

Oscar Albuquerque de Moraes

**Infarto agudo do miocárdio em modelos de polimorfismo da enzima conversora de
angiotensina**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cláudia
Irigoyen.

São Paulo

2018

Oscar Albuquerque de Moraes

**Infarto agudo do miocárdio em modelos de polimorfismo da enzima conversora de
angiotensina**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cláudia
Irigoyen.

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Oscar Albuquerque de
Infarto agudo do miocárdio em modelos de
polimorfismo da enzima conversora de angiotensina /
Oscar Albuquerque de Moraes. -- São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Maria Claudia Irigoyen.

Descritores: 1. Angiotensina I 2. Infarto do
miocárdio 3. Camundongos 4. Sistema nervoso autônomo
5. Ecocardiografia 6. Genes

USP/FM/DBD-423/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, **Silvia Lúcia Albuquerque de Moraes**, em reconhecimento pelo seu amor como mãe e professora, que nunca mediu esforços para me fazer ver que a educação é o caminho a ser seguido.

Dedico este trabalho também a minha esposa **Kátia Scapini** que vem caminhando ao meu lado, não somente no nosso dia a dia, mas também na vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Prof. Dra. Maria Cláudia Irigoyen**, que permitiu que eu fizesse parte da “família de pesquisa do laboratório” de Hipertensão Experimental do InCor. Obrigado pelo acolhimento carinhoso e por ter sido uma pessoa com quem pude contar sempre.

A minha amada **Kátia Scapini**, que soube suportar junto comigo as dificuldades que a vida nos impôs.

Aos técnicos Maikon e Leandro, pela ajuda com os procedimentos cirúrgicos e também pela amizade.

Aos **colegas** do Laboratório de Hipertensão Experimental pela amizade, carinho e por terem criado dentro do “nosso” laboratório um ambiente receptivo de convívio e estudo. Não poderia deixar de agradecer também aos que já concluíram sua etapa no laboratório, como a **Dra. Jaqueline Freire Machi**, a minha quase irmã; **Isabel Lameirinhas**, que me ajudou quando eu ainda não estava preparado para o laboratório; ao colega **Dr. Fernando dos Santos**, com o qual eu aprendi muito devido ao seu olhar crítico sobre os dados debatidos em nossas reuniões; Ao **Dr. Cristiano Mostarda**, que acreditou no meu potencial e me acolheu nos momentos difíceis.

A todos os funcionários e pesquisadores do laboratório de biologia celular (LIM 59) e a Professora Élia Caldini que possibilitou as análises de histologia.

Fica um agradecimento também aos colegas do **biotério**, em especial ao **Dário** e ao **Roberto** pelo esforço extra quando foi necessário.

EPÍGRAFE

“Espero que eu sempre possua firmeza e virtude suficiente para manter aquilo que considero o mais invejável de todos os títulos: o caráter de um homem honesto.”

George Washington

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista *of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Resumo	
Abstract	
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Doenças cardiovasculares</i>	1
1.2 <i>O Sistema renina-angiotensina</i>	2
1.3 <i>Polimorfismo da ECA e doenças cardiovasculares</i>	6
1.4 <i>Infarto agudo do miocárdio</i>	8
1.5 <i>Modelo experimental de polimorfismo da ECA</i>	10
2.0 OBJETIVOS	12
2.1 <i>Objetivo geral</i>	12
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	12
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 <i>Considerações Éticas</i>	13
3.2 <i>Animais e grupos</i>	13
3.3 <i>Genotipagem</i>	14
3.4 <i>Infarto agudo do miocárdio</i>	15
3.5 <i>Avaliações Ecocardiográficas</i>	16
3.6 <i>Canulação</i>	17
3.7 <i>Registro direto dos sinais de pressão arterial</i>	18
3.8 <i>Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial</i>	19
3.9 <i>Análise do barorreflexo espontâneo</i>	20
3.10 <i>Eutanásia e preparação dos tecidos</i>	21
3.11 <i>Processamento do material para histologia e método de identificação</i>	21
3.11.1 <i>Análise da lesão fibras colágenas e área de infarto</i>	22
3.12 <i>Análise do perfil inflamatório</i>	24
3.13 <i>Análise dos dados</i>	25

4.0	RESULTADOS.....	27
4.1	Capítulo I – Caracterização do modelo	27
4.1.1	<i>Avaliação ecocardiográfica.....</i>	<i>27</i>
4.1.2	<i>Frequência cardíaca e pressão arterial</i>	<i>28</i>
4.1.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	<i>29</i>
4.1.4	<i>Variabilidade da Pressão Arterial.....</i>	<i>33</i>
4.1.5	<i>Barorreflexo espontâneo</i>	<i>34</i>
4.1.6	<i>Peso corporal e tecidos</i>	<i>35</i>
4.1.7	<i>Sumários dos resultados do capítulo 1</i>	<i>37</i>
4.2	Capítulo II – Comparação entre os grupos não infartados e os grupos infartados avaliados sete dias após o infarto do miocárdio.....	38
4.2.1	<i>Avaliação ecocardiográfica.....</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Frequência cardíaca e pressão arterial</i>	<i>41</i>
4.2.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	<i>42</i>
4.2.4	<i>Variabilidade da Pressão Arterial.....</i>	<i>48</i>
4.2.5	<i>Barorreflexo espontâneo</i>	<i>49</i>
4.2.6	<i>Peso corporal e tecidos</i>	<i>51</i>
4.2.7	<i>Sumários dos resultados do capítulo 2</i>	<i>53</i>
4.3	Capítulo III – Comparação entre grupos infartados sete e 28 dias após o infarto	
4.3.1	<i>Avaliação ecocardiográfica.....</i>	<i>55</i>
4.3.2	<i>Frequência cardíaca e pressão arterial</i>	<i>59</i>
4.3.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	<i>60</i>
4.3.4	<i>Variabilidade da Pressão Arterial.....</i>	<i>64</i>
4.3.5	<i>Barorreflexo espontâneo</i>	<i>64</i>
4.3.6	<i>Peso corporal e tecidos</i>	<i>66</i>
4.3.7	<i>Avaliação histológica</i>	<i>68</i>
4.3.8	<i>Sumários dos resultados do capítulo 3</i>	<i>69</i>
4.4	Capítulo IV- INTERAÇÕES.....	70
4.4.1	<i>Avaliação ecocardiográfica.....</i>	<i>71</i>
4.4.2	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	<i>77</i>
4.4.3	<i>Barorreflexo espontâneo</i>	<i>78</i>
4.4.4	<i>Análise do perfil inflamatório</i>	<i>81</i>
4.4.5	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	82
4.4.6	<i>Sumários dos resultados do capítulo 4</i>	<i>83</i>

5.0	DISCUSSÃO.....	88
5.1	Caracterização dos grupos controles.....	88
5.1.1	<i>Ecocardiografia.....</i>	88
5.1.2	<i>Pressão Arterial e Frequência cardíaca.....</i>	89
5.1.3	<i>Variabilidade da frequência cardíaca.....</i>	91
5.1.4	<i>Peso Corporal e tecidos.....</i>	93
5.2	Efeito do IM em período sub agudo (7 dias).....	94
5.2.1	<i>Ecocardiografia.....</i>	94
5.2.2	<i>Frequência cardíaca e pressão arterial.....</i>	97
5.2.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca.....</i>	99
5.2.4	<i>Variabilidade da Pressão Arterial.....</i>	101
5.2.5	<i>Barorreflexo espontâneo.....</i>	101
5.2.6	<i>Peso corporal e tecidos.....</i>	102
5.3	Efeito do IAM em 28 dias.....	103
5.3.1	<i>Ecocardiograma.....</i>	103
5.3.2	<i>Frequência cardíaca e pressão arterial.....</i>	104
5.3.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca.....</i>	105
5.3.4	<i>Variabilidade da Pressão Arterial e Barorreflexo.....</i>	105
5.3.5	<i>Peso corporal e tecidos.....</i>	106
5.4	Interações.....	107
5.4.1	<i>Deposição de colágeno, área de infarto e perfil inflamatório.....</i>	107
5.4.2	<i>Avaliação ecocardiográfica.....</i>	110
5.4.3	<i>Variabilidade da Frequência Cardíaca e barorreflexo espontâneo.....</i>	111
6.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	112
6.0	ANEXOS.....	114
7.0	REFERÊNCIAS.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descrição de novos componentes do sistema renina angiotensina.....	3
Figura 2 - Imagem representativa da técnica de infarto do miocárdio.....	16
Figura 3 - Fotos ilustrativas da canulação da artéria carótida e veia jugular em camundongo.....	18
Figura 4 - Imagem representativa do sistema de registro da pressão arterial.....	19
Figura 5 - Imagem mostra o modelo do tratamento utilizado para mensuração da área de infarto e quantidade de colágeno depositado após IAM.....	23
Figura 6 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) FC; B) PAS; C) PAD; D) PAM.....	29
Figura 7 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) SDIP; B) VARIP; C) RMSSD.....	30
Figura 8 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores absolutos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) VLF abs; B) LF abs; C) HF abs.....	31
Figura 9 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores percentuais dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) VLF; B) LF; C) HF.....	32
Figura 10 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores normalizados e balanço simpátovagal dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) LF(nu); B) HF(nu); C) Balanço Simpatovagal.	33
Figura 11 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) SDPAS; B) VARPAS; C) LFPAS abs....	34
Figura 12 - Peso corporal e de tecidos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) Peso corporal; B) Coração; C) TAB; D) Pulmão.....	36
Figura 13 - Índice de hipertrofia renal e peso dos pulmões e do baço dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) IHR; B) Fígado; C) Baço.....	37

Figura 14 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7). Paineis: A) Frequência Cardíaca; B) PAS; C) PAD; D) PAM.....	42
Figura 15 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7). Paineis: A) SDIP; B) VARIP; C) RMSSD.....	43
Figura 16 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores absolutos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) VLF abs; B) LF abs; C) HF abs.....	45
Figura 17 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores percentuais dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) VLF ; B) LF ; C) HF.....	46
Figura 18 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores normalizados e balanço simpato-vagal dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) LF(nu); B) HF(nu); C) Balanço Simpato-vagal.....	47
Figura 19 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) SDPAS; B) Variância PAS; C) LFPAS abs.....	48
Figura 20 - Peso corporal e de tecidos dos grupos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2, ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) Peso corporal; B) Coração; C) TAB; D) Pulmão.....	52
Figura 21 - Peso de tecidos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2, ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Paineis: A) índice de Hipertrofia renal; B) Fígado; C) baço.....	53

Figura 22 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) E/A; B) FAC; C) ESIVd.....	56
Figura 23 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Massa do VE; B) Massa do VE/peso.....	57
Figura 24 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Frequência cardíaca; B) PAS; C) PAD; D) PAM.....	59
Figura 25 - Peso corporal e de tecidos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Peso Corporal; B) Peso Coração; C) TAB; D) Pulmão.....	66
Figura 26 - Peso de tecidos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Índice de hipertrofia renal; C) Baço C) Fígado.....	67
Figura 27 - Dados de histologia do tecido cardíaco dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Colágeno; B) Área de IAM.....	69
Figura 28 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Onda A'; B) Onda E'; C) E'/A'.....	72
Figura 29 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) TDE; B) TRIV/FC; C) ESIVd.....	74
Figura 30 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) FAC; B) FE; C) FS.....	75

Figura 31 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Massa do VE/Peso; B) VVED; C) VVEs.....	77
Figura 32 - Dados de variabilidade da frequência cardíaca dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 33) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) LF abs; B) LF %.....	78
Figura 33 - Dados do barorreflexo espontâneo dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) BRR DOWN; B) BRR ALL C) UP BEI; D) DOWN BEI; E) ALL BEI.....	80
Figura 34 - Dados de perfil inflamatório dos grupos que foram submetidos ao procedimento de infarto do miocárdio (sete e 28 dias após o infarto) com uma (ECA 1(7-28)), duas (ECA 2(7-28)) e três (ECA 3(7-28)) cópias do gene da ECA. Painel: A) IL 10; B) TNF alfa; C) TGF beta; D) CXCL1.....	82
Figura 35 - Curva de Kaplan-Meier (sobrevivência) dos grupos que foram submetidos ao procedimento de infarto do miocárdio (sete e 28 dias após o infarto) com uma (ECA 1(7-28)), duas (ECA 2(7-28)) e três (ECA 3(7-28)) cópias do gene da ECA.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados ecocardiográficos dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3.....	28
Tabela 2 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3.....	35
Tabela 3 - Sumário das alterações dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3.....	38
Tabela 4 - Dados ecocardiográficos dos grupos controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3 -7).....	39
Tabela 5 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3 -7).....	50
Tabela 6 - Sumário das alterações dos grupos infartados ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7.....	54
Tabela 7 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio.....	58
Tabela 8 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio.....	61
Tabela 9 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio.....	63
Tabela 10 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio.....	64
Tabela 11 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio.....	65
Tabela 12 - Sumário das alterações encontradas nos grupos infartados ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28.....	70

Tabela 13 - Sumário dos dados histológicos nos grupos infartados ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7, ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28.....	70
Tabela 14 - Sumário das alterações encontradas de todos os grupos em análise temporal por número de cópias da ECA.....	85
Tabela 15 - Sumário das alterações no perfil inflamatório dos grupos infartados...	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I	Angiotensina II
Ang II	Angiotensina II
DCVs	Doenças cardiovasculares
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FC	Frequência cardíaca
HF %	Banda de alta frequência em porcentagem
HF (nu)	Banda de alta frequência em valores normalizados
HF abs	Banda de alta frequência em valores absolutos
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL 10 IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL 10	Interleucina 10
LF %	Banda de baixa frequência em porcentagem
LF (nu)	Banda de baixa frequência em valores normalizados
LF abs	Banda de baixa frequência em valores absolutos
LFPAS	Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PAM	Pressão arterial média
SDPAS	Desvio padrão da pressão arterial sistólica
SRA	Sistema renina angiotensina
TAB	Tecido adiposo branco
TGF beta	Fator de crescimento transformador beta

TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VARPAS	Variância da pressão arterial sistólica
VE	Ventrículo esquerdo
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VLf %	Banda de muito baixa frequência em porcentagem
VLf (nu)	Banda de muita baixa frequência em valores normalizados
VLf abs	Banda de muito baixa frequência em valores absolutos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
bpm	Batimentos por minuto
g	Gramas
g/g	Gramas por gramas
g/mg	Gramas por miligramas
m/s	Metros por segundo
Mg	Miligramas
mg/dL	Miligrama por decilitro
Min	Minuto
ml/bpm	Mililitros por batimentos por minuto
Mm	Milímetros
mm/s	Milímetros por segundo
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmhg ²	Milímetros de mercúrio ao quadrado
ms	Milissegundos
ms/bpm	Milissegundo por batimento por minuto
ms/mmHg	Milissegundos por milímetros de mercúrio
ms ²	Milissegundo ao quadrado
N	Número
Nu	Unidades normalizadas
°	Graus

pg/ml

Picograma por mililitro

ul

Microlitros

RESUMO

Moraes OA. *Infarto agudo do miocárdio em modelos de polimorfismo da enzima conversora de angiotensina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma doença cardiovascular que apresenta altas taxas de morbimortalidade associado à prejuízo da função cardíaca, disfunção autonômica e alteração do sistema renina angiotensina (SRA). Tem se estabelecido na literatura que a atuação do polimorfismo de genes do SRA, como o da enzima conversora da angiotensina (ECA), poderia contribuir para maior ocorrência de IAM e óbito. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da variação do número de cópias do gene da ECA no infarto agudo do miocárdio. **MÉTODOS:** Foram utilizados camundongos machos adultos, geneticamente modificados para expressar diferentes concentrações fisiológicas da enzima conversora de angiotensina: animais com uma cópia do gene da ECA (ECA 1), que apresentam menores níveis plasmáticos de ECA; com duas cópias do gene da ECA (ECA 2), que apresentam níveis plasmáticos intermediários de ECA; com três cópias do gene da ECA (ECA 3), que apresentam maiores níveis plasmáticos de ECA. Os animais foram divididos em nove grupos (n=10): três grupos sem infarto – ECA 1, ECA 2 e ECA 3; três grupos infartados e avaliados sete dias após o infarto – ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7; três grupos infartados e avaliados 28 dias após o infarto – ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28. Os animais infartados foram submetidos ao IAM pela ligadura da coronária esquerda. Todos os animais passaram por avaliação de ecocardiografia, para determinar a morfometria e função cardíaca e foram canulados para registro direto da pressão arterial. A partir dos sinais de pressão arterial foram realizadas as análises da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), da variabilidade da pressão arterial sistólica e do barorreflexo espontâneo. O tecido cardíaco dos animais infartados foi coletado para quantificação da área de infarto e de colágeno, por meio de técnicas histológicas, e o plasma foi destinado para análise do perfil inflamatório por técnica de ELISA. **RESULTADOS:** Quando comparados os animais não infartados, em relação aos dados ecocardiográficos, observou-se que os animais com três cópias do gene da ECA apresentaram maiores valores de relação E/A do que os animais com duas e uma cópia

do gene da ECA (ECA 3: $1,80 \pm 0,14$ vs. ECA 2: $1,24 \pm 0,16$ e ECA 1: $1,08 \pm 0,14$). Não houve diferença entre os grupos não infartados na pressão arterial sistólica (ECA 1: $124,6 \pm 4,0$; ECA 2: $127,1 \pm 5,62$; ECA 3: $129,2 \pm 3,32$ mmHg) e diastólica (ECA 1: $87,90 \pm 3,00$; ECA 2: $86,79 \pm 2,63$; ECA 3: $85,08 \pm 1,85$ mmHg), bem como na frequência cardíaca (ECA 1: $682,7 \pm 12,54$; ECA 2: $654,6 \pm 15,77$; ECA 3: $625,6 \pm 25,60$ bpm). Em relação aos parâmetros autonômicos nos grupos não infartados, o componente de muito baixa frequência da VFC, em valores percentuais, foi menor no grupo ECA 1 do que no ECA 2 (ECA 1: $7,87 \pm 1,98$ vs. ECA 2: $18,00 \pm 4,25$ %) e o índice de Down Gain do barorreflexo espontâneo foi maior no grupo ECA 3 em comparação com os grupos ECA 2 e ECA 1 (ECA 3: $3,80 \pm 0,50$ vs. ECA 2: $2,00 \pm 0,36$ e ECA 1: $2,24 \pm 0,30$ ms/mmHg). Em relação aos dados ecocardiográficos, comparando os animais não infartados e os animais infartados avaliados sete dias após o infarto, observou-se que: a relação E/A foi maior no grupo ECA 3-7 do que nos grupos não infartados com uma e duas cópias e do que no grupo infartado com duas cópias do gene da ECA (ECA 3-7: $3,47 \pm 0,50$ vs. ECA 1: $1,08 \pm 0,14$, ECA 2: $1,24 \pm 0,16$ e ECA 2-7: $1,74 \pm 0,25$); a mudança de área fracional foi menor nos grupos infartados ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7 em comparação com os não infartados (ECA 1-7: $30,10 \pm 1,80$, ECA 2-7: $31,12 \pm 1,47$ e ECA 3-7: $21,30 \pm 1,47$ vs. ECA 1: $37,14 \pm 1,67$, ECA 2: $37,16 \pm 1,23$ e ECA 3: $40,68 \pm 1,28$ %), e entre os infartados, foi menor no grupo ECA 3-7 do que nos grupos ECA 2-7 e ECA 1-7; a fração de encurtamento foi menor nos grupos ECA 3-7 e ECA 2-7 do que no grupo ECA 3 (ECA 3-7: $16,81 \pm 1,6$ e ECA 2-7: $17,25 \pm 2,1$ vs. ECA 3: $25,00 \pm 1,2$ %). Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, não foram observadas diferenças na pressão arterial e frequência cardíaca entre os grupos sete dias após o infarto. Quanto aos parâmetros autonômicos comparando os animais não infartados e os animais infartados avaliados sete dias após o infarto, observou-se que: a modulação simpática foi maior no grupo ECA 3-7 do que nos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 1-7 (ECA 3-7: $14,85 \pm 2,36$ vs. ECA 1: $4,76 \pm 2,00$, ECA 2: $4,34 \pm 1,40$ e ECA 1-7: $5,13 \pm 1,88$ ms²); e o balanço simpátovagal foi maior no grupo ECA 3-7 do que no grupo ECA 1-7 (ECA 3-7: $2,22 \pm 0,17$ vs. ECA 1-7: $0,81 \pm 0,25$). Sete dias após o infarto, foi observado aumento no peso do coração no grupo ECA 3-7 em comparação aos grupos não infartados (ECA 3-7: $0,205 \pm 0,01$ vs. ECA 1: $0,135 \pm 0,006$, ECA 2: $0,146 \pm 0,006$ e ECA 3: $0,145 \pm 0,008$ g). Quando comparados os grupos infartados sete e 28 dias após o infarto do miocárdio observou-se que: a relação E/A foi menor no

grupo ECA 2-28 do que o grupo ECA 3-7 (ECA 2-28: $1,75 \pm 0,14$ vs. ECA 3-7: $3,47 \pm 0,50$); a espessura do septo intraventricular na diástole foi menor no grupo ECA 1-28 em comparação ao grupo ECA 1-7 (ECA 1-28: $0,63 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,87 \pm 0,06$ mm); não houve diferença entre os grupos na pressão arterial e na frequência cardíaca; o componente de baixa frequência da VFC em valores absolutos foi menor nos grupos ECA 1-28 e ECA 3-28 em comparação ao grupo ECA 3-7 (ECA 1-28: $4,09 \pm 1,45$ e ECA 3-28: $6,04 \pm 1,03$ vs. ECA 3-7: $14,85 \pm 2,36$ ms²); o índice de eficiência do barorreflexo foi maior no grupo ECA 1-28 do que nos grupos infartados avaliados sete dias após o infarto (ECA 1-28: $0,28 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,15 \pm 0,02$, ECA 2-7: $0,17 \pm 0,01$ e ECA 3-7: $0,17 \pm 0,01$); a avaliação histológica mostrou maior deposição de colágeno no grupo ECA 2-7 em comparação ao grupo ECA 1-7 (ECA 2-7: $41,20 \pm 2,87$ vs. ECA 1-7: $23,09 \pm 4,15$ mm²) e menor deposição de colágeno no grupo ECA 1-28 do que o grupo ECA 2-7 (ECA 1-28: $22,09 \pm 5,41$ vs. ECA 2-7: $41,20 \pm 2,87$ mm²); o grupo ECA 1-28 apresentou menor área de infarto comparado ao grupo ECA 3-7 (ECA 1-28: $33,62 \pm 2,40$ vs. ECA 3-7: $48,90 \pm 1,72$ mm²). Em relação ao perfil inflamatório dos animais infartados sete e 28 dias após o infarto, os animais com uma cópia do gene da ECA apresentam maiores valores de IL-10 comparados aos animais com duas e três cópias do gene da ECA (ECA 1(7-28): $65,04 \pm 5,90$ vs. ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28): $37,06 \pm 6,00$ pg/ml) e menores valores de TGF beta (ECA 1 (7-28): $91,44 \pm 11,33$ vs. ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28): $122,0 \pm 8,00$ pg/ml). A curva de sobrevivência mostrou que os animais infartados com 3 cópias do gene da ECA apresentaram menor sobrevivência (41%) e os animais com 1 cópia do gene da ECA maior sobrevivência (71%) ao final do estudo. **CONCLUSÃO:** De maneira geral, os nossos resultados de função cardíaca, função autonômica cardiovascular, perfil inflamatório, área de infarto e curva de sobrevivência indicam que os animais com três cópias do gene da ECA apresentaram pior evolução após o infarto do miocárdio em relação aos animais com uma cópia do gene da ECA.

