos parâmetros sistêmicos e da função do VE nos animais tratados com VEGF₁₆₅ e submetidos à CDM nos presentes experimentos sugerem que o efeito de compressão do GD no miocárdio infartado, e não a administração do fator angiogênico, seja o

principal fator na melhora hemodinâmica, já que a normalização da PA, DC e PDF foram verificadas no grupo IM-CDM (independente do VEGF).

Na literatura poucos trabalhos estudaram os efeitos dos fatores angiogênicos nos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e na função do VE. A administração de proteínas recombinantes de VEGF e FGF podem induzir hipotensão (Hariawala et al., 1996; Horowitz et al., 1997) por aumentarem a liberação da óxido nítrico sintase (Van Der Zee et al., 1997; Murihara et al., 1998). Este efeito hipotensor resultou na morte de porcos com isquemia crônica miocárdica que receberam injeção intracoronariana da proteína de VEGF₁₆₅ (Hariawala et al., 1996). Os efeitos hipotensores clínicos da administração intracoronariana de FGF estão sendo testados na Phase I (Unger et al. 2000).

Neste estudo, a opção pelo uso do músculo esquelético para a aplicação do VEGF₁₆₅ evita a hipotensão, uma vez que, a administração não é sistêmica, ficando restrita a sua área de atuação no músculo propriamente dito. Além disto, quando a doença coronariana é difusa, o uso do GD pode ser importante na melhora do fluxo sanguíneo, uma vez que, a circulação coronariana é deficitária. Somado a isto o GD tem a vantagem de poder ser manipulado para maximizar o fluxo colateral para o coração e de estar mais integro em relação ao miocárdio que normalmente apresenta disfunção sistólica (Cheng et al., 1991; Lee et al., 1991) e diastólica (Capouya et al., 1993) do VE e conseqüentemente alterações estruturais já bem determinadas.

Unger e colaboradores (2001) em uma revisão recente sobre as avaliações experimentais do desenvolvimento do fluxo colateral afirma que o aumento dos leitos colaterais melhora a perfusão miocárdica, e em última instância, a função do VE. Entretanto, quantificar a função ventricular como resultado benéfico da angiogênese pode não ser a melhor maneira de avaliação, uma vez que o processo angiogênico se

restringe a algumas áreas do miocárdio. No entanto, parece que os investigadores realizam tais medidas com o objetivo de tentar evidenciar alterações funcionais sistêmicas e também devido a familiaridade com estas técnicas. Neste aspecto, é importante salientar que como o processo de angiogênese tende a causar alterações regionais na perfusão do VE, sua repercussão na função ventricular nem sempre é evidente, uma vez que as técnicas para avaliar a função ventricular global provavelmente não tem sensibilidade necessária e adequada para acessar os efeitos da intervenção angiogênica (Unger et al., 2001). De fato, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a função do VE, bem como a hemodinâmica sistêmica, não foram eficientes em detectar os efeitos da administração de fator angiogênico no grupo VEGF-IMCDM; ou seja, não se observaram diferenças importantes em relação ao grupo IM-CDM.

O fluxo sanguíneo renal também não foi alterado no grupo VEGF-IMCDM em relação aos demais grupos submetidos à CDM, estando aumentado em relação ao grupo IM-56. A avaliação da perfusão coronariana, no entanto, mostra que apesar do grupo VEGF-IMCDM apresentar um aumento não significativo do fluxo coronariano em relação aos outros grupos com CDM, o número de esferas no tecido miocárdico estava aumentado e a resistência coronariana reduzida nestes animais em relação ao grupo C-CDM. Estes achados sugerem uma melhor perfusão coronariana nos animais tratados com uma única dose de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD, provavelmente proveniente da circulação colateral desenvolvida pós infarto.

4.4.2. Fluxo colateral

O crescimento de vasos no coração é um processo intenso durante as primeiras fases do desenvolvimento pós-natal. O comprimento e a superfície capilar aumentam 23 vezes mais rápido que a massa cardíaca durante os primeiros 11 dias de

vida de um rato (Olivetti et al., 1980). Aos 45 dias o crescimento de vasos cessa no coração, sendo raramente observado no miocárdio adulto (Rakusan, 1984). Entretanto, em determinadas situações fisiológicas como em resposta ao treinamento físico, exposição à hipóxia ou ao frio (Hudlicka & Brown, 1992) foi demonstrada neovascularização.

A neovascularização é um importante processo associado ao desenvolvimento de vasos sanguíneos colaterais que tem a função de compensar a função vascular comprometida. Vários fatores estão envolvidos no crescimento de novos vasos no coração adulto em situações patológicas (Folkman & Klagsbrun, 1987; Schaper et al., 1990), e a identificação de tais fatores angiogênicos possibilitou o uso destes no tratamento terapêutico. Todavia, deve-se salientar que o uso de fatores angiogênicos em trabalhos experimentais e clínicos só foi possível após o desenvolvimento de inúmeras e sofisticadas técnicas bioquímicas, moleculares e funcionais. A identificação e purificação do VEGF, por exemplo, ocorreu por volta dos anos 70 e 80 (Dvorak et al., 1979; Senger et al., 1983, 1986, 1987; Connolly et al., 1989). A aplicação deste fator na experimentação animal teve de aguardar o desenvolvimento de técnicas que permitissem a produção suficiente da proteína para administração e posteriormente de técnicas de biologia molecular de transfecção gênica deste fator (Epstein 2001). A implicação terapêutica de fatores de crescimento angiogênicos foi definida pelos trabalhos pioneiros de Folkman (1971) e outros autores ao longo das últimas décadas. Seu trabalho evidenciou a participação da neovascularização no desenvolvimento tumoral, e estudos subsequentes estabeleceram o papel de um grupo comum de fatores polipeptídeos na angiogênese natural e patológica. Estes fatores foram altamente conservados nos diferentes mamíferos, com mais de 92% de similaridade nas seqüências gênicas que os codificam (Goldfarb, 1990). Hockel e

colaboradores (1993) foi o primeiro investigador a propor o uso dos processos angiogênicos no tratamento das doenças vasculares que atualmente esta sendo testada em uma grande variedade de condições isquêmicas, não só no coração (Fujita et al., 1988; Hirai et al., 1989; Yanagisawa-Miwa et al., 1992; Quyyumi et al., 1993) ou membros (Chleboun et al., 1992), mas também em enxertos de pele (Khoury et al., 1994), nervos periféricos (Cordeiro et al., 1989) e ossos (Eppley et al., 1988).

Corações de pacientes com angina (Fujita et al., 1997) seguido de IAM (Schwartz et al., 1984; Fujita et al., 1988) tipicamente apresentam grande crescimento de vasos colaterais. A expansão das colaterais pós IM pode melhorar a perfusão miocárdica nas áreas isquêmicas, preservando a viabilidade e função cardíaca (Connolly et al., 1989). A produção de VEGF mostrou-se significativamente aumentada in vitro (Ferrara et al., 1992; Favard et al., 1991) e no coração isquêmico de porcos (Banai et al., 1994a) e ratos (Hashimoto et al., 1994), sugerindo que o VEGF é um mediador natural da neovascularização induzida pela isquemia. O possível papel do VEGF exógeno foi fortalecido pelo aumento de 40% no fluxo sangüíneo colateral no miocárdio em cães submetidos a injeções intracoronarianas de 45µg deste fator, começando 10 dias após o isquemia cardíaca (Banai et al., 1994b). Dessa forma, os resultados de melhora de perfusão coronariana no grupo VEGF-IMCDM sugerem a participação do VEGF₁₆₅ no aumento de fluxo colateral, ou mesmo na manutenção da perfusão das regiões isquêmicas pós IM. Apesar da aplicação do VEGF₁₆₅ ter sido realizada no GD, existem estudos mostrando a atuação angiogênica desta proteína em regiões miocárdicas distantes de sua administração, melhorando não só a isquemia regional, mas também a função dependente do endotélio e a função da parede ventricular nas regiões de aumento de perfusão coronariana (Harada et al., 1996).

Neste estudo foi avaliado o uso do músculo GD, tratado ou não com VEGF₁₆₅, na revascularização indireta do miocárdio infartado de ratos. Alguns trabalhos tem pesquisado o uso de músculos esqueléticos para o tratamento de doenças coronarianas inoperáveis em pacientes (Buckman et al., 1992; Bailey et al., 1993; Mannion et al., 1993). Além disto, a CDM tem sido realizada principalmente em pacientes com cardiomiopatia isquêmica, sendo possível a participação da revascularização indireta na melhora sintomática e de função ventricular em alguns destes indivíduos. Acreditando nessa hipótese, o aumento desta neovascularização através da utilização de fatores angiogênicos, como o VEGF, poderia beneficiar ainda mais estes pacientes.

O fluxo colateral desenvolvido entre os tecidos pós CDM foi avaliado em ambos os sentido (coração-GD e GD-coração) nos presentes experimentos. Analisando estes resultados podemos observar padrões diferenciados na presença destes fluxos nos ratos submetidos à CDM. Enquanto, no grupo C-CDM o fluxo coração-GD ocorre em 71% dos animais (vs. 20% no sentido inverso), no grupo IM-CDM o fluxo GD-coração aparece em 100% dos ratos (vs. 29% no sentido inverso). Estes achados sugerem que o grau de isquemia tecidual foi fundamental na determinação do sentido do fluxo colateral. Assim, o GD transposto, em uma situação de isquemia devido a ligadura de pequenos vasos (Isoda et al., 1995; Georgiade et al., 1992), recebeu irrigação sangüínea via vasos formados de um coração normal no grupo C-CDM. De forma inversa, a maior isquemia ventricular pós IM propiciou a formação de vasos provenientes do GD, provavelmente não tão isquêmico. No grupo VEGF-IMCDM, todos os animais estudados apresentaram fluxo do GD-coração e apenas um animal (83%) não mostrou fluxo no sentido inverso. Estes resultados, sugerem que a injeção da proteína angiogênica VEGF₁₆₅ provavelmente induz reperusão muscular no momento da

transposição, favorecendo não só o fluxo colateral do GD-coração como também de forma indireta, pela melhor perfusão miocárdica, no sentido inverso. Vineberg e colaboradores (1955) demonstraram que o fluxo desenvolvido após o procedimento de Vineberg foi predominante no sentido do tecido cronicamente isquêmico. Um percentual menor de ocorrência foi detectado em estudos anteriores, nos quais aproximadamente somente metade dos animais avaliados apresentavam fluxo do GD para o coração isquêmico (Buckamnn et al., 1992; Bailey et al., 1993). Mannion e colaboradores (1996), evidenciaram fluxo colateral do GD-coração em cinco dos oito bodes infartados com CDM e submetidos a infusões de FGF na artéria subclávica. Os próprios autores destes trabalhos reconhecem que não existe razão para a ausência de colaterais do GD para o coração nestes 3 bodes, uma vez que, os animais foram submetidos aos mesmos procedimento cirúrgicos e possuíam um grande estímulo isquêmico (o miocárdio infartado), sugerindo problemas durante a injeção ou processamento das microesferas (Bailey et al., 1993).

O fluxo colateral foi avaliado no presente trabalho pela razão das microesferas encontradas no coração/ GD (fluxo GD-coração) e no GD/coração (fluxo coração/GD). A secção da veia do GD e a ausência de microesferas amarelas no tecido renal, demonstram que esta infusão foi realizada com eficiência no GD e que as esferas não recircularam, passando ao tecido miocárdico via novas colaterais formadas pós CDM. Da mesma forma, a secção da artéria do GD possibilitou a avaliação do fluxo colateral proveniente do coração para o GD no momento da infusão das microesferas azuis no VE. Os percentuais de fluxo colateral foram avaliados em valores absolutos e normalizados por grama de tecido. A análise normalizada permite detectar alterações que não podiam ser observadas em função da disparidade de massa entre os tecidos cardíaco e do GD. Assim, a massa ventricular usualmente ultrapassava 1 grama de

tecido, ao passo que a massa do GD após 56 dias de CDM estava em torno de 0,5-0,7 gramas nos animais estudados.

Mannion e colaboradores tem estudado a circulação colateral desenvolvida pós CDM em animais de grande porte (Buckman et al. 1992; Bainey et al., 1993 e Mannion et al., 1996). O cálculo de fluxo colateral em ml/min baseou-se em uma primeira injeção de microesferas vermelhas sistemicamente, sem a oclusão da circulação do GD. Uma segunda injeção de esferas azuis foi realizada na artéria do GD e uma terceira (verdes) foi realizada sistemicamente, mas com oclusão da circulação para o GD. Este procedimento permite o cálculo do fluxo colateral em ml/min em ambos os sentidos, todavia deve-se lembrar que os vasos colaterais neoformados em muitos casos apresentam diâmetros reduzidos (Rivard et al., 1999), e as microesferas ao serem injetadas sistemicamente podem obliterar estes pequenos vasos (Unger et al., 2001). Dessa forma, a segunda e a terceira injeções realizadas pelo grupo de Mannion podem subestimar os fluxos colaterais em ambos os sentidos, pois os pequenos neovasos podem estar ocluídos pelas esferas vermelhas injetadas sistemicamente. Esta talvez seja uma das razões pela qual um grande percentual de animais estudados não apresentavam fluxos colaterais, resultado que nem mesmo os autores do trabalho conseguiram explicar, descartando estes da análise de dados. No presente estudo uma única infusão foi realizada no sentido do fluxo colateral, ou azuis (fluxo coração-GD) ou amarelas (fluxo GD-corção), reduzindo o risco de perda de sensibilidade do método em função de uma obliteração prévia. No entanto, deve-se reconhecer que os valores percentuais apresentados no presente trabalho são difíceis de transpor em termos de unidade de fluxo sanguíneo.

O fluxo colateral do GD-corção normalizado foi maior no grupo IM-CDM quando comparado ao grupo C-CDM (\uparrow 5x), no entanto, não foram observadas

diferenças no fluxo colateral do coração-GD. Tais achados foram anteriormente documentados pelo grupo de Mannion em corações isquêmicos de bodes submetidos à CDM passiva (Buckmann et al., 1992). Este fluxo colateral foi significativamente aumentado com a estimulação elétrica do GD (2 Hz) durante 6 semanas pós-CDM (Bailey et al., 1993).

O grupo VEGF-IMCDM apresentou um aumento significativo do fluxo colateral avaliado em termos absolutos (\uparrow 5,5x vs IM-CDM) ou normalizados (\uparrow 8x vs IM-CDM) em relação ao grupo C-CDM e IM-CDM, demonstrando que uma única aplicação de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD pode aumentar a formação de neovasos entre o GD e o miocárdio isquêmico. Além disso, o fluxo normalizado do coração-GD foi maior no grupo VEGF-IMCDM em comparação ao grupo IM-CDM, sugerindo que a melhora de perfusão miocárdica em função da aplicação de VEGF tenha propiciado a formação de neovasos também no sentido inverso. Mannion e colaboradores (1996) evidenciaram que a aplicação de 80 μ g de bFGF na artéria subclávica 4 vezes ao dia durante o período 10-35, associado a estimulação elétrica do GD a partir do 7º dia pós CDM melhoraram a função muscular e duplicaram a formação de colaterais para o coração em relação aos seus estudos anteriores (Bailey et al., 1993).

Este fluxo colateral extramiocárdico observado em corações isquêmicos representa aproximadamente 25% em média do fluxo sanguíneo necessário para um miocárdio normal quando o GD é estimulado agudo ou cronicamente (Mannion et al., 1993 e Bailey et al., 1993). A importância do fluxo colateral extramiocárdico foi enfatizado já há bastante tempo (Hudson et al., 1932). White e colaboradores (1992) concluíram que esta circulação extramiocárdica pode contribuir com mais de 30% do fluxo sanguíneo para a área de risco pós oclusão coronária em situações de fluxo extramiocárdico aumentado. Mannion e colaboradores, 1996 calcularam que

aproximadamente 28% do fluxo da área de risco miocárdico foi proveniente do GD, estimulado e tratado com bFGF, em condições fisiológicas basais.

Correlações positivas foram obtidas no presente estudo entre o fluxo GD-coração e o volume sistólico ($r=0,7$) e o fluxo coronariano ($r=0,7$). Estes achados sugerem que o aumento do fluxo colateral extramiocárdico do GD-coração no grupo VEGF-IMCDM pode estar contribuindo para a melhora da perfusão miocárdica e da própria função ventricular.

Unger (2001) ao discutir os métodos experimentais de avaliação do fluxo colateral conclui que o método das microesferas constitui-se no mais indicado para tais avaliações e a função ventricular esquerda o mais impreciso. Neste estudo foi realizada ainda a observação macroscópica da interface GD-coração, na qual evidenciamos grande adesão e pequenos vasos entre os tecidos. A análise por imunohistoquímica para músculo liso vascular evidencia a presença de grande número de vasos nas regiões adjacentes do GD e do coração, sugerindo que alguns possam ser vasos colaterais extramiocárdicos formados pós CDM. O músculo GD, conforme mostram as figuras 52 e 55, apesar de aparentemente bem vascularizado apresenta desorganização das fibras musculares e infiltração de tecido adiposo conforme previamente documentado em outros estudos (Ianuzzo et al., 1996; Moreira et al., 1993). Além disso, por esta análise microscópica é possível detectar o grande afinamento e desordenação da parede do VE no animal do grupo IM-56 em relação ao grupo C-56 e VEGF-IMCDM.

4.4.3 Alterações morfométricas e do tamanho do infarto do miocárdio

A avaliação do peso ventricular absoluto e normalizado não mostrou diferenças entre os ratos submetidos à CDM, com ou sem administração de VEGF₁₆₅. É importante salientar que o peso ventricular e a razão peso ventricular/peso corporal

estavam reduzidas em relação ao grupo IM-56 (\downarrow 16% e 11%, respectivamente). Estes achados sugerem que a aplicação do VEGF₁₆₅ no GD não desempenhe um papel importante na redução da hipertrofia ventricular observada pós IM. Neste aspecto o efeito de compressão passiva do GD pós CDM parece ser bastante relevante, uma vez que, os dois grupos infartados submetidos à CDM não apresentaram aumento de massa ventricular em relação aos seus controles. A correlação positiva obtida entre a razão peso ventricular/peso corporal e a PDF ($r=0.8$) nos ratos estudados sugerem uma associação entre a disfunção ventricular esquerda e a hipertrofia ventricular pós IM, alterações estas que segundo os dados do presente trabalho podem ser atenuadas de forma significativa pela CDM passiva.

A aplicação de VEGF₁₆₅ no GD apesar de não ter alterado de forma significativa a maior parte dos parâmetros hemodinâmicos e morfométricos avaliados em ratos infartados submetidos à CDM, induziu redução do tamanho do IM em relação aos grupo IM-56 e IM-CDM. Neste aspecto, o desenvolvimento e expansão das colaterais podem melhorar a perfusão miocárdica em áreas de isquemia pós IM, e conseqüentemente a viabilidade e a função cardíaca (Connolly et al., 1989). Yanagisawa-Miwa e colaboradores (1992) demonstraram que a administração de fatores angiogênicos imediatamente após o IM reduzem o tamanho do infarto do miocárdio. Recentemente, Vale e colaboradores (2000) evidenciaram que a transfecção gênica do VEGF₁₆₅ no miocárdio de pacientes com doença coronariana induz aumento da perfusão e redução das regiões isquêmicas do miocárdio.

O fluxo colateral extramiocárdico proveniente do GD parece ter um aspecto fundamental na determinação da evolução da área de infarto dos 14 (35%) para os 56 dias (44%) de IM. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o fluxo GD-corção em animais infartados submetidos à CDM não foi suficiente para suprir as

necessidades das áreas isquêmicas decorrentes do IM. Todavia, a aplicação de uma única dose de VEGF₁₆₅ no GD aos 14 dias de IM e imediatamente antes da CDM, parece impedir a progressão da cicatriz decorrente da morte tecidual por isquemia. Mannion e colaboradores (1996) evidenciaram fluxos do GD-coração que representam 42% do obtido em uma região de miocárdio normal em corações infartados de bodes submetidos à CDM e a aplicação de bFGF. Bailey e colaboradores (1993) verificaram uma correlação positiva entre o fluxo GD-coração e a área isquêmica do miocárdio, e concluíram que o fluxo colateral desenvolvido do GD para o miocárdio foi responsável pela limitação da extensão do infarto na área isquêmica de risco. De fato, resultados semelhantes foram demonstrados no presente estudo, onde maiores valores de fluxo colateral extramiocárdico do GD-coração foram correlacionados com menor tamanho de infarto, sugerindo que este fluxo colateral GD-coração atenua a perda de miócitos na zona isquêmica.

As implicações da redução do tamanho do IM na função ventricular pode ser ilustrado pela correlação positiva obtida entre a área do infarto e a PDF ($r=0,6$) anteriormente documentada na literatura (Pfeffer et al., 1979; Sladek et al., 1996). Além disso, as correlações inversas obtidas entre o tamanho do IM e o volume sistólico ($r=0,8$), bem como com o IC, evidenciam a importância da redução da cicatriz pós IM nas alterações sistêmicas, sugerindo que a perda de massa do VE e aumento da área do infarto estejam associados a menor eficiência do VE em manter a demanda.

Baseado nos mecanismos de ação, a eficiência das terapias farmacológicas ou mecânicas utilizadas para a melhora do fluxo colateral através do aumento da neovascularização pode ser manifestada como: a) melhora da isquemia reversível como resultado do aumento da perfusão colateral; e b) melhora da função ventricular esquerda em razão da melhor perfusão das áreas de “hibernação” do coração (Unger, 2001). Entretanto, cabe salientar que nem todos os estudos realizados com fatores angiogênicos obtiveram sucesso em seus resultados. A via de administração, o número de aplicações,

a escolha pela proteína ou pelo gene, as variáveis analisadas, bem como eventuais efeitos colaterais demonstram que não existe um consenso com relação a melhor forma de utilização da terapia angiogênica (Epstein et al., 2001; Conway et al., 2001; Unger 2001, Post et al. 2001).

Os estudos clínicos preliminares da Fase I e II (Schumacher et al., 1998; Unger et al., 2000; Lazarous et al., 2000; Hendel et al., 2000; Kawasuji et al., 2000; Laham et al., 2000) demonstraram que a administração de fatores angiogênicos é viável. No entanto, os achados são conflitantes com relação a demonstração dos efeitos biológicos. De fato, experimentos bem delineados da Fase II, evidenciaram resultados negativos (Henry et al., 1999). Em face destes achados negativos, o entusiasmo inicial vem sendo substituído por atitudes mais cautelosas. Sem dúvida o resultado de estudos clínicos em andamento estão sendo ansiosamente esperados, mas parece claro que muitos estudos experimentais terão que ser realizados antes de uma aplicação racional e viável da terapia angiogênica.

3. RESULTADOS

3.1 Alterações temporais do infarto do miocárdio

3.1.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

Na tabela 2 e 3 são apresentados os valores médios das avaliações dos registros de pressão arterial e de pressão ventricular esquerda. O grupo IM-14 mostrou redução da PAS, PAD e PAM (Figura 15) em relação ao grupo C-14. No entanto, 14 dias de IM não alteraram a FC, O DC, o VS, o IC e a RVP. A PVS e a contratilidade (+dP/dt e -dP/dt) ventricular estavam reduzidas após 14 dias de IM, enquanto a PDF apresentou-se aumentada quando comparado ao grupo C-14 (Figura 17).

O grupo IM-56 apresentou hipotensão em relação ao grupo C-56, mas a FC foi semelhante entre estes grupos conforme pode ser observado na tabela 2. A figura 15 ilustra a redução da PAM apresentada após 56 dias de IM. Após 56 dias de IM os animais apresentavam aumento da PDF em relação ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 17). A PVS foi similar entre os grupos IM-56 e C-56 (mmHg). Após 56 dias de IM observou-se redução da +dP/dt e da -dP/dt (Tabela 3).

A comparação dos grupos IM-14 e IM-56 demonstra que alterações mais severas são observadas em fases mais crônicas do IM. Assim, o grupo IM-56 apresentou um aumento da PDF em relação ao grupo IM-14 (Tabela 3 e Figura 17), evidenciando o desenvolvimento de um quadro de insuficiência cardíaca. Além disso, o DC e o IC estavam reduzidos após 56 dias de IM em relação a 14 dias de IM (Figura 16 e Tabela 2). A hipotensão e a reduzida contratilidade ventricular observadas aos 14 dias foram

mantidas após 56 dias de IM (Tabela 2 e Figura 15). Os valores de FC, PVS, VS e RVP foram similares aos 14 e aos 56 dias de IM (Tabela 2 e 3).