Descritores: angiotensina I; infarto do miocárdio; camundongos; sistema nervoso autônomo; ecocardiografia; genes.

ABSTRACT

Moraes OA. *Acute myocardial infarction in models of angiotensin converting enzyme polymorphism* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Acute myocardial infarction (AMI) is a cardiovascular disease with high morbidity and mortality rates associated with impairment of cardiac function, autonomic dysfunction, and altered renin angiotensin system (RAS). It has been established in the literature that the performance of the RAS gene polymorphism, such as angiotensin converting enzyme (ACE), could contribute to a higher occurrence of AMI and death. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of the variation of the number of copies of the ACE gene in the acute myocardial infarction.

METHODS: Adult male mice, genetically modified to express different physiological concentrations of the angiotensin converting enzyme were used: animals with one copy of the ACE gene (ACE 1), which had lower plasma levels of ACE; with two copies of the ACE gene (ACE 2), which present intermediate plasma levels of ACE; with three copies of the ACE gene (ACE 3), which have higher plasma levels of ACE. The animals were divided into nine groups (n = 10): three groups without infarction - ACE 1, ACE 2 and ACE 3; three infarcted groups assessed seven days after infarction - ACE 1-7, ACE 2-7 and ACE 3-7; three infarcted groups assessed 28 days after infarction - ACE 1-28, ACE 2-28 and ACE 3-28. Infarcted animals were submitted to AMI by ligation of the left coronary artery. All animals underwent echocardiographic evaluation to determine morphometry and cardiac function and were cannulated for direct recording of blood pressure. The analysis of heart rate variability (HRV), systolic blood pressure variability and spontaneous baroreflex were performed from blood pressure signals. The cardiac tissue of the infarcted animals was collected for quantification of the infarct area and collagen by means of histological techniques, and the plasma was used for analysis of the inflammatory profile by ELISA technique.

RESULTS: When compared non-infarcted animals, in relation to echocardiographic data, it was observed that animals with three copies of the ACE gene had higher values of E/A ratio than animals with two and one copies of the ACE gene (ACE 3 : 1.80 ± 0.14 vs. ACE 2: 1.24 ± 0.16 and ACE 1: 1.08 ± 0.14). There was no difference between the non-infarcted

groups on systolic blood pressure (ACE 1: 124.6 ± 4.0 , ACE 2: 127.1 ± 5.62 , ACE 3: 129.2 ± 3.32 mmHg) and diastolic blood pressure (ACE 1: 87.90 ± 3.00 , ACE 2: 86.79 ± 2.63 , ACE 3: 85.08 ± 1.85 mmHg), as well as in heart rate (ACE 1: 682.7 ± 12 , ACE 2: 654.6 ± 15.77 , ACE 3: 625.6 ± 25.60 bpm). Regarding the autonomic parameters in the non-infarcted groups, the very low frequency component of HRV, in percentage values, was lower in the ACE 1 group than in the ACE 2 (ACE 1: 7.87 ± 1.98 vs. ACE 2: 18.00 ± 4.25 %) and the Down Gain index of the spontaneous baroreflex was higher in the ACE 3 group compared to the ACE 2 and ACE 1 groups (ACE 3: 3.80 ± 0.50 vs. ACE 2: 2.00 ± 0.36 and ACE 1: 2.24 ± 0.30 ms/mmHg). Regarding the echocardiographic data, comparing non-infarcted animals and infarcted animals evaluated seven days after infarction, it was observed that: the E/A ratio was higher in the ACE group 3-7 than in the non-infarcted groups with one and two copies of ACE and higher than in the infarcted group with two copies of the ACE gene (ACE 3-7: 3.47 ± 0.50 vs. ACE 1: 1.08 ± 0.14 , ACE 2: 1.24 ± 0.16 and ACE 2-7: 1.74 ± 0.25); the fractional area change was smaller in the infarcted groups ACE 1-7, ACE 2-7 and ACE 3-7 compared to non-infarcted (ACE 1-7: 30.10 ± 1.80 , ACE 2-7: 31.12 ± 1.47 and ACE 3-7: 21.30 ± 1.47 vs. ACE 1: 37.14 ± 1.67 , ACE 2: 37.16 ± 1.23 and ACE 3: 40.68 ± 1.28 %), and among infarcts, was lower in the ACE group 3-7 than in the ACE groups 2-7 and ACE 1-7; the shortening fraction was lower in the ACE groups 3-7 and ACE 2-7 than in the ACE group 3 (ACE 3-7: 16.81 ± 1.6 and ACE 2-7: 17.25 ± 2.1 vs. ACE 3: 25.00 ± 1.2 %). Regarding hemodynamic parameters, no differences were observed in blood pressure and heart rate among the groups seven days after the infarction. Regarding the autonomic parameters comparing non-infarcted animals and infarcted animals evaluated seven days after infarction, it was observed that: sympathetic modulation was higher in the ACE group 3-7 than in the ACE 1, ACE 2 and ACE 1-7 groups (ACE 3-7: 14.85 ± 2.36 vs. ACE 1: 4.76 ± 2.00 , ACE 2: 4.34 ± 1.40 and ACE 1-7: 5.13 ± 1.88 ms²); and the sympatovagal balance was higher in the ACE group 3-7 than in the ACE group 1-7 (ACE 3-7: 2.22 ± 0.17 vs. ACE 1-7: 0.81 ± 0.25). Seven days after infarction, an increase in heart weight was observed in the ACE group 3-7 compared to non-infarcted groups (ACE 3-7: 0.205 ± 0.01 vs. ACE 1: 0.135 ± 0.006 , ACE 2: 0.146 ± 0.006 and ACE 3: 0.145 ± 0.008 g). When comparing infarcted groups 7 and 28 days after myocardial infarction, it was observed that: the E/A ratio was lower in the ACE group 2-28 than the ACE group 3-7 (ACE 2-28: 1.75 ± 0.14

vs. ACE 3-7: 3.47 ± 0.50); the thickness of the intraventricular septum in diastole was lower in the ACE group 1-28 compared to the ACE group 1-7 (ACE 1-28: 0.63 ± 0.03 vs. ACE 1-7: 0.87 ± 0.06 mm); there was no difference between groups in blood pressure and heart rate; the low frequency component of HRV in absolute values was lower in the ACE groups 1-28 and ACE 3-28 compared to the ACE group 3-7 (ACE 1-28: 4.09 ± 1.45 and ACE 3-28: 6.04 ± 1.03 vs. ACE 3-7: 14.85 ± 2.36 ms²); the baroreflex efficiency index was higher in the ACE group 1-28 than in the infarcted groups assessed seven days after the infarction (ACE 1-28: 0.28 ± 0.03 vs. ACE 1-7: 0.15 ± 0.02 , ACE 2-7: 0.17 ± 0.01 and ACE 3-7: 0.17 ± 0.01); the histological evaluation showed greater collagen deposition in the ACE group 2-7 compared to the ACE group 1-7 (ACE 2-7: 41.20 ± 2.87 vs. ACE 1-7: 23.09 ± 4.15 mm²) and lower collagen deposition in the ACE group 1-28 than the ACE group 2-7 (ACE 1-28: 22.09 ± 5.41 vs. ACE 2-7: 41.20 ± 2.87 mm²); the ACE group 1-28 had a lower infarction area compared to the ACE group 3-7 (ACE 1-28: 33.62 ± 2.40 vs. ACE 3-7: 48.90 ± 1.72 mm²). In relation to the inflammatory profile of infarcted animals seven and 28 days after infarction, animals with one copy of the ACE gene had higher IL-10 values compared to animals with two and three copies of the ACE gene (ACE 1 (7-28): 65.04 ± 5.90 vs. ACE 2 (7-28) + ACE 3 (7-28): 37.06 ± 6.00 pg/ml) and lower TGF beta values (ACE 1 (7-28): 91.44 ± 11.33 vs. ACE 2 (7-28) + ACE 3 (7-28): 122.0 ± 8.00 pg/ml). The survival curve showed that animals infarcted with 3 copies of the ACE gene had lower survival (41%) and animals with 1 copy of the ACE gene had greater survival (71%) at the end of the study. **CONCLUSION:** Our results of cardiac function, cardiovascular autonomic function, inflammatory profile, infarct area and survival curve indicate that animals with three copies of the ACE gene presented a worse evolution after myocardial infarction in relation to the animals with a copy of the ACE gene.

Descriptors: angiotensin I; myocardial infarction; mice; autonomic nervous system; echocardiography; genes.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

Dados recentes sobre a saúde cardiovascular sugerem uma melhoria geral entre pessoas de meia idade e idosos em todo o mundo nas últimas duas décadas. Em contrapartida, os adultos mais jovens tendem a desenvolver um perfil de risco cardiovascular cada vez mais insalubre, especialmente em termos de prevalência de sobrepeso ou obesidade. Além disso, a taxa de diabetes e uso de cigarro eletrônico aumentou entre esses segmentos da população. Estas observações sugerem que poderá ocorrer um novo aumento na prevalência de doenças cardiovasculares (DCVs) ¹.

Ainda assim, dados da Organização Mundial de Saúde apontam as DCVs como a principal causa de morte no mundo, sendo estimado que no ano de 2016 ocorreram 17,9 milhões de mortes por DCVs, representando 31,1% do total de óbitos, sendo que dessas mortes, 85% foram ocasionadas devido a infarto agudo do miocárdio (IAM) ².

No Brasil os dados epidemiológicos sobre DCVs oriundos de diferentes bases foram organizados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia. De forma, semelhante aos dados mundiais, os dados brasileiros apresentados nesse painel incluindo os anos de 2003 até 2013, demonstram que houve uma redução na mortalidade por DCVs, em ambos os sexos, em quase todos os estados do Brasil ³. No entanto, as DCVs ainda são a causa mais comum de óbito, sendo as doenças isquêmicas do coração responsáveis por mais de 116 mil óbitos no ano de 2016 ⁴.

As DCVs são grupos de desordens que afetam tanto o coração como os vasos. Em relação ao coração há várias formas da doença se manifestar, podendo promover

insuficiência cardíaca, arritmia, problemas de válvulas cardíacas e infarto agudo do miocárdio (IAM) ⁵.

O IAM é a doença com maior taxa de mortalidade mundial entre as doenças cardiovasculares, sendo responsável por 48% dos óbitos nos homens e 38% dos óbitos nas mulheres ⁶. Nos Estados Unidos, a doença arterial coronariana foi a principal causa de morte atribuída as DCVs em 2015, representando 43,8% das mortes por DCVs e dados da American Heart Association mostram que aproximadamente a cada 40 segundos um americano tem um IAM ⁷.

Devido a estreita relação do sistema renina angiotensina com o controle pressórico, os medicamentos inibidores do sistema renina angiotensina são amplamente utilizado em doenças cardiovasculares de alto risco, incluindo o IAM.

Baseado em estudos experimentais, Pfeffer ⁸ hipotetizou que as alterações promovidas no infarto do miocárdio são o resultado de condições alteradas de carga com aumento do estresse de parede e nas áreas sobreviventes. Desde então o tratamento farmacológico com os inibidores de enzima conversora de angiotensina (IECA) tem sido utilizados com sucesso no tratamento do IAM ⁹, melhorando remodelamento, reduzindo a área de infarto e melhorando a sobrevivência quando a área de infarto é moderada ¹⁰⁻¹².

1.2 O Sistema renina-angiotensina

Está bem estabelecido que o SRA, possui importante papel no controle cardiovascular, atuando a curto e longo prazo no controle da pressão arterial como também na homeostasia hidroeletrólítica do organismo ¹³. Na visão clássica desse sistema, a renina (enzima liberada pelo aparelho justaglomerular) cliva o angiotensinogênio (uma glicoproteína que pertence à classe da alfa2-globulina liberada

pelo fígado) em angiotensina I (Ang I) (um decapeptídeo) que por sua vez é clivada em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA possui papel-chave, pois ao mesmo tempo em que remove dois aminoácidos da Ang I para formar Ang II, degrada a bradicinina bloqueando seus efeitos vasodilatadores: esta é conhecida como a visão clássica desse sistema. Esta enzima está presente na superfície vascular e tem como seu principal ponto anatomofuncional o leito vascular pulmonar, o qual recebe 100% do débito cardíaco ¹⁴.

Devido à descrição de novos componentes nos últimos anos, como as angiotensina III, 1-7, 1-9, receptor MAS, e mediadores como quimase, catepsina e tonina, tem se atribuído uma nova visão ao SRA devido a interação dessas moléculas (Figura 1). Esse sistema age como um dos principais reguladores da pressão arterial basal através de diferentes peptídeos vasoativos com ações hipertensivas ou anti-hipertensivas atuando de maneira endócrina, parácrina e autócrina, com papel importante na homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrólítico ¹⁵⁻¹⁷.

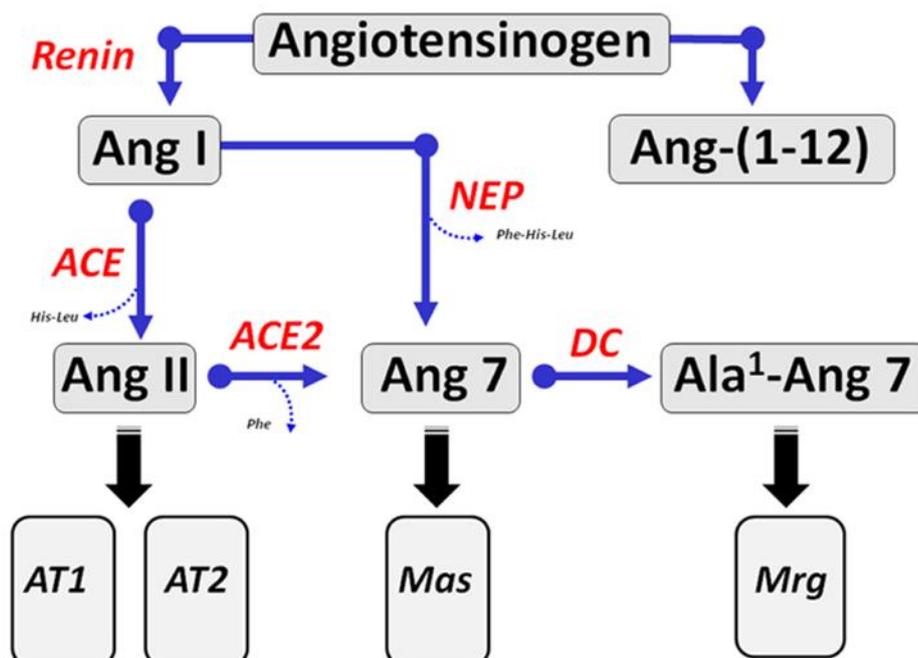


Figura 1 - Descrição de novos componentes do sistema renina angiotensina

Após o angiotensinogênio ser liberado pelo fígado para a circulação, devido a estímulos hormonais (glucocorticoides ou hormônios tireoidianos), ele é clivado pela renina que irá gerar o decapeptídeo Ang I. Nesse momento a ECA, presente em vários tecidos, como o miocárdio ¹⁸, tecido adiposo ¹⁹, músculo esquelético ²⁰ etc, hidrolisa a angiotensina I transformando em outro composto, o octapeptídeo Ang II, considerado uma das moléculas mais importantes do SRA, por ser potente vasoconstritor, atuando na retenção renal de sódio e água nos túbulos renais e dessa forma atuando na volemia, inibindo a ação de substâncias vasodilatadoras ²¹.

Por sua vez, a Ang II promove sua ação por meio de receptores específicos em órgãos alvo, os receptores AT1 e AT2. São conhecidos 2 subtipos do receptor AT1: AT1- alfa que predomina nos vasos sanguíneos, pulmões e coração, se relacionando com a resposta de vasoconstrição da Ang II; e o receptor AT1-beta encontrado principalmente na glândula adrenal e hipófise, se relacionando com a secreção hormonal e com o controle osmótico mediado pela Ang II ^{22,23}. É atribuído a esse receptor AT1 ações de vasoconstrição ²⁴, proliferação celular ^{25,26}, inflamação ²⁷, coagulação e remodelamento da matriz extra celular ²⁸.

A Ang II também pode se ligar ao receptor AT2 e antagonizar a ligação com o receptor AT1. O receptor AT2 está presente em tecidos embrionários e ocasiona efeitos opostos aos do receptor AT1, como a vasodilatação e a inibição da hiperplasia e hipertrofia celular ^{29,30}. É descrito que a ativação do receptor AT2 ocasiona produção de bradicinina e óxido nítrico, mas seus mecanismos de sinalização ainda não estão totalmente elucidados ³¹.

A ECA promove a transformação da angiotensina I em Ang II, contudo ela apresenta uma molécula análoga, a chamada ECA 2, que promove a hidrólise da Ang II a partir da remoção da fenilalanina do terminal carboxil, resultando na formação da

angiotensina (1-7)³². A sua ação é de antagonizar o efeito vasoconstritor da Ang II³³, pela liberação de óxido nítrico ou prostaglandinas³⁴. Dessa forma, atualmente podemos entender dois grandes eixos do SRA, um em que a Ang II é a molécula efetora, e outro em que a Ang 1-7 é esta molécula³⁵, sendo que os eixos tem ação antagônica.

O manejo desse sistema nas patologias cardiovasculares é objeto de estudo, pois é possível através da supressão do sistema, controlar a pressão arterial promovendo proteção contra lesão dos órgãos alvo³⁶. O desequilíbrio na modulação com predomínio do eixo ECA/AngII/AT1, associado ou não a redução do eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas, está relacionado à progressão e aparecimento de lesão em órgãos alvo. Além disso, a Ang II parece atuar em vários tecidos com componentes patogênicos de associação entre o desenvolvimento do remodelamento cardíaco e da nefropatia³⁷.

A Ang II atua no controle da pressão arterial mediante a interação de diferentes sistemas fisiológicos. Partindo do sistema nervoso central, a estimulação da área rostro ventrolateral do bulbo³⁸ promove a liberação de noradrenalina por meio das terminações simpáticas com um elo entre o sistema nervoso simpático e o sistema renina angiotensina. Ainda, podemos atribuir o aumento da volemia à ação da Ang II por estimular a hipófise posterior para liberar o hormônio anti-diurético ou vasopressina (ADH), que atua nos túbulos distais intermediado pelo receptor V2, promovendo reabsorção de água, e também como potente vasoconstritor via receptor V1. Ainda, a Ang II promove a estimulação da aldosterona na zona glomerulosa renal e atua no órgão subfornical aumentando a retenção de sódio e água³⁹. Também são atribuídas à Ang II as ações de potente vasoconstrição e proliferação endotelial⁴⁰.

Por sua vez, a Ang (1-7) apresenta ações antagônicas a Ang II, promovendo aumento da sensibilidade do barorreceptor, potenciação da bradicinina⁴¹ e liberação de óxido nítrico⁴². Dessa forma, os dois eixos atuam de maneira contra regulatória,

interagindo de forma constante na manutenção e controle da pressão arterial. De fato, a Ang 1-7 facilita o componente bradicárdico do barorreflexo, melhorando a sua sensibilidade, enquanto a Ang II atenua a sensibilidade do mesmo. Isso foi corroborado por estudos que demonstraram a redução da sensibilidade do barorreflexo em camundongos com deleção genética do receptor Mas^{41,43,44}.

Adicionalmente, a Alamandina, um novo peptídeo do sistema renina-angiotensina foi descrita por Lautner e colaboradores em 2013³². Este peptídeo somente se difere da Ang 1-7 pelo fato de possuir como primeiro aminoácido na porção N-terminal um resíduo de alanina ao invés de aspartato, podendo ser encontrado em tecido cardíaco de ratos e no plasma humano³². A Alamandina produz vasodilatação dependente do endotélio em anéis aórticos de ratos e camundongos, como também é capaz de modular a sensibilidade barorreflexa após infusão intra-cerebro ventricular. Seu receptor é MRGD (Mas-related genes), uma família da proteína G relacionada ao receptor MAS^{45,46}.

1.3 Polimorfismo da ECA e doenças cardiovasculares

As DCVs estão relacionados a diversos fatores resultando geralmente de processos relacionados à aterosclerose, que promove o estreitamento da luz de artérias. Quando o comprometimento do fluxo sanguíneo se torna grave ou é totalmente ocluído, pode ocorrer um IAM⁴⁷.

O IAM é o resultado da interrupção do fluxo sanguíneo coronariano, devido a formação de um trombo sobre uma placa aterosclerótica, promovendo uma situação de isquemia aguda, que leva à uma lesão tecidual, necrose de cardiomiócitos e disfunção ventricular⁴⁸.

Estudos de Dakik e colaboradores⁴⁹ apontam para a atuação do polimorfismo de alguns genes do sistema renina angiotensina, como o do gene da ECA, que poderiam contribuir para a ocorrência de eventos cardiovasculares como o IAM. Sabe-se que, de acordo com os diferentes tipos de polimorfismo pode haver mais ou menos ECA na circulação⁵⁰.

A geração de Ang II é dependente dos níveis de ECA, portanto parece ser provável que indivíduos que apresentem maiores níveis plasmáticos de ECA com genótipo (DD), apresentem maiores riscos para doença isquêmica⁵⁰.

O primeiro estudo reportando associação positiva entre o alelo D e infarto do miocárdio foi publicado em 1992⁵¹. Desde então outros trabalhos importantes surgiram como o estudo *EstudeCas-Temoin de l'Infartcus Du Myocarde*⁵² no qual 610 casos e 733 controles foram avaliados. Os achados mostram que o genótipo com alelo D foi significativamente mais frequente em homens com IAM que seus controles, em particular entre os indivíduos com baixo risco para o IAM.

Outros trabalhos também confirmaram que indivíduos DD infartados teriam herdado o risco de seus pais confirmando a associação do genótipo DD e o infarto do miocárdio⁵³. Seguindo essa linha de trabalho, o estudo de Evans⁵⁴, concluiu pela autópsia de pacientes, que o genótipo DD é um fator de risco para doença isquêmica do miocárdio.

Além disso, estudos realizados em camundongos com diferentes cópias do gene da ECA, um modelo que mimetiza o polimorfismo encontrados em seres humanos, mostram que animais com maior expressão da ECA em situações patológicas, nas quais a formação da Ang II ou a depleção da Cinina podem estar aumentados, apresentam maiores danos ao coração, artérias ou ainda prejuízo metabólico⁵⁵.

O aumento das expressões de RNAm da ECA⁵⁶, e AT1R⁵⁷, tem sido relatado tanto no tecido cicatricial, como no tecido intacto do coração infartado. De fato, efeitos favoráveis dos IECA em atenuar a dilatação do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio⁵⁸, podem refletir a importância funcional desses componentes do SRA expressos no coração infartado.

Além disso, a ECA está diretamente relacionada como marcador de atividade do sistema nervoso simpático, seja por aumento da Ang II ou dos peptídeos natriuréticos, sendo responsável pela manutenção e progressão da injúria ocasionada ao ventrículo no contexto da disfunção ventricular⁵⁹ e *per se* é um fator independente de pior prognóstico em pacientes pós IAM. Nesse sentido, o bloqueio da estimulação neuro-humoral possibilita a atenuação do remodelamento do ventrículo e pode modificar a história natural da insuficiência cardíaca⁶⁰.

Dessa forma, fica evidente o papel dos IECA na injúria provocada pelo infarto através de mecanismos diversos que incluem vasodilatação, redução da pressão arterial e da sobrecarga hemodinâmica, inibição da hipertrofia do cardiomiócito, melhora na circulação coronária e efeito sobre a atividade fibrinolítica intrínseca. De fato, os benefícios dos IECA no pós infarto, em pacientes com disfunção ventricular sintomática e ou assintomática, promoveram impacto no manejo clínico do IAM⁶¹.

1.4 Infarto agudo do miocárdio

Estudos apoiam a contribuição das variações genéticas do polimorfismo da ECA na patogênese do infarto do miocárdio⁵¹. O IAM está ligado diretamente a ativação do SRA, sendo que a Ang II promove proliferação de células musculares lisas determinando alterações cardíacas estruturais que podem levar a necrose e apoptose miocárdica e insuficiência cardíaca congestiva⁶². A Ang II exerce grande parte de seus

efeitos pelos receptores AT1 levando à disfunção endotelial, principalmente, como consequência de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição, ativação plaquetária, maior liberação do fator inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1.

Um modelo experimental de IAM, promovido por isoproterenol, associado à manipulação genética do polimorfismo da ECA mostrou um prejuízo adicional em dados de ecocardiografia e na deposição de colágeno dos animais que possuíam aumento nas cópias do gene da ECA ⁶³. Outro trabalho que também observou a isquemia pós IAM observou que uma modesta elevação na ECA desequilibra de forma negativa a tolerância a isquemia mediadas por cininas e Ang II ⁶⁴.

Dessa forma, é esperado que indivíduos que apresentem maiores níveis de Ang II possuam piores complicações clínicas, como demonstrado por Wiam Hmimech ⁶⁵. Nesse estudo é evidenciado uma relação do infarto do miocárdio em pacientes entre 45 e 55 anos que apresentavam alelos do tipo DD, e portanto maiores níveis plasmáticos circulantes de ECA ⁶⁵.

As alterações genéticas também se refletem no impacto no sistema nervoso autonômico mediado pela Ang II. O controle autonômico cardiovascular é prejudicado após o IAM, com evidências apontando para a redução da atividade vagal e aumento da atividade simpática ⁶⁶. Além disso, é possível que exista uma estreita relação entre o desequilíbrio do sistema nervoso autonômico e o processo inflamatório como proposto por Kevin Tracy ⁶⁷, no qual o processo inflamatório poderia ser mediado pelo sistema nervoso parassimpático.

O impacto dos danos causados pelo IAM no sistema nervoso autônomo pode ser avaliado pela VFC tanto em humanos ^{50,68} como em modelos experimentais ^{69,70}. Nesse sentido, pacientes pós IAM que possuíam valores reduzidos de VFC

apresentaram maior mortalidade do que pacientes com maiores valores de VFC ⁷¹. Um importante estudo observacional multicêntrico demonstrou que valores de SDNN, um índice de VFC no domínio do tempo, menores que 70 ms foi associado ao aumento da mortalidade durante 21 meses de seguimento. Além disso, a combinação de baixos índices de SDNN e fração de ejeção inferior a 35% resultou em altos índices de mortalidade ⁷².

Outro marcador autonômico importante é o barorreflexo, um importante mecanismo de controle da pressão arterial momento a momento, e que por si é marcador independente de mortalidade no IAM ⁷².

1.5 Modelo experimental de polimorfismo da ECA

Em humanos, o polimorfismo da ECA é associado com diferenças quantitativas na atividade circulante da ECA ⁵⁰. O modelo experimental que melhor representa as alterações do polimorfismo da ECA encontrado em seres humanos foi desenvolvido por Krege e Oliver Smithies em 1997 utilizando camundongos ⁷³. Esse modelo surge como ferramenta para ajudar a elucidar os efeitos sistêmicos das alterações genéticas da ECA.

Dessa forma, foi desenvolvido uma linhagem de animais carregando uma inativação do gene alvo e uma segunda linhagem carregando a duplicação do gene alvo na sua localização cromossômica normal ⁷⁴. Nesse modelo, os animais que possuem a inativação do gene alvo (uma cópia do gene da ECA) possuem uma redução de forma geral na função genética da ECA, em comparação com os animais normais que possuem duas cópias do gene. Em contrapartida, os animais que possuem a duplicação do gene alvo (três cópias do gene da ECA ou até mesmo quatro cópias) apresentam um aumento geral na função da ECA.

De fato, a relação entre o número de cópias do gene e os níveis séricos da atividade da ECA é linear e dose dependente, sendo que os animais com duas cópias e três cópias do gene da ECA apresentam, respectivamente, valores séricos 64% e 144% superiores de níveis séricos de ECA do que os animais com uma cópia. Essa variação dos níveis séricos apresentada no modelo é compatível aos níveis séricos observados no polimorfismo da ECA em humanos. Dessa forma estudos com animais possuindo uma, duas ou três cópias do gene alvo podem ser utilizados para determinar a relação entre o nível de função do gene e o fenótipo de interesse ⁷⁵.

Um estudo observou que em camundongos com a inativação do gene da ECA ocorria uma redução na pressão arterial sistólica de aproximadamente 34 mmHg, sugerindo que essa alteração seria importante para o controle da pressão arterial ⁷⁶.

A utilização de modelos experimentais que apresentam alterações genéticas no SRA, permite que fatores ambientais se somem as alterações genéticas podendo assim iniciar um gatilho de respostas para o desenvolvimento de DCVs como a hipertensão e o IAM.

2.0 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o efeito de diferentes cópias do gene da ECA , um modelo de polimorfismo desse gene, curso temporal do infarto agudo do miocárdio sobre a morfometria e função cardíaca, função autonômica cardiovascular e marcadores inflamatórios em um modelo experimental.

2.2 *Objetivos específicos*

Avaliar em camundongos com 1, 2 e 3 cópias do gene da ECA, submetidos a infarto do miocárdio (sete e 28 dias pós infarto) os seguintes parâmetros:

- Morfometria e função cardíaca: Volume do ventrículo esquerdo em diástole (VVE_d) e sístole (VVE_s), espessura do septo interventricular (ESIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE_d) em diástole, massa do ventrículo esquerdo (MVE), Fração de ejeção (FE), Fração de encurtamento (FS), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), relação onda E onda A, mudança da área fracional (FAC);
- Hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca
- Autonômicos: variabilidade da frequência cardíaca, variabilidade da pressão arterial e barorreflexo espontâneo;
- Perfil inflamatório (IL-10; TNF alfa; TGF beta; CXCL1);
- Área de infarto e deposição de colágeno no tecido cardíaco;
- Sobrevivência.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA SDC 4376/16/042) (ANEXO A) e foi realizado seguindo os princípios da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.2 Animais e grupos

Foram utilizados camundongos machos, entre 6 e 11 meses de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina (FMUSP). Esses animais são oriundos da linhagem original desenvolvida por Krege ⁷³, que é geneticamente modificada para expressar diferentes concentrações fisiológicas da ECA.

Os animais foram mantidos no Biotério do InCor em caixas plásticas (4 animais por gaiola), em ambiente com temperatura controlada (22° - 24°C) e com luz controlada, em ciclo de 12 horas (claro - escuro) e alimentados com água e ração padrão “ad libitum”. Os animais foram divididos em nove grupos (n=10 em cada grupo), conforme descrito a seguir:

- ECA 1: camundongos com uma cópia do gene da ECA.
- ECA 2: camundongos com duas cópias do gene da ECA.
- ECA 3: camundongos com três cópias do gene da ECA.
- ECA 1-7: camundongos com uma cópia do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados sete dias após o infarto;

- ECA 2-7: camundongos com duas cópias do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados sete dias após o infarto;
- ECA 3-7: camundongos com três cópias do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados sete dias após o infarto;
- ECA 1-28: camundongos com uma cópia do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados 28 dias após o infarto;
- ECA 2-28: camundongos com duas cópias do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados 28 dias após o infarto;
- ECA 3-28: camundongos com três cópias do gene da ECA submetidos a infarto do miocárdio e avaliados 28 dias após o infarto.

3.3 Genotipagem

No dia do desmame os animais foram anestesiados com isoflurano, identificados com um “chipe” inserido no tecido subcutâneo e foram realizadas biopsias do material coletado da orelha direita dos animais. O DNA genômico foi extraído das amostras dos tecidos a partir da digestão com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol.

Para a criação dos animais geneticamente modificados, o grupo de Oliver Smithies utilizou a técnica de recombinação gênica. Esta técnica consiste em inserir por recombinação uma sequência de DNA no lugar do gene a ser desativado ou inserir uma cópia extra de um gene paralelo ao gene existente. Os nossos animais possuem inserido o gene que confere resistência a neomicina entre o exon 14 e o intron 13 (animais ‘knockout’- gene da ECA modificado).

A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR, determinando assim o número de cópias do gene da ECA.

No caso dos animais “knockout foram utilizados três “primers”: A, B e C. O “primer” A se localiza a direita da neomicina no exon 14, o primer B se localiza á esquerda da neomicina no intron 13 e o “primer” C no gene da neomicina (Anexo C).

Para animais “Knockin” foram utilizados dois “primers”: D11M+ e D11M- .O “primer” D11M+ amplifica uma sequencia de 130 pares de bases (pb) (animais normais – 2 cópias do gene da ECA), e o “primer” D11M amplifica uma sequencia de 166 pb (animais com uma cópia a mais do gene da ECA) A sequencia de “primers” e o esquema de reação de PCR podem ser visualizados no anexo C.

3.4 Infarto agudo do miocárdio

Nos grupos infartados, o infarto agudo do miocárdio foi realizado de acordo com imagem representativa de French e Kramer⁷⁷ (Figura 2). Para tal os animais foram anestesiados por isoflurano (anestésico inalatório - Cristália®). Posteriormente a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, entubados (Gelko-14G) e submetidos à respiração artificial (Harvard Aparatus, Boston, EUA). Foi realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para viabilizar o procedimento. O pericárdio foi seccionado para visualização e ligadura da artéria coronária esquerda (fio monolynon 6.0) provocando isquemia cardíaca. Após a ligadura, a incisão torácica foi fechada (fio monolynon 5.0) e o pneumotórax drenado mediante sucção do ar com agulha (5x7) conectado a uma seringa de 10 ml. Os músculos afastados para o procedimento foram reposicionados e a pele suturada (fio monolynon 4.0). Em seguida os animais foram retirados da ventilação artificial e a respiração natural foi estimulada. Logo após o procedimento cirúrgico os animais receberam dipirona sódica (20 mg/kg) e foram colocados em ambiente

aquecido para recuperação ⁸. Por um período de três dias de pós-operatório os animais receberam cloridrato de tramadol (3 a 4 mg/kg), cada 8-12hs.

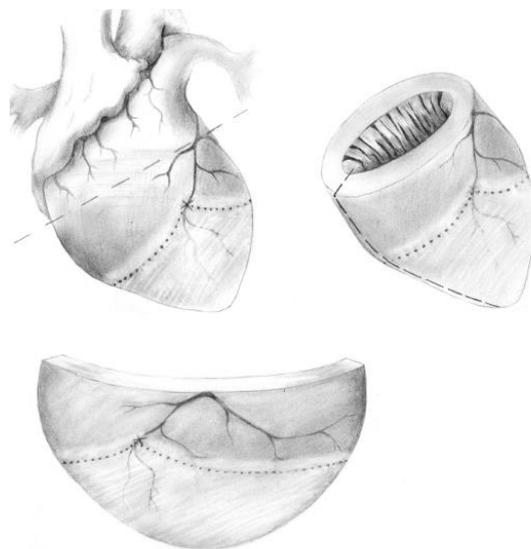


Figura 2 - Imagem representativa da técnica de infarto do miocárdio. (Ilustração de Brent A. French, e Christopher M. Kramer, Drug Discov Today Dis Mech, 2007).

3.5 Avaliações Ecocardiográficas

Para o exame ecocardiográfico foi utilizado o equipamento VEVO 2100 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz, e os animais foram anestesiados com isoflurano 1% (Cristália®). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foram mensurados: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular (ESIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) em sístole e em diástole. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi calculada segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, utilizando a seguinte fórmula matemática: $MVE = [(DDVE+ESIV+PP)^3-(DDVE)^3] \times 1,047$, onde 1,047 (mg/mm^3) corresponde a densidade do miocárdio. Além da MVE, foi calculada a força de encurtamento do ventrículo esquerdo. As imagens obtidas através do Doppler foram utilizadas para calcular os parâmetros da função diastólica do ventrículo esquerdo.

Foram medidos os picos de velocidade da onda E, os picos de velocidade da onda A, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo de desaceleração, bem como foi calculada a relação onda E / onda A. Utilizando ainda o tempo de ejeção (TE) do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo foi calculada a velocidade de encurtamento circunferencial da fibra miocárdica ($VCF = [(DDVE-DSVE)/DDVE]/TE$). Embora o VCF seja sensível a mudanças agudas da pressão arterial na sobrecarga hemodinâmica, em condições basais, na ausência de mudanças agudas da pressão arterial, o cálculo do VCF fornece informações quanto a contratilidade miocárdica.

3.6 Canulação

O procedimento de canulação foi realizado 48 horas após o exame ecocardiográfico com os animais anestesiados com isoflurano 1% (Cristália®) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37° C) para colocação de cânulas na artéria carótida para registro da PA e da FC. Os camundongos anestesiados foram colocados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão mediana na região cervical como também separação da musculatura pré-traqueal para localização da artéria carótida. Foi implantado uma cânula de Tygon (0,05 mm de diâmetro interno), com 3,0 cm de comprimento, soldado a um segmento de Cloreto de Polivinila (0,05 mm de diâmetro interno), com 4,0 cm de comprimento e preenchido com solução fisiológica. A extremidade de cloreto de polivinila foi introduzida e fixada no vaso e a extremidade de Tygon foi exteriorizada no dorso do animal na região cervical e fixada com fio de polipropileno na pele (Figura 3). Após o termino da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil®, Fontoura-Wyeth, 60.000U) e os cuidados pós-operatórios foram baseados na descrição de Fleknell ⁷⁸. Após

procedimento, bem como durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas, cada animal foi mantido individualmente em gaiolas apropriadas.



Figura 3 - Fotos ilustrativas da canulação da artéria carótida e veia jugular em camundongo.

3.7 Registro direto dos sinais de pressão arterial

Após 24 horas do procedimento de canulação com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi então conectada a um transdutor (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2, Quintron Instrument© Inc, EUA). Para a manutenção da cânula, a fim de se evitar obstruções, foi realizado uma lavagem precedente ao registro de PA, usando-se 0,02ml de heparina sódica (Liquemine – Roche 5.000) em 0,5 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%. Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2KHz, DATAQ Instruments, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 4000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e intervalo de pulso da pressão^{79,80} (Figura 4).



Figura 4 - Imagem representativa do sistema de registro da pressão arterial.

3.8 Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

A avaliação da VFC foi realizada a partir da análise do intervalo de pulso da pressão nos domínios do tempo e da frequência.

Variabilidade no domínio do tempo: A série temporal do intervalo de pulso foi analisada no domínio do tempo por meio da análise da variância do intervalo de pulso (VARIP). Além da variância, foram obtidos o SDIP (desvio padrão de intervalos de pulso normais), e o RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos de pulso consecutivos).

Variabilidade no domínio da frequência (análise espectral): A análise no domínio da frequência foi realizada utilizando a Transformada Rápida de Fourier no software CardioSeries (versão 2.4, Brasil). Para tal foi utilizada uma interpolação de 20 Hz com segmentos de 512 pontos.

A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: 1) HF: frequências altas, entre 0,1 e 1,0 Hz – Parassimpático; 2) LF: frequências baixas, entre 1,0 e 5,0 Hz – Simpático; 3) VLF: frequências muito baixas, 0,0-0.1 Hz. Ainda, realizou-se a razão entre LF e HF (LF/HF) para avaliar o balanço simpatovagal. A

determinação das bandas foi realizada de acordo com o estudo de J. Thireau e colaboradores⁸¹.