Tabela 2– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56

| | C-14 | IM-14 | C-56 | IM-56 |
|---------------------------------|-------------|---------------------|-------------|-------------------------|
| PAS (mmHg) | 112 ± 4 | 93 ± 5 [•] | 122 ± 4 | 104 ± 4 |
| PAM (mmHg) | 102 ± 4 | 84 ± 6 [•] | 114 ± 3 | 98 ± 3* |
| PAD (mmHg) | 92 ± 3 | 75 ± 5 [•] | 105 ± 3 | 87 ± 3* |
| FC (bpm) | 377 ± 11 | 323 ± 20 | 355 ± 13 | 345 ± 13 |
| DC (ml/min) | 76,3 ± 8 | 72 ± 9 | 62,5 ± 8 | 49,5 ± 9 [∞] |
| IC (ml/min/kg) | 261 ± 31 | 267 ± 30 | 159 ± 25 | 129,5 ± 27 [∞] |
| VS (ml) | 0,19 ± 0,02 | 0,23 ± 0,03 | 0,18 ± 0,02 | 0,14 ± 0,03 |
| RVP (mmHg/ml/min/kg) | 4,1 ± 0,3 | 4,6 ± 0,5 | 4,9 ± 0,5 | 4,8 ± 0,3 |

Valores representam média ± EPM. C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico; RVP: resistência vascular sistêmica. • P<0.05 em relação ao grupo C-14; *P<0,05 em relação ao grupo C-56; ∞ P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

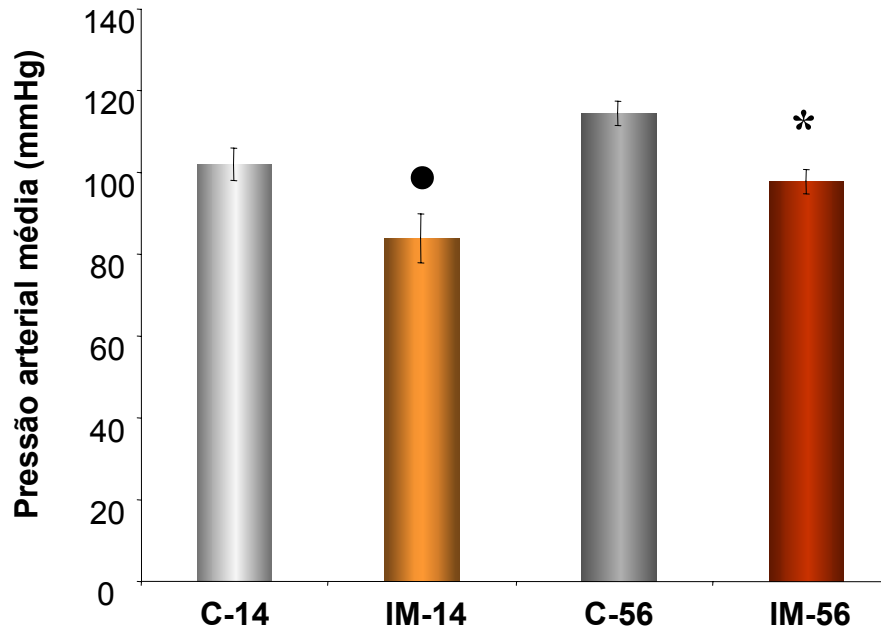


Figura 15– Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-14 (n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). • $P < 0.05$ em relação ao grupo C-14; * $P < 0,05$ em relação ao grupo C-56. (Teste: Anova duas vias)

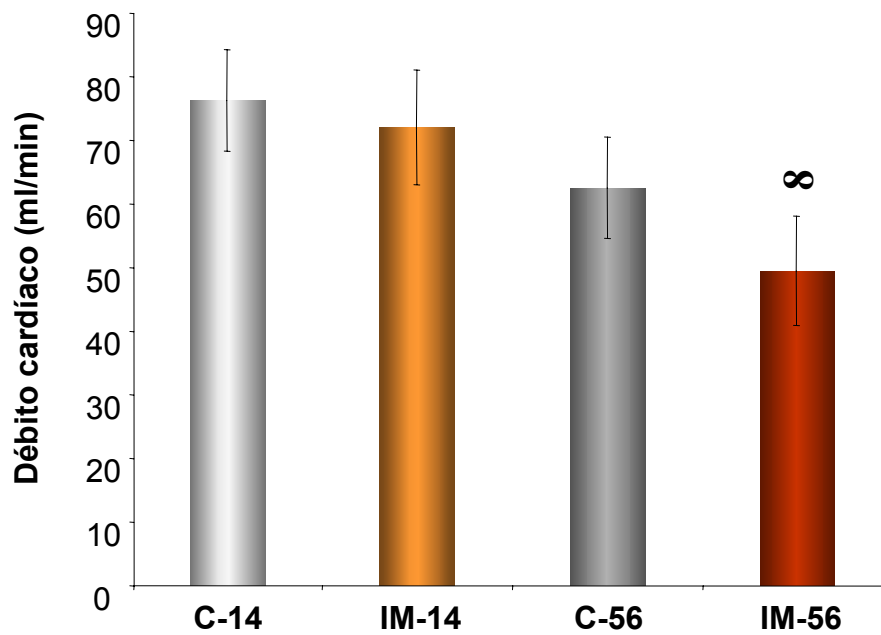


Figura 16– Débito Cardíaco (DC, ml/min) nos grupos C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). ∞ $P < 0.05$ em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

Tabela 3– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56.

| | C-14 | IM-14 | C-56 | IM-56 |
|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|------------------------|
| PVS (mmHg) | 129 ± 6 | 91 ± 3 [•] | 133 ± 7 | 113 ± 9 [∞] |
| PDF (mmHg) | -3,2 ± 0,5 | 6,88 ± 2,6 [•] | 0,5 ± 1,7 | 15,4 ± 2 ^{*∞} |
| + dP/dt (mmHg/Seg) | 4830 ± 265 | 3003 ± 541 | 5420 ± 355 | 4191 ± 354* |
| -dP/dt (mmHg/Seg) | -4141 ± 309 | -2461 ± 415 [•] | -4553 ± 243 | -3062 ± 254* |

Valores representam média ± EPM. C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8).

PVS: pressão ventricular sistólica; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada de contração do ventrículo esquerdo; -dP/dt: derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo. • P<0.05 em relação ao grupo C-14; *P<0,05 em relação ao grupo C-56; ∞ P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

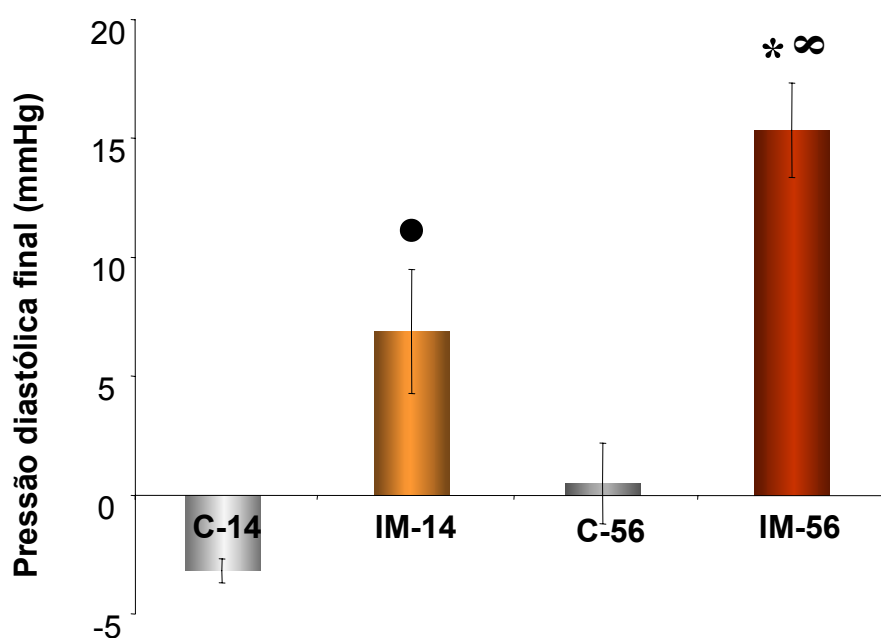


Figura 17– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). • P<0.05 em relação ao grupo C-14; *P<0,05 em relação ao grupo C-56; ∞ P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

3.1.2 Avaliações hemodinâmicas regionais

Os fluxos coronariano e renal não se alteraram após 14 dias de IM (Tabela 4, Figuras 18). O fluxo sanguíneo para os rins estava reduzido após 56 dias de IM em relação ao grupo C-56 e IM-14 (Tabela 4, Figura 18).

Tabela 4– Fluxo sanguíneo (ml/min/g) coronariano e renal nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56.

| | C-14 | IM-14 | C-56 | IM-56 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| Coração (ml/min/g) | 3,29 ± 0,47 | 3,40 ± 0,31 | 4,33 ± 0,42 | 3,59 ± 0,49 |
| Rim direito (ml/min/g) | 3,46 ± 0,54 | 3,49 ± 0,6 | 3,85 ± 0,44 | 2,47 ± 0,44* [∞] |
| Rim esquerdo (ml/min/g) | 3,81 ± 0,43 | 4,10 ± 0,64 | 3,95 ± 0,56 | 2,16 ± 0,51* [∞] |
| Rins (ml/min/g) | 3,63 ± 0,45 | 3,8 ± 0,58 | 3,93 ± 0,41 | 2,32 ± 0,41* [∞] |

Valores representam média ± EPM. C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; [∞] P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

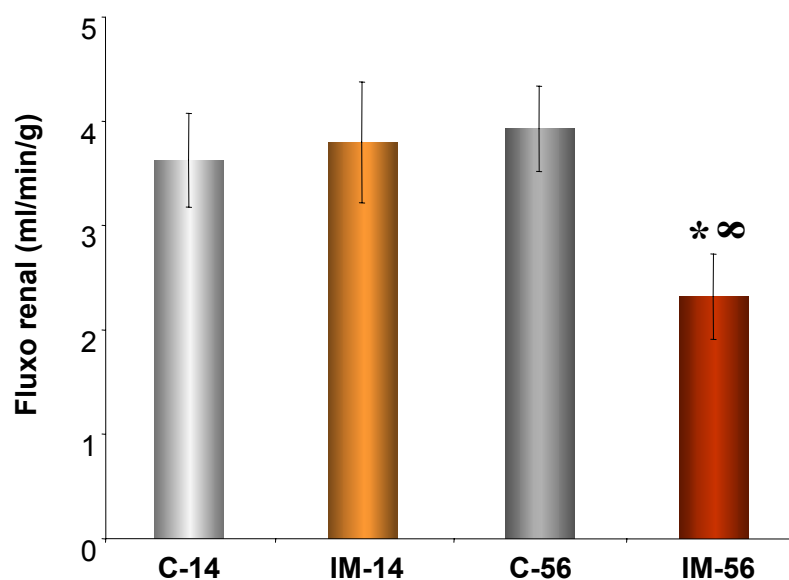


Figura 18– Fluxo renal (ml/min/g) nos grupos C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; [∞] P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (Teste: Anova duas vias)

A tabela 5 mostra o número de esferas azuis nos tecidos cardíaco e renal nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56. O IM não alterou o número de esferas azuis no tecido cardíaco. No entanto, o grupo IM-56 apresentou redução no número de esferas no tecido renal em relação ao grupo C-56 e IM-14.

Tabela 5– Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56.

| | C-14 | IM-14 | C-56 | IM-56 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Coração | 14578 ± 3419 | 12356 ± 2290 | 19553 ± 1888 | 19118 ± 2069 |
| Rim direito | 13047 ± 3000 | 14103 ± 2404 | 15105 ± 1337 | 11486 ± 1232* |
| Rim esquerdo | 14080 ± 2132 | 16843 ± 2787 | 15401 ± 1825 | 10149 ± 1482* |

Valores representam média ± EPM. C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8).

*P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: Anova duas vias)

Conforme pode ser observado na tabela 6 a resistência vascular no tecido coronarino foi semelhante entre os grupos C-14, IM-14, C-56, e IM-56. A resistência renal mostrou-se aumentada no grupo IM-56 em comparação aos grupos C-56 e IM-56.

Tabela 6– Resistências vasculares no coração e nos rins (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-14, IM-14, C-56 e IM-56.

| | C-14 | IM-14 | C-56 | IM-56 |
|---------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| Coração | 36,7 ± 4 | 26,6 ± 2,4 | 28,4 ± 3,44 | 28,1 ± 4 |
| Rins | 30,1 ± 1 | 23,9 ± 5 | 31,84 ± 4 | 41 ± 4* |

Valores representam média ± EPM. C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8).

*P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: Anova duas vias)

3.1.3 Avaliações morfométricas

Os animais com 14 dias de IM ($268 \pm 8,6$ g) apresentaram menor peso corporal em relação aos controles (C-14: 293 ± 11 g), no entanto, o peso foi semelhante entre os grupos IM-56 e C-56 (390 ± 10 vs 385 ± 9 g). O peso ventricular foi similar entre os grupos C-14 ($0,84 \pm 0,03$ g) e IM-14 ($0,85 \pm 0,04$ g) (Figura 19). A razão do peso ventricular/peso corporal foi maior no grupo IM-14 ($3,16 \pm 0,13$ mg/g) em relação aos seus controles ($2,86 \pm 0,02$ mg/g) (Figura 20). Após 56 dias de IM os animais apresentaram hipertrofia ventricular avaliada no presente estudo pelo peso ventricular ($1,3 \pm 0,04$ g) e pela relação pv/pc ($3,37 \pm 0,08$ mg/g) em comparação ao grupo C-56 ($0,98 \pm 0,04$ g e $2,54 \pm 0,09$ mg/g) (Figuras 19 e 20).

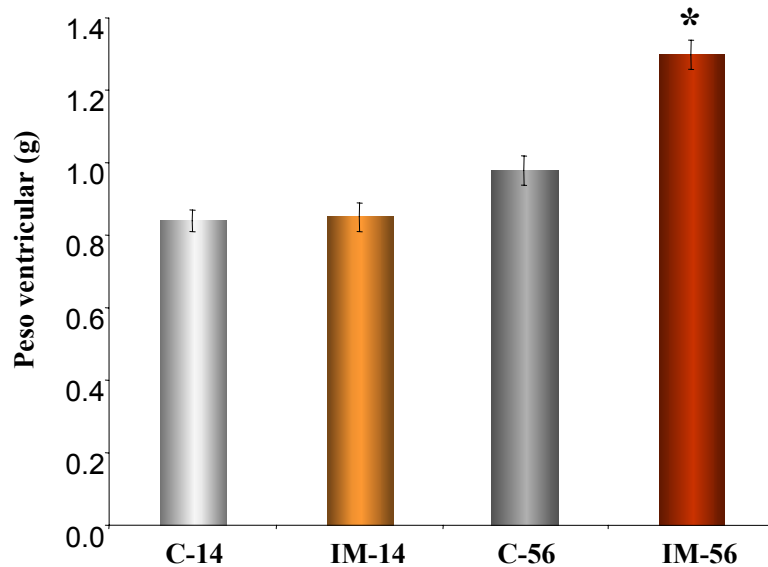


Figura 19– Peso ventricular (g) nos grupos C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; (Teste: Anova duas vias)

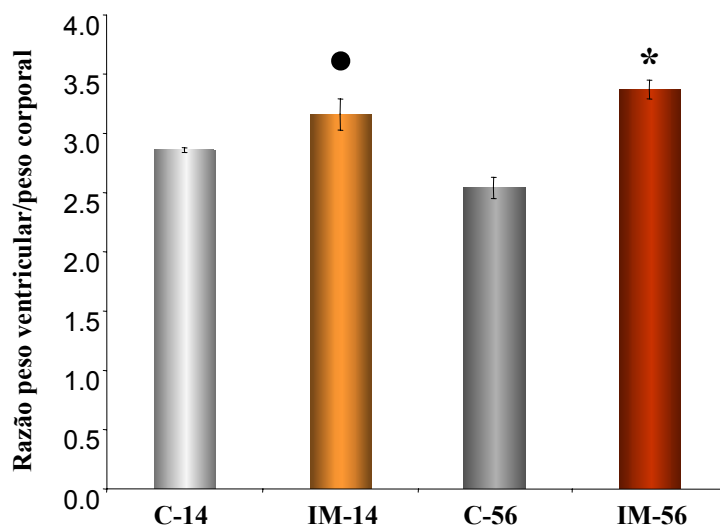


Figura 20– Razão peso ventricular/ peso corporal (mg/g) nos grupos C-14(n=6), IM-14 (n=6), C-56 (n=6) e IM-56 (n=8). • P<0.05 em relação ao grupo C-14; *P<0,05 em relação ao grupo C-56; (*Teste: Anova duas vias*)

3.1.4 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio

O tamanho do infarto foi avaliado pelo método da planimetria em 4 animais. A figura 21 mostra cortes histológicos corados com tricômico de Masson de corações normal e infartado (14 dias de IM). A média do tamanho do IM destes animais foi $30,2 \pm 1,5\%$ do VE e a extensão do IM foi $19,2 \pm 2\%$ do VE.

Nos animais avaliados hemodinamicamente a avaliação do área do infarto pelo carimbo no papel milimetrado evidenciou menor área de infarto nos animais com 14 dias de IM ($35 \pm 3\%$ do VE) em relação aos animais com 56 dias de IM ($44 \pm 2\%$ do VE) (Figura 22).

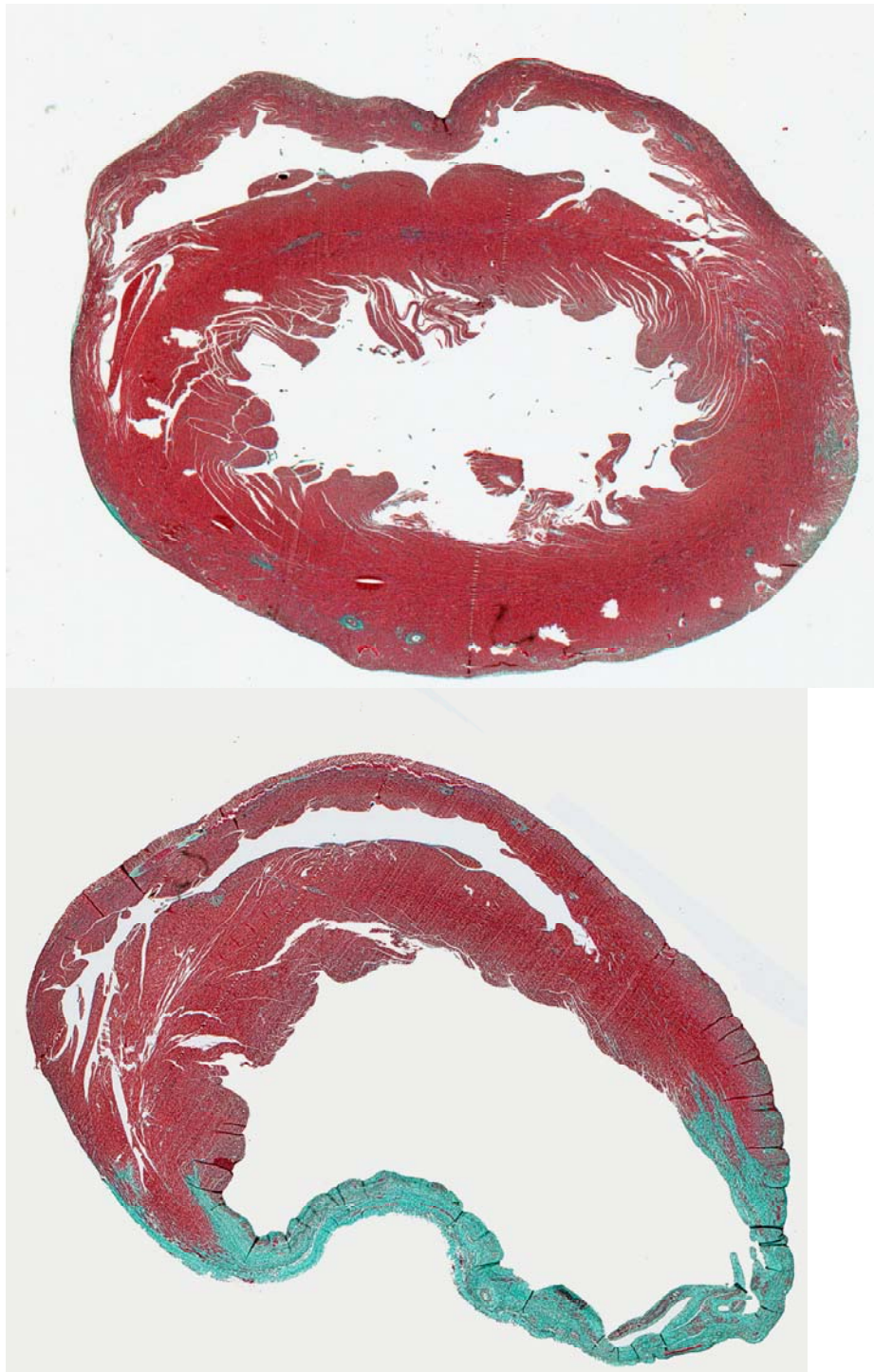


Figura 21 – Fotografia mostrando cortes histológicos do ventrículo de corações normal e infartado (14 dias de infarto do miocárdio). Observe a coloração diferenciada da região infartada na parede do ventrículo esquerdo.

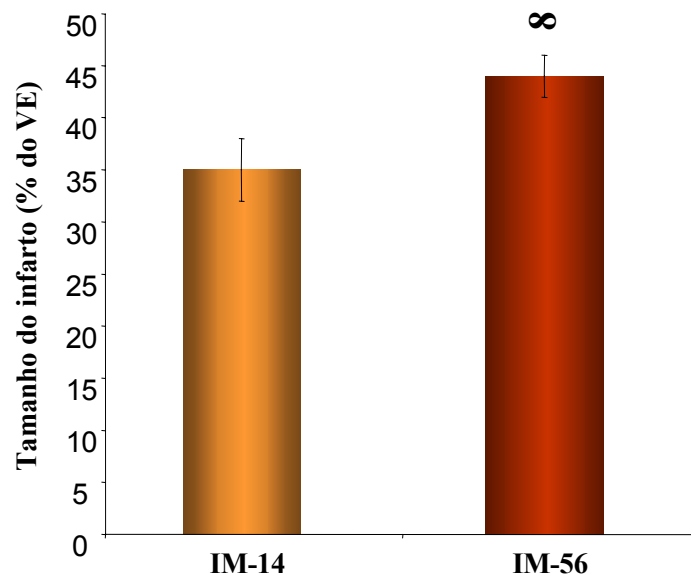


Figura 22– Tamanho do infarto (% do VE) nos grupos IM-14 (n=6) e IM-56 (n=8). ∞ P<0.05 em relação ao grupo IM-14. (*Teste T student*)

3.2 Efeitos da cirurgia fictícia: comparação entre os grupos C-56 e S-IMCDM

3.2.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

Conforme pode ser observado nas tabelas 7 e 8 não foram observadas diferenças entre o grupo C-56 e o grupo S-IMCDM com relação as avaliações de pressão arterial e ventricular. O DC, o IC, o VS, a RVP (Tabela 7) foram semelhantes entre os animais controles e sham operados.

Tabela 7– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-56 e S-IMCDM

| | C-56 | S-IMCDM |
|----------------------|-------------|-------------|
| PAS (mmHg) | 122 ± 4 | 115 ± 2 |
| PAM (mmHg) | 114 ± 3 | 109 ± 2 |
| PAD (mmHg) | 105 ± 3 | 99 ± 3 |
| FC (bpm) | 355 ± 13 | 325 ± 18 |
| DC (ml/min) | 62,5 ± 8 | 74 ± 9 |
| IC (ml/min/kg) | 159 ± 25 | 201 ± 16 |
| VS (ml) | 0,18 ± 0,02 | 0,25 ± 0,03 |
| RVP (mmHg/ml/min/kg) | 4,9 ± 0,5 | 4,1 ± 0,6 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6) e S-IMCDM (n=5). PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico; RVP: resistência vascular sistêmica. (Teste t-student)

Tabela 8– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-56 e S-IMCDM.

| | C-56 | S-IMCDM |
|---------------------------|-------------|----------------|
| PVS (mmHg) | 133 ± 7 | 113 ± 7 |
| PDF (mmHg) | 0,5 ± 1,7 | -0.7 ± 0.9 |
| + dP/dt (mmHg/seg) | 5420 ± 355 | 5650 ± 469 |
| -dP/dt (mmHg/seg) | -4553 ± 243 | -4279 ± 442 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6) e S-IMCDM (n=5).PVS: pressão ventricular sistólica; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada de contração do ventrículo esquerdo; -dP/dt: derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo. (*Teste t-student*)

3.2.2 Avaliações fluxos regionais

Os fluxos sangüíneos coronarianos e renal foram semelhantes entre o grupo C-56 e S-IMSCDM (Tabela 9)

Tabela 9– Fluxos sangüíneos (ml/min/g) coronariano e renais nos grupos C-56 e S-IMCDM.

| | C-56 | S-IMCDM |
|-------------------------|-------------|----------------|
| Coração (ml/min/g) | 4,33 ± 0,42 | 3,68 ± 0,45 |
| Rim direito (ml/min/g) | 3,85 ± 0,44 | 4,33 ± 0,45 |
| Rim esquerdo (ml/min/g) | 3,95 ± 0,56 | 4,34 ± 0,33 |
| Rins (ml/min/g) | 3,93 ± 0,41 | 4,33 ± 0,37 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6) e S-IMCDM (n=5). (*Teste t-student*)

3.2.3 Avaliações morfométricas

Os pesos corporal e ventricular foram semelhantes entre os grupos C-56 e S-IMCDM conforme pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10– Avaliações morfométricas nos grupos C-56 e S-IMCDM

| | C-56 | S-IMCDM |
|---------------------------------------|-------------|----------------|
| Peso corporal (g) | 390 ± 10 | 379 ± 30 |
| Peso ventrículos (g) | 0,98 ± 0,04 | 0,96 ± 0,04 |
| Peso corporal/peso ventricular (mg/g) | 2,54 ± 0,09 | 2,54 ± 0,02 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6) e S-IMCDM (n=5). (*Teste t-student*)

3.3 Efeitos da cirurgia fictícia: comparação entre os grupos IM-56 e IM-SCDM

3.3.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

A tabela 11 mostra os parâmetros hemodinâmicos sistêmicos nos grupos IM-56 e IM-SCDM. O grupo IM-56 foi semelhante ao grupo sham IM-SCDM com relação aos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11– Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos IM-56 e IM-SCDM

| | IM-56 | IM-SCDM |
|----------------------|-------------|-------------|
| PAS (mmHg) | 104 ± 4 | 110 ± 3 |
| PAM (mmHg) | 98 ± 3 | 103 ± 3 |
| PAD (mmHg) | 87 ± 3 | 93 ± 4 |
| FC (bpm) | 345 ± 13 | 353 ± 14 |
| DC (ml/min) | 49,5 ± 9 | 69 ± 4 |
| IC (ml/min/kg) | 129,5 ± 27 | 171 ± 17 |
| VS (ml) | 0,14 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 |
| RVP (mmHg/ml/min/kg) | 4,8 ± 0,3 | 4,1 ± 0,7 |

Valores representam média ± EPM. IM-56 (n=8) e IM-SCDM (n=5). PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico; RVP: resistência vascular sistêmica. (Teste t-student)

Tabela 12– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos IM-56 e IM-SCDM.

| | IM-56 | IM-SCDM |
|--------------------|--------------|----------------|
| PVS (mmHg) | 113 ± 9 | 118 ± 5 |
| PDF (mmHg) | 15,4 ± 2 | 11,5 ± 4,4 |
| + dP/dt (mmHg/seg) | 4191 ± 354 | 4565 ± 116 |
| -dP/dt (mmHg/seg) | -3062 ± 254 | -3337 ± 213 |

Valores representam média ± EPM. IM-56 (n=8) e IM-SCDM (n=5). PVS: pressão ventricular sistólica; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada de contração do ventrículo esquerdo; -dP/dt: derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo. (*Teste t-student*)

3.3.2 Avaliações dos fluxos regionais

Conforme mostra a tabela 13 os grupos IM-56 e IM-SCDM apresentaram valores de fluxo sanguíneos regionais semelhantes.

Tabela 13– Fluxos sanguíneos (ml/min/g) coronariano e renais nos grupos IM-56 e IM-SCDM.

| | IM-56 | IM-SCDM |
|-------------------------|--------------|----------------|
| Coração (ml/min/g) | 3,59 ± 0,49 | 3,03 ± 0,56 |
| Rim direito (ml/min/g) | 2,47 ± 0,44 | 2,91 ± 0,35 |
| Rim esquerdo (ml/min/g) | 2,16 ± 0,51 | 3,03 ± 0,19 |
| Rins (ml/min/g) | 2,32 ± 0,41 | 2,97 ± 0,27 |

Valores representam média ± EPM. IM-56 (n=8) e IM-SCDM (n=5). (*Teste t-student*)

3.3.3 Avaliações morfométricas

Os pesos corporal e ventricular apresentados na tabela 14 foram semelhantes entre os grupos IM-56 e IM-SCDM.

Tabela 14– Avaliações morfométricas nos grupos IM-56 e IM-SCDM

| | IM-56 | IM-SCDM |
|---------------------------------------|--------------|----------------|
| Peso corporal (g) | 385 ± 9 | 365 ± 28 |
| Peso ventricular (g) | 1,3 ± 0,04 | 1,15 ± 0,07 |
| Peso corporal/peso ventricular (mg/g) | 3,3 ± 0,08 | 3 ± 0,15 |

Valores representam média ± EPM. IM-56 (n=8) e IM-SCDM (n=5). (*Teste t-student*)

3.3.4 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio

A cirurgia fictícia de CDM não alterou o tamanho do IM nos animais infartados

(44 ± 2 vs 45 ± 4 % do VE nos IM-SCDM, *Teste t-student*).

Estes resultados demonstram que as manobras operatórias, tais como entubação, ventilação, abertura de tórax, entre outras, envolvidos na cirurgias de IM ou de CDM não determinaram alterações hemodinâmicas, morfométricas ou do tamanho do IM nos animais estudados. Dessa forma, os grupos sham serão excluídos das demais comparações a fim de permitir uma melhor exposição dos dados.

3.4 Efeitos da cardiomioplastia: comparação entre os grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM

3.4.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

Os ratos infartados submetidos à CDM demonstraram melhora dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos em relação ao grupo IM-56. A hipotensão apresentada pelo grupo IM-56 não foi observada no grupo IM-CDM conforme ilustra a figura 23. O grupo IM-CDM apresentou valores semelhantes de PAS, PAD e PAM em relação ao grupo C-56. Os demais parâmetros hemodinâmicos avaliados foram semelhantes entre os grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM (Figura 24 e Tabela 15).

A figura 25 mostra registros originais da pressão ventricular esquerda de ratos dos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM. Na tabela 16 pode-se observar a PVS, a PDF e a dp/dt dos grupos controles e infartados submetidos à CDM. Conforme ilustra as figuras 26 nos animais submetidos à CDM não houve o aumento da PDF observado nos ratos com 56 dias de IM (Tabela 16). A PVS foi semelhante entre os grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM (Tabela 16), no entanto, a contratilidade ventricular estava diminuída no grupo C-CDM, IM-56 e IM-CDM em relação ao grupo C-56 (Tabela 16).

Tabela 15- Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM.

| | C-56 | C-CDM | IM-56 | IM-CDM |
|------------|----------|----------|----------|---------|
| PAS (mmHg) | 122 ± 4 | 114 ± 4 | 104 ± 4 | 116 ± 2 |
| PAM (mmHg) | 114 ± 3 | 107 ± 4 | 98 ± 3* | 106 ± 2 |
| PAD (mmHg) | 105 ± 3 | 94 ± 4 | 87 ± 3* | 95 ± 2 |
| FC (bpm) | 355 ± 13 | 335 ± 13 | 345 ± 13 | 355 ± 9 |

| | | | | |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| DC (ml/min) | 62,5 ± 8 | 77,4 ± 5 | 49,5 ± 9 | 76,4 ± 12 |
| IC (ml/min/kg) | 159 ± 25 | 208 ± 16 | 129,5 ± 27 | 192,5 ± 36 |
| VS (ml) | 0,18 ± 0,02 | 0,25 ± 0,03 | 0,14 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 |
| RVP (mmHg/ml/min/kg) | 4,9 ± 0,5 | 4,1 ± 0,4 | 4,8 ± 0,3 | 4,5 ± 0,8 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico; RVP: resistência vascular sistêmica. *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA duas vias)

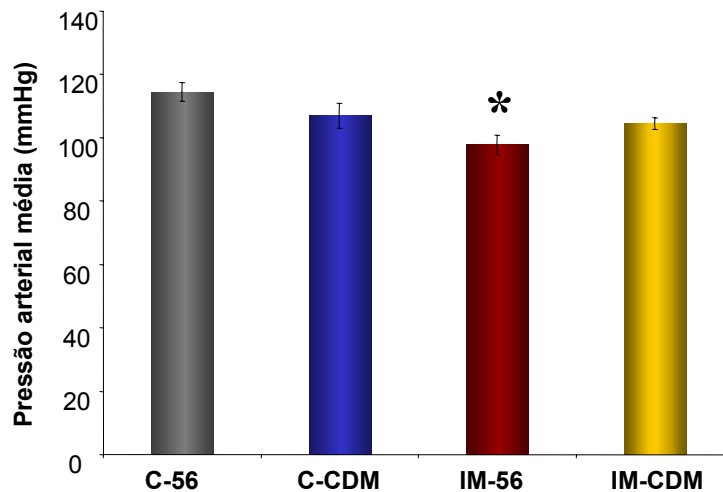


Figura 23- Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA duas vias)

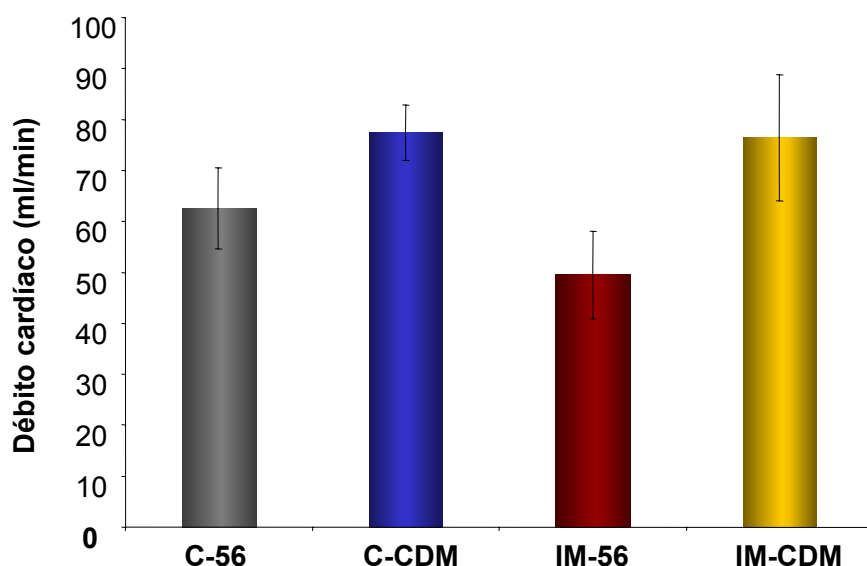


Figura 24– Débito cardíaco (ml/min) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). (Teste: ANOVA duas vias)

Tabela 16– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM.

| | C-56 | C-CDM | IM-56 | IM-CDM |
|---------------------------|-------------|--------------|------------------------|--------------|
| PVS (mmHg) | 133 ± 7 | 119 ± 7 | 113 ± 9 | 116 ± 6 |
| PDF (mmHg) | 0,5 ± 1,7 | -0,4 ± 2 | 15,4 ± 2* [#] | 4,8 ± 1,7 |
| + dP/dt (mmHg/seg) | 5420 ± 355 | 3243 ± 328* | 4191 ± 354* | 3907 ± 358* |
| -dP/dt (mmHg/seg) | -4553 ± 243 | -2560 ± 266* | -3062 ± 254* | -3170 ± 270* |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). PVS: pressão ventricular sistólica; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada de contração do ventrículo esquerdo; -dP/dt: derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo. *P<0,05 em relação ao grupo C-56; #P<0,05 em relação ao grupo IM-CDM. (Teste: ANOVA duas vias)

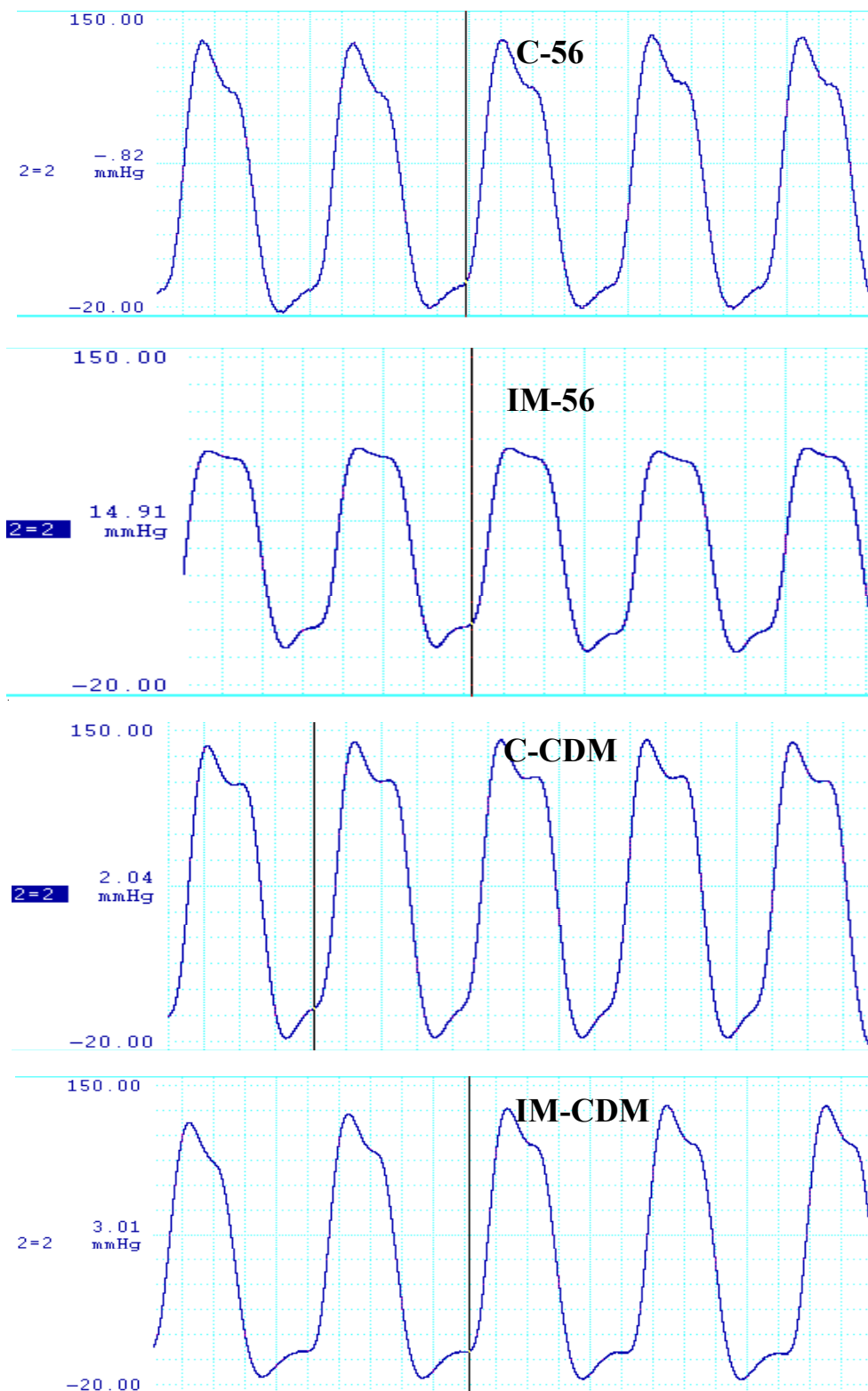


Figura 25 – Registros da pressão ventricular esquerda em ratos dos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM. Observe que o rato do grupo IM-56 apresenta PDF (indicada pelos marcadores) elevada em relação aos demais grupos.

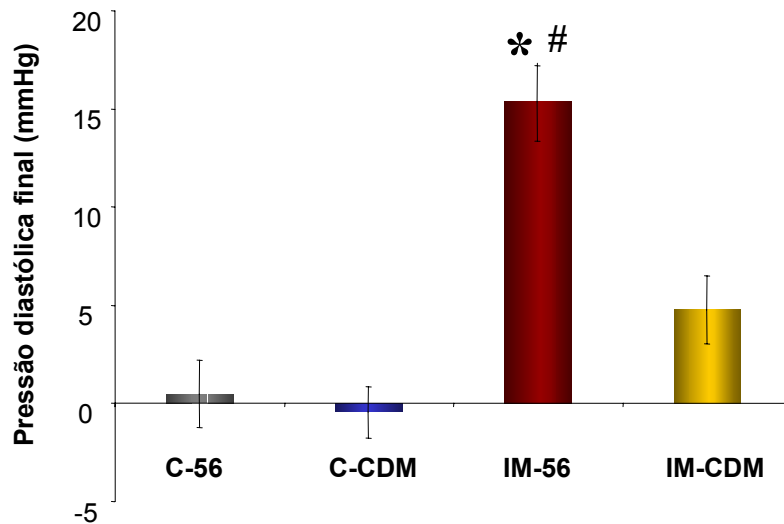


Figura 26– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; #P<0,05 em relação ao grupo IM-CDM. . (Teste: ANOVA duas vias)

3.4.2 Avaliações hemodinâmicas regionais

A CDM não alterou o fluxo coronariano dos grupos controle ($4,33 \pm 0,42$ vs $3,15 \pm 0,39$ ml/min/g nos C-CDM) e infartado ($3,59 \pm 0,49$ vs $3,35 \pm 0,36$ ml/min/g nos IM-CDM) (Figura 27).

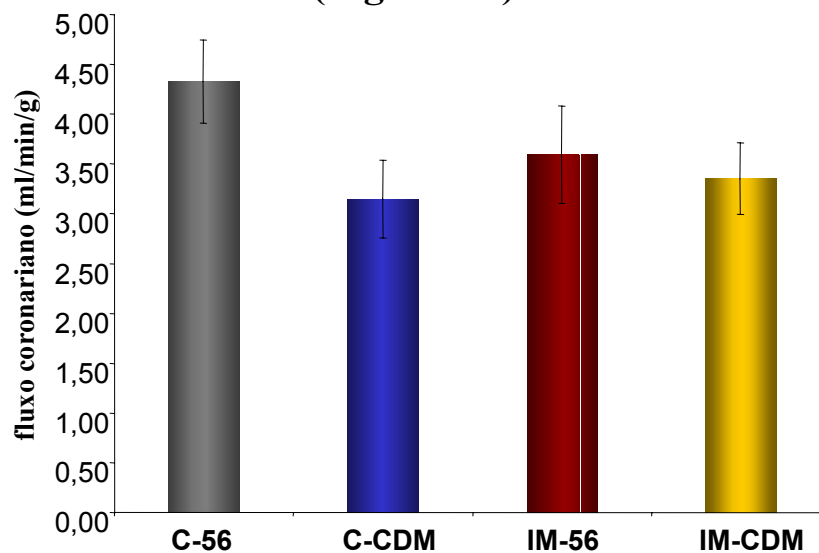


Figura 27– Fluxo sanguíneo coronariano (ml/min/g) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). (Teste: ANOVA duas vias)

Os animais infartados submetidos à CDM tiveram fluxos sanguíneos renais similares aos dos grupos C-56 e C-CDM. A CDM, portanto, preveniu a redução do fluxo sanguíneo para os rins nos ratos submetidos ao IM. (Figura 28 e Tabela 17).

Tabela 17- Fluxos sanguíneos renais (ml/min/g) nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM.

| | C-56 | C-CDM | IM-56 | IM-CDM |
|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| Rim direito | 3,85 ± 0,44 | 2,78 ± 0,34 | 2,47 ± 0,44* | 3,26 ± 0,44 |
| Rim esquerdo | 3,95 ± 0,56 | 3,23 ± 0,6 | 2,16 ± 0,51* | 3,18 ± 0,33 |
| Rins | 3,93 ± 0,41 | 3,06 ± 0,4 | 2,32 ± 0,41* | 3,26 ± 0,38 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA duas vias)

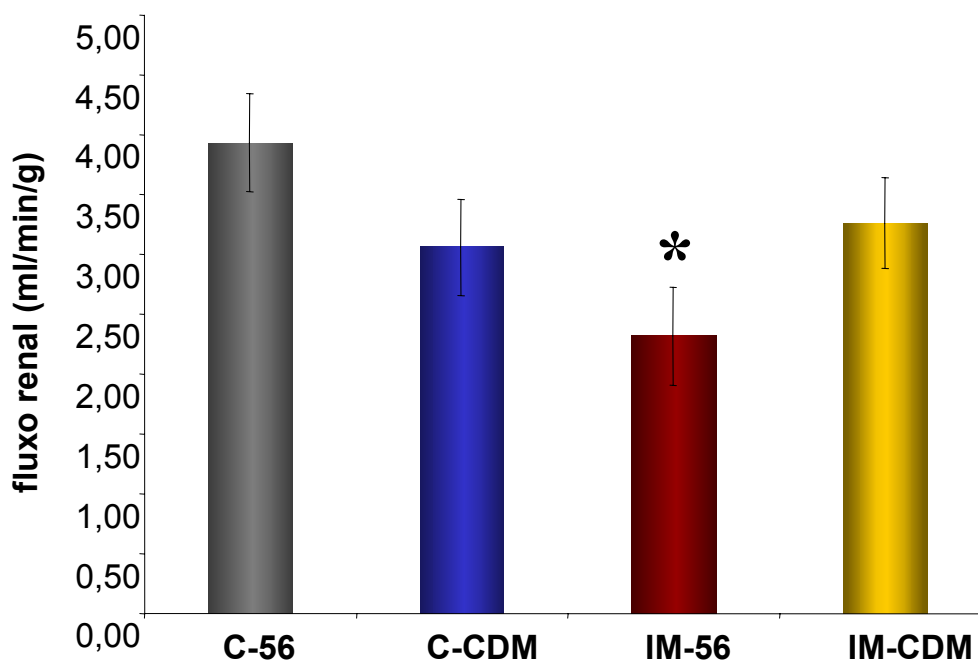


Figura 28– Fluxo sanguíneo renal médio (ml/min/g) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA duas vias)

A tabela 18 mostra o número de esferas azuis nos tecidos cardíaco, renal e muscular nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM. A CDM não alterou o número de esferas azuis no tecido cardíaco nos grupos controle ou infartado. No entanto, a redução no número de esferas no tecido renal apresentada pelo grupo IM-56 em relação ao grupo C-56, não foi observada no grupo IM-CDM.

Tabela 18– Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM.

| | C-56 | C-CDM | IM-56 | IM-CDM |
|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Coração | 19553 ± 1888 | 12761 ± 1740 | 19118 ± 2069 | 13870 ± 1409 |
| Rim direito | 15105 ± 1337 | 12209 ± 974 | 11486 ± 1232* | 15944 ± 932 |
| Rim esquerdo | 15401 ± 1825 | 16040 ± 2235 | 10149 ± 1482* | 16538 ± 1825 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA duas vias)

A CDM não alterou a resistência vascular coronariana nos animais controles (28,4 ± 3,44 vs 37,7 ± 4 mmHg/ml/min/g nos C-CDM) ou infartados (28,1 ± 4 vs 30,6 ± 3 mmHg/ml/min/g nos IM-CDM) (Figura 29). Conforme pode ser observado na tabela 19 a resistência vascular no tecido renal foi semelhante entre os grupos C-56, C-CDM, IM-56 e IM-CDM.

Tabela 19– Resistência vascular (mmHg/ml/min/g) renal nos grupos C-56, IM-56, C-CDM e IM-CDM

| | C-56 | C-CDM | IM-56 | IM-CDM |
|------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| Rins | 31,84 ± 4 | 43,1 ± 4 | 41 ± 4 | 33,97 ± 4 |

Valores representam média ± EPM. C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8).

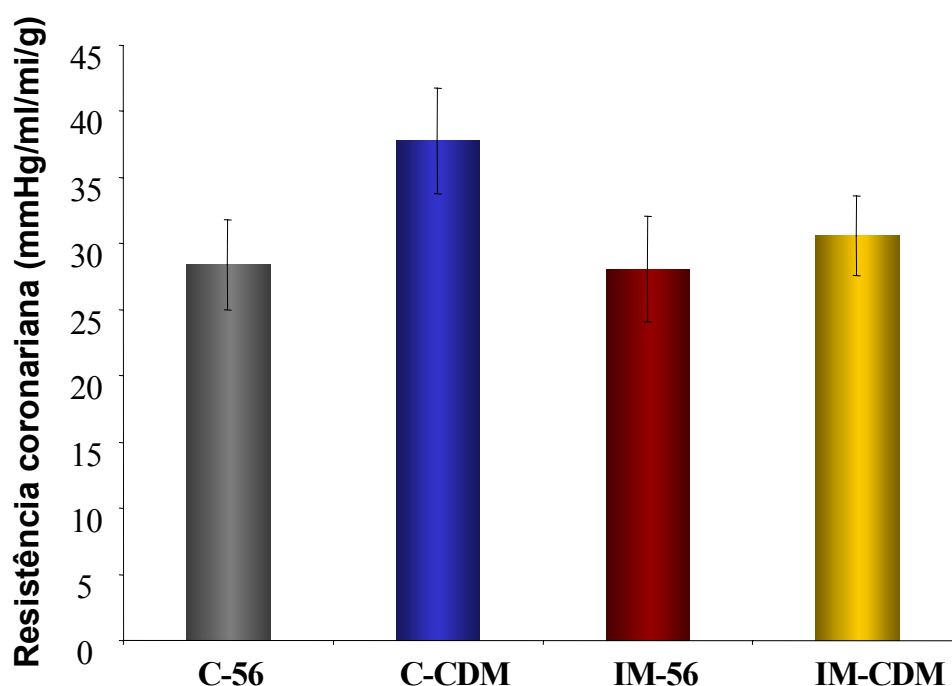


Figura 29– Resistência vascular coronariana (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). (*Teste: ANOVA duas vias*)

3.4.3 Avaliações morfométricas

O peso corporal foi semelhante entre os grupos C-56 (390 ± 10 g), C-CDM (375 ± 9 g), IM-56 (385 ± 9 g) e IM-CDM (374 ± 8 g). A CDM em animais normais não modificou o peso ventricular ($0,98 \pm 0,04$ vs $1,04 \pm 0,04$ g nos C-CDM) nem a razão peso corporal/peso ventricular ($2,54 \pm 0,09$ vs $2,77 \pm 0,09$ mg/g nos C-CDM). O grupo IM-CDM ($1,11 \pm 0,04$ g) apresentou menor peso ventricular em relação ao grupo IM-56 ($1,3 \pm 0,04$ g) não sendo observada hipertrofia ventricular em relação ao grupo C-56 e C-CDM (Figura 30). A razão peso ventricular/peso corporal confirma a menor massa ventricular nos animais infartados submetidos à CDM ($3,37 \pm 0,08$ vs $2,94 \pm 0,09$ mg/g nos IM-CDM) (Figura 31).