Os componentes VFC no domínio da frequência também foram apresentados na sua forma normalizada (nu), ou seja:

$$\text{LF nu} = \text{potência de LF} / (\text{potência total ms}^2 - \text{VLF}) \times 100$$

$$\text{HF nu} = \text{potência de HF} / (\text{potência total ms}^2 - \text{VLF}) \times 100$$

A VARPAS foi analisada por meio do desvio padrão (SDPAS) e da variância (VARPAS) dos valores da PAS. No domínio da frequência foi analisado o componente de baixa frequência da PAS em valores absolutos, que representa a modulação simpática pra os vasos.

3.9 Análise do barorreflexo espontâneo

A análise do barorreflexo espontâneo foi realizada pelo método da sequência, utilizando o software CardioSeries (versão 2.4, Brasil). O método da sequência se baseia na identificação da ocorrência espontânea de sequências de três ou mais batimentos cardíacos consecutivos, nos quais existe um aumento progressivo da PAS acompanhado de prolongamento do intervalo de pulso (*BRR up*: rampas barorreflexas em subida), ou uma diminuição progressiva da PAS acompanhada de redução do intervalo de pulso (*BRR down*: rampas barorreflexas em descida). A todas as sequências é aplicada uma regressão linear, e uma média dos valores obtidos em todas as sequências é calculada em ms/mmHg; esse valor é denominado ganho, e representa a medida da SBR espontânea. Além disso, também é apresentado um índice de eficiência do barorreflexo (*BEI*), calculado pela razão entre o número de rampas barorreflexas e o número total de rampas.

3.10 Eutanásia e preparação dos tecidos

No dia seguinte ao término das avaliações hemodinâmicas, o sangue foi coletado pela cânula na qual foi realizado os registros hemodinâmicos, sempre que possível com o volume de 0,5ml. O sangue foi centrifugado e o plasma coletado e armazenado em freezer -80 para posterior análise de perfil inflamatório.

Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Logo após, o coração, ainda com contrações, foi imerso em solução de cloreto de potássio (KCL), a 20X o volume do coração a 1 molar para o órgão parar em diástole. O tecido cardíaco foi fixado em paraformoldeído a 4% em PBS por 24 horas e depois transferidas para uma solução de álcool 70° para serem posteriormente processadas e incluídas em parafina e receberem cortes e colorações específicas.

Além do tecido cardíaco, também foram coletados e pesados o tecido adiposo branco (TAB), (gordura inguinal, epididimal e retroperitoneal), os pulmões, os rins, o fígado e o baço.

3.11 Processamento do material para histologia e método de identificação

Os tecidos foram lavados e desidratados em gradientes de concentração de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina com a face marcada com nanquim para cima. Cortes seriados de 5um de espessura foram obtidos e distendidos em lâminas de vidro. Foram obtidos cortes histológicos de cada uma das fatias de músculo cardíaco, em todos os grupos infartados. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise cega. Após hidratação, as lâminas foram coradas pelos seguintes métodos de identificação histológica:

a) Hematoxilina-eosina: Os cortes de tecido foram corados pela hematoxilina-eosina para estudo histológico geral, por ser esta uma coloração clássica para identificação histopatológica de rotina.

b) Picrossírius-polarização: Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora com Sirius Red 0,1% (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico sendo, em seguida, rapidamente lavados em água corrente ⁸².

Com a coloração pelo Picrossírius, além da possibilidade de identificar o colágeno que adquire uma intensa coloração vermelha quando analisado sob luz convencional, também é possível realizar a avaliação qualitativa de seu grau de agregação quando as lâminas são analisadas sob luz polarizada, conforme o método descrito por Junqueira além de se mostrarem birrefringentes, as fibras que contêm colágeno, assumem intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física do colágeno; dessa forma, fibras finas, como as presentes no tecido de granulação jovem, são reveladas como estruturas esverdeadas fracamente birrefringentes, enquanto as fibras grossas, que caracterizam lesões fibróticas maduras, definem-se por sua forte birrefringência de coloração amarela a vermelha ⁸².

3.11.1 Análise da lesão fibras colágenas e área de infarto

A coloração do HE foi escolhida, pois se identificam facilmente as zonas central (ZC), de regeneração (ZR) e de células musculares preservadas (ZP).

Foi considerada ZC aquela região com infiltrado inflamatório, coágulo e presença de tecido de granulação. Já a ZR, foi identificada entre a ZC e a ZP como sendo uma área com miotubos e mioblastos e nas lesões mais recentes com a presença de fibras musculares em sofrimento. A ZR foi diferenciada da ZP pelas diferenças

estruturais entre os miotubos e as células musculares maduras, uma vez que essas células são mais eosinófilas que os miotubos além de serem mais calibradas e possuírem núcleos periféricos^{83,84}.

Foram obtidas imagens digitais de cada corte histológico em que a laceração foi observada, utilizando-se objetiva de 4 vezes, de modo a cobrir toda a extensão da laceração, incluindo as zonas central, de regeneração e a transição com o tecido preservado. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por um microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a uma câmara de vídeo digital Nikon DXM1200F. Imagens digitais de alta resolução foram gravadas pelo programa Nikon ACT-1 em um microcomputador acoplado ao sistema.

Após as imagens foram tratadas no programa Adobe Photoshop® (por contagem da área por intensidade de cor – por Threshold) onde foi destacado todo o tecido com colágeno como no exemplo abaixo (Figura 5):

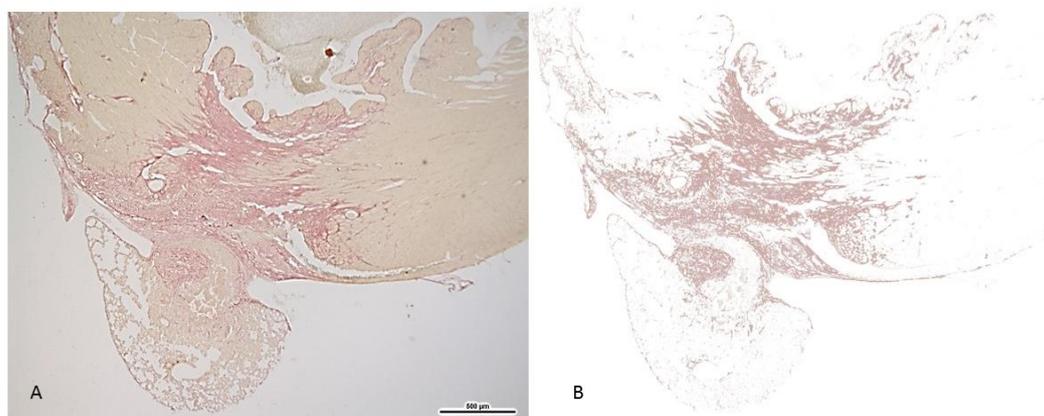


Figura 5 - Imagem mostra o modelo do tratamento utilizado para mensuração da área de infarto e quantidade de colágeno depositado após IAM; em A – imagem sem tratamento com 500 micrometros e aumento de 10X. Em B é possível observar somente o tecido colágeno.

A seguir, as imagens obtidas foram transferidas para o programa Image J, do National Institute of Health (USA), para quantificar os dados obtidos. Por fim com o

Image J, foi possível mensurar a área de colágeno como também definir a relação área de colágeno/área total.

3.12 Análise do perfil inflamatório

Para a análise do perfil inflamatório foi utilizado a técnica de ELISA de acordo com Natarajan⁸⁵. Neste método, uma nova curva padrão é gerada usando os valores do delta das amostras do ensaio original. Entre 8–10 amostras com o maior delta são escolhidas e re-executadas com uma proteína padrão de trabalho verificada. As concentrações destas amostras são então usadas para gerar uma nova curva padrão, que é aplicada à placa original a fim de determinar as concentrações da amostra. A análise de regressão linear dessas curvas mostra uma correlação 1: 1 entre as concentrações, com valores de r^2 variando de 0,98 a 0,99 e declives variando de 0,97 a 1,10 para cada citocina testada.

1. Execução Inicial da Amostra

A. As amostras são processadas de acordo com o protocolo ELISA padrão otimizado anteriormente.

B. Imediatamente antes de parar a reação de cor, o OD590 é medido.

C. A reação é interrompida com ácido sulfúrico e os valores ΔOD são usados para análise. Neste ponto, se uma curva padrão de trabalho puder ser gerada, os dados podem ser analisados normalmente. Se não, os seguintes passos podem ser tomados para preservação de dados amostrais.

2. Novo Standard Run

A. Escolha de oito a 10 amostras para executar novamente a nova curva padrão.

B. As amostras com os valores máximo e mínimo de ΔOD são sempre escolhidas, junto com outros com valores ΔOD que são uniformemente distribuídos dentro deste intervalo.

C. Estas amostras são repetidas pelo protocolo ELISA padrão.

D. Antes da adição de solução de ácido sulfúrico, o OD590 é monitorizado. A reação não deve ser interrompida até que os valores OD590 sejam iguais àqueles lidos na amostra inicial executada. As placas podem ser deixadas em um leitor de placas cobertas e relidas até que o OD590 desejado seja obtido. Isto é para assegurar que as diferenças na extensão de desenvolvimento de cor não afetam as concentrações de amostras novo padrão.

E. Uma regressão não linear de 4 parâmetros é usada para gerar uma curva padrão. As concentrações das amostras são então usadas para gerar uma nova curva padrão da seguinte forma:

1. Cada poço correspondente a uma amostra na nova execução padrão é re-rotulado como um padrão e sua concentração é inserida manualmente.

2. Depois que todas as amostras forem renomeadas e as concentrações inseridas, esses poços são usados para gerar a nova curva padrão e equação de parâmetro.

3. A nova curva padrão é então aplicada às amostras da amostra inicial executada para interpolar as concentrações de todas as amostras.

3.13 Análise dos dados

Para análise dos dados foi usado o software GraphPad Prism[®] 6.0. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de Grubbs, também chamado de método ESD (extreme studentized deviate), para

determinar se o valor mais extremo na lista de dados é um valor significativo do resto (outlier), caso o resultado fosse positivo para outlier o dado era removido. Utilizamos a ANOVA para comparação dos subgrupos e a análise de variância de dois fatores foi utilizada para comparação dos resultados em cada uma das situações de interesse, seguida do teste complementar de Tukey. Para a análise de sobrevivência foi utilizado o método de Kaplan Meier. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.0 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em quatro capítulos. No primeiro capítulo realizamos a caracterização do modelo utilizado de polimorfismo da ECA. No segundo capítulo foi analisado os efeitos das diferentes variações fisiológicas do gene da ECA em um período subagudo do infarto do miocárdio (sete dias após o infarto). No terceiro capítulo foi analisado a influência das diferentes cópias do gene da ECA pós IAM em um momento tardio (28 dias após o infarto). Por fim, no quarto capítulo são demonstradas as interações entre os grupos (controle sem infarto, sete dias após infarto e 28 dias após infarto) e a curva de sobrevivência.

4.1 Capítulo I – Caracterização do modelo

Nesse capítulo, com o intuito de caracterizar o modelo utilizado de polimorfismo da ECA, serão apresentadas as comparações entre os animais com uma (ECA 1), duas (ECA 2) e três cópias (ECA 3) do gene da ECA que não foram submetidos ao IAM.

4.1.1 Avaliação ecocardiográfica

Os dados ecocardiográficos dos animais modificados geneticamente para expressar diferentes flutuações fisiológicas da ECA apresentam diferença na relação E/A, sendo que o grupo ECA 3 apresenta maior valores que os outros dois grupos (ECA 1 e ECA 2). Não foram observadas diferenças entre os grupos para os demais índices avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados ecocardiográficos dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3

	ECA 1 (n=11)	ECA 2 (n=10)	ECA 3 (n=10)	P
a'(mm/s)	15,20 ± 0,8	18,04 ± 1,7	15,21 ± 1,2	0,244
e'(mm/s)	17,60 ± 1,7	17,61 ± 1,4	22,20 ± 2,1	0,131
E/e'	43,23 ± 5,2	40,27 ± 4,5	32,05 ± 2,8	0,287
E/A	1,08 ± 0,14	1,24 ± 0,16	1,80 ± 0,14*#	0,011
TDE (ms)	15,39 ± 1,1	15,42 ± 1,3	15,63 ± 1,2	0,987
TRIV/FC (ms/bpm)	0,046 ± 0,005	0,047 ± 0,002	0,041 ± 0,003	0,486
ESIVd (mm)	0,84 ± 0,016	0,79 ± 0,030	0,85 ± 0,024	0,180
VVEd (ul)	70,24 ± 3,3	72,04 ± 9,1	82,00 ± 4,9	0,453
VVEs (ul)	48,84 ± 3,8	39,70 ± 6,3	42,60 ± 4,5	0,434
FAC (%)	37,14 ± 1,7	37,16 ± 1,2	40,68 ± 1,3	0,103
FE (%)	42,40 ± 2,7	48,63 ± 1,3	48,11 ± 2,5	0,162
FS (%)	22,08 ± 2,0	24,31 ± 0,7	25,00 ± 1,2	0,339
MVE (mg)	0,136 ± 0,005	0,130 ± 0,006	0,137 ± 0,009	0,800
MVE corr (g/mg)	94,74 ± 6,5	91,74 ± 4,4	97,31 ± 7,4	0,927
PPVED (mm)	0,81 ± 0,035	0,72 ± 0,003	0,83 ± 0,033	0,086

a': velocidade dopler tecidual da onda a; e': velocidade dopler tecidual da onda e; E/e': relação de onda E e e'; E/A: relação de onda E e A; TDE: tempo de desaceleração da onda e'; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; ESIVd: espessura do septo intraventricular na diástole; VVEd: volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: volume do ventrículo esquerdo na sístole; FAC: mudança da área fraccional; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; MVE: massa do ventrículo esquerdo; MVE corr: massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso; PPVED: parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão. * p < 0,05 vs. ECA 1; # p < 0,05 vs. ECA 2;

4.1.2 Frequência cardíaca e pressão arterial

A frequência cardíaca (ECA 1: 688 ± 12,54; ECA 2: 655 ± 15,77; ECA 3: 625 ± 25,60 bpm; p = 0,117), a pressão arterial sistólica (ECA 1: 124,6 ± 4,0; ECA 2: 127,1 ± 5,62; ECA 3: 129,2 ± 3,32 mmHg; p = 0,776), diastólica (ECA 1: 87,90 ± 3,00; ECA 2: 86,79 ± 2,63; ECA 3: 85,08 ± 1,85 mmHg; p = 0,736) e média (ECA 1: 107,0 ± 3,50;

ECA 2: $107,0 \pm 4,0$; ECA 3: $107,4 \pm 2,50$ mmHg; $p = 0,994$) não foram diferentes entre os grupos (Figura 6).

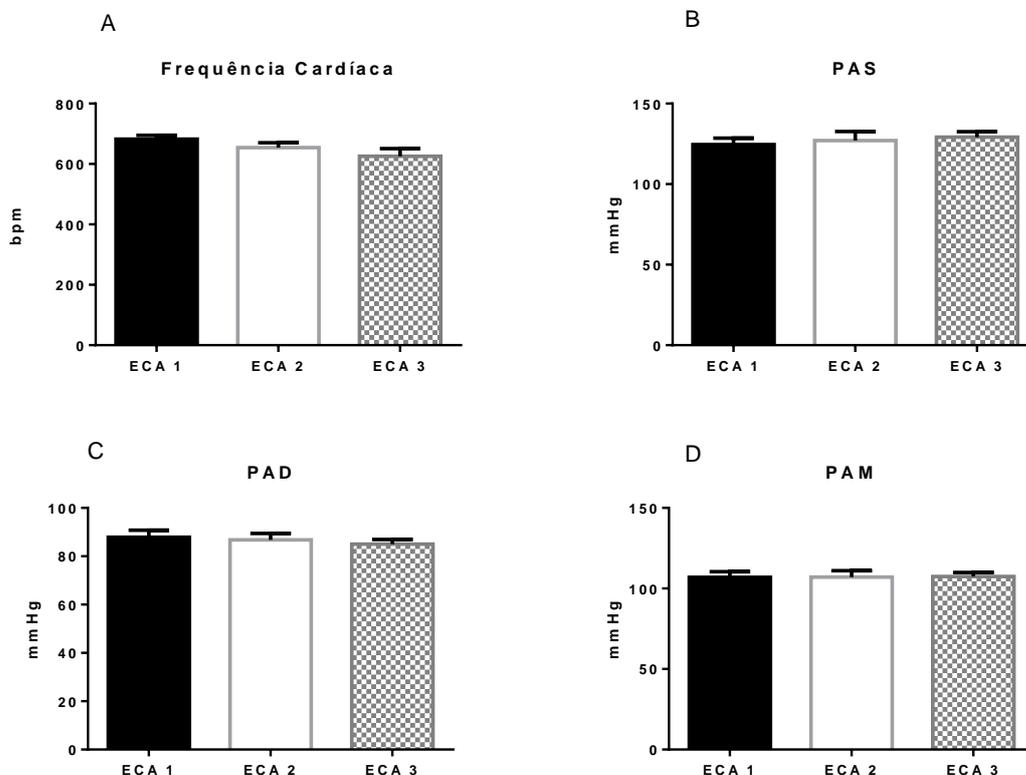


Figura 6 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Pannel: A) FC; B) PAS; C) PAD; D) PAM. FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$; ECA 3: $n = 7$.

4.1.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Em relação a VFC, foi avaliado se o número de cópias do gene da ECA poderia interferir nos índices descritos abaixo. Dessa forma avaliamos a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência.

Variabilidade no domínio do tempo

A variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, avaliada por meio do desvio padrão dos intervalos de pulso (ECA 1: $6,00 \pm 0,60$; ECA 2: $5,82 \pm$

1,70; ECA 3: $4,95 \pm 0,45$ ms; $p = 0,354$) ou pela variância dos intervalos de pulso (ECA 1: $39,50 \pm 7,75$; ECA 2: $36,50 \pm 7,25$; ECA 3: $26,20 \pm 4,45$ ms²; $p = 0,321$), não foi diferente entre os grupos (Figura 7 - A e B). O RMSSD, um índice representativo da modulação vagal, também não apresentou diferença entre os grupos avaliados (ECA 1: $6,53 \pm 0,60$; ECA 2: $5,05 \pm 0,70$; ECA 3: $5,50 \pm 0,45$ ms; $p = 0,211$) (Figura 7 - C).

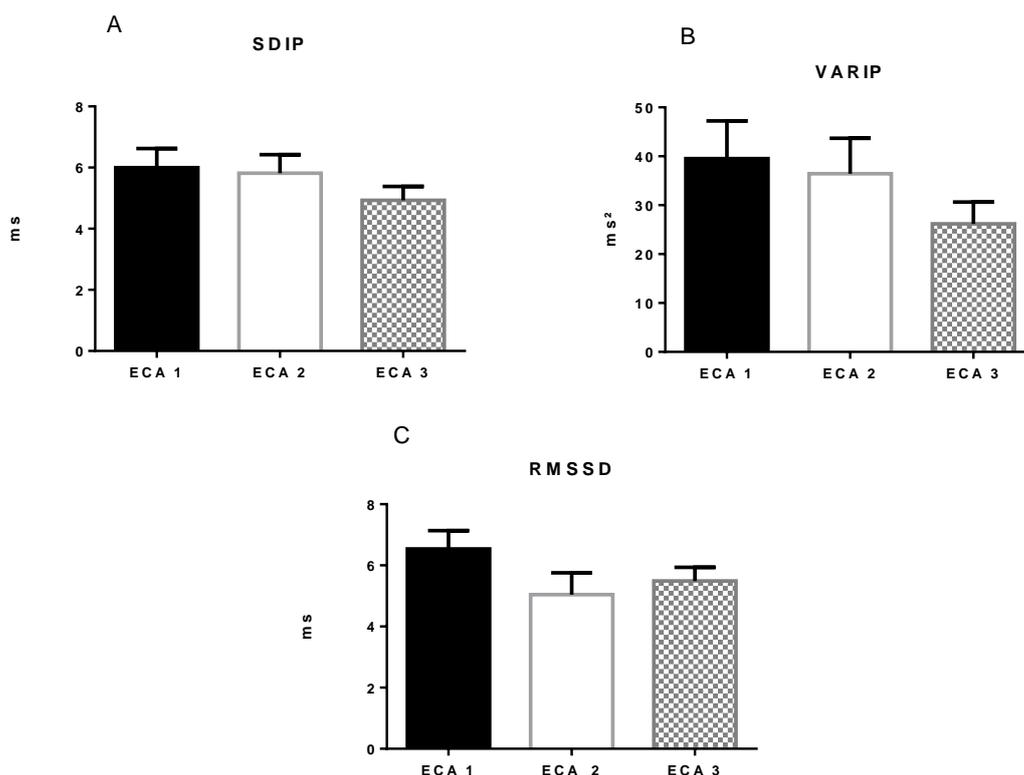


Figura 7 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) SDIP; B) VARIP; C) RMSSD. SDIP: desvio padrão dos intervalos de pulso; VARIP: variância dos intervalos de pulso; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos de pulso consecutivos. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$; ECA 3: $n = 7$.

Variabilidade no domínio da frequência

Em relação aos dados de VFC no domínio da frequência, não foi observado diferença entre os grupos no componente VLF em valores absolutos (ECA 1: $2,44 \pm 0,83$; ECA 2: $3,68 \pm 1,23$; ECA 3: $2,50 \pm 0,56$ ms²; $p = 0,591$). Similarmente, o LF

absoluto (ECA 1: $4,76 \pm 2,00$, ECA 2: $4,34 \pm 1,40$ e ECA 3: $6,27 \pm 2,54$ ms²; $p = 0,780$) e o HF absoluto não foram diferentes entre os grupos avaliados (ECA 1: $9,37 \pm 1,70$; ECA 2: $5,35 \pm 1,36$; ECA 3: $7,76 \pm 1,9$ ms²; $p = 0,297$), como pode ser observado na figura 8.

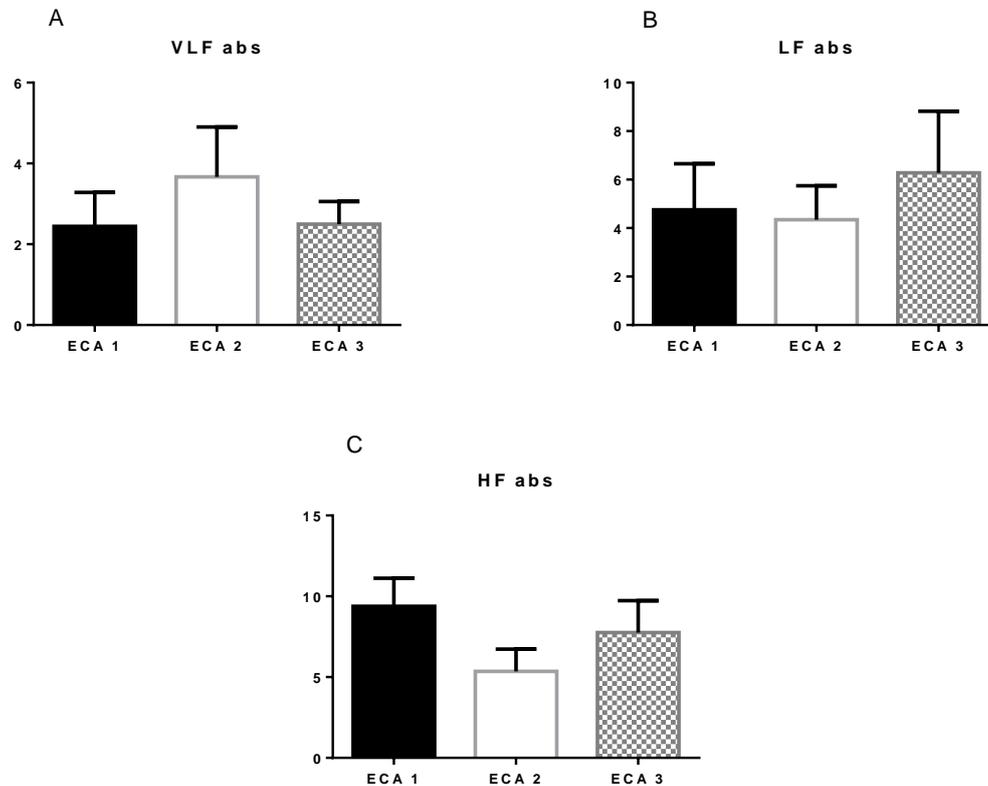


Figura 8 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores absolutos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) VLF abs; B) LF abs; C) HF abs. VLF abs: banda de muito baixa frequência em valores absolutos; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; HF: banda de alta frequência em valores absolutos. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$; ECA 3: $n = 7$.

Já, para os índices de VFC em valores percentuais, somente o componente VLF foi diferente entre os grupos, sendo maior no grupo ECA 2 comparado ao grupo ECA 1 (ECA 2: $18,00 \pm 4,25$ vs. ECA 1: $7,87 \pm 1,98$; ECA 3: $11,68 \pm 1,75$; $p = 0,04$). Não foram observados diferenças nos índices de LF % (ECA 1: $39,83 \pm 6,40$; ECA 2: $37,86 \pm 3,05$; ECA 3: $39,29 \pm 6,84$ %; $p = 0,967$) e HF % (ECA 1: $63,63 \pm 9,42$; ECA 2: $63,13 \pm 9,45$; ECA 3: $54,57 \pm 8,06$ %; $p = 0,792$) entre os grupos (Figura 9).

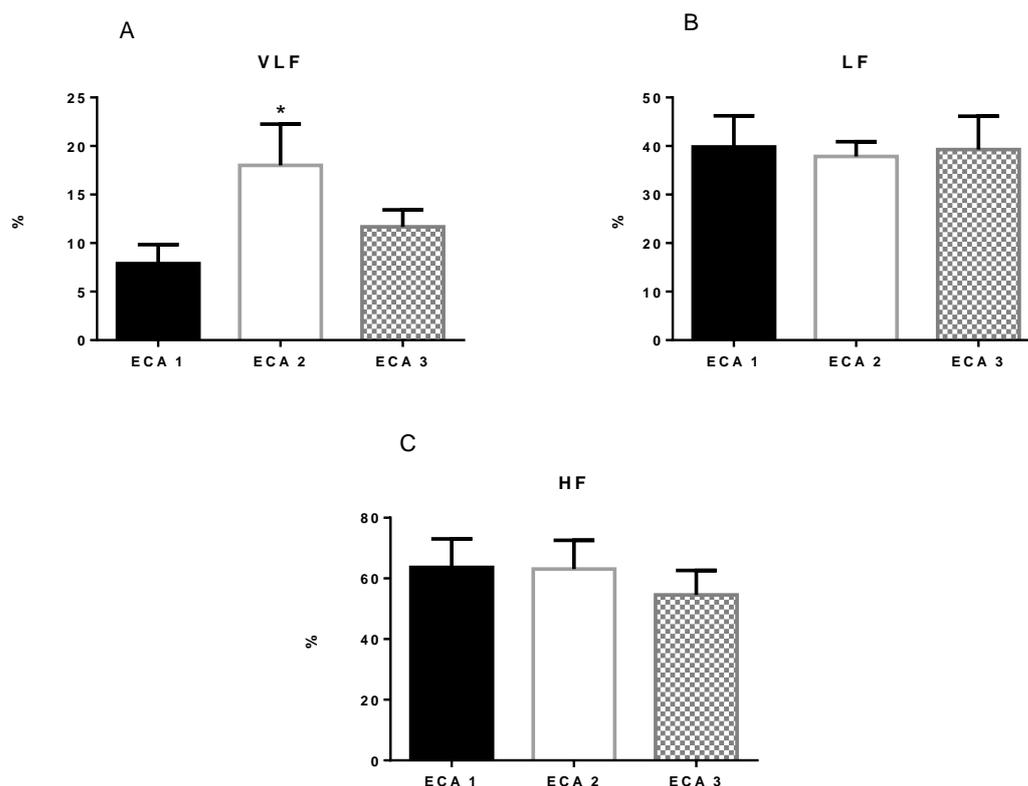


Figura 9 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores percentuais dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Paineis: A) VLF; B) LF; C) HF. VLF: banda de muito baixa frequência; LF: banda de baixa frequência; HF: banda de alta frequência. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7; ECA 3: n = 7. * p < 0,05 vs. ECA 1;

Ao analisarmos os componentes normalizados, ou seja, sem a participação do VLF, observamos que o LF normalizado, que representa a modulação cardíaca simpática, não foi diferente entre os grupos (ECA 1: $43,00 \pm 8,20$; ECA 2: $59,29 \pm 6,30$; ECA 3: $48,96 \pm 6,77$; p = 0,292), bem como o HF normalizado, que representa a modulação parassimpática cardíaca (ECA 1: $57,00 \pm 8,32$; ECA 2: $40,71 \pm 6,30$; ECA 3: $51,04 \pm 6,77$; p = 0,292). A razão entre as bandas de baixa e alta frequência, que demonstra o balanço simpatovagal, também não foi diferente entre os grupos (ECA 1: $1,10 \pm 0,30$; ECA 2: $1,81 \pm 0,40$; ECA 3: $1,21 \pm 0,57$ p = 0,521) (Figura 10).

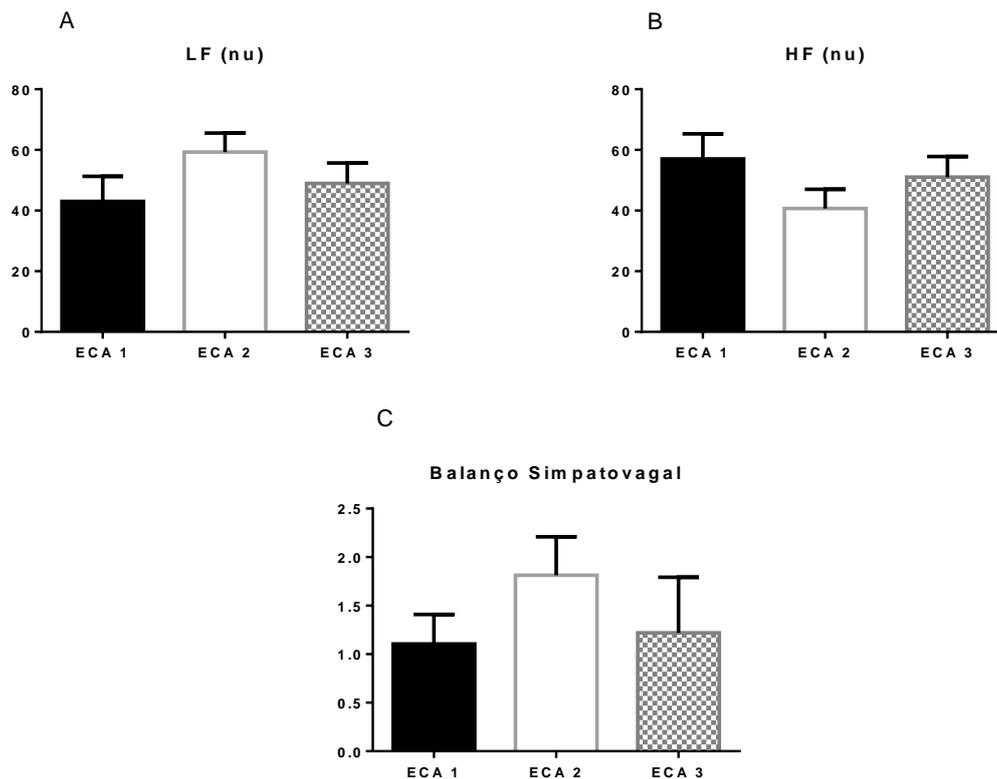


Figura 10 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores normalizados e balanço simpatovagal dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) LF(nu); B) HF(nu); C) Balanço Simpatovagal. LF (nu): banda de baixa frequência em valores normalizados; HF (nu): banda de alta frequência em valores normalizados. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7; ECA 3: n = 7.

4.1.4 Variabilidade da Pressão Arterial

A variabilidade da pressão arterial sistólica quando avaliada pelo desvio padrão da PAS ou pela variância da PAS não foi diferente entre os grupos (SDPAS: ECA 1: $5,00 \pm 0,55$; ECA 2: $5,08 \pm 0,43$; ECA 3: $4,80 \pm 0,34$ mmHg; $p = 0,917$; VARPAS: ECA 1: $27,40 \pm 5,80$; ECA 2: $31,28 \pm 5,65$; ECA 3: $23,81 \pm 3,57$ mmHg²; $p = 0,630$). Também não foi observado diferença entre os grupos na modulação simpática para os vasos (ECA 1: $11,80 \pm 2,75$; ECA 2: $12,75 \pm 3,28$; ECA 3: $10,77 \pm 1,82$ mmHg²; $p = 0,873$) (Figura 11).

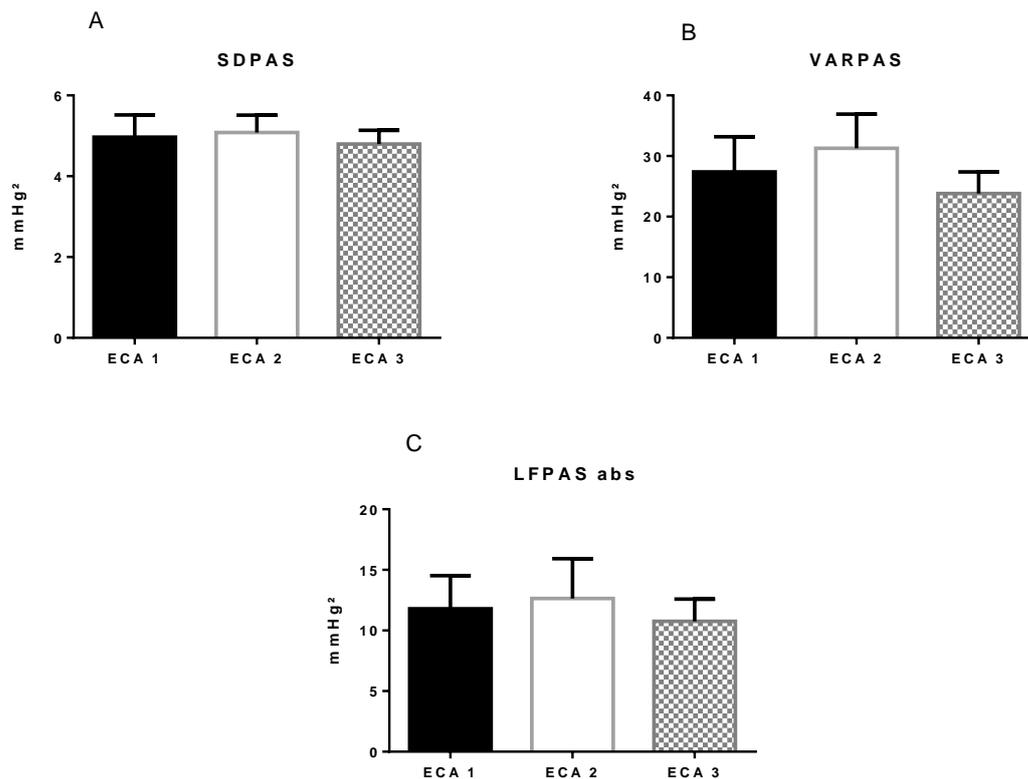


Figura 11 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) SDPAS; B) VAPAS; C) LFPAS abs. SDPAS: Desvio padrão da pressão arterial sistólica; VAPAS: Variância da pressão arterial sistólica; LFPAS abs: Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica em valores absolutos. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7; ECA 3: n = 7.

4.1.5 Barorreflexo espontâneo

Os dados do barorreflexo espontâneo, avaliado pelo método da sequência, são apresentados na tabela 2. Os animais com três cópias do gene da ECA apresentaram maiores valores para o índice de *Down Gain* quando comparados aos animais com uma ou duas cópias do gene da ECA. Para os demais índices não houve diferença entre os grupos.

Tabela 2 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3

	ECA 1 (n=9)	ECA 2 (n=7)	ECA 3 (n=7)	p
Rampas <i>Up</i> (n)	490,2 ± 27,5	510, ± 66,0	539,0 ± 70,0	0,827
Rampas <i>Down</i> (n)	380,0 ± 25,8	350,2 ± 37,6	331,6 ± 45,5	0,638
Rampas totais (n)	870,1 ± 43,8	860,0 ± 87,2	870,2 ± 109,0	0,995
<i>BRR Up</i> (n)	105,5 ± 18,8	112,1 ± 26,0	118,4 ± 35,8	0,945
<i>BRR Down</i> (n)	161,6 ± 25,0	130,0 ± 27,6	125,0 ± 27,4	0,573
<i>All BRR</i> (n)	182,8 ± 26,0	192,0 ± 38,3	245,7 ± 60,0	0,547
<i>Up BEI</i>	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,991
<i>Down BEI</i>	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,790
<i>All BEI</i>	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,975
<i>Up Gain</i>	3,08 ± 0,40	2,80 ± 0,52	3,44 ± 0,47	0,766
(ms/mmHg)				
<i>Down Gain</i>	2,24 ± 0,30	2,00 ± 0,36	3,80 ± 0,50*#	0,0007
(ms/mmHg)				
<i>All Gain</i>	2,86 ± 0,48	2,50 ± 0,44	3,83 ± 0,50	0,135
(ms/mmHg)				

Rampas *Up*: número total de rampas em subida; Rampas *Down*: Número total de rampas em decida; *BRR Up*: Rampas barorreflexas em subida; *BRR Down*: Rampas barorreflexas em decida; *All BRR*: Número total de rampas baroreflexas; *Up BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em subida; *Down BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em decida; *All BEI*: Índice total de eficiência barorreflexa; *Up Gain*: Ganho barorreflexo em subida; *Down Gain*: w; *All Gain*: Ganho total. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão.* p < 0,05 vs. ECA 1; # p < 0,05 vs. ECA 2.

4.1.6 *Peso corporal e tecidos*

Não foi observado diferença para os valores de peso corporal (ECA 1: 29,64 ± 0,87; ECA 2: 29,35 ± 0,86; ECA 3: 30,87 ± 1,13 g; p = 0,280) (Figura 12 - A) e do tecido cardíaco (ECA 1: 0,135 ± 0,006; ECA 2: 0,146 ± 0,006; ECA 3: 0,145 ± 0,008 g; p = 0,475) entre os grupos (Figura 12 - B). Também não houve diferença ente os grupos no peso do tecido adiposo branco (ECA 1-7: 0,731 ± 0,09; ECA 2: 0,585 ± 0,08; ECA 3: 0,774 ± 0,105 g; p = 0,518) (Figura 12 - C), bem como no peso dos pulmões (ECA 1:

0,235 ± 0,021; ECA 2: 0,288 ± 0,031; ECA 3: 0,224 ± 0,020 g; p = 0,166) (Figura 12 – D).

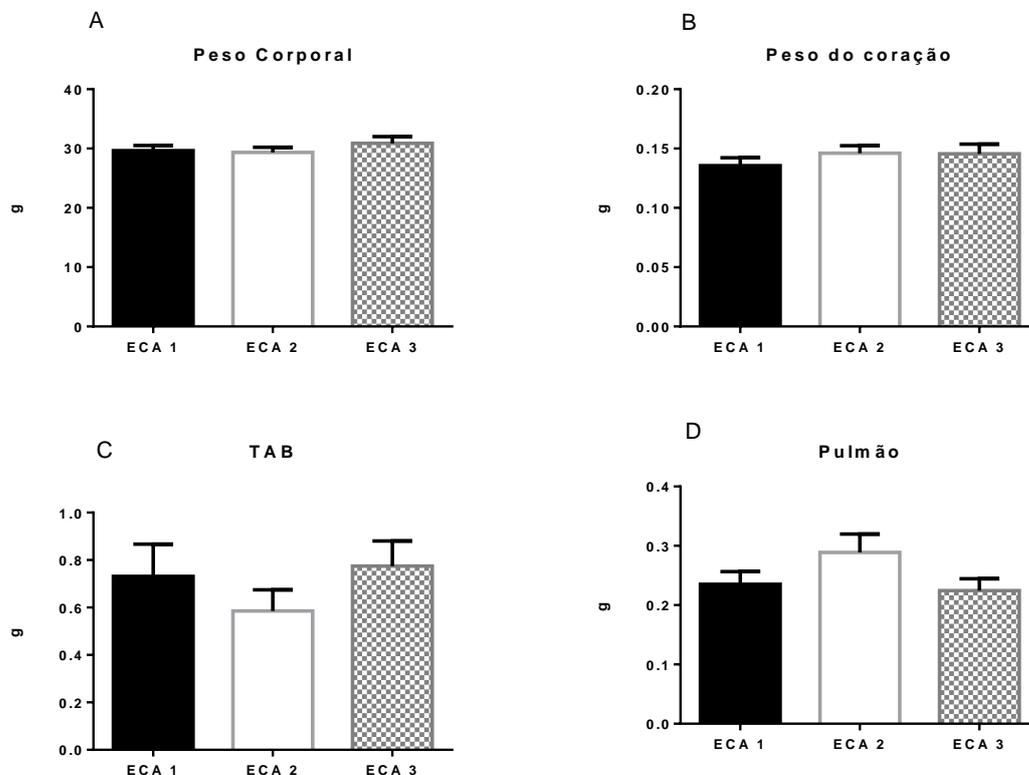


Figura 12 - Peso corporal e de tecidos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Painel: A) Peso corporal; B) Coração; C) TAB; D) Pulmão. TAB: tecido adiposo branco. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão. ECA 1: n = 12; ECA 2: n = 11; ECA: 3 n = 11.

Em relação ao peso dos demais tecidos, o índice de hipertrofia renal não foi diferente entre os grupos (ECA 1: 75,40 ± 3,50; ECA 2: 92,67 ± 5,68; ECA 3: 80,45 ± 4,23 g; p = 0,055) (Figura 13 - A). Também não houve diferença entre os grupos para o peso do fígado (ECA 1: 1,430 ± 0,047; ECA 2: 1,489 ± 0,098; ECA 3: 1,407 ± 0,061 g; p = 0,516) (Figura 13 - B) e do baço (ECA1: 0,136 ± 0,47; ECA 2: 0,150 ± 0,02 ECA3: 0,122 ± 0,035 g; p = 0,893) (Figura 13 - C).