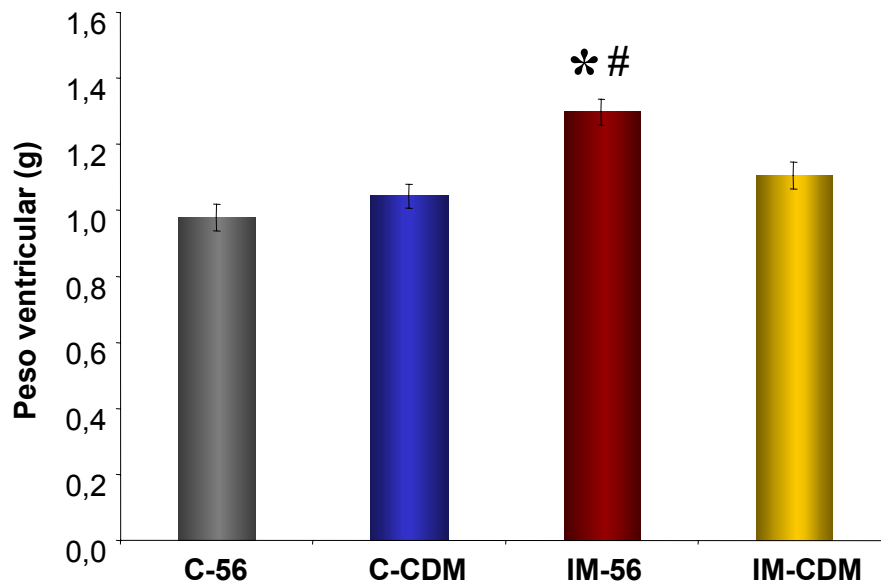


Figura 30– Peso ventricular (g) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; #P<0,05 em relação ao grupo IM-CDM. (Teste: ANOVA duas vias)

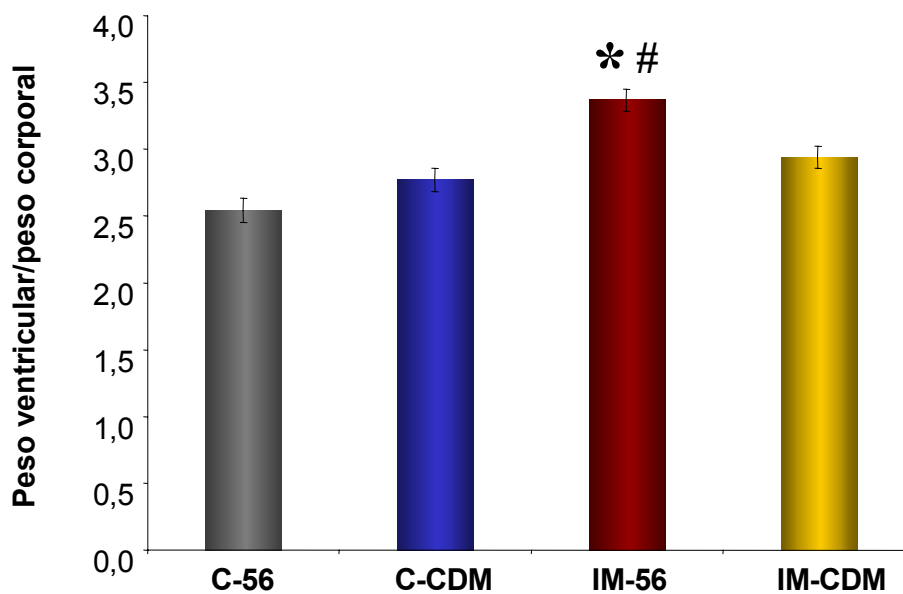


Figura 31– Razão peso ventricular/ peso corporal (mg/g) nos grupos C-56 (n=6), C-CDM (n=8), IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8). *P<0,05 em relação ao grupo C-56; #P<0,05 em relação ao grupo IM-CDM. (Teste: ANOVA duas vias)

3.4.4 Avaliações da adesão pós-cardiomioplastia

A figura 32 mostra a CDM ao final do protocolo experimental em um animal do grupo IM-CDM, podendo-se observar o adesão do GD ao miocárdio. A figura 33 contém uma seqüência de fotos realizada durante a separação do GD do coração. É importante notar que o músculo estava bastante aderido ao ventrículo esquerdo, principalmente na região do IM.

3.4.5 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio

A CDM não alterou o tamanho do infarto nos animais infartados (44 ± 2 vs 45 ± 3 %VE nos IM-CDM, *Teste t-student*).

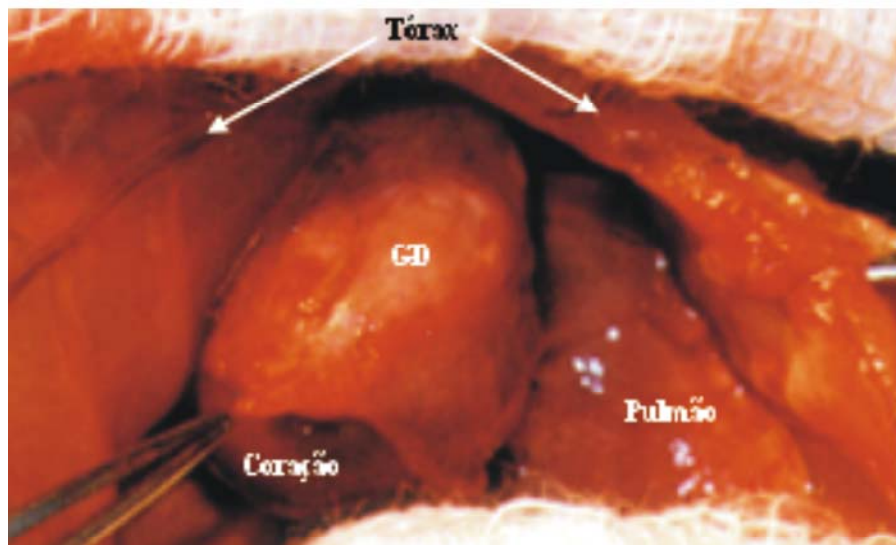


Figura 32- Cardiomioplastia após 8 semanas em um rato do grupo IM-CDM.

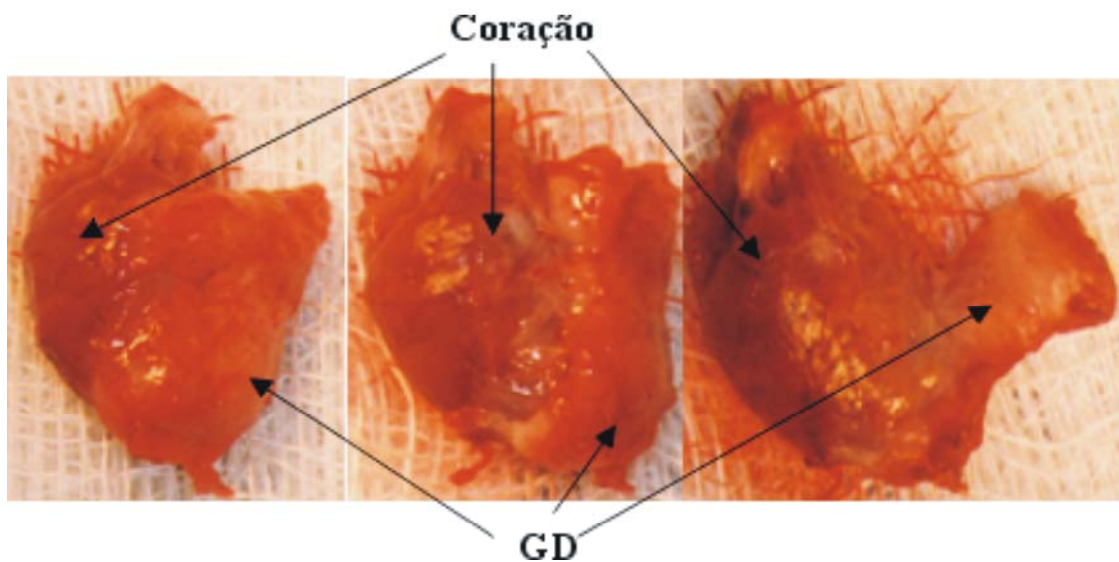


Figura 33- Sequência de fotografias mostrando a separação do grande dorsal do coração após 8 semanas de cardiomioplastia em um rato do grupo IM-CDM.

3.5 Efeitos do VEGF: comparação entre os grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF

3.5.1 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

A tabela 20 apresenta os parâmetros hemodinâmicos sistêmicos nos grupos submetidos à CDM. O grupo de ratos tratado com VEGF apresentou PAS, PAM, PAD e FC semelhante aos demais grupos submetidos à CDM (Tabela 20, Figura 34). O DC (Figura 35), o IC, o VS e a RVP também foram similares entre o grupos submetidos à CDM (Tabela 20).

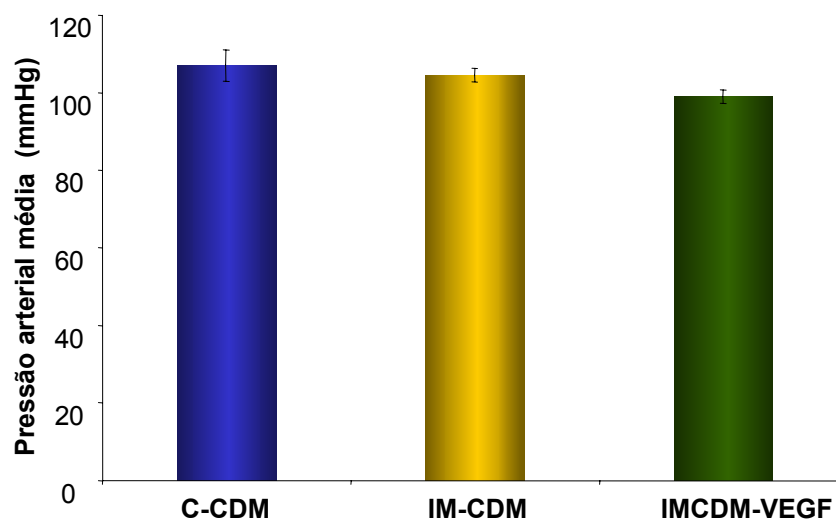


Figura 34- Pressão arterial média (mmHg) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

Tabela 20- Avaliações hemodinâmicas sistêmicas nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| PAS (mmHg) | 114 ± 4 | 116 ± 2 | 110 ± 2 |
| PAM (mmHg) | 107 ± 4 | 106 ± 2 | 100 ± 2 |
| PAD (mmHg) | 94 ± 4 | 95 ± 2 | 91 ± 2 |
| FC (bpm) | 335 ± 13 | 355 ± 9 | 323 ± 9 |
| DC (ml/min) | 77,4 ± 5 | 76,4 ± 12 | 76 ± 10 |
| IC (ml/min/kg) | 208 ± 16 | 192,5 ± 36 | 209 ± 24 |
| VS (ml) | 0,25 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 | 0,27 ± 0,03 |
| RVP (mmHg/ml/min/kg) | 4,1 ± 0,4 | 4,5 ± 0,8 | 3,8 ± 0,2 |

Valores representam média ± EPM. C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). PAS: Pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico; RVP: resistência vascular sistêmica. *P<0,05 em relação ao grupo C-56. (Teste: ANOVA uma via)

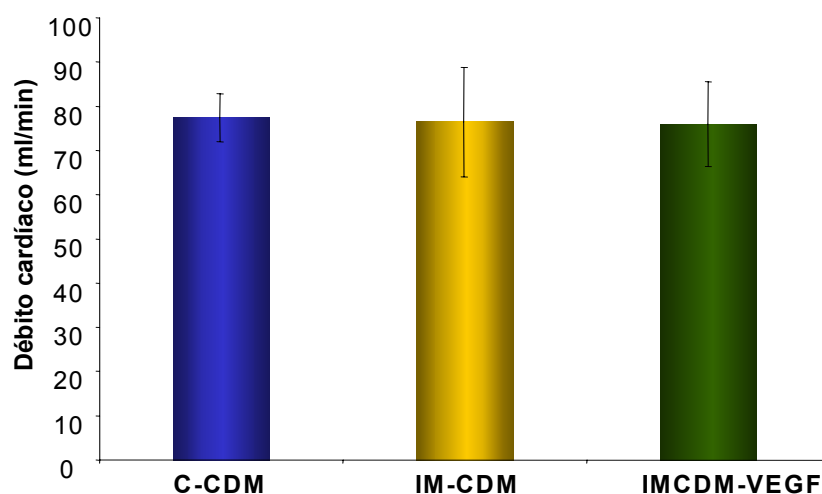


Figura 35– Débito cardíaco (ml/min) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

A figura 36 mostra um registro original da pressão ventricular esquerda de um rato do grupo IMCDM-VEGF. Conforme mostra a tabela 21 a PSV, a PDF (Figura 37) e a contratilidade ventricular foram semelhantes entre os grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

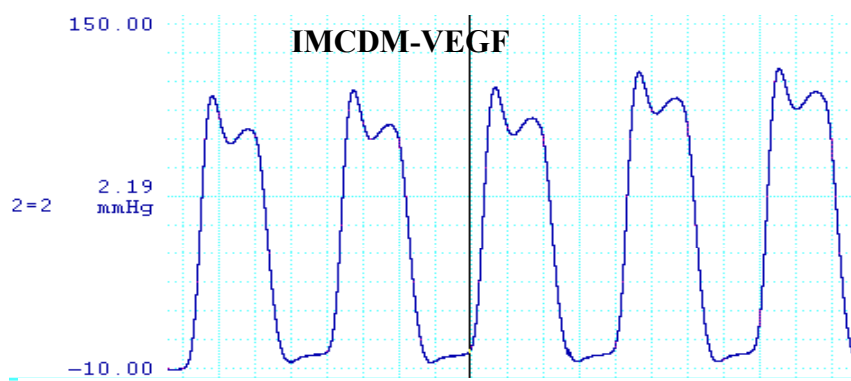


Figura 36 – Registro da pressão ventricular esquerda em um rato do grupo IMCDM-VEGF.

Tabela 21– Pressões e derivadas do ventrículo esquerdo nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| PVS (mmHg) | 119 ± 7 | 116 ± 6 | 105 ± 7 |
| PDF (mmHg) | -0,4 ± 2 | 4,8 ± 1,7 | 3,9 ± 2 |
| + dP/dt (mmHg/seg) | 3243 ± 328 | 3907 ± 358 | 4399 ± 442 |
| -dP/dt (mmHg/seg) | -2560 ± 266 | -3170 ± 270 | -3039 ± 353 |

Valores representam média ± EPM. C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). PVS: pressão ventricular sistólica; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada de contração do ventrículo esquerdo; -dP/dt: derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo. (Teste: ANOVA duas vias)

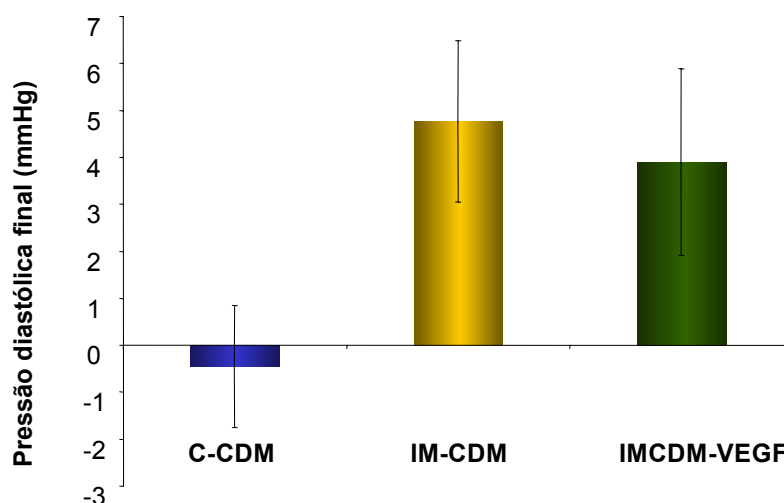


Figura 37– Pressão diastólica final (mmHg) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

3.5.2 Avaliações hemodinâmicas regionais

A aplicação de VEGF na artéria do GD não modificou o fluxo coronariano dos animais submetidos à CDM (C-CDM: $3,15 \pm 0,39$; IM-CDM: $3,35 \pm 0,36$ e IMCDM-VEGF: $4,25 \pm 0,63$) conforme pode ser observado na figura 38.

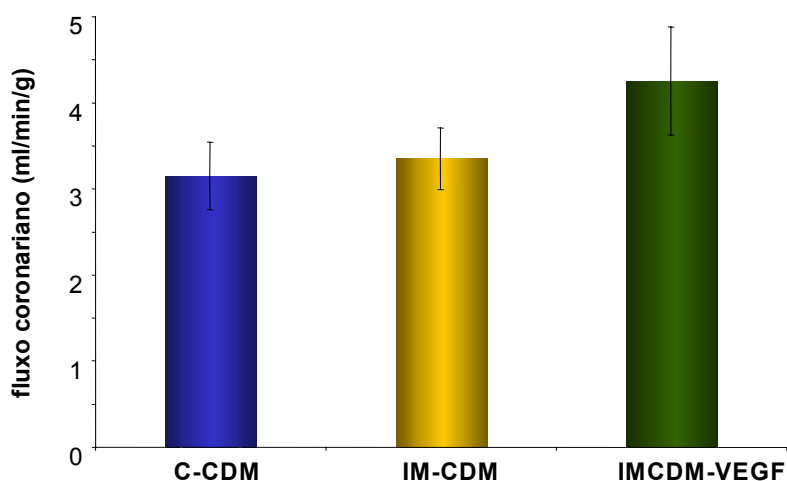


Figura 38– Fluxo sanguíneo coronariano (ml/min/g) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA um via)

Os ratos submetidos à CDM apresentaram fluxos sanguíneos renais similares conforme pode ser observado na tabela 22.

Tabela 22- Fluxos sanguíneos renais (ml/min/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Rim direito | 2,78 ± 0,34 | 3,26 ± 0,44 | 2,92 ± 0,58 |
| Rim esquerdo | 3,23 ± 0,6 | 3,18 ± 0,33 | 3,5 ± 0,4 |
| Rins | 3,06 ± 0,4 | 3,26 ± 0,38 | 3,21 ± 0,49 |

Valores representam média ± EPM. C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5).
(*Teste: ANOVA uma via*)

A tabela 23 mostra o número de esferas azuis nos tecidos cardíaco e renal nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF. O grupo tratado com VEGF apresentou maior número de esferas no coração em relação ao grupo C-CDM (Tabela 23). Os grupos submetidos à CDM não mostraram diferenças no número de esferas azuis nos tecidos renal (Tabela 23).

Tabela 23– Número de esferas azuis no coração, rim direito e rim esquerdo nos grupos C-CDM, IM-CDM e IM-CDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Coração | 12761 ± 1740 | 13870 ± 1409 | 18173 ± 1457† |
| Rim direito | 12209 ± 974 | 15944 ± 932 | 12326 ± 1027 |
| Rim esquerdo | 16040 ± 2235 | 16538 ± 1825 | 13271 ± 1213 |

Valores representam média ± EPM. C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). †P<0,05 em relação ao grupo C-CDM. (*Teste: ANOVA uma via*)

A aplicação de VEGF nos animais submetidos à CDM reduziu a resistência vascular coronariana (22,07 ± 2,01 mmHg/ml/min/g) em relação ao grupo C-CDM (37,78 ± 4 mmHg/ml/min/g) (Figura 39). O grupo IM-CDM (30,61 ± 3 mmHg/ml/min/g) apresentou resistência vascular coronariana semelhante aos grupos C-CDM e IMCDM-VEGF.

A resistência vascular renal foi semelhante entre os grupos submetidos à CDM conforme pode ser observado na tabela 24.

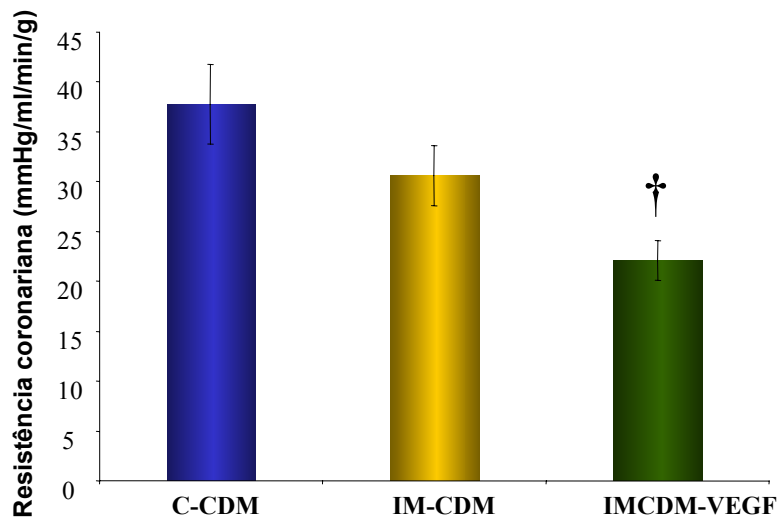


Figura 39– Resistência vascular coronariana (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). †P<0,05 em relação ao grupo C-CDM. (Teste: ANOVA uma via)

Tabela 24– Resistência vascular renal (mmHg/ml/min/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF

| | C-CDM | IM-CDM | VEGF-IMCDM |
|------|----------|-----------|------------|
| Rins | 43,1 ± 4 | 33,97 ± 4 | 32 ± 5 |

Valores representam média ± EPM. C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

3.5.3 Avaliações de fluxo sanguíneo colateral

O fluxo sanguíneo colateral foi avaliado no sentido do coração para o GD ($FCO_{CORACÃO \rightarrow GD}$), sendo expresso em valores negativos, e no sentido do GD para o coração ($FCO_{GD \rightarrow CORACÃO}$), sendo expresso em valores positivos. A tabela 25 mostra o número de animais avaliados em cada grupo com relação ao fluxo colateral, além do número e do percentual de animais nos quais foi observado $FCO_{CORACÃO \rightarrow GD}$ e $FCO_{GD \rightarrow CORACÃO}$. Observe que o número de animais avaliados com relação ao fluxo $FCO_{GD \rightarrow CORACÃO}$ é menor do que os avaliados no sentido contrário. Isso se deve ao fato da infusão das esferas amarelas na artéria principal do GD não ter sido efetuada com sucesso em razão da dificuldade de acesso e de identificação da artéria do GD entre os vários vasos e ramificações da região braquial, fazendo com que, por vezes, as esferas amarelas injetadas não atingissem o GD. Além disso, os animais que apresentaram microesferas amarelas no tecido renal foram descartados desta avaliação.

Nos animais normais submetidos à CDM observa-se um predomínio do $FCO_{CORACÃO \rightarrow GD}$, enquanto nos animais IM-CDM observou-se o predomínio no sentido inverso $FCO_{GD \rightarrow CORACÃO}$ (Tabela 25 e Figura 40). No grupo IMCDM-VEGF o fluxo colateral foi observado em ambos os sentidos.

A tabela 26 apresenta os dados de fluxo colateral absolutos (%) e normalizados pelo peso dos tecidos (%/g) nos animais submetidos à CDM. O $FCO_{CORACÃO \rightarrow GD}$ foi semelhante entre os grupos C-CDM e MI-CDM, quando avaliado em valores absolutos (Tabela 26, Figura 41 e 42). O grupo VEGF apresentou um aumento do $FCO_{CORACÃO \rightarrow GD}$ em relação ao grupo MI-CDM, quando avaliado em valores normalizados (Tabela 26, Figura 42).

Tabela 25- Percentual de ratos avaliados que desenvolveram fluxo colateral nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|--|-------|--------|------------|
| Total de ratos avaliado FCO CORAÇÃO→GD | 7 | 7 | 6 |
| Ratos com FCO CORAÇÃO→GD | 5 | 2 | 5 |
| % ratos com FCO CORAÇÃO→GD | 71,4 | 28,6 | 83,3 |
| Total de ratos avaliado FCO GD→CORAÇÃO | 5 | 5 | 5 |
| Ratos com FCO GD→CORAÇÃO | 1 | 5 | 5 |
| % ratos com FCO GD→CORAÇÃO | 20 | 100 | 100 |

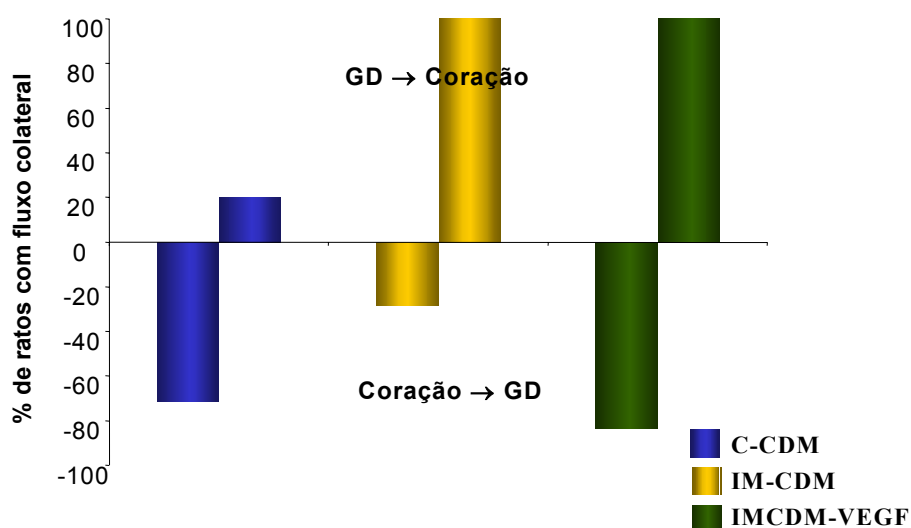


Figura 40- Percentual de ratos avaliados que desenvolveram fluxo colateral nos grupos C-CDM, IM- CDM e IMCDM-VEGF.

O FCO $GD \rightarrow CORAÇÃO$ aumentou no grupo IM-CDM em relação ao grupo C-CDM quando avaliado em valores normalizados, conforme pode ser observado na Figura 42. A aplicação de VEGF₁₆₅ resultou em aumento do FCO $GD \rightarrow CORAÇÃO$ em relação aos grupos C-CDM e MI-CDM, tanto em valores absolutos como em valores normalizados (Tabela 26, Figura 41 e 42)

Tabela 26- Fluxo colateral no sentido do coração para o grande dorsal (FCO CORAÇÃO→GD) e do grande dorsal para o coração (FCO GD→CORAÇÃO) em valores absolutos (%) e normalizados (%/g) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF.

| | C-CDM | IM-CDM | IMCDM-VEGF |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
| FCO CORAÇÃO→GD (%) | -5,49 ± 2,35 | -3,88 ± 2,34 | -9,5 ± 2,66 |
| FCO GD→CORAÇÃO (%) | 0,88 ± 0,89 | 4,43 ± 1,45 | 24,85 ± 10,3†‡ |
| FCO CORAÇÃO→GD (%/g) | -3,03 ± 1,13 | -2,34 ± 1,44 | -4,47 ± 1,46‡ |
| FCO GD→CORAÇÃO (%/g) | 1,42 ± 1,42 | 7,66 ± 2,34† | 62,29 ± 23,27†‡ |

Valores representam média ± EPM. †P<0,05 em relação ao grupo C-CDM. ‡P<0,05 em relação ao grupo MI-CDM. (Teste: ANOVA uma via)

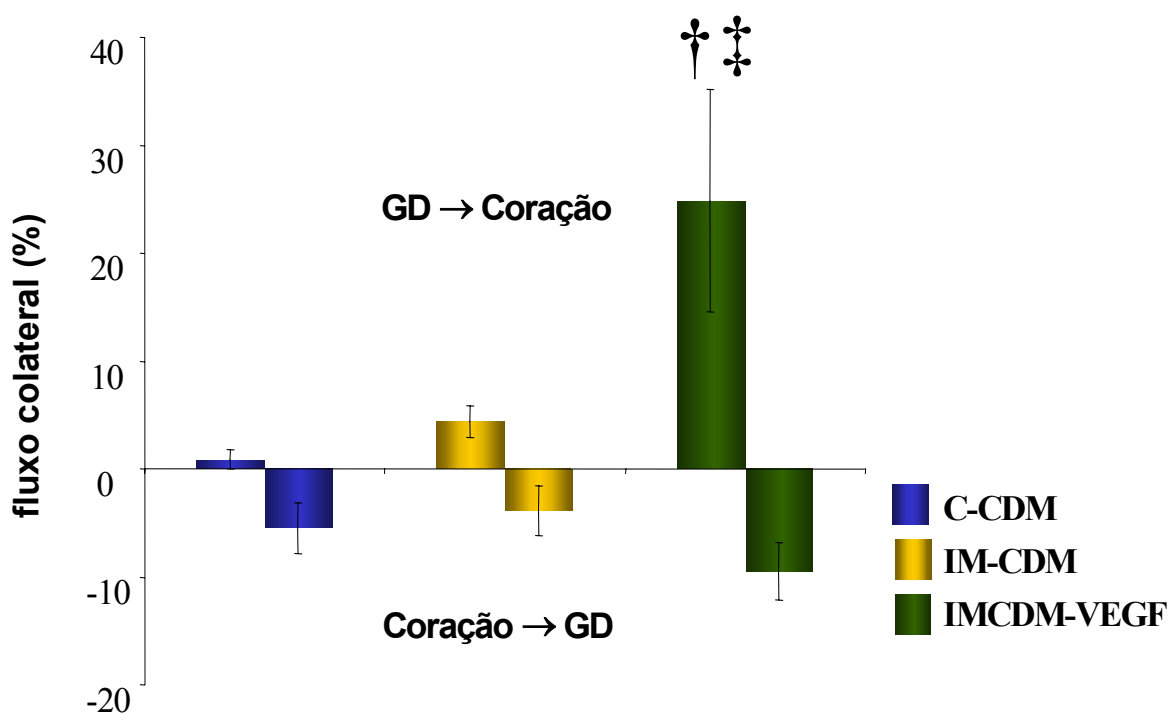


Figura 41- Fluxo colateral absoluto (%) no sentido do grande dorsal para o coração (GD→CORAÇÃO) e do coração para o grande dorsal (CORAÇÃO→GD) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF. †P<0,05 em relação ao grupo C-CDM. ‡P<0,05 em relação ao grupo MI-CDM. (Teste: ANOVA uma via)

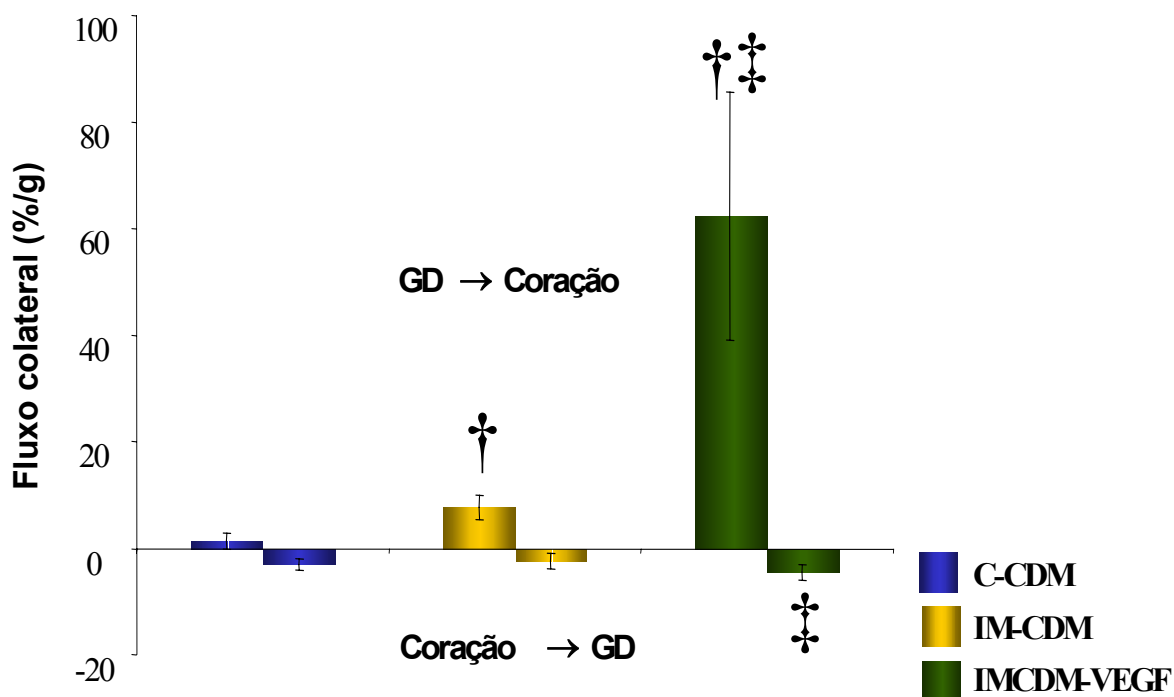


Figura 42– Fluxo colateral normalizado por grama de tecido (%/g) no sentido do grande dorsal para o coração (GD→CORAÇÃO) e do coração para o grande dorsal (CORAÇÃO→GD) nos grupos C-CDM, IM-CDM e IMCDM-VEGF. †P<0,05 em relação ao grupo C-CDM. ‡P<0,05 em relação ao grupo MI-CDM. (Teste: ANOVA uma via)

O fluxo colateral do grande dorsal para o coração nos grupos submetidos à cardiomioplastia estava positivamente correlacionado ao volume sistólico ($r=0,7$, $P<0,05$) e ao fluxo coronariano ($r=0,7$, $P<0,05$). Dessa maneira, conforme ilustra a figura 43, fluxos colaterais do GD-coração maiores foram correlacionados com maiores volumes sistólicos, bem como com maiores valores de fluxo coronariano (Figura 44).

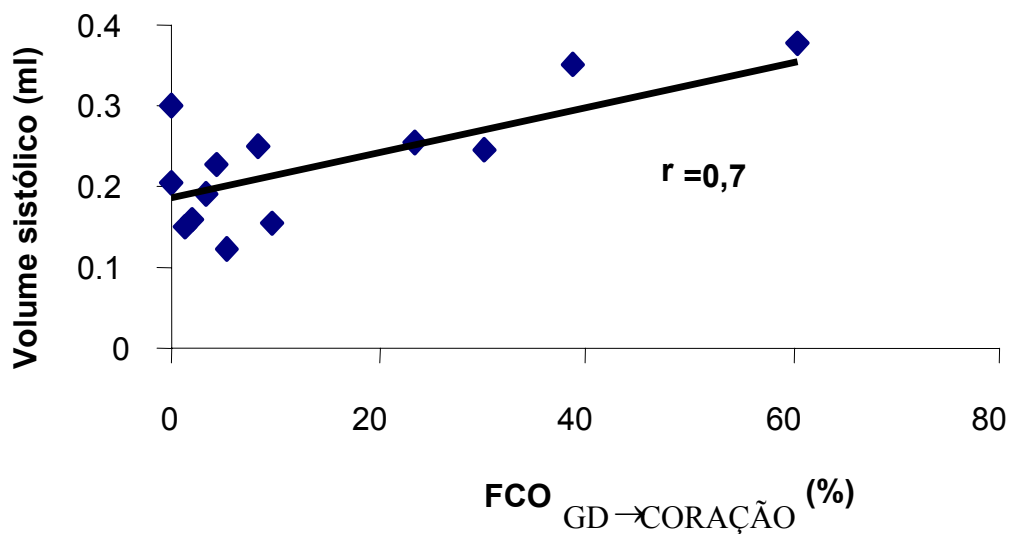


Figura 43- Correlação positiva entre o fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração com o volume sistólico (ml).

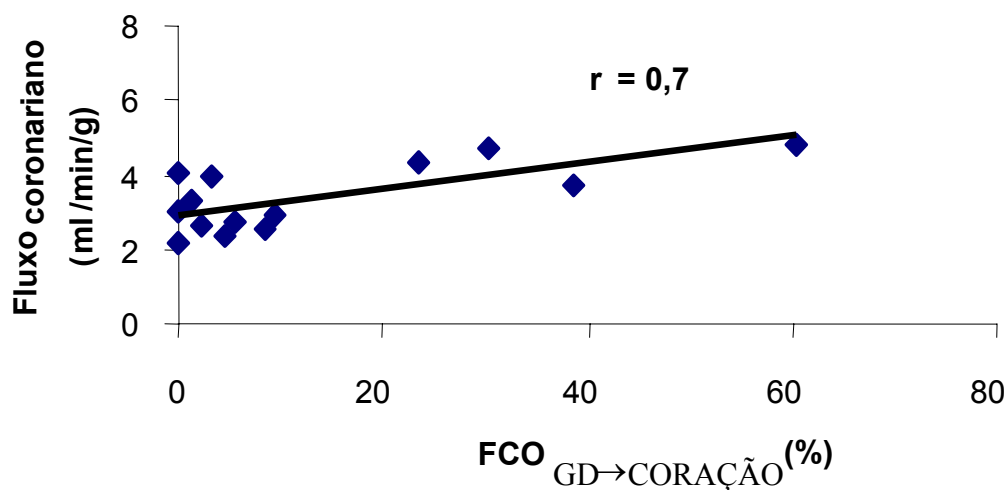


Figura 44- Correlação positiva entre o fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração com o fluxo coronariano (ml).

5.5.4 Avaliação da adesão pós-cardiomioplastia

Após 8 semanas de cardiomioplastia os animais controles e infartados apresentavam adesão do GD ao miocárdio conforme pode ser observado nas figuras 45 e 46.

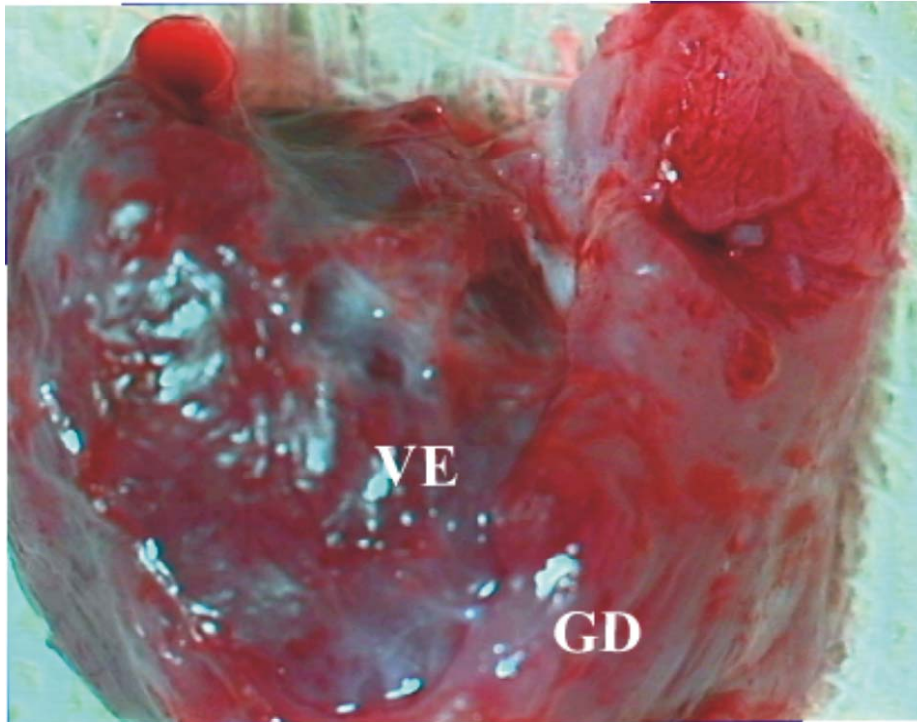


Figura 45 – Fotografia mostrando a cardiomioplastia em um rato do grupo C-CDM após 8 semanas.

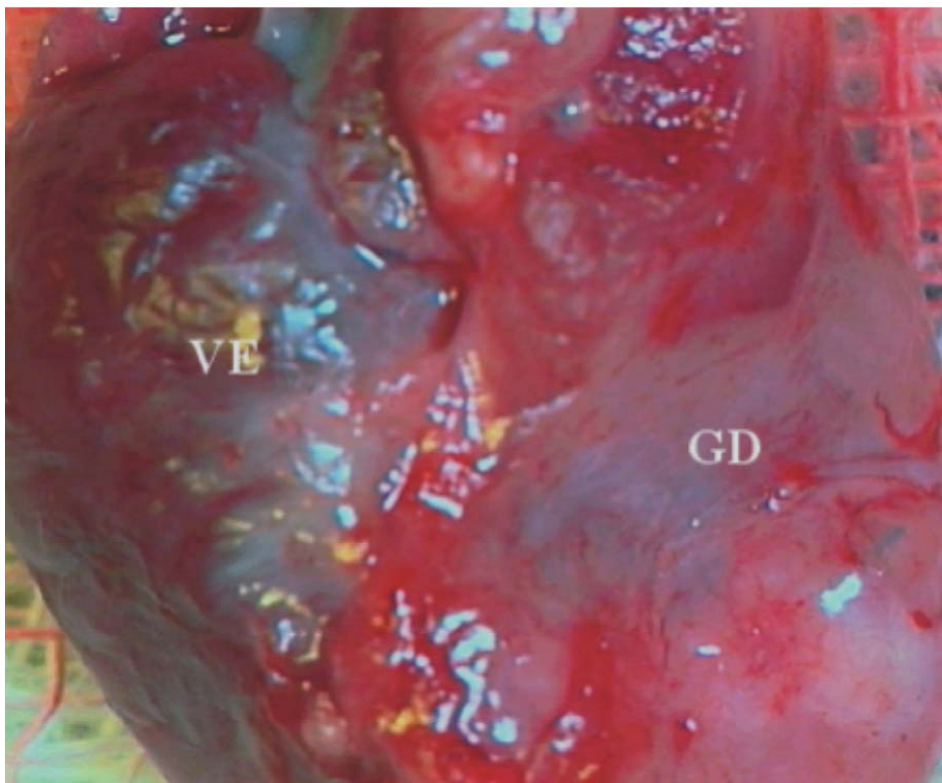


Figura 46– Fotografia mostrando a cardiomioplastia em um rato do grupo IM-CDM após 8 semanas.

As figuras 47 e 48 mostram fotografias da região de adesão do GD ao miocárdio em animais dos grupos C-CDM e IM-CDM, respectivamente. Nesta região pode-se observar pequenos vasos sugerindo a presença de fluxo colateral entre estes tecidos.

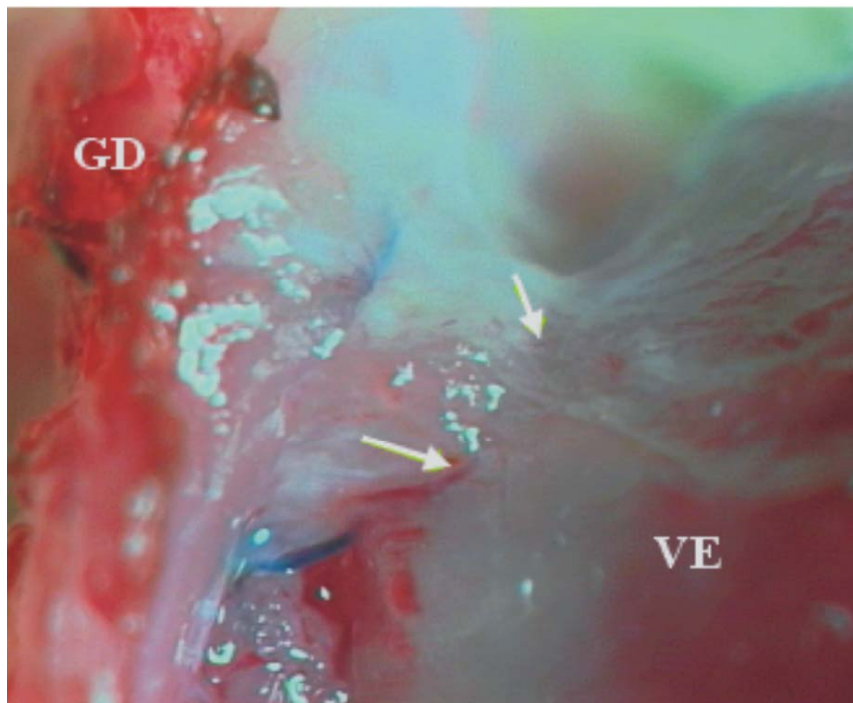
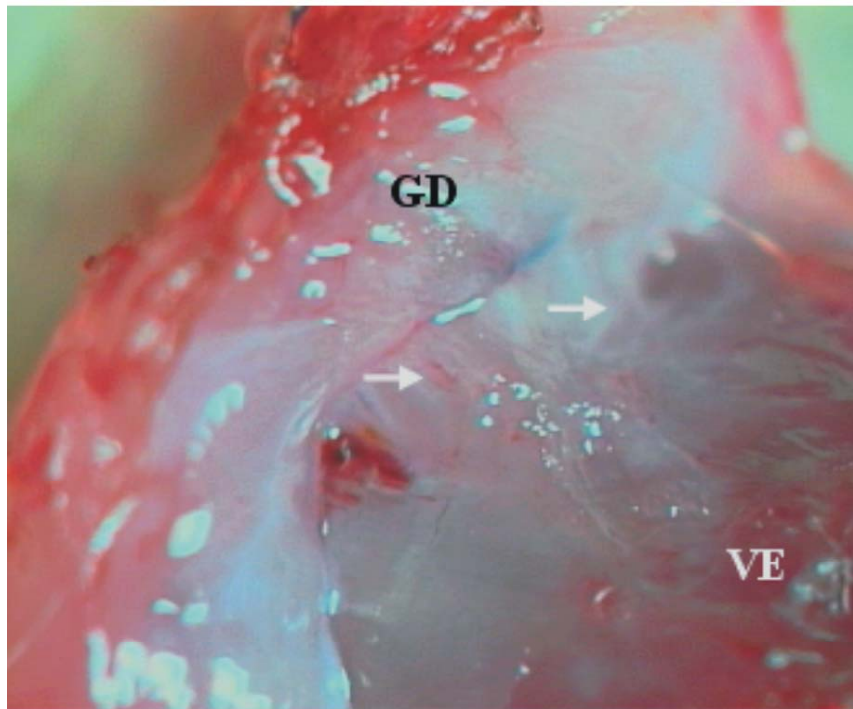


Figura 47- Fotografias mostrando vasos na região de adesão do grande dorsal ao miocárdio em um rato do grupo C-CDM

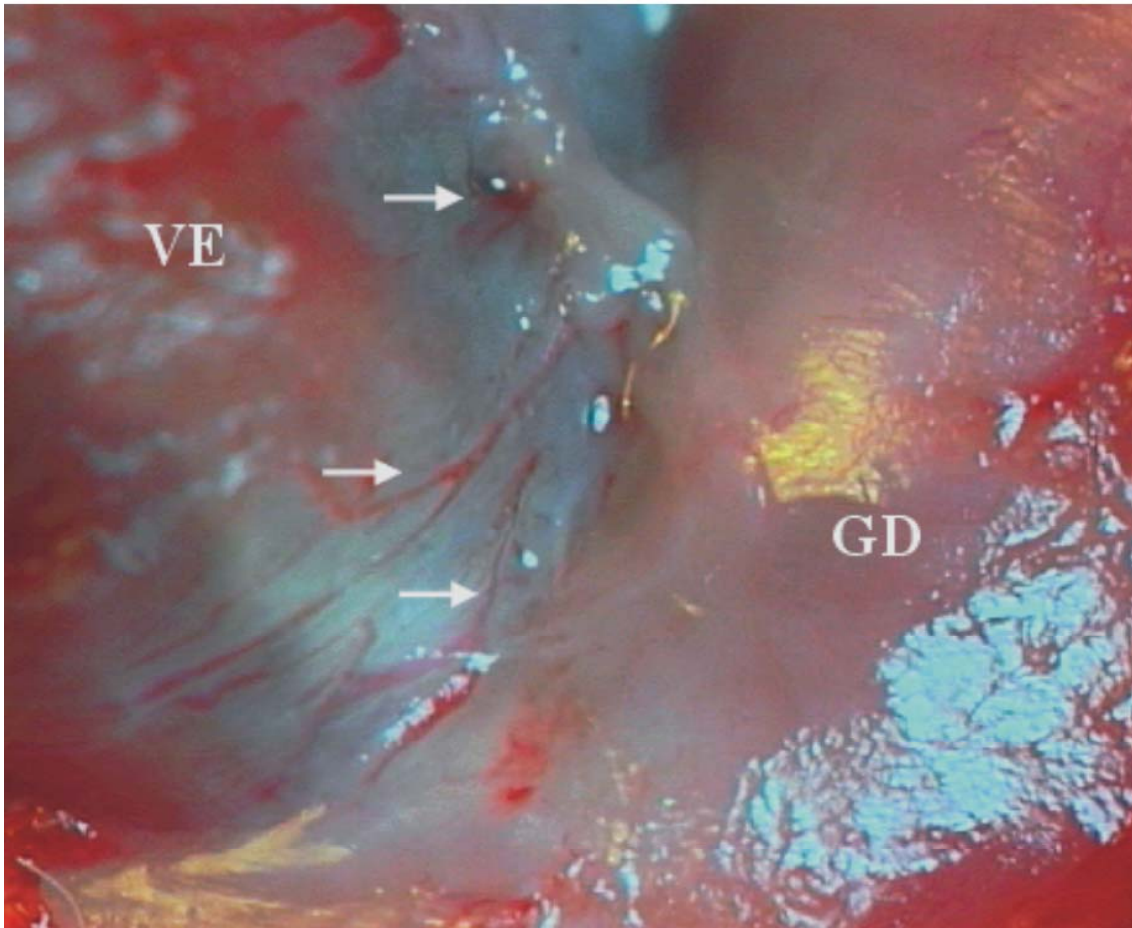


Figura 48- Fotografia mostrando vasos na região de adesão do grande dorsal ao miocárdio em um rato do grupo IM-CDM

A figura 49 mostra a parede ventricular esquerda infartada após a separação do grande dorsal do coração em um rato do grupo IM-CDM.



Figura 49- Fotografia mostrando a parede ventricular esquerda infartada de um rato do grupo IM-CDM após a separação do grande dorsal do coração.

5.5.5 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica para músculo liso vascular mostra a presença de vasos na parede ventricular esquerda nos ratos estudados conforme pode ser observado nas figuras a seguir. Comparando as figuras pode-se observar um grande afinamento da parede ventricular esquerda no rato do grupo IM-56 (Figura 51) em relação ao rato controle (Figura 50) e ao rato infartado com VEGF e cardiomioplastia (Figura 52). Observe também a desorganização da parede ventricular nos animais infartados (Figura 51) em relação ao controle (Figura 50).