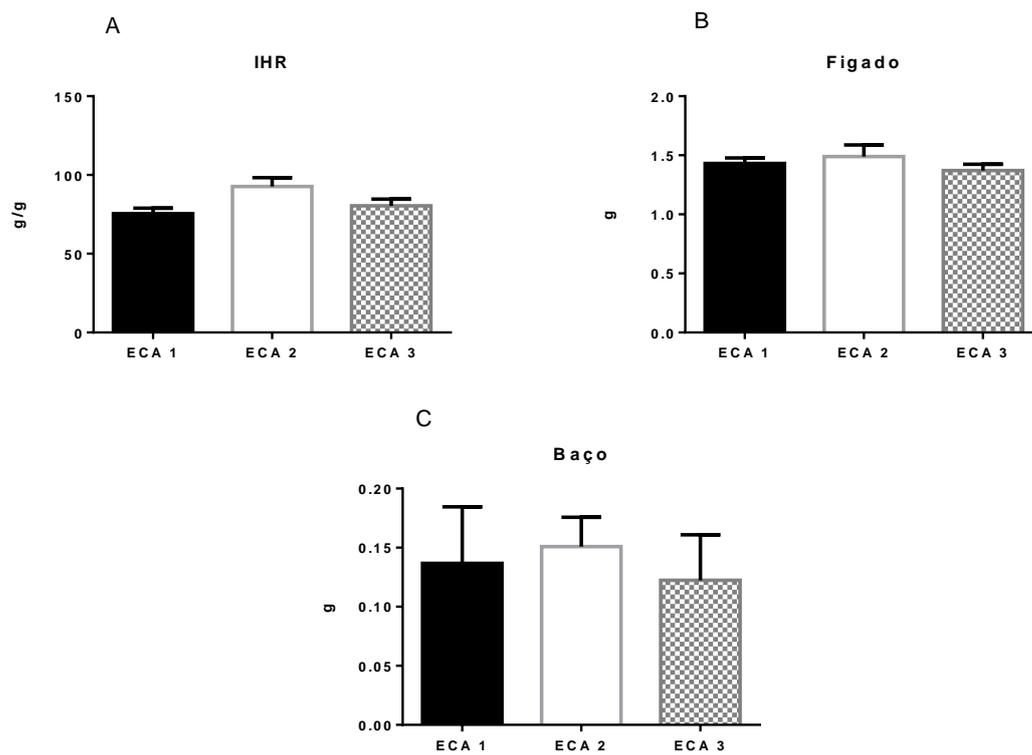


Figura 13 - Índice de hipertrofia renal e peso dos pulmões e do baço dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA. Paineis: A) IHR; B) Fígado; C) Baço. IHR: Índice de hipertrofia cardíaca. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 12; ECA 2: n = 11; ECA 3: n = 11.

4.1.7 Sumários dos resultados do capítulo 1

A tabela 3 apresenta o sumário dos resultados para os dados que apresentaram diferença significativa no capítulo 1.

Tabela 3 – Sumário das alterações dos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 3

VARIÁVEIS\GRUPOS	ECA 1	ECA 2	ECA 3
Ecocardiografia			
E/A (mm/s)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2)
VFC			
VLF (%)	--	Maior (vs. ECA 1)	--
Barorreflexo			
Down Gain (ms/mmHg)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2)

E/A: relação de onda E e A; VFC: variabilidade da frequência cardíaca; VLF (%): componente de muito baixa frequência em valores percentuais; Down Gain: ganho barorreflexo em descida.

4.2 Capítulo II – Comparação entre os grupos não infartados e os grupos infartados avaliados sete dias após o infarto do miocárdio

Nesse capítulo serão apresentadas as comparações entre os animais não infartados com uma, duas e três cópias controles, ou seja não infartados (ECA 1, ECA 2 e ECA 3), e os animais infartados avaliados sete dias após o IAM (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7).

4.2.1 Avaliação ecocardiográfica

A tabela 4 apresenta os dados ecocardiográficos dos grupos controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) comparado aos grupos infartados (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7).

Tabela 4 - Dados ecocardiográficos dos grupos controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7)

	ECA 1 (n=11)	ECA 2 (n=10)	ECA 3 (n=10)	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=8)	P
a'(mm/s)	15,20 ± 0,85	18,04 ± 1,73	15,21 ± 1,17	8,90 ± 2,05#	7,34±2,40*#&	6,45 ± 0,88*#&	0,0001
e'(mm/s)	17,60 ± 1,7	17,61 ± 1,4	22,20 ± 2,1	21,56 ± 1,10	21,22 ± 3,35	17,18±1,70	0,315
E/e'	43,23 ± 5,2	40,27 ± 4,5	32,05 ± 2,8	30,84 ± 3,84	48,59 ± 11,09	38,20 ± 6,70	0,417
E/A	1,08 ± 0,14	1,24 ± 0,16	1,80 ± 0,14	2,12 ± 0,17	1,74 ± 0,25	3,47 ± 0,50*#&	0,0001
TDE (ms)	15,39 ± 1,06	15,42 ± 1,35	15,63 ± 1,20	24,20 ± 5,04	19,38 ± 1,81	19,61 ± 2,95	0,212
TRIV/FC (ms/bpm)	0,046 ± 0,005	0,047 ± 0,002	0,041 ± 0,003	0,088±0,014*#&	0,054 ± 0,006†	0,062 ± 0,006	0,0003
ESIVd (mm)	0,84 ± 0,016	0,79 ± 0,030	0,85 ± 0,024	0,87 ± 0,061	0,75 ± 0,05	0,62 ± 0,036*#&†	0,0004
VVEd (ul)	70,24 ± 3,28	72,04 ± 9,14	82,00 ± 4,95	78,65 ± 8,42	103,7 ± 12,22	110,2 ± 6,50*#	0,002
VVEs (ul)	48,84 ± 3,80	39,70 ± 6,30	42,60 ± 4,48	45,07 ± 6,48	40,70 ± 4,73	67,80 ± 8,95#&	0,02
FAC (%)	37,14 ± 1,67	37,16 ± 1,23	40,68 ± 1,28	30,10 ± 1,80*#&	31,12 ± 1,47*#&	21,30±1,47*#&†	0,0001
FE (%)	42,40 ± 2,7	48,63 ± 1,3	48,11 ± 2,5	35,06 ± 3,60#&	35,97 ± 4,18#	30,94 ± 3,40#&	0,0003
FS (%)	22,08 ± 2,0	24,31 ± 0,7	25,00 ± 1,2	18,68 ± 2,3	17,25 ± 2,1\$	16,81 ± 1,6#&	0,003
MVE (mg)	0,125 ± 0,002	0,122 ± 0,003	0,127 ± 0,009	0,112 ± 0,005	0,135 ± 0,005	0,128 ± 0,005	0,205
MVE corr (g/mg)	94,74 ± 6,6	91,74 ± 4,4	97,31 ± 7,4	94,93 ± 8,3	100,7 ± 6,4	107,0 ± 3,4	0,605
PPVED (mm)	0,81 ± 0,035	0,72 ± 0,003	0,83 ± 0,033	0,78 ± 0,08	0,74 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,230

a': velocidade tecidual da onda a; e': velocidade tecidual da onda e; E/e': relação de onda E e e'; E/A: relação de onda E e A; TDE: tempo de desaceleração da onda e'; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela FC; ESIVd: espessura do septo intraventricular na diástole; VVEd: volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: volume do ventrículo esquerdo na sístole; FAC: mudança da área fracional; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; MVE: massa do ventrículo esquerdo; MVE corr: massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; PPVED: parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão. *p < 0,05 vs. ECA 1; # p < 0,05 vs. ECA 2; \$ p < 0,05 vs. ECA 3; & p < 0,05 vs. ECA 2-7; † p < 0,05 vs. ECA 1-7.

Um dos índices, a onda “a”, que representa o pico da contração atrial está reduzido nos grupos infartados, sendo essa redução mais evidente nos grupos ECA 2-7 e ECA 3-7, uma vez que no grupo ECA 1-7 essa redução só foi significativa comparado ao grupo ECA 2.

A relação E/A, um marcador clássico da função diastólica do ventrículo esquerdo, foi maior no grupo ECA 3-7 comparado com os grupos sem infarto com uma e duas cópias do gene da ECA e com o grupo infartado com duas cópias do gene da ECA.

O tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca foi maior no grupo ECA 1-7 *versus* todos os controles. Ainda, entre os grupos infartados, o tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca foi menor no grupo ECA 2-7 em comparação com o grupo ECA 1-7.

A espessura do septo intraventricular foi menor no grupo ECA 3-7 quando comparado com os grupos ECA 1 e ECA 3 e com o grupo infartado ECA 1-7. Outro índice que representa a progressão do infarto é o volume das câmaras cardíacas. O volume do ventrículo esquerdo na diástole foi maior no grupo infartado com 3 cópias da ECA em relação aos grupos controles ECA 1 e ECA 2. Por sua vez, na sístole, esse aumento também ocorreu somente no grupo ECA 3-7 quando comparado ao grupo ECA 2 e ECA 3.

A mudança de área fracional (FAC) estava reduzida em todos os grupos infartados (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) quando comparados com os controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3). Além disso, o grupo ECA 3-7 apresentou menor FAC quando comparado com os grupos ECA 1-7 e ECA 2-7. Em relação a fração de encurtamento (FS), observamos menor FS no grupo ECA 2-7 em comparação com o grupo ECA 3 e menor FS no grupo ECA 3-7 em comparação com os grupos ECA 2 e

ECA 3. Quanto a fração de ejeção (FE), observamos uma redução em todos os grupos infartados quando comparado ao grupo ECA 2. Ainda, os grupos ECA 1-7 e ECA 3-7 também apresentaram menor FE do que o grupo ECA 3.

Não foi observado diferença entre os grupos para os seguintes parâmetros avaliados: onda e', relação E/e', TDE, MVE, MVE corrigido pelo peso corporal e PPVEd.

4.2.2 Frequência cardíaca e pressão arterial

Não foi observado influência do número de cópias do gene da ECA ou mesmo do IAM na frequência cardíaca (ECA 1: $683 \pm 12,54$; ECA 2: $655 \pm 15,77$; ECA 3: $625 \pm 25,60$; ECA 1-7: $627 \pm 32,13$; ECA 2-7: $688 \pm 12,58$; ECA 3-7: $605 \pm 23,92$ bpm; $p = 0,09$), bem como na pressão arterial sistólica (ECA 1: $124,6 \pm 4,0$; ECA 2: $127,1 \pm 5,62$; ECA 3: $129,2 \pm 3,32$; ECA 1-7: $126,2 \pm 6,52$; ECA 2-7: $124,7 \pm 2,48$; ECA 3-7: $117,3 \pm 5,16$ mmHg; $p = 0,627$), diastólica (ECA 1: $87,90 \pm 3,0$; ECA 2: $86,79 \pm 2,629$; ECA 3: $85,08 \pm 1,846$; ECA 1-7: $93,50 \pm 2,90$; ECA 2-7: $90,57 \pm 2,15$; ECA 3-7: $85,28 \pm 2,46$ mmHg; $p = 0,328$) e média (ECA 1: $107,0 \pm 3,5$; ECA 2: $107,0 \pm 4,0$; ECA 3: $107,4 \pm 2,5$; ECA 1-7: $110,1 \pm 4,36$; ECA 2-7: $108,7 \pm 1,81$; ECA 3-7: $102,1 \pm 4,15$ mmHg; $p = 0,806$) (Figura 14).

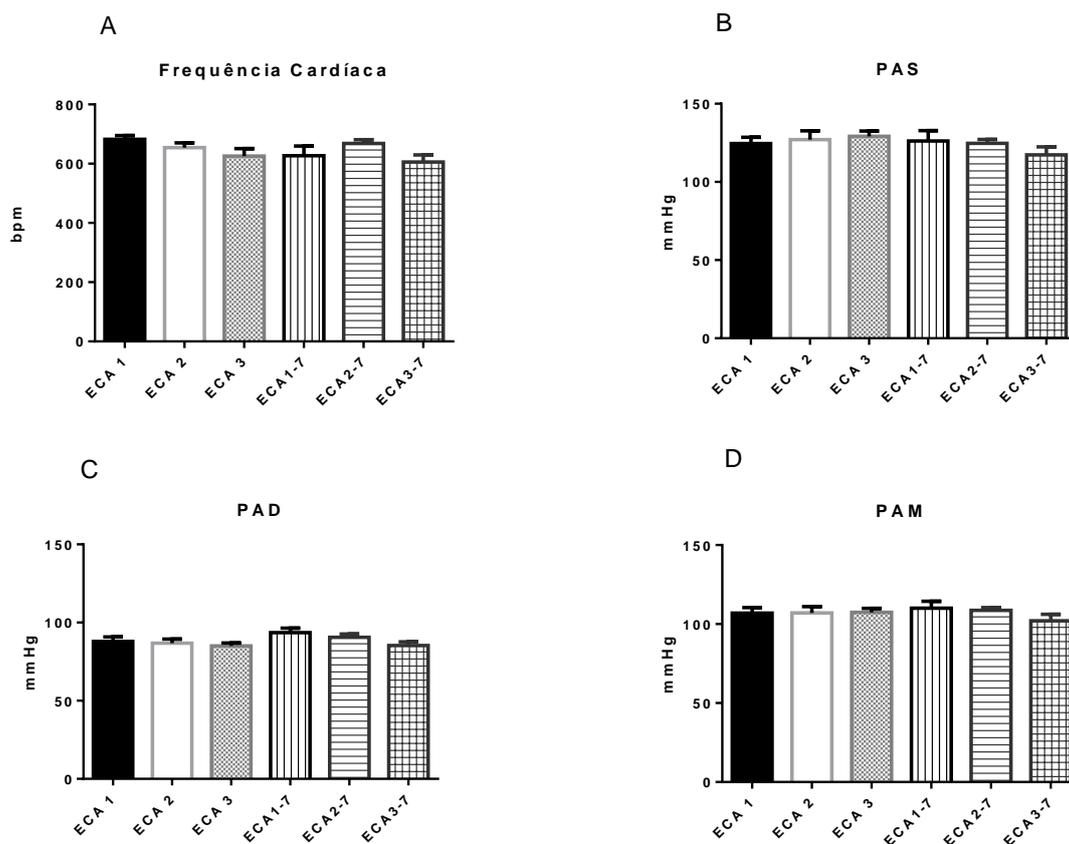


Figura 14 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7). Painel: A) Frequência Cardíaca; B) PAS; C) PAD; D) PAM. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7, ECA 3: n = 7; ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 7.

4.2.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Variabilidade no domínio do tempo

Embora, de maneira geral os valores médios dos grupos infartados tenham sido menores do que os dos grupos não infartados, não observamos diferença significativa entre os grupos na VFC no domínio do tempo, avaliada por meio do desvio padrão dos intervalos de pulso (ECA 1: $6,00 \pm 0,60$; ECA 2: $5,82 \pm 1,70$; ECA 3: $4,95 \pm 0,45$; ECA 1-7: $4,27 \pm 0,35$; ECA 2-7: $5,58 \pm 0,75$; ECA 3-7: $5,17 \pm 0,43$ ms; $p = 0,372$) ou pela variância dos intervalos de pulso (ECA 1: $39,50 \pm 7,75$; ECA 2: $36,50 \pm 7,25$;

ECA 3: $26,20 \pm 4,45$; ECA 1-7: $18,76 \pm 10,58$; ECA 2-7: $33,73 \pm 8,91$; ECA 3-7: $28,11 \pm 4,40 \text{ ms}^2$; $p = 0,311$) (Figura 15 A e B). De forma semelhante, o RMSSD, um índice representativo da modulação vagal, também não apresentou diferença entre os grupos avaliados (ECA 1: $6,53 \pm 0,60$; ECA 2: $5,05 \pm 0,70$; ECA 3: $5,50 \pm 0,45$; ECA 1-7: $6,00 \pm 0,85$; ECA 2-7: $5,45 \pm 0,55$; ECA 3-7: $5,20 \pm 0,42 \text{ ms}$; $p = 0,416$) (Figura 15 - C).

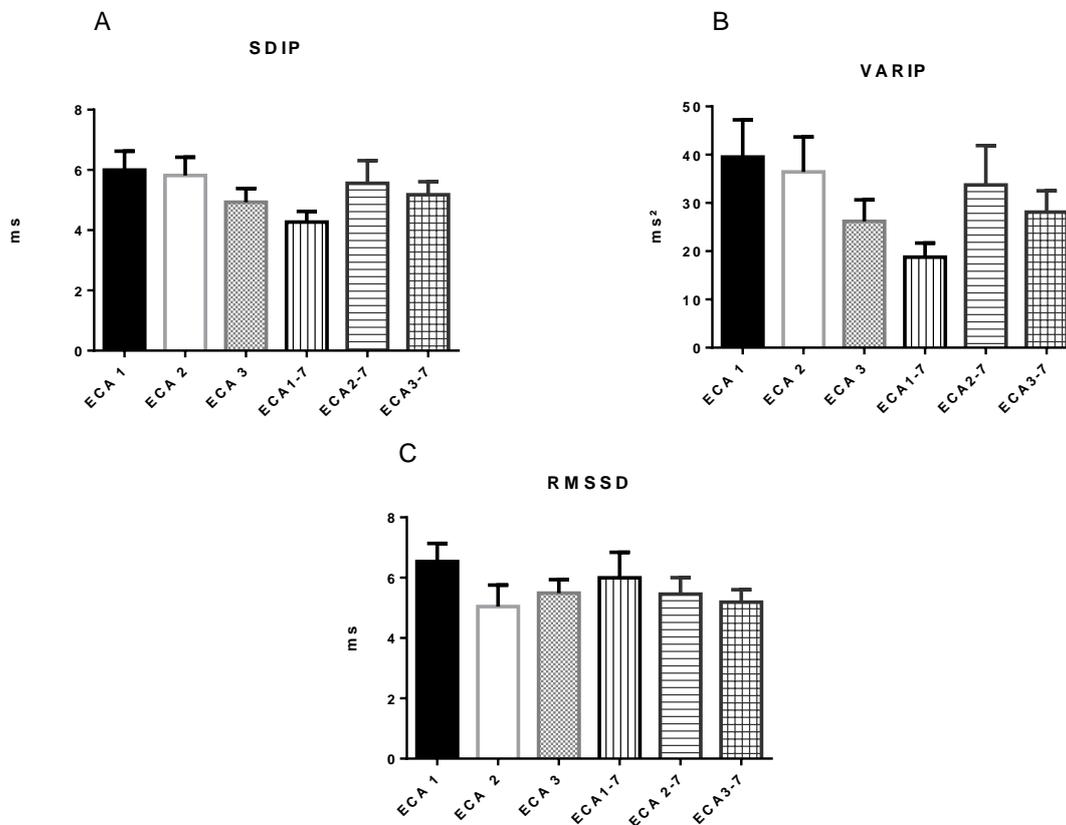


Figura 15 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7). Painel: A) SDIP; B) VARIP; C) RMSSD. SDIP: desvio padrão dos intervalos de pulso; VARIP: variância dos intervalos de pulso; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos de pulso consecutivos. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$, ECA 3: $n = 7$; ECA 1-7: $n = 6$; ECA 2-7: $n = 6$; ECA 3-7: $n = 7$.

Variabilidade no domínio da frequência

Em relação aos dados de VFC no domínio da frequência, não foi observado diferença entre os grupos no componente VLF em valores absolutos (ECA 1: $2,44 \pm 0,83$; ECA 2: $3,68 \pm 1,23$; ECA 3: $2,50 \pm 0,56$; ECA 1-7: $3,56 \pm 1,43$; ECA 2-7: $5,83 \pm 2,27$; ECA 3-7: $3,83 \pm 0,72 \text{ ms}^2$; $p = 0,458$). Já, o componente LF em valores absolutos, estava maior no grupo ECA 3-7 comparado aos grupos ECA 1, ECA 2 e ECA 1-7 (ECA 3-7: $14,85 \pm 2,36$ vs. ECA 1: $4,76 \pm 2,00$, ECA 2: $4,34 \pm 1,40$ e ECA 1-7: $5,13 \pm 1,88$; ECA 3: $6,27 \pm 2,54$; ECA 2-7: $7,93 \pm 2,74 \text{ ms}^2$; $p = 0,009$). Em relação a modulação vagal, avaliada pelo componente HF em valores absolutos, não houve diferença entre os grupos (ECA 1: $9,37 \pm 1,70$; ECA 2: $5,35 \pm 1,36$; ECA 3: $7,76 \pm 1,9$; ECA 1-7: $6,97 \pm 1,26$; ECA 2-7: $7,63 \pm 1,95$; ECA 3-7: $9,73 \pm 1,88 \text{ ms}^2$; $p = 0,507$), como pode ser observado na figura 16.