As figuras 53, 54 e 55 mostram as mesmas regiões das fotografias anteriores porém com maior aumento. Comparando estas três figuras é possível observar que a desorganização da parede ventricular esquerda não é tão acentuada no rato VEGF-IMCDM (Figura 55) em relação ao rato do grupo IM-56 (Figura 54). É importante observar o grande número de vasos nas regiões adjacentes do coração e do grande dorsal no grupo IMCDM-VEGF (Figura 55), demonstrando um tecido bastante vascularizado e sugerindo que alguns desses vasos possam ser responsáveis pelo fluxo colateral observado pela técnica de microesferas coloridas.

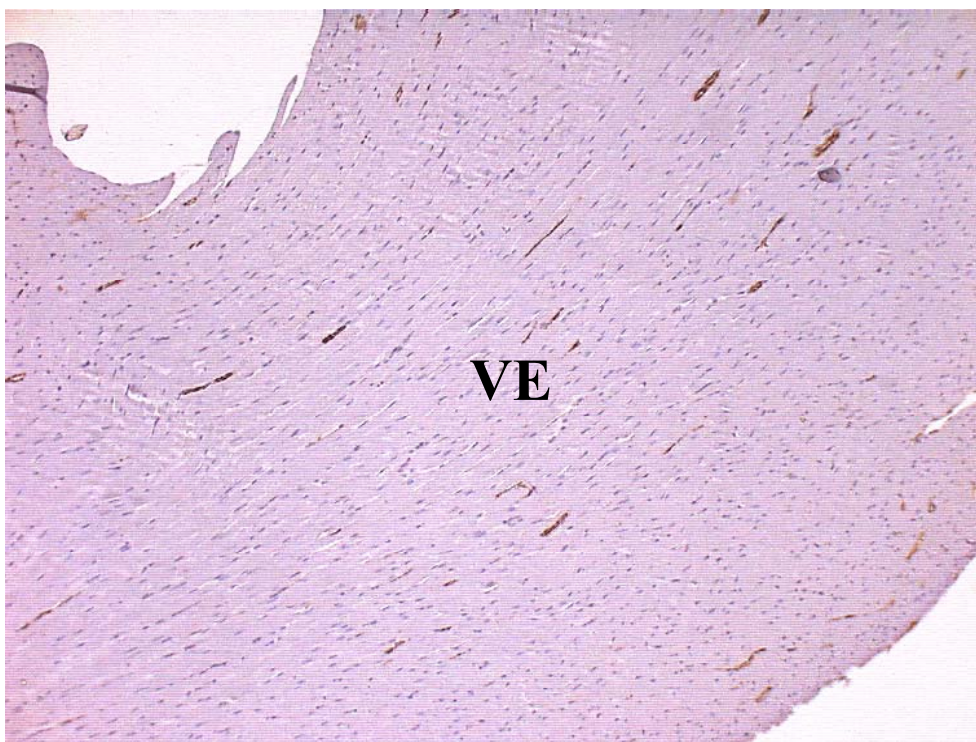


Figura 50– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) de um rato do grupo C-56.

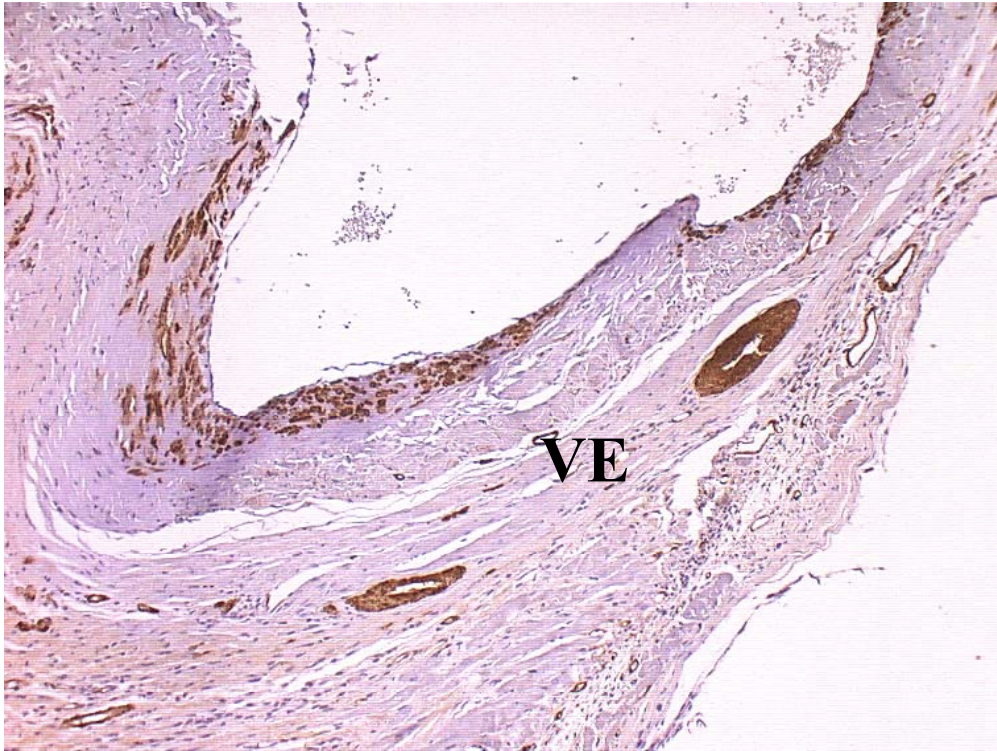
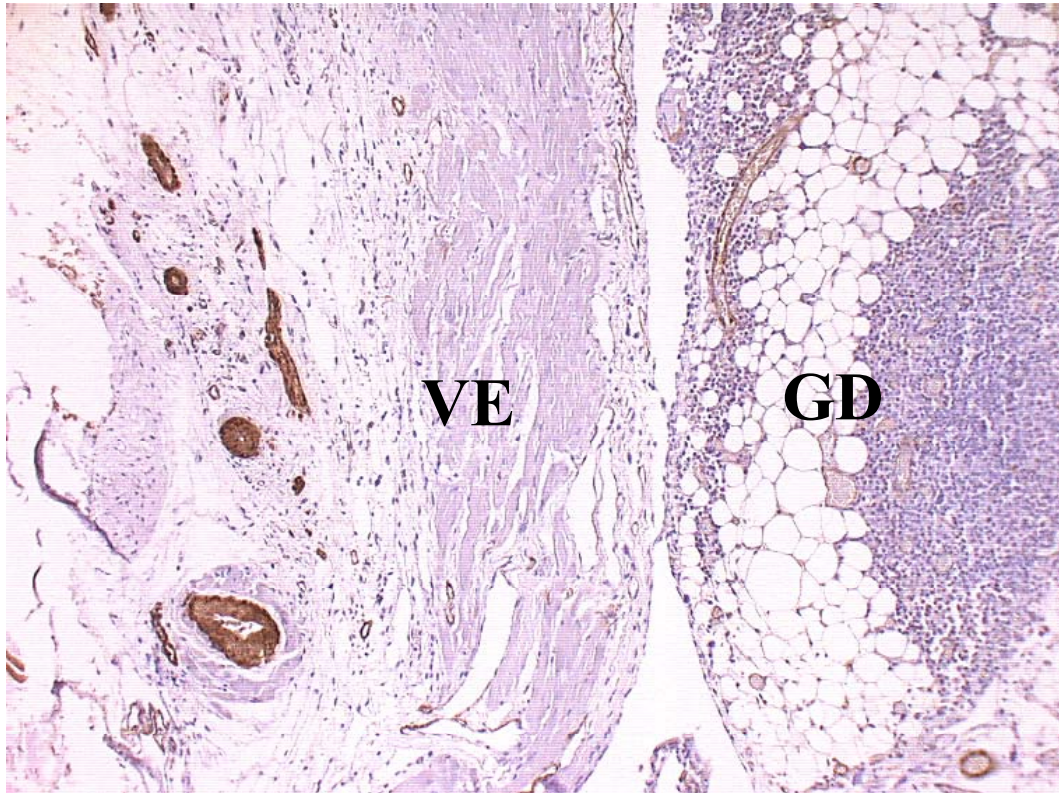


Figura 51– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) de um rato do grupo IM-56.



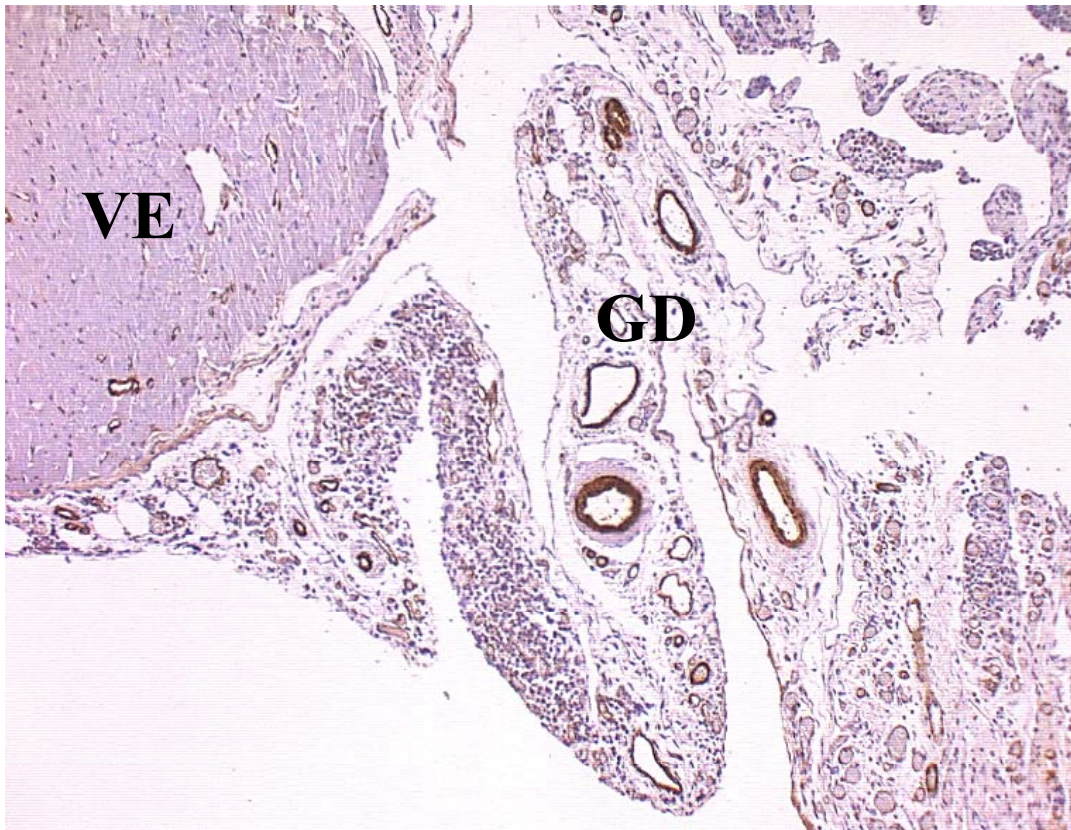


Figura 52– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) e do grande dorsal (GD) de um rato do grupo VEGF-IMCDM.

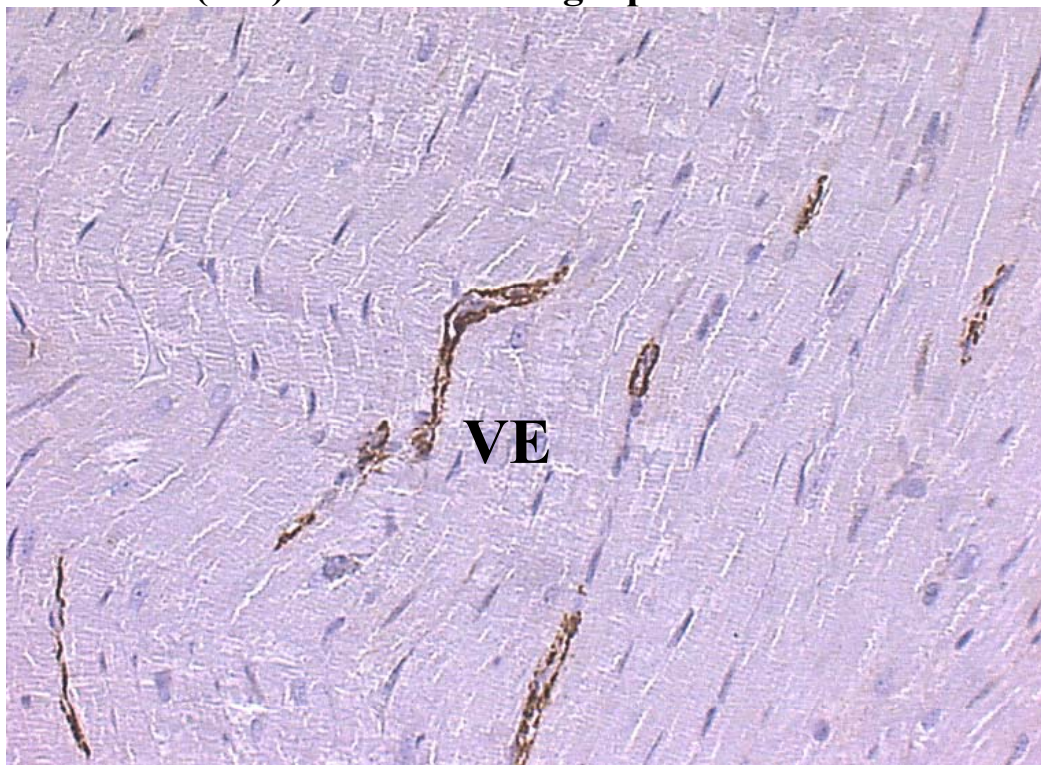


Figura 53– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) de um rato do grupo C-56.

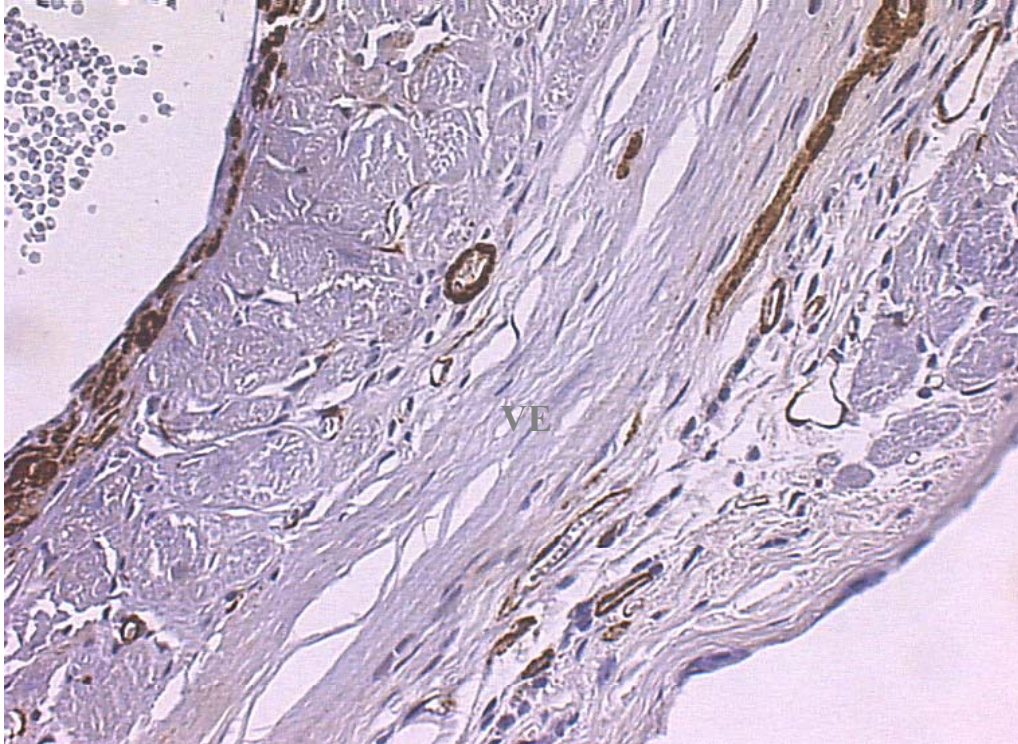


Figura 54– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) de um rato do grupo IM-56.

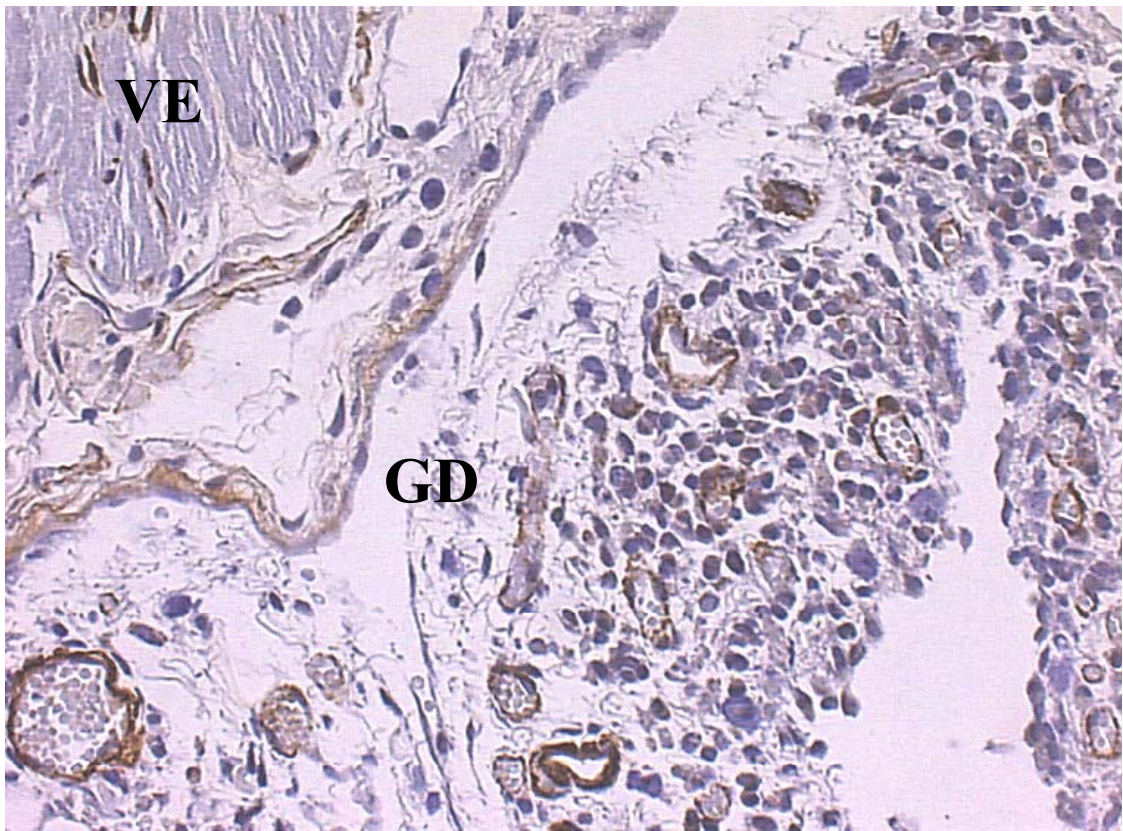
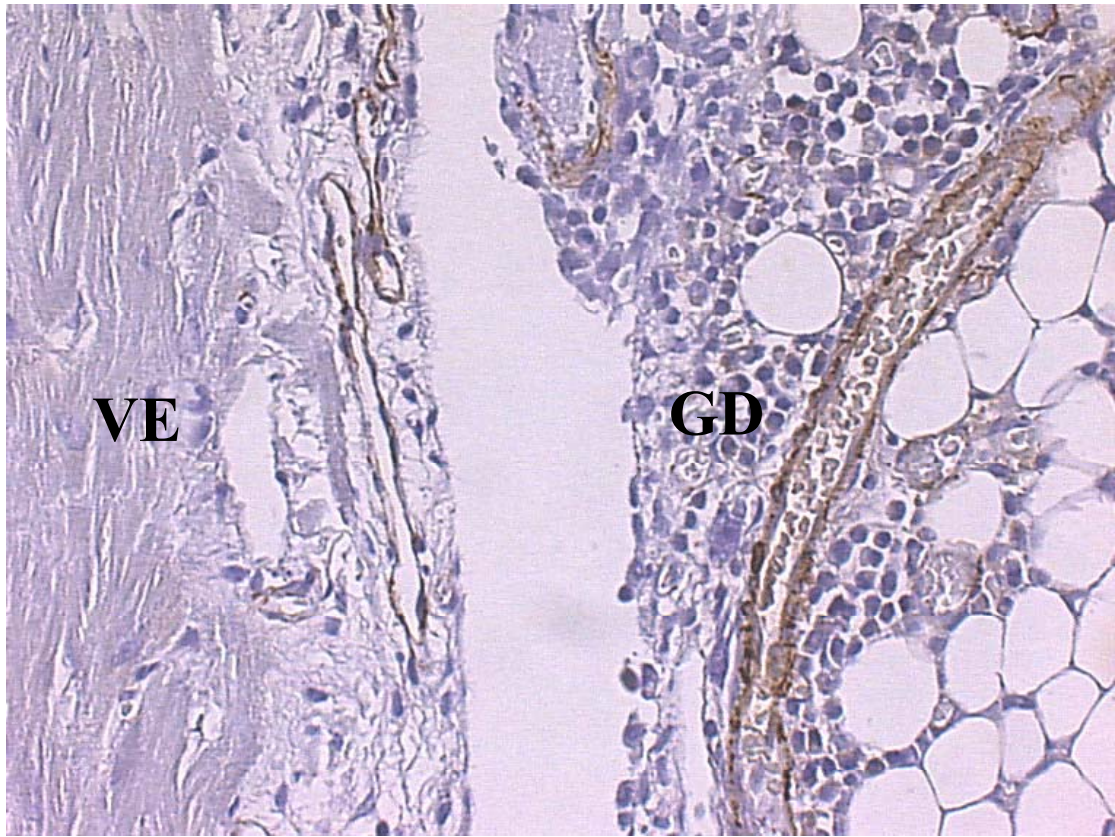


Figura 55– Imunohistoquímica para músculo liso vascular da parede ventricular esquerda (VE) e do grande dorsal (GD) de um rato do grupo VEGF-IMCDM.

3.5.5 Avaliações morfométricas

O peso corporal foi semelhante entre os grupos C-CDM (375 ± 9 g), IM-CDM (374 ± 8 g) e IMCDM-VEGF (364 ± 7 g). Os grupos submetidos à CDM apresentaram peso ventricular (C-CDM: $1,04 \pm 0,04$ g, IM-CDM: $1,11 \pm 0,04$ g e IMCDM-VEGF: $1,12 \pm 0,06$ g) (Figura 56) e razão peso corporal/peso ventricular (C-CDM: $2,77 \pm 0,09$ mg/g; IM-CDM: $2,94 \pm 0,09$ mg/g e IMCDM-VEGF: $3,02 \pm 0,14$ mg/g) (Figura 57) semelhantes. É importante salientar que a hipertrofia ventricular, avaliada pela razão do peso ventricular/peso corporal, verificada nos animais submetidos ao IM, também não foi observada no grupo IMCDM-VEGF.

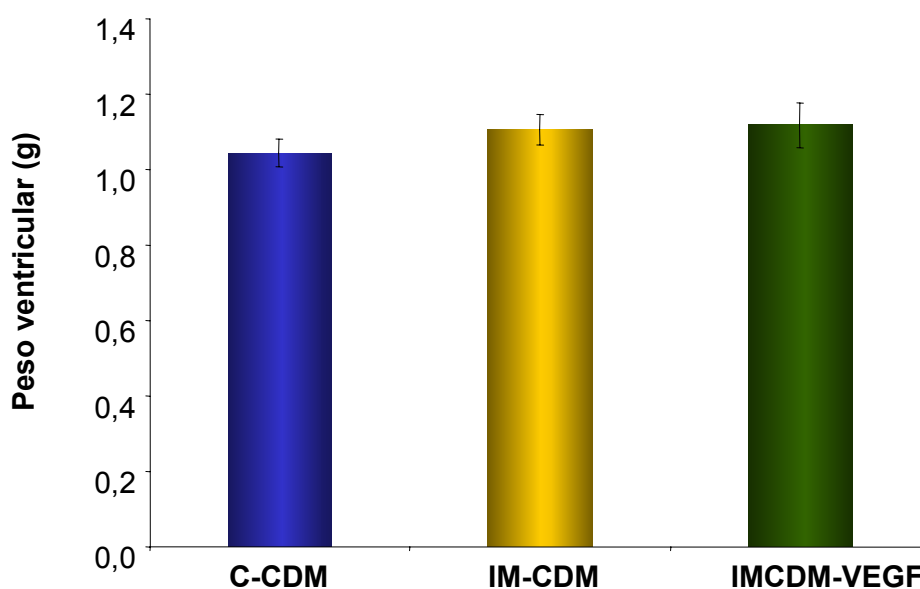


Figura 56– Peso ventricular (g) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

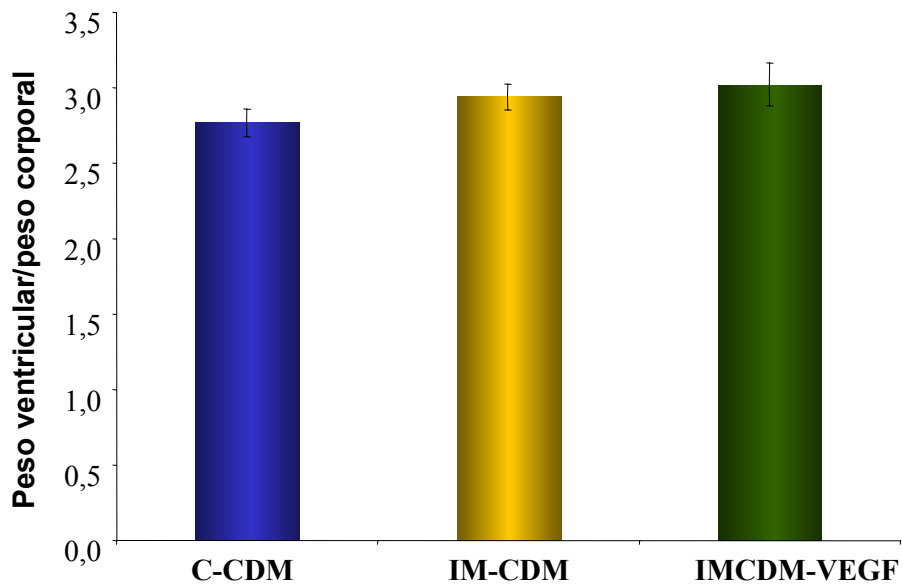


Figura 57– Razão peso ventricular/ peso corporal (mg/g) nos grupos C-CDM (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). (Teste: ANOVA uma via)

Foi obtida uma correlação positiva ($r=0,8$, $P<0.05$) entre a PDF e a razão pv/pc, mostrando que maiores valores de PDF estavam correlacionados com maior hipertrofia ventricular, avaliada pelo peso ventricular nos grupos estudados (Figura 58).

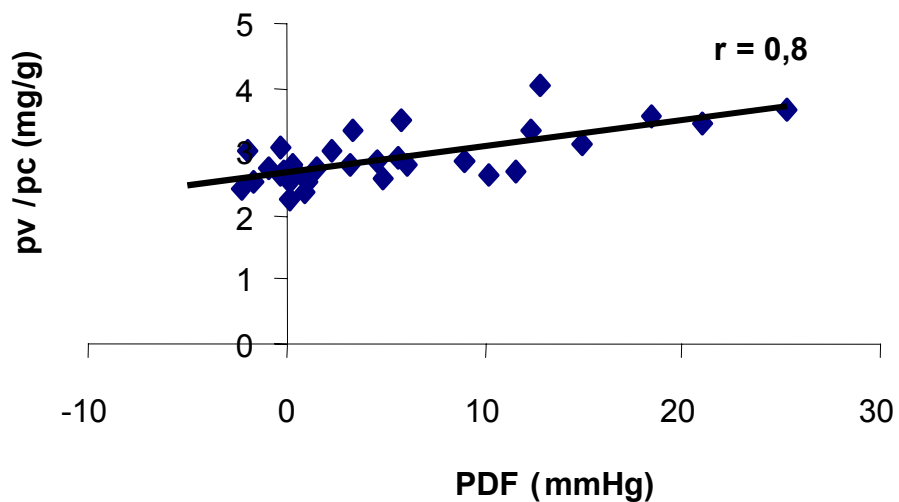


Figura 58- **Correlação positiva entre a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF, mmHg) e o razão peso ventricular/peso corporal (pv/pc, mg/g).**

3.5.6 Avaliações do tamanho do infarto do miocárdio

Apesar de não ter alterado a maior parte dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e dos parâmetros morfométricos a aplicação do VEGF nos animais infartados e submetidos à CDM reduziu o tamanho do IM no VE. O grupo IMCDM-VEGF (36 ± 3 % do VE) apresentou menor tamanho de IM em relação aos grupos IM-56 (44 ± 2 % do VE) e IM-CDM. (45 ± 3 % do VE) (Figura 59).

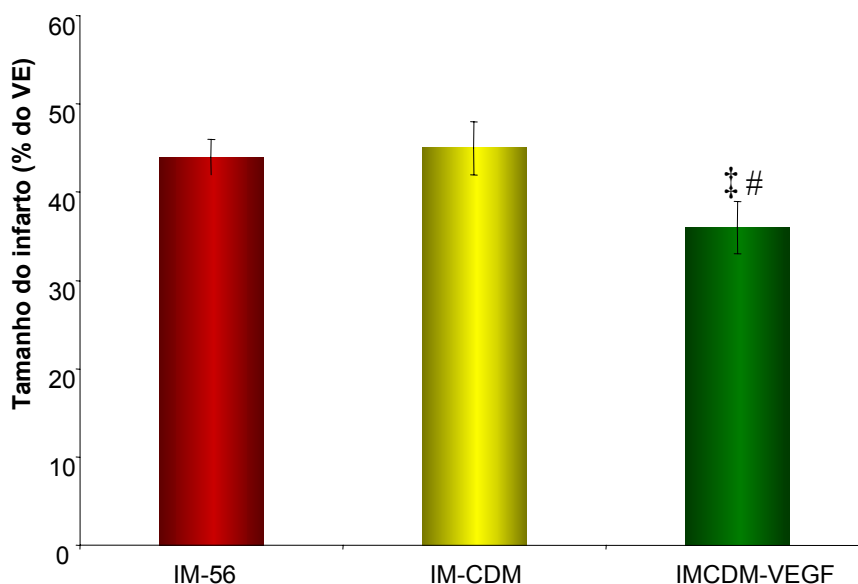


Figura 59- Tamanho do infarto do miocárdio (% do VE) nos grupos IM-56 (n=8), IM-CDM (n=8) e IMCDM-VEGF (n=5). #P<0,05 em relação ao grupo IM-56. ‡ P<0,05 em relação ao grupo IM-CDM. (Teste: ANOVA uma via)

Áreas de infarto maiores foram correlacionados com maior PDF ($r=0,6$, $P<0,05$) nos animais infartados (56 dias). Uma correlação negativa ($r=0,8$, $P<0,05$) foi obtida entre o volume sistólico e o tamanho do infarto do miocárdio, mostrando que, nos

animais infartados avaliados, menores volumes sistólicos foram observados em ratos com maior área de infarto (Figura 60). Da mesma forma, uma correlação menor, porém significativa foi obtida entre o índice cardíaco ($r=0,6$, $P<0,05$) e o tamanho do infarto, no qual maiores valores de índices cardíacos foram inversamente correlacionados com menores áreas de infarto.

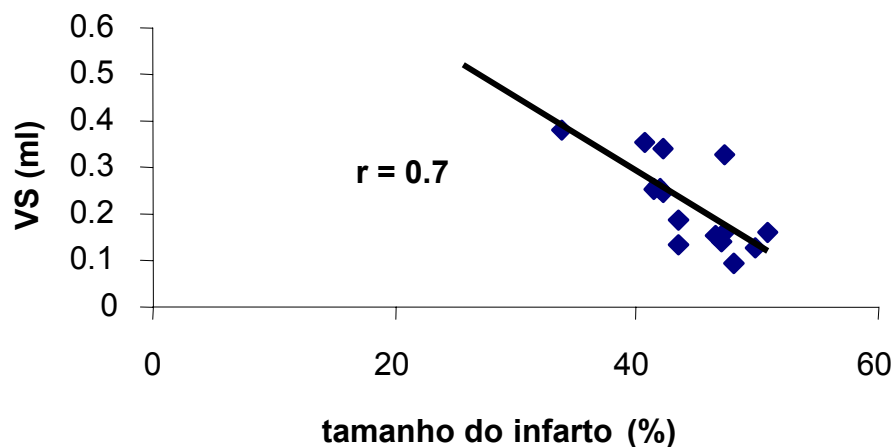


Figura 60- Correlação inversa entre a tamanho do infarto (% do VE) e o volume sistólico (VS, ml).

Além disso, a área do infarto foi inversamente correlacionada com o fluxo colateral do GD-coração ($r=0,7$, $P<0,05$), demonstrando que o aumento de fluxo colateral extramiocárdico do GD para o coração estava correlacionado com menor cicatriz pós IM (Figura 61).

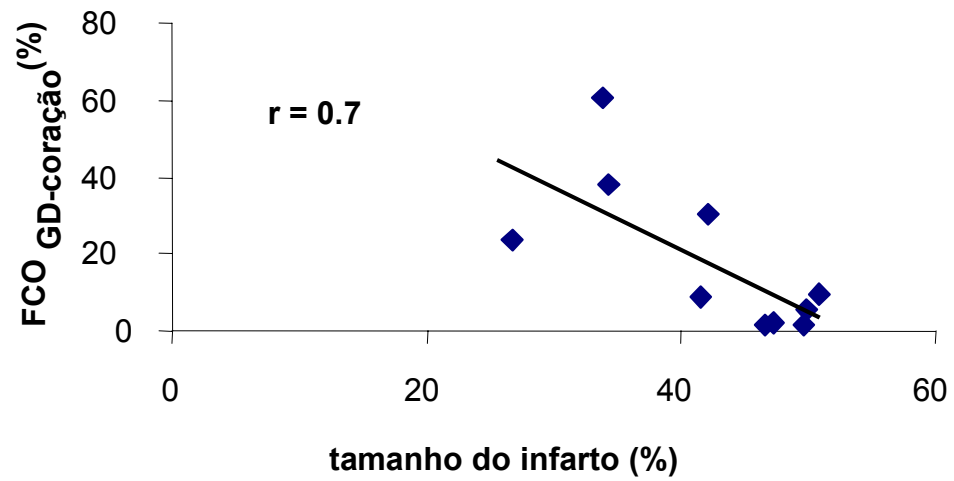


Figura 61- Correlação inversa entre a área infartada (% do VE) e o o fluxo colateral extramiocárdico entre o grande dorsal e o coração (fluxo CO_{GD-coração}, %).

5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

No presente estudo foi estabelecido e padronizado o modelo crônico de CDM passiva em ratos. Este procedimento foi realizado em ratos controles e infartados, submetidos ou não a aplicação de uma dose de 25 μ g de VEGF165 na artéria principal do GD.

As alterações induzidas pelo IM foram avaliadas aos 14 e aos 56 dias e comparadas com os controles permitindo quantificar as modificações temporais dos parâmetros hemodinâmicos, morfométricos e do tamanho da cicatriz do infarto. Ratos infartados (14 ou 56 dias) apresentaram: 1) hipotensão, 2) aumento da PDF e 3) redução da derivada de relaxamento do VE. No grupo com 56 dias de IM observou-se maior comprometimento hemodinâmico dos animais evidenciado por: 1) grande aumento da PDF (vs C-56 e vs IM-14), 2) menor débito cardíaco (vs IM-14), 3) redução da +dP/dt (vs C-56), 4) redução no fluxo sanguíneo renal, 5) aumento da massa do VE e da razão pv/pc (vs C-56) e 6) maior tamanho de IM do VE (vs IM-14).

A CDM passiva induziu redução das derivadas de contração e relaxamento do VE nos ratos controles, com manutenção dos demais parâmetros avaliados. Os animais infartados submetidos à CDM passiva (após 14 dias de IM) quando comparados ao grupo controle não apresentaram: 1) hipotensão, 2) redução de DC, 3) aumento da PDF, 4) redução de fluxo renal e 5) aumento da massa do VE e da razão pv/pc. Entretanto, a CDM pós IM não modificou a redução de contratilidade do VE e o

tamanho do IM observadas no grupo IM-56. Estes resultados, associados a correlação positiva entre a PDF e a razão pv/pc ($r=0,8$), sugerem que a CDM passiva previne parcialmente o remodelamento e a disfunção ventricular pós IM em ratos.

O grupo de ratos submetidos a administração de uma dose única de 25 μ g de VEGF165 na artéria principal do GD no momento da CDM (14 dias pós IM) apresentou melhora semelhante ao grupo IM-CDM dos parâmetros hemodinâmicos e morfométricos em relação ao grupo com 56 dias de infarto. O fluxo colateral extramiocárdico avaliado através do uso da técnica de microesferas coloridas nos animais submetidos à CDM passiva demonstrou predominância do fluxo do coração-GD no grupo C-CDM e no sentido inverso no grupo IM-CDM. Nos animais tratados com VEGF o fluxo colateral foi observado em 83% dos ratos no sentido coração-GD e em todos os animais no sentido inverso. O VEGF165 induziu aumento de fluxo colateral extramiocárdico do GD-corção, que pode estar associado a uma melhora de perfusão das regiões isquêmicas do miocárdio. Apesar do uso do VEGF165 no GD não ter induzido melhoras hemodinâmicas sistêmicas e morfométricas em relação ao grupo infartado submetido à CDM, correlações positivas entre o fluxo GD-corção e o VS ($r=0,7$) e o fluxo coronariano ($r=0,7$), sugerem uma melhora funcional nos ratos do grupo IMCDM-VEGF. O menor tamanho da cicatriz do IM observado no grupo tratado com VEGF₁₆₅ em relação ao grupo IM-CDM e IM-56, associado à correlação inversa obtida entre o fluxo colateral GD-corção e o tamanho do IM no VE ($r=0,7$), reforçam a hipótese de melhora de perfusão das regiões isquêmicas pós IM. Além disso, correlação positiva entre a PDF e o tamanho do IM ($r=0,7$), e a correlação inversa obtida entre o tamanho do IM e o volume sistólico ($r=0,72$), sugerem que a diminuição da evolução da cicatriz leva a um menor comprometimento hemodinâmico.

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- 1) o rato pode ser usado como modelo biológico para a realização da CDM crônica passiva;
- 2) o IM em ratos produz (após 14 dias) hipotensão acompanhada de disfunção do VE, caracterizada por aumento da PDF e prejuízo da contratilidade. Essas alterações são mais evidentes aos 56 dias de IM quando também se observa diminuição do DC, aumento da massa do VE e do tamanho do infarto;
- 3) a CDM passiva previne parcialmente a disfunção hemodinâmica e o remodelamento do VE em ratos infartados sem, no entanto, alterar a contratilidade e o tamanho do IM;
- 4) a aplicação de 25 μ g de VEGF₁₆₅ na artéria principal do GD induz diminuição do tamanho do IM que pode estar associada ao aumento do fluxo colateral extramiocárdico do GD-coração observado neste grupo tratado com VEGF. Estes resultados sugerem que o uso de fatores angiogênicos, como o VEGF₁₆₅, pode induzir melhora da perfusão das regiões isquêmicas do coração infartado, limitando a perda tecidual, que associada ao efeito de compressão passiva do VE infartado pelo GD pós CDM, pode atenuar as disfunções decorrentes de isquemias miocárdicas crônicas .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acker MA. Dynamic Cardiomyoplasty: at the crossroads. *Ann Thorac Surg*, 68: 750-755, 1999.

Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanism of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res*, 29: 354-362, 1997.

Annex BH, Torgan CE, Lin P, Taylor DA, Thompson MA, Peters KG, Kraus WE. Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 274 H860-H867, 1998.

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y & Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurements of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *American Journal of Pathology*, 118:484-492, 1985a.

Anversa P, Loud AV, Levicky V & Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology*, 248: H876-h882, 1985b.

Anversa, P., C. Beghi, Y. Kikawa, G. Olivetti. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy and capillary growth. *Circ. Res.* 58:26-37, 1986.

Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 74:555-564, 1994.

Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 91(11):2793-2801, 1995.

Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel J, Hutcheson KA, Glower DD, Taylor DA. Cellular cardiomyoplasty improves diastolic properties of injured heart. *J Surg Res*, 85: 234-242, 1999.

Bailey WF, Magno MG, Buckman PD, DiMeo F, Langan T, Armenti VT, Mannion JD. Chronic stimulation enhances

**extramiocardial collateral blood flow after
cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 56: 1045-1052, 1993.**

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 28: 1176-1179, 1994a.

Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 89(5): 2183-2189, 1994b.

Barner HB, Kaiser GC, Mudd G, Jellinek M, Hanlon CR. Internal mammary artery implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 56: 43-50, 1968.

Bassand JP. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction-solved and unsolved issues. *Eur Heart J*, 16(1): 58-63, 1995.

Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med*, 73(7):333-346, 1995.

Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 97, 1114-1123, 1998.

Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation*, 91, 2802-2809, 1995.

Bauters C, Meurice T, Hamon M, Mcfadden EP, Lablanche JM, Bertrand ME.

Mechanisms and prevention of restenosis: From experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res*, 31: 835-846, 1996.

Beck CS, Tichy VL. The production of collateral circulation to the heart. *Am Heart J*, 10:849-73, 1935.

Beck CS. Further data on the establishment of a new blood supply to the heart by operation. *J Thorac Surg*, 5: 604, 1936.

Begg FR, Adatepe MH, Salvoza MI, Magovern GJ. Myocardial scintigraphy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 70:398-404, 1975.

Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol*, 27:291-305, 1995.

Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, 89:151-163, 1994.

Boluyt MO, O'neil L, Meredith AL, Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG: Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. *Circ Res* 75:23-32, 1994.

Bomtemps L, Itti R, Delahaye F, Jegaden O. et al. Evaluations of stress ejection fraction in patients with severely reduced left ventricular function before and after cardiomyoplasty. *Eur J Nucl Med*, 18 (8): 648, 1991.

Brown LF, Tognazzi, K. Dvorak HF, Harrist TJ. Strong expression of kinase insert domain-containing receptor, a vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptor in AIDS-associated Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol*, 148: 1065-1074, 1996.

Buckman PD, Mannion JD, Magno M, DiMeo F, McHugh M. After a cardiomyoplasty, collaterals from skeletal muscle form to chronic ischemic myocardium. *Artificial Organs*, 16(3):273-280,1992.

Bueler H. Adeno-associated viral vector for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem*, 380: 613-622, 1999.

Callif RM, Bounos P, Horrel FE et al. The prognosis in the presence of coronary artery disease. Em: Braunwood E, Mock MB, Watson J eds. *Congestive heart failure*, New York, Grune and Stratton, 31-40, 1992.

Capasso JM, Li P, Zhang X Meggs Lg & Anversa P.

Alteration in Ang II responsiveness in left and ventricular myocardium after infarction-induced heart failure in rats.

***American Journal of Physiology*, 264:H2056-H2067, 1993.**

Capouya ER, Gerber RS, Drinkwater DC Jr, Pearl JM, Sack JB, Aharon AS, Barthel SW, Kaczer EM, Chang PA, Laks H. et al. Girding effects of nonstimulated cardiomyoplasty on left ventricular function. *Ann Thorac Surg*, 56:867-71, 1993.

Carpentier A, Chachques JC, Acar C, Relland J, Mihaileanu S, Bensasson D, Kieffer JP, Guibourt P, Tournay D, Roussin I. Dynamic cardiomyoplasty at seven years. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 106: 42-52, 1993.

Carpentier AC, Chachques JC. Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case. *Lancet*, 8440: 1267, 1985.

- Cestari IA, Marques E, Leirner AA. Effects of muscle length, frequency of stimulation, and fatigue on the isometric tension in canine latissimus dorsi. *Artificial Organs*, 19 (3): 217-221, 1995.
- Chachques JC, Berrebi A, Hernigou A, Cohen-Solal A, Lavergne T, Marino JP, D'Attellis N, Bensasson D, Carpentier A. Study of muscular and ventricular function in dynamic cardiomyoplasty: a ten-year follow-up. *J Heart Lung Transplant*, 16:854-68, 1997.
- Chachques JC, Grandjean P, Schwartz K, Mihaileanu S, Fardeau M, Swynghedauw B, Fontaliran F, Romero N, Wisnewsky C, Perier P, Carpentier A. Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function. *Circulation*, 78(5 Pt 2):III203-16, 1988.
- Chan SY, Li K, Piccotti JR, Louie MC, Judge TA, Turka LA, Eichwald EJ, Bishop DK. Tissue specific consequences of the anti adenoviral immune response: implications for cardiac transplants . *Nat Med*, 5: 1143-1149, 1999.
- Checanov VS, Tchekanov GV, Rieder MA, Einstein R, Wankowki DM, Schmidt DH, Nikolaychik VV, Lelkes PI. Biologic glue increase capillary ingrowth after cardiomyoplasty in an ischemic cardiomyopathy model. *ASAIO J*, 42: M480-M487, 1996.
- Chen FY, Aklog L, deGuzman BJ, Laurence RG, Couper GS, Appleyard RF, Cohn LH, McMahon TA. New technique measures decreased transmural myocardial pressure in cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 60:1678-82, 1995.
- Cheng W, Justiz AG, Soberman MS, Alazraki NP, Santamore WP, Sink JD: Effects of dynamic cardiomyoplasty on indices of left ventricular systolic and diastolic function in canine model chronic heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 103:1207-13, 1991.

- Chleboun JO, Martins RN, Mitchell CA, Chrilla TV. Basic FGF enhances, the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem Biophys Res Commun*: 185: 510-516, 1992.
- Cohn JN. Left ventricular function after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 14(9): S55-S58, 1989.
- Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*, 264:20017-20024, 1989.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiov Res*, 49, 507-521, 2001.
- Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Acidic FGF enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 83: 1013-1019, 1989.
- Corin WJ, George DT, Sink JD, Santamore WP. Dynamic cardiomyoplasty acutely impairs left ventricular diastolic function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 104: 1062-1071, 1992.
- Corr P, Pearle D, Hinton J, Roberts W, Gillis R. Site of myocardial infarction: a determinant of the cardiovascular changes induced in the cat by coronary occlusion. *Circ. Res.* 39:840-847, 1976.
- Corr PB, Gillis RA. Autonomic neural influences on the dysrhythmias resulting from myocardial infarction. *Circ Res*, 43(1):1-9, 1978.
- Criollos RL, AlShamma AM, Roe BB. Direct measurement of extracoronary blood flow after revascularization procedures. *Ann Thorac Surg*, 4:151-9, 1967.

- Criollos RL, AlShamma AM, Roe BB. Quantitative studies of extracoronary blood flow after double internal mammary artery implantation. *Circulation*, 37/38 (suppl 2): II27-32, 1968.
- d'Avila K, Cestari IA, Bittencourt Jr. PHI, Leirner AA, Irigoyen MC. Changes in latissimus dorsi isometric contractile properties in streptozotocin-induced diabetic rats. *Artificial Organs*, 21(6): 485, 1997.
- De Angelis K, Cestari IA, Barp J, Dall'Ago P, Bittencourt PIH, Belló AA, Belló-Klein A, Llesuy S, Irigoyen MC. Oxidative stress in latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*, 33 (11): 1363-1368, 2000.
- De Angelis K, Fortes ZB, Oliveira MA, Irigoyen MC, Cestari IA. Vasoreactivity in Latissimus dorsi: a new approach to study videomicroscopy of microcirculation. *Artificial Organs*, in press, nov. 2001b.
- De Angelis K, Senna S, Irigoyen MC, Cestari IA. Contractile and biochemical alterations of rat latissimus dorsi in experimental diabetes. *J Appl Physiol*, em discussão, 2001b.
- De Brusk RF. Evaluations of patients after recent acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 110:485, 1989.
- De Felice A, Frering R, Horan P. Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *Am J Physiol*, 26: H289-H296, 1989.
- Drexler, H., J. Depenbusch, A. Truog, R. Zelis, S. Flaim. Effects of diltiazem on cardiac function and regional blood flow at rest and during exercise in a conscious rat preparation of chronic heart failure (myocardial infarction). *Circulation* 71:1262-1270, 1985.
- Drinkwater DC, Chiu RC-J, Modry D. Cardiac assist and myocardial repair with synchronously stimulated skeletal muscle. *Surg Forum*, 31: 271-273, 1980.

- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor , microvascular hypermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.*, 146:1029-1039, 1995.
- Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P. Induction of a fibrin-gel investment: na early event in line 10 hepatocarcinoma growth medicated by tumor-secret products. *J Immunol*, 122: 166-174, 1979.
- Edelman ER, Mathiowitz E. Langer R, Klagsbrun M. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 12: 619-626, 1991.
- Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. *Circulation*, 94:2285-96; 1996.
- EIOakley RM, Jarvis JC, Barman D, Greenhalgh DL, Currie J, Downham DY, Salmons S, Hooper TL. Factors affecting the integrity of latissimus dorsi muscle grafts: implications for cardiac assistance from skeletal muscle. *J Heart Lung Transplant*, 14 (2): 359-365, 1995.
- Elser D, Riegger GAJ. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Cur Opin Cardiol*, 10: 253-259, 1995.
- Eppley BL, Doucet M, Connolly DT, Feder J. Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg.* 96: 391-398. 1988.
- Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowski R, Therapeuttc interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res*, 49: 532-542, 2001.
- Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann Thorac Surg*, 5:334-9, 1968.

- Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculoptorpin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell*, 73: 1-6, 1991.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161:851-858, 1989.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13: 18-32, 1992.
- Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J, Henzel WJ. Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods Enzymol*, 198: 391-404, 1991.
- Fishbein M, Maclean D, Maroko P. Experimental myocardial infarction in the rat. *Am. J. Pathol.* 90:57-70, 1978.
- Fletcher P, Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects of systolic function. *Circ. Res.* 49:618-626, 1981.
- Folkman J, Klagsbrun M. A family of angiogenic peptides. *Nature* 329: 671, 1987.
- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186, 1971.**
- Fujita M, Nakae I, Fudo T, Tanaka T, Iwase T, Tamaki S, Nohara R, Sasayama S. Rate of collateral vessels after successful coronary angioplasty in patients with effort angina. *J Am Coll Cardiol*, 1;29(3):544-548, 1997.
- Fujita M, Sasayama S, Asanoi H, Nakajima H, Sakai O, Ohno A. Improvement of treadmill capacity and collateral circulation as a result of exercise with heparin pretreatment in patients with effort angina. *Circulation*. 77: 1022-1029, 1988.

Furberg C, Yusuf S, Thom TJ. Potential for altering the natural history of congestive heart failure. Need for large clinical trials. *Am J Cardiol*, 55:45-7, 1985.