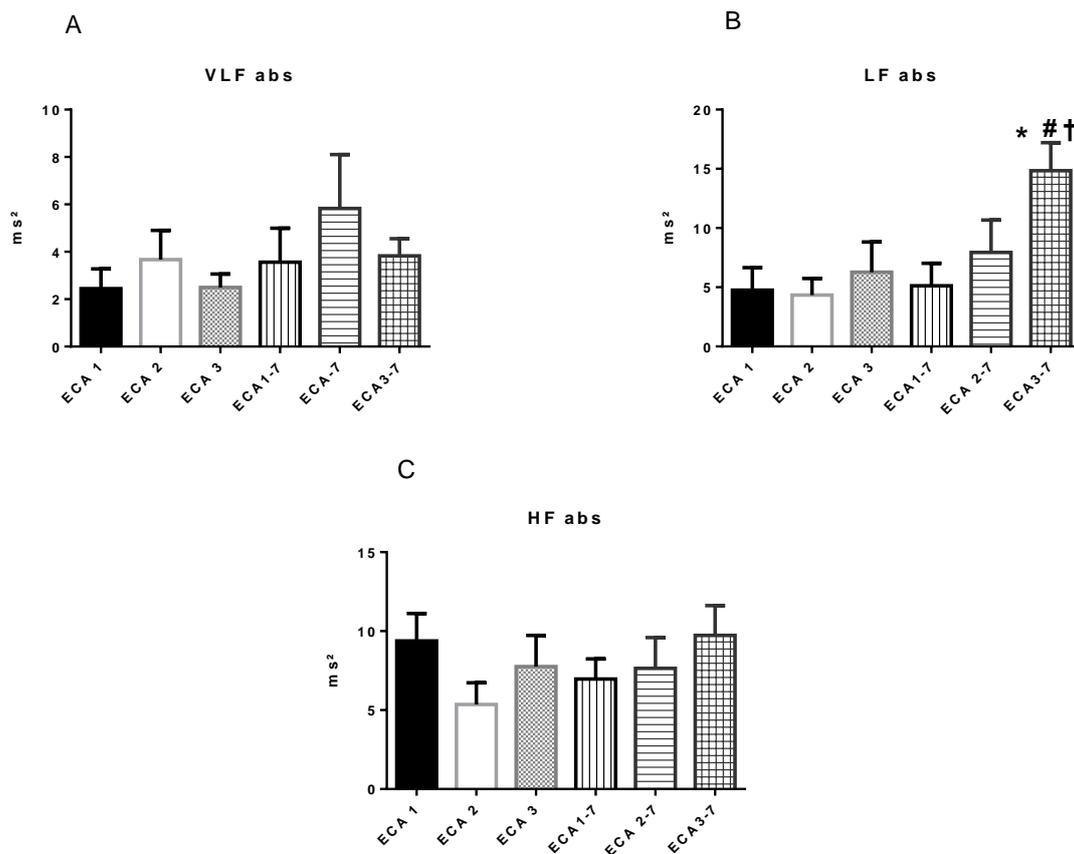


Figura 16 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores absolutos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Painel: A) VLF abs; B) LF abs; C) HF abs. VLF abs: banda de muito baixa frequência em valores absolutos; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; HF abs: banda de alta frequência em valores absolutos. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7; ECA 3: n = 7; ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 7. * p < 0,05 vs. ECA 1; # p < 0,05 vs. ECA 2; † p < 0,05 vs. ECA 1-7.

Quanto aos componentes da VFC no domínio da frequência em valores percentuais, o componente VLF foi maior nos grupos ECA 1-7 e ECA 2-7 quando comparados ao grupo ECA 1 (ECA 1-7: $18,87 \pm 4,63$ e ECA 2-7: $19,40 \pm 2,08$ vs. ECA 1: $7,87 \pm 1,98$; ECA 2: $18,00 \pm 4,25$; ECA 3: $11,68 \pm 1,75$; ECA 3-7: $12,00 \pm 0,62$ %; p = 0,01). Não foram observados diferenças entre os componentes de LF % (ECA 1: $39,83 \pm 6,40$; ECA 2: $37,86 \pm 3,05$; ECA 3: $39,29 \pm 6,84$; ECA 1-7: $28,67 \pm 5,50$; ECA 2-7: $33,60 \pm 4,90$; ECA 3-7: $52,57 \pm 3,42$ p = 0,055) e HF % (ECA 1: $63,63 \pm 9,42$;

ECA 2: $63,13 \pm 9,45$; ECA 3: $54,57 \pm 8,06$; ECA 1-7: $52,43 \pm 10,09$; ECA 2-7: $46,80 \pm 6,40$; ECA 3-7: $39,88 \pm 4,07$ $p = 0,278$) (Figura 17).

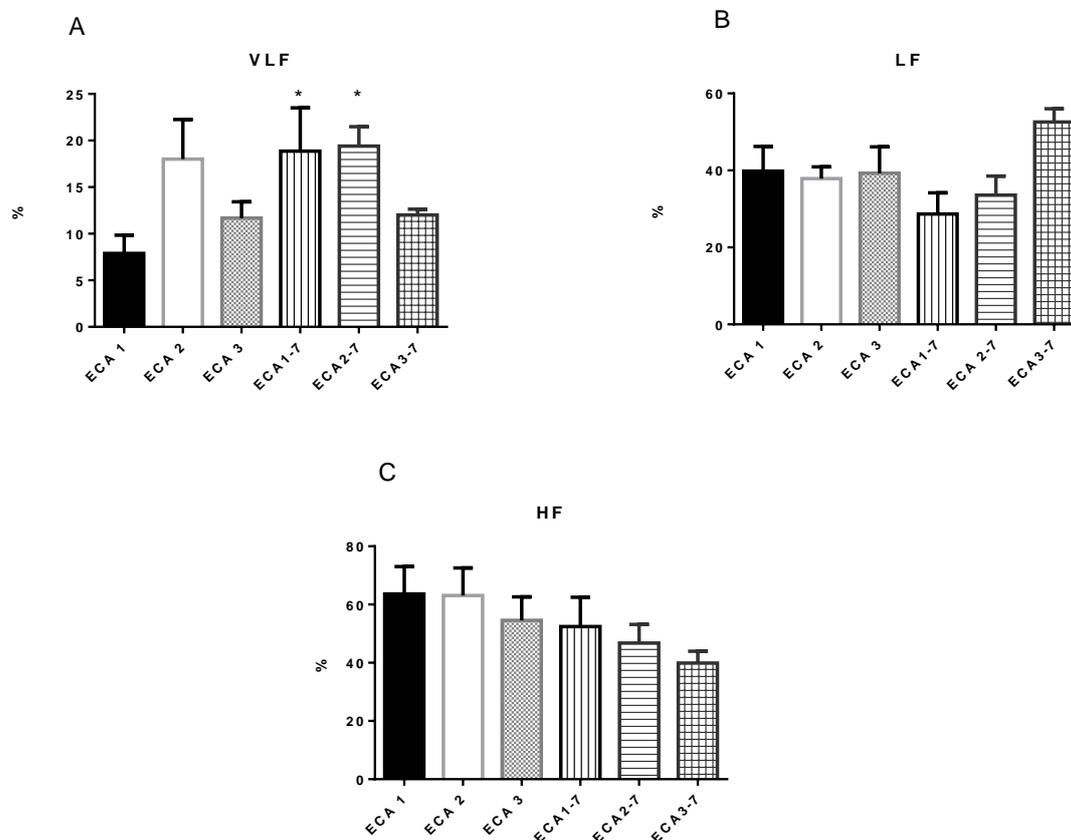


Figura 17 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores percentuais dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Painel: A) VLF; B) LF ; C) HF. VLF: banda de muito baixa frequência em porcentagem; LF: banda de baixa frequência em porcentagem; HF: banda de alta frequência em porcentagem. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$; ECA 3: $n = 7$; ECA 1-7: $n = 6$; ECA 2-7: $n = 6$; ECA 3-7: $n = 7$. * $p < 0,05$ vs. ECA 1.

Ao analisarmos os componentes normalizados, ou seja, sem a participação do VLF, o LF normalizado, que representa a modulação cardíaca simpática, não foi diferente entre os grupos (ECA 1: $43,00 \pm 8,20$; ECA 2: $59,29 \pm 6,30$; ECA 3: $48,96 \pm 6,77$; ECA 1-7: $37,98 \pm 8,70$; ECA 2-7: $44,00 \pm 5,77$; ECA 3-7: $59,57 \pm 3,55$; $p = 0,150$), bem como o HF normalizado, que representa a modulação parassimpática

cardíaca (ECA 1: $57,00 \pm 8,32$; ECA 2: $40,71 \pm 6,30$; ECA 3: $51,04 \pm 6,77$; ECA 1-7: $62,01 \pm 8,70$; ECA 2-7: $57,40 \pm 6,86$; ECA 3-7: $44,25 \pm 5,00$; $p = 0,243$). Já, a razão entre as bandas de baixa e alta frequência, que representa o balanço simpátovagal, foi maior no grupo ECA 3-7 do que no grupo ECA 1-7 (ECA 3-7: $2,22 \pm 0,17$ vs. ECA 1-7: $0,81 \pm 0,25$; ECA 1: $1,10 \pm 0,30$; ECA 2: $1,81 \pm 0,40$; ECA 3: $1,21 \pm 0,57$; ECA 2-7: $1,07 \pm 0,31$; $p = 0,04$) (Figura 18).

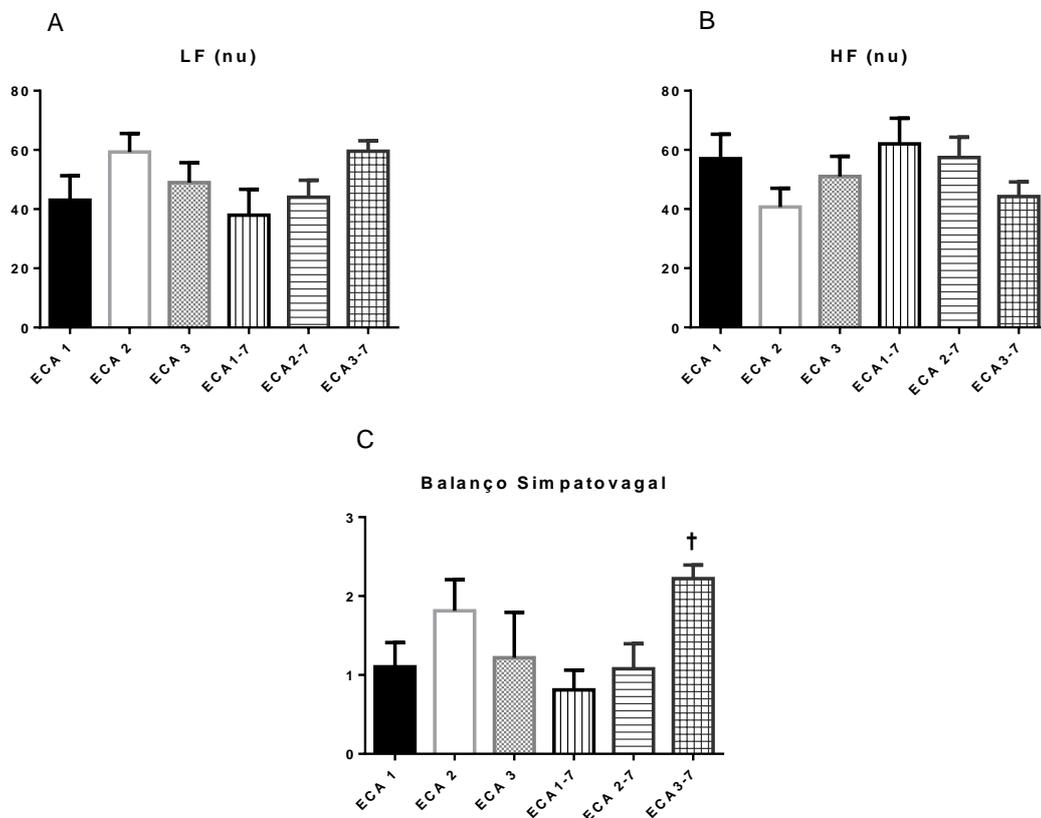


Figura 18 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência em valores normalizados e balanço simpátovagal dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Painel: A) LF(nu); B) HF(nu); C) Balanço Simpátovagal. LF (nu): banda de baixa frequência em valores normalizados; HF (nu): banda de alta frequência em valores normalizados. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 9$; ECA 2: $n = 7$; ECA 3: $n = 7$; ECA 1-7: $n = 6$; ECA 2-7: $n = 6$; ECA 3-7: $n = 7$. † $p < 0,05$ vs. ECA 1-7.

4.2.4 Variabilidade da Pressão Arterial

A VARPAS, quando avaliada pelo desvio padrão da PAS ou pela variância da PAS, não foi diferente entre os grupos (SDPAS: ECA 1: $5,00 \pm 0,55$; ECA 2: $5,08 \pm 0,43$; ECA 3: $4,80 \pm 0,34$; ECA 1-7: $5,42 \pm 0,62$; ECA 2-7: $4,70 \pm 0,22$; ECA 3-7: $5,07 \pm 0,61$ mmHg²; $p = 0,940$; VARPAS: ECA 1: $27,40 \pm 5,80$; ECA 2: $31,28 \pm 5,65$; ECA 3: $23,81 \pm 3,57$; ECA 1-7: $31,34 \pm 6,63$; ECA 2-7: $22,01 \pm 2,15$; ECA 3-7: $28,76 \pm 7,00$ mmHg²; $p = 0,803$). Também não foi observado diferença estatística entre os grupos na modulação simpática para os vasos (ECA 1: $11,80 \pm 2,75$; ECA 2: $12,75 \pm 3,28$; ECA 3: $10,77 \pm 1,82$; ECA 1-7: $13,32 \pm 3,58$; ECA 2-7: $13,17 \pm 1,85$; ECA3-7: $14,22 \pm 1,70$ mmHg²; $p = 0,916$) (Figura 19).

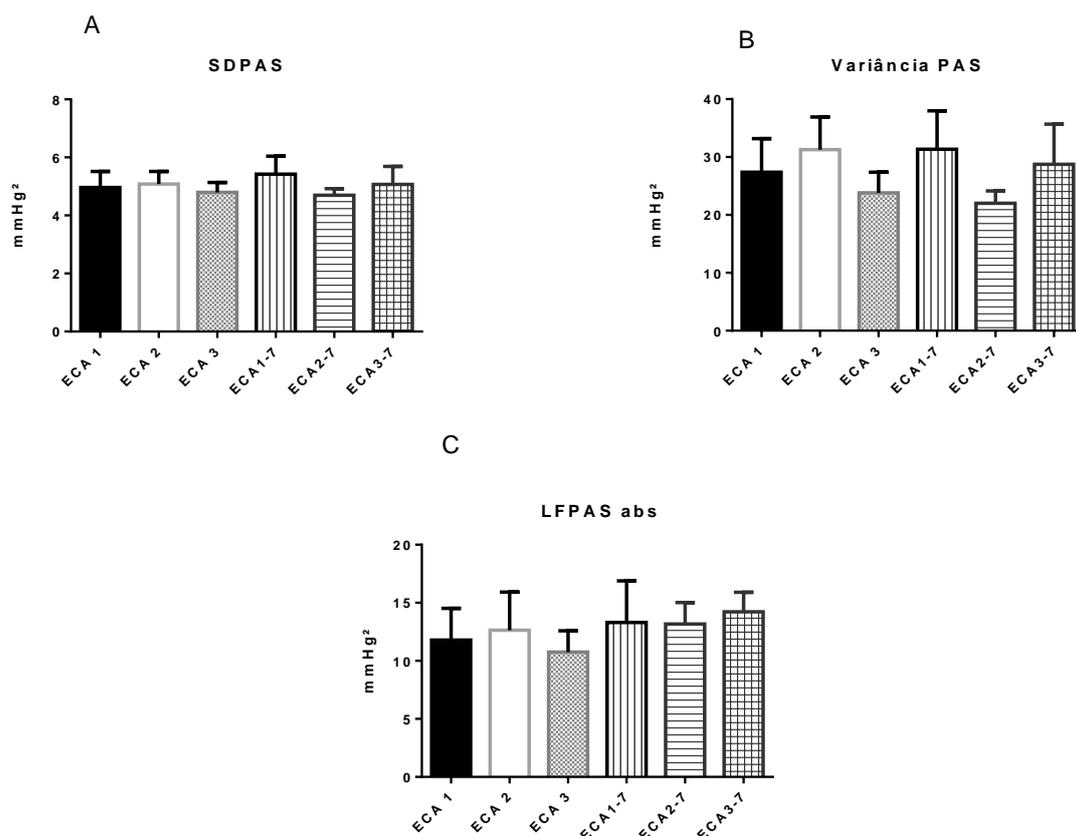


Figura 19 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Painel: A) SDPAS; B) Variância PAS; C) LFPAS abs. SDPAS: desvio padrão da pressão arterial sistólica;

LFPAS: banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 9; ECA 2: n = 7; ECA 3: n = 7; ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 7.

4.2.5 *Barorreflexo espontâneo*

Os dados do barorreflexo espontâneo, avaliado pelo método da sequência, são apresentados na tabela 5. O aumento do número de cópias da ECA ou o infarto do miocárdio não promoveram alterações em nenhum dos índices avaliados.

Tabela 5 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos controles sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3 -7)

	ECA 1 (n=9)	ECA 2 (n=7)	ECA 3 (n=7)	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=7)	P
Rampas <i>Up</i> (n)	490,2 ± 27,5	510, ± 66,0	539,0 ± 70,0	380,00 ± 50,70	513,20 ± 41,20	445,00 ± 82,00	0,603
Rampas <i>Down</i> (n)	380,0 ± 25,8	350,2 ± 37,6	331,6 ± 45,5	288,70 ± 32,20	380,00 ± 38,90	286,50 ± 40,78	0,338
Rampas totais (n)	870,1 ± 43,8	860,0 ± 87,2	870,2 ± 109,0	650,80 ± 74,40	894,20 ± 63,58	780,30 ± 140,80	0,711
<i>BRR Up</i> (n)	105,5 ± 18,8	112,1 ± 26,0	118,4 ± 35,8	65,00 ± 13,75	95,83 ± 12,00	70,50 ± 20,00	0,927
<i>BRR Down</i> (n)	161,6 ± 25,0	130,0 ± 27,6	125,0 ± 27,4	60,00 ± 21,00	60,00 ± 6,10	57,58 ± 11,35	0,117
<i>All BRR</i> (n)	182,8 ± 26,0	192,0 ± 38,3	245,7 ± 60,0	85,45 ± 24,88	154,80 ± 13,25	128,10 ± 30,00	0,999
<i>Up BEI</i>	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,410
<i>Down BEI</i>	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,240
<i>All BEI</i>	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,400
<i>Up Gain</i> (ms/mmHg)	3,08 ± 0,40	2,80 ± 0,52	3,44 ± 0,47	3,40 ± 0,95	3,03 ± 0,70	2,66 ± 0,43	0,64
<i>Down Gain</i> (ms/mmHg)	2,24 ± 0,30	2,00 ± 0,36	3,80 ± 0,50	4,35 ± 1,10	2,70 ± 0,35	2,65 ± 0,62	0,117
<i>All Gain</i> (ms/mmHg)	2,86 ± 0,48	2,50 ± 0,44	3,83 ± 0,50	3,00 ± 0,50	3,00 ± 0,45	3,00 ± 0,50	0,200

Rampas *Up*: número total de rampas em subida; Rampas *Down*: Número total de rampas em decida; *BRR Up*: Rampas barorreflexas em subida; *BRR Down*: Rampas barorreflexas em decida; *All BRR*: Número total de rampas baroreflexas; *Up BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em subida; *Down BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em decida; *All BEI*: Índice total de eficiência barorreflexa; *Up Gain*: Ganho barorreflexo em subida; *Down Gain*: Ganho barorreflexo em decida; *All Gain*: Ganho total. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão.

4.2.6 *Peso corporal e tecidos*

Não foi observado diferença no peso corporal entre os grupos (ECA 1: $29,64 \pm 0,87$; ECA 2: $29,35 \pm 0,86$; ECA 3: $30,87 \pm 1,13$; ECA 1-7: $29,47 \pm 0,78$; ECA 2-7: $27,57 \pm 1,20$; ECA 3-7: $28,45 \pm 0,88$ g; $p = 0,280$) (Figura 20 - A). Já, em relação ao peso do coração, foi observado maior peso no grupo ECA 3-7 em comparação aos grupos não infartados (ECA 3-7: $0,205 \pm 0,01$ vs. ECA 1: $0,135 \pm 0,006$, ECA 2: $0,146 \pm 0,006$ e ECA 3: $0,145 \pm 0,008$; ECA 1-7: $0,175 \pm 0,01$; ECA 2-7: $0,178 \pm 0,01$ g; $p < 0,0001$) (Figura 20 - B). O peso do tecido adiposo branco foi menor nos grupos ECA 1-7 e ECA 3-7 comparados ao grupo ECA 3 (ECA 1-7: $0,311 \pm 0,09$ e ECA 3-7: $0,368 \pm 0,06$ vs. ECA 3: $0,774 \pm 0,105$; ECA 1: $0,731 \pm 0,135$; ECA 2: $0,585 \pm 0,08$; ECA 2-7: $0,450 \pm 0,08$ g; $p = 0,004$) (Figura 20 - C). Não foi observado diferenças no peso dos pulmões entre os grupos (ECA 1: $0,235 \pm 0,021$; ECA 2: $0,288 \pm 0,031$; ECA 3: $0,224 \pm 0,020$; ECA 1-7: $0,186 \pm 0,01$; ECA 2-7: $0,210 \pm 0,01$; ECA 3-7: $0,201 \pm 0,01$ g; $p = 0,180$) (Figura 20 - D).