Furnary AP, Chachques JC, Moreira LF et al. Long-term outcome, survival analysis, and risk stratification of dynamic cardiomyoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112: 1640-1650, 1996.

Furnary AP, Magovern JA, Chirstlieb IY , Trumble DR, Magovern GJ. Component analysis of bilateral anterior cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 55: 72-77, 1993.

Gay RG. Early and late effects of captropil treatment after large myocardial infarction in rats. *Journal of the American College of Cardiology*, 16:967-977, 1990.

George DT, Corin WJ, Sink JD, Santamore WP. Static cardiomyoplasty effects on load-dependent and load-independent left ventricular systolic function. In: *Cardiac Bioassit*, Carpentier A, Chachques JC, Grandjean PA, Futura Publishing Company (ed), New York, 1997.

Georgiade GS, Georgiade NG, Reifkohl R, Barwis WJ (eds), Textbook of Plastic, Maxillofacial and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 26-46, 1009-1020, 1992.

Gibson CM, Ryan K, Sparano A, Moynihan JL, Rizzo M, Kelley M, Marble SJ, Laham R, Simons M, McClusky TR, Dodge JT Jr. Angiographic methods to assess human coronary angiogenesis. *Am Heart J*, 137: 169-179, 1999.

Gilgenkrantz H, Duboc D, Juillard V, Couton D, Pavirani A, Guillet JG, Briand P, Kahn A Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation

- adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum Gene Ther.* 6: 1265-1274, 1995.
- Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*, 2: 534-539, 1996.
- Goldfarb M. The fibroblast growth factor family. *Cell Growth Differ*, 1:439-445, 1990.
- Griffith GC, Hbats W. A ventricular perforation in transplanting a new blood supply. *New Int Clin NS*, 2:17, 1938.
- Guazzi M, Polese A, Fiorentini C, Magrini F, Olivari MT, Bartorelli C. Left and right haemodynamics during spontaneous angina pectoris. Comparisons between angina with ST segment depression and angina with ST segment elevation. *Br Heart J*, 37: 401-13, 1975.
- Habib GB; Heibig J; Forman SA, Brown BG; Robertes R, Terrin ML, Bolli R. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans: results of phase I Thrombolysis in Myocardial infarction (TIMI) trial. *Circulation*, 83: 739-146, 1991.
- Hagege AA, Desnos M, Fernandez F, Besse B, Mirochnik N, Castaldo M, Chachques JC, Carpentier A, Guerot C. Clinical study of the effect of latissimus dorsi muscle flap stimulation after cardiomyoplasty. *Circulation*, 92 (Suppl 2): 210-5, 1995.
- Hakkinen JP, Miller MW, Smith A, Knight D. Measurement of organ blood flow with colored microspheres in the rat. *Cardiovasc Res*, 29: 74-79, 1995.
- Hammermeister KE, De Rouen TA, Dodge HT. Variables predictive of survival in patients with coronary in patients with coronary disease. *Circulation* 59: 421, 1979.

- Harada K, Friedman M, Lopez JJ, Wang SY, Li J, Prasad PV, Peralman JD, Edelman ER, Sellke FW, Simons M. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*, 270, H1791-H1802, 1996.
- Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, Isner JM, Symes JF. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF- mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*, 63:77-82, 1996.
- Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*. 267: 1948-1954. 1994.
- Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K , Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Bonow RO. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation*, 101:118-121, 2000.
- Henry T, Rocha-Singh K, Isner J et al. Results of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) administration trial. *J Am Coll Cardiol*, 31:65A, 1998.
- Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC. Final results of the VIVA trial of rhVEGF human therapeutic angiogenesis. *Circulation*, 100: I-476, 1999.
- Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis*, 20(1):55-79, 1977.
- Hirai T, Fugita M, Nakajima H. et al. Importance of collateral circulation for prevention of left ventricular aneurysm formation in acute myocardial infarction. *Circulation*, 79:791-796, 1989.

- Hockel M, Schlenger K, Doctrow s, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg* 128:423-429, 1993.
- Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala MD, Sheriff DD, Esakof DD, Chaudhry M, Symes JF, Isner JM. Vascular endothelial growth factor vascular permeability factor produces nitric oxide-dependente hypotension. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*, 17: 2793-2800, 1997.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5(12):1806-1814, 1991.
- Hudlicka O, Brown MD, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* 72: 369-417, 1992.
- Hudson CL, Moritz AR, Wearn JT. The extramiocardial anastomoses of the coronary arteries. *J Exp Med*, 56: 919-928, 1932.
- Ianuzzo CD, Ianuzzo SE, Carson N, Feild M, Locke M, Gu J, Anderson WA, Klabunde RE. Cardiomyoplasty: degeneration of the assisting skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 80(4): 1205-1213, 1996.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization (Perspective). *J Clin Invest*, 103: 1231-1236, 1999.
- Isoda S, Jano J, Jin J, Walters HL, Kondo J, Matsumoto A. Influence of a delay on latissimus dorsi muscle flap blood flow. *Ann Thorac Surg*, 59: 632-638, 1995.
- Ito WD, Arras M, Scholz D , Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*, 273: H1255-H1265, 1997.

- Jatene AD, Moreira LF, Stolf NA, , Bocchi EA, Seferian P Jr, Fernandes PM, Abensur H. Left ventricular function changes after cardiomyoplasty in patients with dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 102: 132-9, 1991.
- Jessup M. Dynamic cardiomyoplasty: expectations and results. *J Heart Lung Transplant,* 19: 68-72, 2000.
- Jesus FR. Breve consideraciones sobre un case de herida penetrante del corazon. *Bol Assoc Med Puerto Rico,* 23: 380-382, 1931.
- Jondeau G, Dorent R, Dib JC, Dib JC, Dubourg O, Benzidia R, Gandjbakhch I, Bourdarias JP. Dynamic cardiomyoplasty: effect of discontinuing latissimus dorsi stimulation on left ventricular systolic and diastolic performance and exercise capacity. *J Am Coll Cardiol.* 26: 129-34, 1995.
- Kalil Filho R, Bocchi E, Rosemberg L, Bacal F, Moreira LF, Ferreira BM, Stolf NA, Magalhães AA, Bellotti G, Jatene A. Avaliação das alterações morfológicas crônicas do músculo grande dorsal, após cardiomioplastia, através de ressonância magnética. *Arq Bras Cardiol,* 65(3): 221-225, 1995.
- Kantrowitz A & McKinnon W. The experimental use of diaphragm as an auxiliary myocardium. *Surg Forum,* 9: 266-268, 1959.
- Kantrowitz A. Functioning autogenous muscle used experimentally as an auxiliary ventricle. *Trans Am Soc Artif Intern Org,* 6: 305-310, 1960.
- Kass D, Baughman KL, Park PH, Cho PW, Levin HR, Gardner TJ, Halperin HR, Tsitlik JE, Acker MA. Reverse remodeling from cardiomyoplasty in human heart failure: external constraint versus active assist. *Circulation,* 91:2314-8; 1995.
- Kawaguchi O, Goto Y, Futaki S, Ohgoshi Y, Yaku H, Suga H. Mechanical enhancement and myocardial oxygen saving by synchronized dynamic left ventricular compression. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 103:573-81, 1992.

- Kawaguchi O, Goto Y, Futaki S, Ohgoshi Y, Yaku H, Suga H. The effects of dynamic cardiac compression on ventricular mechanics and energetics. Role of ventricular size and contractility. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 107:850-9, 1994.
- Kawaguchi O, Goto Y, Ohgoshi Y, Yaku H, Murase M, Suga H. Dynamic cardiac compression improves contractile efficiency of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 113:923-31, 1997.
- Khouri RK, Hong SP, Deune EG, Tarpley JE, Song SZ, Serdar CM, Pierce GF. De novo generation of permanent neovascularized soft tissue appendages by platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* . 94: 1757-1763: 1994.
- Kornowski R, Leon MB, Fuchs S , Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE. Electromagnetic guidance for catheter based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models. *J Am Coll Cardiol*, 35: 1031-1039, 2000.
- Kratz J M, Johnson WS, Mukherjee R, Hu J, Crawford FA, Spinale GG. The relation between latissimus dorsi skeletal muscle structure and contractile function after cardiomyoplasty. *J Thor Cardiovasc Surg*, 107:868-878, 1994.
- Kusaba E, Schraut W, Sawatani S, Jaron D, Freed P, Kantrowitz A. A diaphragmatic graft for augmenting left ventricular function. *Trans Am Soc Artif Intern Org*, 19: 251-257, 1973.
- Laham RJ, Rezaee M, Post M, Sellke FW, Braeckman RA, Hung D, Simons M.. Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos*, 27: 821-826, 1999.
- Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF et al. Comparative effects

of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and arterial response to injury. *Circulation*, 94: 1074-1082, 1996.

Lazzara RR, Trumble DR, Duan C, Magovern JA. Effects of mobilization and stimulation on pH and temperature in pedicled latissimus dorsi flaps used for cardiac assist. In: *Cardiac Bioassist*, Carpentier A, Chachques JC, Grandjean PA, Futura Publishing Company (ed), New York, 1997.

Lee KF, Dignan RJ, Parmar JM, Dyke CM, Benton G, Yeh T Jr, Abd-Elfattah AS, Wechsler AS. Effect of dynamic cardiomyoplasty on left ventricular performance and myocardial mechanics in dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 102:124-31, 1991.

Leriche R, Fontaine R. Essai experimental de traitement de certains infarctus du myocarde et de l'aneurysme du coeur par une greffe de muscle strie. *Bull Soc Nat Chir*, 59: 229-232, 1933.

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, 270:13333-13340, 1995.

Li CM, Chiu RC. The importance and limitations of prospective randomized studies for new, evolving surgical procedures: lessons from the dynamic cardiomyoplasty trial. *Pacing Clin Electrophysiol*, 19(12 Pt1):2035-9, 1996.

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*, 272(2 Pt 2):H722-727, 1997.

- Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP, Tofukuji M, Sellke FW, Bunting S, Simons M. Hemodynamic effect of intracoronary VEGF delivery evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol*, 273:H1317-323, 1997.
- Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, Carrozza JP, Sellke FW, Simons M. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res*, 40: 272-281, 1998.
- Lorusso R, Milan E, Volterrani M, Giubbini R, van der Veen FH, Schreuder JJ, Picchioni A, Alfieri O. Cardiomyoplasty as an isolated procedure to treat refractory heart failure. *Eur J Cardio-Thoracic Surg*, 11:363-372, 1997.
- Lucas CM, Van der Veen F, Cheriex E et al. The importance of muscle relaxation in dynamic CMP. *PACE*, 15: 1430-1436, 1992.
- Mackoviak JA, Stephenson LW, Kelley A. Partial replacement of the right ventricle with a synchronously contracting diaphragmatic skeletal muscle autograft. *Proc 3rd Meeting Int Soc Artif Org*, 5 (Suppl): 550, 1981.
- Madsen EB, Hougaard P, Gilpin E. Dynamic evaluation of prognosis from time-dependent variables in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 51: 1579, 1983.
- Magovern JA, Furnary AP, Christlied IY, Kao RL, Magovern GJ. Bilateral latissimus dorsi cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 52: 1259-1265, 1991.
- Mannion JD, Blood V, Bailey W, Bauer TL, Magno MG, DiMeo F, Epple A, Spinale FG. The effect of basic fibroblast growth factor on the blood flow and morphologic features of a latissimus dorsi cardiomyoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg* ;111:19-28,1996.
- Mannion JD, Magno M, Buckman P. Acute stimulation increases extramiocardial collateral blood flow after a cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 56: 1351-1358, 1993.

Massie BM, Conway M. Survival of patients with congestive heart failure: past, present, and future prospects. *Circulation*, 75(suppl 4):2-19, 1987.

Mathey D, Bleifeld W, Hanrath P, Effert S. Attempt to quantitative relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction. *Br. Heart J.* 36:271-279,1974.

Mazue G, Bertolero F, Garofano L, Brughera M, Carminati P. Experience with the preclinical assessment of basic fibroblast growth factor (bFGF). *Toxicol Lett*, 64-65, (329-338), 1992.

Meggs LG, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ & Anversa P (1993). Regulation of Angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circulation Research*, 72:1149-1162.

Melillo G, Soccianti M, Kovesde I, Safi J Jr, Riccioni T, Capogrossi MC. Gene therapy for collateral vessel development. *Cadiovasc Res*, 35: 480-489, 1997.

Meyrelles SS, Monteiro KC, Cabral AM, Vasquez EC. Impairment of the reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Br j Med Biol Res*, 27: 1065-9, 1994.

Mill JG, Gomes APV, Carrara AB, Gomes MGS, Vassalo DV. Influence of chronic captropil therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. *Pharmacological Research*, 29:77-88, 1994.

Mill JG, Leite CM, Novaes MA, Lima-Pereira FE, Vassalo DV. Propranolol reduces myocardial hypertrophy in the

right cardiac chambers after infarction in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, 25:865-869, 1992.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res*, 24(9):748-753, 1990.

Mill JG, Vassalo DV, Leite CM. Time courses changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24:855-858, 1991.

Moreira LF, Bocchi EA, Stolf NA, Bellotti G, Jatene AD. Dynamic cardiomyoplasty in the treatment of dilated cardiomyopathy: current results and perspectives. *J Card Surg*, 11(3): 207-16, 1996.

Moreira LF, Stolf NA. Dynamic cardiomyoplasty as a therapeutic alternative: current status. *Heart Fail Rev*, 6(3): 201-212, 2001.

Moreira LFP, Bocchi EA, Stolf NAG, Pileggi F, Jatene AD. Current expectations in dynamic cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 55: 299-303, 1993.

Mott BD, Misawa Y, Lough JO, Chiu RC. Clinicopathological correlation of dynamic cardiomyoplasty. *Am J Cardiol*, 11:133E, 1996.

Mott DB, Oh JH, Misawa Y, Helou J, Badhwar V, Francischelli D, Chiu RCJ. Mechanisms of cardiomyoplasty: comparative effects of adynamic versus dynamic cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 65: 1039-1045, 1998.

- Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 99: 1726-1732, 1999.
- Muhlhauser J, Pili R, Merrill MJ, Maeda H, Passaniti A, Crystal RG, Capogrossi MC. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or non secreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Human Gene Ther*, 6: 1457-1465, 1995.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang P, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 101: 2567-2578, 1998.
- Nakajima H, Niinami H, Hooper TL, Hammond RL, Nakajima HO, Lu H, Ruggiero R, Thomas GA, Mocek RW, Fietsam R, Krakovsky AA, Spanta AD, Suga D, Stephenson LW, Baciewicz FA. Cardiomyoplasty: probable mechanism of effectiveness using the pressure-volume relationship. *Ann Thorac. Surg*. 57:407-415, 1994.
- Nakamura K & Glenn WWL. Graft of the diaphragm as a functioning substitute for the myocardium. *J Surg Res*, 4: 435-439, 1964.
- Norris RM, Barnaby PF, Brandt PWT, Geary GG, Whitlock RM, Wild CJ, Barratt-Boyes BG. Prognosis after recovery from first acute myocardial infarction: determinations of reinfarction and sudden death. *Am J Cardiol*, 53: 48, 1984.
- O'Shaughnessy L. An experimental method of providing a collateral circulation to the heart. *Br J Surg*, 23:665-670, 1936.
- Oh JH, Badhwar V, Chiu RC. Mechanism of dynamic cardiomyoplasty. *J Cardioac Surg*, 11: 194-199, 1996.

Oh JH, Badhwar V, Mott BD, Li CM, Chiu RCJ. The effects of prosthetic binding and adynamic cardiomyoplasty in a model of dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116: 148-153, 1998.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F et al. Apoptosis in failing human heart. *N Engl J Med*, 336: 1131-1141, 1997.

Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development of thoracic aorta in rat. *Circ Res* 47 417-424, 1980.

Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circ Res*, 68:856-869, 1991.

Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*, 67: 23-34, 1990.

Opie LH. Heart failure today: proceedings of a symposium. *Cardiology*, 75:138, 1988.

Packer M. Prolonging life in patients with congestive heart failure: the next frontier. *Circulation*, 75(Suppl IV): 1-3, 1987.

Palmer AS, Spies SM, Miller AJ, Greene R, Balino A. Nuclear scanning with Technetium-99 m-Sestmaibi to evaluate ischemia in muscle flaps for CMP. *ASAIO* 41: M 508-M511, 1995.

Patel HJ, Lankford EB, Polidori DJ, Pilla JJ, Plappert T, Sutton MStJ, Acker MA. Dynamic cardiomyoplasty: Its chronic and acute effects on the failing heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 114:169-78, 1997.

Patel HJ, Polidori DJ, Pilla JJ, Plappert T, Kass D, St John Sutton M, Lankford EB, Acker MA. Stabilization of chronic remodeling by asynchronous cardiomyoplasty in dilated cardiomyopathy: effects of a conditioned muscle wrap. *Circulation*, 96:3665-71, 1997.

Pecher P & Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg*, 69, 1414-1419, 2000.

Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*, 57:84-95, 1985.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher J, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*, 260: H1406-H1414, 1991.

Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spandaro J, Konecny R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* 44:503-512, 1979.

Pfeffer M, Pfeffer J, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 72:406-412, 1985.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 81: 1161-1172, 1990.

Pinto YM, De Smet BGJL, Van Gilst WH, Scholtens E, Monnick S, De Graeff PA, Wesseling H: Selective and time related activation of the cardiac renin-angiotensin system after experimental heart failure: relation to ventricular

function and morphology. *Cardiovas Res*, 27:1993-1938, 1993.

Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res*, 49: 522-531, 2001.

Prinzen FW & Bassingthwaighte JB. Blood flow distribution by microspheres deposition methods. *Cardiovasc Res*, 45: 13-21, 2000.

Provan JL, Hammond GL, Austen WG. Flowmeter studies of internal mammary artery function after implantation into the left ventricular myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 52:820-32, 1966.

Quyumi AA, Diodati JG, Lakatos E, Bonow RO, Epstein SE. Angiogenic effects of low molecular weight heparin in patients with stable coronary artery disease: a pilot study. *J Am Coll Cardiol*: 22: 635-641, 1993.

Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121: 871-878, 2001.

Rakusan K. Cardiac growth, maturation and aging. Em: R Zak (ed.). *Growth of the heart in health and disease*. Raven Press, New York, 131-164, 1984.

Rentrop KP, Feit F, Sherman W, Thornton JC. Serial angiographic assessment of coronary artery obstruction and collateral flow in acute myocardial infarction. Report from the second Mount Sinai-New York University Reperfusion Trial. *Circulation*, 80: 1166-1175, 1989.

Ribatti D, Gualandris A, Belleri M, Massardi L, Nico B, Rusnati M, Dell'Era P, Vacca A, Roncali L, Presta M.. Alteration of blood vessel development by endothelial cells overexpressing fibroblast growth factor-2. *J Pathol*, 189: 590-599, 1999.

Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, Toivanen P, Leinonen M, Saikku P, Tenkanen L, Manninen V, Hovi T, Manttari M. Infections, inflammation and the risk of coronary heart disease. *Circulation*, 101: 252-257, 2000.

Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, Sarembock IJ, Burwell LR, Kaul S. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patient with recent myocardial infarction. *N Engl J Med* 327:1825-31, 1992.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, 75:977-984, 1994.

Sasayama S, Fujita M. Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation*, 85:1197-204, 1992.

Schaper W, Piek JJ, Munoz-Chapuli R, Wolf C, Ito WD. Collateral circulation of the heart. In: Ware JA, Simons M. Angiogenesis in cardiovascular disease. New York, Oxford University Press, pp159-198, 1999.

Schreuder JJ, van der Veen FH, van der Velde ET, Delahaye F, Alfieri O, Jegaden O, Lorusso R, Jansen JR, van Ommen V, Finet G. Beat-to-beat analysis of left ventricular pressure-volume relation and stroke volume by conductance catheter and aortic Modelflow in cardiomyoplasty patients. *Circulation*, 91: 2010-7, 1995.

Schwartz H, Leiboff RH, Bren GB, Wasserman AG, Katz RJ, Varghese PJ, Sokil AB, Ross AM. Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 4:1088-1093, 1984.

Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH, Kloner RA.

Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat – angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol*, 35: 1323-1330, 35, 2000.

Schwinger RH, Bohm M, Koch A, Schimdt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Ermann E: The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res*, 74:959-969, 1994.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219: 983-985, 1983.

Shirota K, Kawaguchi O, Huang Y, Takeshi Y, Carrington R, Brady PW, Hunyor SN. Ventricular remodeling after cardiomyoplasty in heart failure sheep: passive and dynamic effects. *Ann Thorac Surg*, 70:2102-6, 2000.

Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 2;102(11):E73-86, 2000.

Sladek T, Sladkova J, Kolar F, Papousek F, Cicutti N, Korecky B, Rakusan K. The effects of AT1 receptor antagonist on chronic cardiac response to coronary artery ligation in rats. *Cradiovasc Res*, 31: 568-576, 1996.

Smith WM. Epidemiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol*, 55:3A-8A, 1985.

Soltero ER, Glaeser DH, Michael LH, Hartley CJ, Earle NR, Li Z, Lawrie GM. Hemodynamic effects of different pacing ratios in chronic dynamic double cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 62(5): 1380-1387, 1996.

Spinale FG. Pathophysiology of tachycardia induced heart failure. New York: Futura, 1996.

Stefanon I, Martins MA, Vassalo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*, 27: 2667-2679, 1994.

Sweet C, Ludden C, Stabilito I, Emmert S, Heyse J. Beneficial effects of milrinone and enalapril on long-term survival of rats with healed myocardial infarction. *Eur. J. Pharmacol.* 147:29-37, 1988.

Takagi H, Hirose H, Sasaki E, Bando M, Furuzawa Y, Murukawa S, Mori Y. Effects of Wrapping tightness on acute cardiac function in dynamic cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 63, 1706-1712, 1997.

Takeshita, S Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindblind model. *J Clin Invest* 93:662-670, 1994.

Taylor GJ, Humphries JO, Mellits ED , Pitt B, Schulze RA, Griffith LS, Achuff SC. Predictors of clinical course, coronary anatomy and left ventricular function after recovery from acute myocardial infarction. *Circulation*, 62:960, 1980.

Termet H, Chalencon JL, Estour E. Transplantation sur le myocarde d'un muscle strie excite par pacemaker. *Ann Chir Thorac Cardio*, 5: 260-263, 1966.

Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 94:3281-90, 1996.

Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGE and the VEGF receptors KDR/flk and fit in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. *J Clin Invest*, 95: 1798-1807, 1995.

Unger EF, Sheffield CD, Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the coronary circulation. *Circulation*, 1449-66, 1990.

Unger EF. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*, 49, 497-506, 2001.

Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF₁₆₅ gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 102, 965-974, 2000.

Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, 95: 1030-1037, 1997.

Van Doorn CAM, Bhabra MS, El Oakley RM, Jarvis JC, Salmons S, Hooper T. Effects of cardiomyoplasty on cardiac growth in rats. *J card Surg*, 11:226-233, 1996.

- Vansant JH, Muller WH. Surgical procedures to revascularize the heart: review of the literature. *Am J Surg*, 100:572, 1960.
- Vaynblat M, Chiavarelli M, Shah HR, Ramdev G, Aron M, Zisbrod Z, Cunningham JN Jr.. Cardiac binding in experimental heart failure. *Ann Thorac Surg*; 64:81-5, 1997.
- Vineberg AM. Development of an anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *Can Med Assoc J*, 55:117-9, 1946.
- Vineberg AM. Development of anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *J Thorac Surg*, 18:839-50, 1949.
- Vineberg AM. Treatment of coronary artery insufficiency by implantation of the internal mammary artery into the left ventricular myocardium. *J Thorac Surg*, 23:45-54, 1952.
- Vinerberg AM, Nubro DD, Cohen H, Buller W. Four years' clinical experience with internal mammary implantation in the treatment of human coronary insufficiency including additional experimental studies. *J Thorac Surg*, 29:1-37, 1955.
- Walter DH, Hink U, Asahara T, Van Belle E, Horowitz J, Tsurumi Y, Vandlen R, Heinsohn H, Keyt B, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. The in vivo bioactivity of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is independent of N-linked glycosylation. *Lab Invest*, 74(2):546-556, 1996.
- Wang JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand*, 269: 1-33, 1996.
- Webb SW, Adagey AA, Pantridge JF. Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *Br Med J*, 3: 89-92, 1972.
- Weinstein M, Schasiroff BG. Grafts of free muscle transplants upon the myocardium. *Science*, 104:410, 1936.

White FC, Bloor CM. Coronary vascular remodeling and coronary resistance during chronic ischemia. *Am J Cardiovasc Pathol*, 4:193-202, 1992.

White FC, Carrol SM, Magnet A, Bloor CM. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res* 71:1490-500, 1992.

White HD, Norris RM, Brown MA. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*, 76: 44, 1987.

Wilson JR, Schwartz JS, Sutton MS, Ferraro N, Horowitz LN, Reichek N, Josephson ME. Prognosis in severe heart failure: Relation to hemodynamic measurements and ventricular ectopic activity. *J Am Coll Cardiol*, 2: 403-410, 1983.

Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol*, 30: 2291-2305, 1998.

Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 257, 1401-1403, 1992.

Yap J, O'Brien T, Tazelaar HD, McGregor CG. Immunosuppression prolongs adenoviral mediated transgene expression in cardiac allograft transplantation. *Cardiovasc Res*, 35: 529-535, 1997.

Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological response to

chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alfa. *J Clin Invest*, 103: 691-696, 1999.