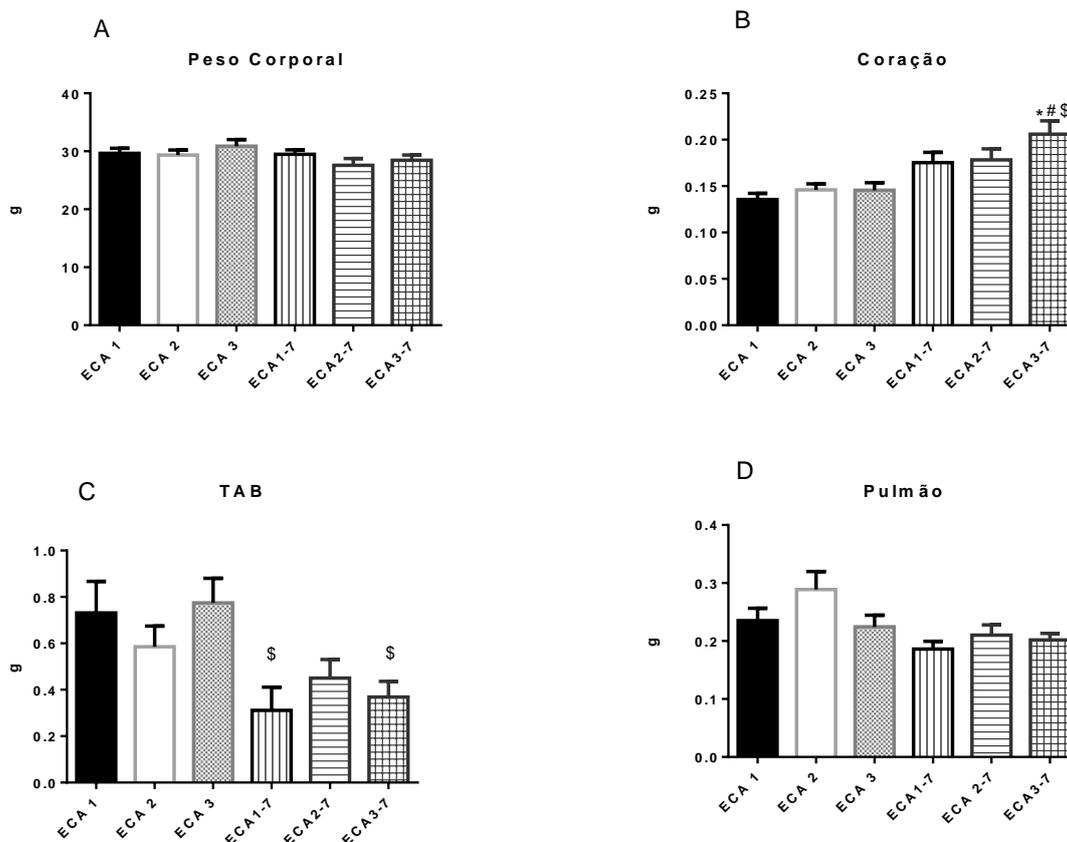


Figura 20 - Peso corporal e de tecidos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2, ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Painel: A) Peso corporal; B) Coração; C) TAB; D) Pulmão. TAB: tecido adiposo branco. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: n = 12; ECA 2: n = 11; ECA 3: n = 11; ECA1-7: n = 9; ECA 2-7: n = 7; ECA 3-7: n = 8. * p < 0,05 vs. ECA 1; # p < 0,05 vs. ECA 2; \$ p < 0,05 vs. ECA 3.

Em relação ao peso dos demais tecidos, o índice de hipertrofia renal não foi diferente entre os grupos (ECA 1: $75,40 \pm 3,50$; ECA 2: $92,67 \pm 5,68$; ECA 3: $80,45 \pm 4,23$; ECA 1-7: $85,02 \pm 4,05$; ECA 2-7: $93,28 \pm 6,94$; ECA 3-7: $82,68 \pm 2,40$ g; p = 0,058) (Figura 21 - A). Também não houve diferença entre os grupos para o peso do fígado (ECA 1: $1,430 \pm 0,047$; ECA 2: $1,489 \pm 0,098$; ECA 3: $1,407 \pm 0,061$; ECA 1-7: $1,300 \pm 0,130$; ECA 2-7: $1,333 \pm 0,063$; ECA 3-7: $1,459 \pm 0,057$ g; p = 0,444) (Figura 21 - B) e do baço (ECA 1: $0,136 \pm 0,47$; ECA 2: $0,150 \pm 0,02$; ECA 3: $0,122 \pm 0,035$;

ECA 1-7: $0,136 \pm 0,030$; ECA 2-7: $0,170 \pm 0,048$; ECA 3-7: $0,125 \pm 0,013$ g; $p = 0,949$) (Figura 21- C).

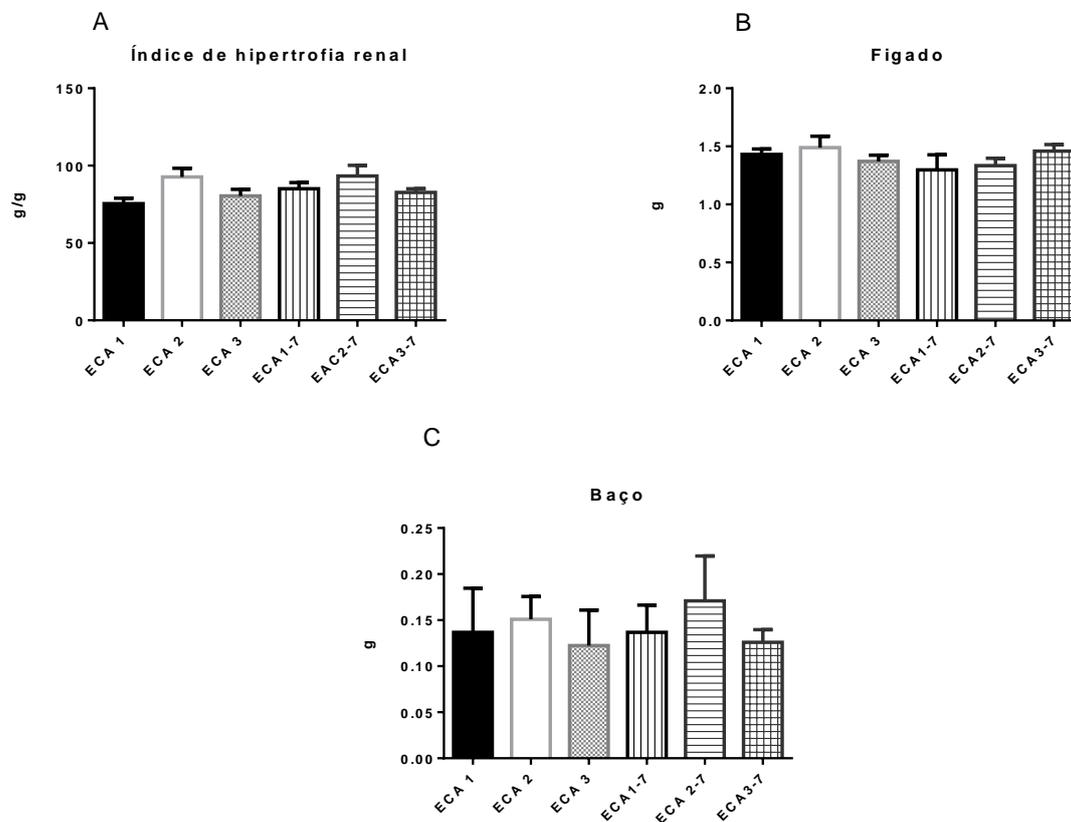


Figura 21 - Peso de tecidos dos grupos com uma, duas e três cópias do gene da ECA sem infarto (ECA 1, ECA 2, ECA 3) e sete dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7). Pannel: A) Índice de Hipertrofia renal; B) Fígado; C) Baço. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1: $n = 12$; ECA 2: $n = 11$; ECA 3: $n = 11$; ECA 1-7: $n = 9$; ECA 2-7: $n = 7$; ECA 3-7: $n = 8$.

4.2.7 Sumários dos resultados do capítulo 2

A tabela 6 apresenta o sumário dos resultados para os dados que apresentaram diferença significativa no capítulo 2 nos grupos infartados sete dias após o IAM

Tabela 6 - Sumário das alterações dos grupos infartados ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7

VARIÁVEIS\GRUPOS	ECA 1-7	ECA 2-7	ECA 3-7
Ecocardiografia			
a' (mm/s)	Menor (vs. ECA 2)	Menor (vs. ECA 1, ECA 2 e ECA 3)	Menor (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3)
E/A	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 2-7)
TRIV/FC (ms/bpm)	Maior (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3)	Menor (vs. ECA 1-7)	--
ESIVd (mm)	--	--	Menor (vs. ECA1, ECA 3, ECA 1-7)
VVED (ul)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2)
VVEs (ul)	--	--	Maior (vs. ECA 2, ECA 3)
FAC (%)	Menor (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3)	Menor (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3)	Menor (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3, ECA 1-7, ECA 2-7)
FE (%)	Menor (vs. ECA 2, ECA 3)	Menor (vs. ECA 2)	Menor (vs. ECA 2, ECA 3)
FS (%)	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 2, ECA 3)
VFC			
LF abs (ms ²)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 1-7)
VLF (%)	Maior (vs. ECA 1)	Maior (vs. ECA 1)	
LF/HF	--	--	Maior (vs. ECA 1-7)
Peso tecidos			
Coração (g)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 2, ECA 3)
TAB (g)	Menor (vs. ECA 3)	--	Menor (vs. ECA 3)

a': velocidade tecidual da onda a; E/A: relação de onda E e A; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela FC; ESIVd: espessura do septo intraventricular na diástole; VVED: volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: volume do ventrículo esquerdo na sístole; FAC: mudança da área fracional; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; VLF%: banda de muito baixa frequência em porcentagem; LF/HF: relação das ondas de LF/HF; TAB: tecido adiposo branco.

4.3 Capítulo III – Comparação entre grupos infartados sete e 28 dias após o infarto

Nesse capítulo serão apresentadas as comparações entre os animais infartados sete dias (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e 28 dias após o IAM (ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7).

4.3.1 Avaliação ecocardiográfica

A análise ecocardiográfica comparando os dois tempos de infarto (sete e 28 dias após infarto do miocárdio) mostra que o grupo ECA 2-28 apresentou menor relação E/A que o grupo ECA 3-7 (ECA 2-28: $1,75 \pm 0,14$ vs. ECA 3-7: $3,47 \pm 0,50$ mm/s, $p = 0,05$). Quanto aos demais grupos, não observamos diferenças na relação E/A (ECA 1-7: $2,16 \pm 0,17$; ECA 2-7: $1,74 \pm 0,25$; ECA 1-28: $2,12 \pm 0,17$; ECA 3-28: $2,40 \pm 0,36$ mm/s) (Figura 22 - A).

Não foram observadas diferenças entre os grupos na FAC (ECA 1-7: $30,10 \pm 1,80$; ECA 2-7: $31,12 \pm 1,47$; ECA 3-7: $21,30 \pm 1,47$; ECA 1-28: $32,86 \pm 3,06$; ECA 2-28: $30,00 \pm 2,10$; ECA 3-28: $28,27 \pm 1,88$ %; $p = 0,150$) (Figura 22 - B). A espessura do septo intraventricular na diástole foi menor nos grupos ECA 3-7 e ECA 1-28 comparados ao grupo ECA 1-7 (ECA 3-7: $0,62 \pm 0,03$ e ECA 1-28: $0,63 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,87 \pm 0,06$ mm; $p = 0,014$). Para os demais grupos não observamos diferença nesse parâmetro (ECA 2-7: $0,76 \pm 0,05$; ECA 2-28: $0,70 \pm 0,04$; ECA 3-28: $0,67 \pm 0,02$ mm) (Figura 22 - C).

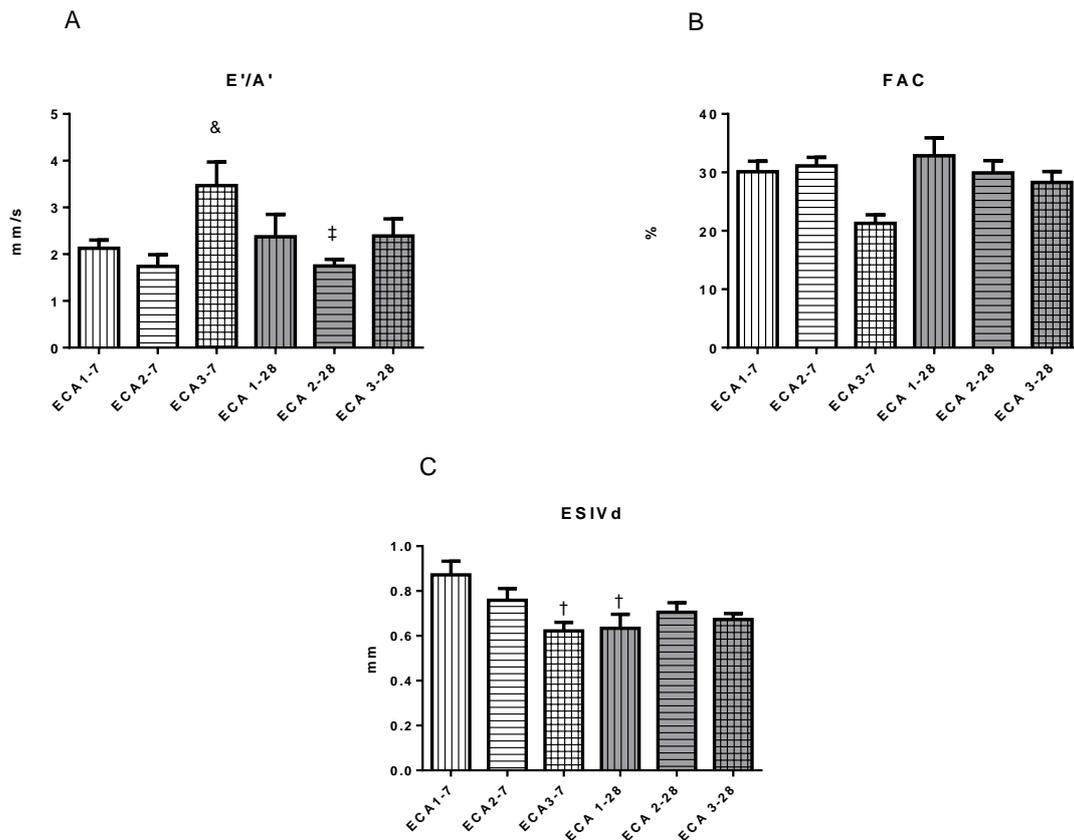


Figura 22 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) E/A; B) FAC; C) ESIVd; E/A: relação da onda E pela onda A; FAC: Mudança de área fracional; ESIVd: espessura do septo intraventricular em diástole. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 8; ECA 1-28: n = 6; ECA 2-28 n = 6; ECA 3-28: n = 10. ‡ p < 0,05 vs. ECA 3-7; & p < 0,05 vs. ECA 2-7; † p < 0,05 vs. ECA 1-7.

A massa do ventrículo esquerdo foi maior nos grupos ECA 1-28 e ECA 2-28 comparados ao grupo ECA 1-7 (ECA 1-28: $0,177 \pm 0,01$; ECA 2-28: $0,174 \pm 0,01$ vs. ECA 1-7: $0,112 \pm 0,005$ g; p = 0,02). Contudo, quando corrigimos a massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal não foram observadas diferenças entre os grupos (ECA 1-7: $94,93 \pm 8,3$; ECA 2-7: $100,7 \pm 6,4$; ECA 3-7: $107,0 \pm 3,4$; ECA 1-28: $135,5 \pm 15,4$; ECA 2-28: $135,1 \pm 10,3$ e ECA 3-28: $121,6 \pm 10,2$ g; p = 0,120) (Figura 23).

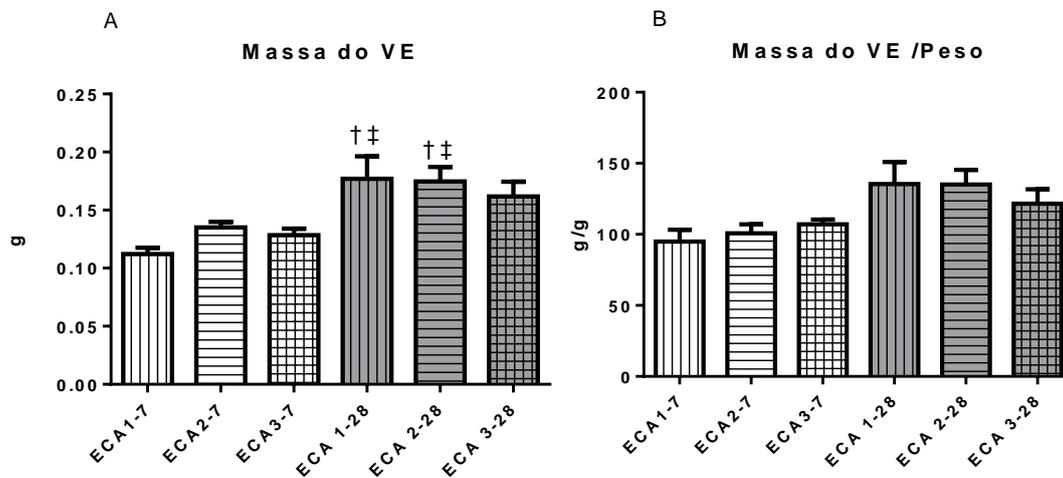


Figura 23 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Paineis: A) Massa do VE; B) Massa do VE/peso; VE: ventrículo esquerdo; VE/peso: ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 8; ECA 1-28: n = 6; ECA 2-28 n = 6; ECA 3-28: n = 10. [†] p < 0,05 vs. ECA 1-7; [‡] p < 0,05 vs. ECA 3-7.

Os demais parâmetros avaliados pela ecocardiografia estão apresentados na tabela 7, sendo que não foram observadas diferenças entre os grupos sete dias e 28 dias após IAM.

Tabela 7 - Dados ecocardiográficos dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio

	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=8)	ECA 1-28 (n=6)	ECA 2-28 (n=6)	ECA 3-28 (n=10)	P
a' (mm/s)	8,90 ± 2,05	7,34 ± 2,40	6,45 ± 0,88	5,63 ± 1,14	7,04 ± 1,21	5,67 ± 1,23	0,740
e' (mm/s)	21,56 ± 1,10	21,22 ± 3,35	17,18 ± 1,70	23,63 ± 2,14	25,32 ± 2,73	22,64 ± 3,32	0,613
E/e'	30,84 ± 3,84	48,59 ± 11,09	38,20 ± 6,70	46,73 ± 11,04	49,33 ± 8,75	41,88 ± 6,56	0,850
TDE (ms)	24,20 ± 5,04	19,38 ± 1,81	19,61 ± 2,95	21,57 ± 2,50	20,24 ± 1,87	20,53 ± 1,24	0,872
TRIV/FC (ms/bpm)	0,088 ± 0,014	0,054 ± 0,006	0,062 ± 0,006	0,056 ± 0,004	0,070 ± 0,005	0,070 ± 0,08	0,064
VVEd (ul)	78,65 ± 8,42	103,7 ± 12,22	110,2 ± 6,50	131,4 ± 12,25	131,5 ± 13,00	132,4 ± 17,44	0,085
VVEs (ul)	45,07 ± 6,48	40,70 ± 4,73	67,80 ± 8,95	82,92 ± 9,53	89,08 ± 11,93	95,27 ± 20,62	0,056
FE (%)	35,06 ± 3,60	35,97 ± 4,18	30,94 ± 3,40	38,73 ± 3,66	34,18 ± 2,53	32,23 ± 6,32	0,820
FS (%)	18,68 ± 2,3	17,25 ± 2,1	16,81 ± 1,6	17,11 ± 1,70	16,52 ± 1,32	14,96 ± 2,15	0,867
PPVEd (mm)	0,78 ± 0,08	0,74 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,78 ± 0,07	0,84 ± 0,07	0,82 ± 0,05	0,668

a': velocidade dopler tecidual da onda a; e': velocidade dopler tecidual da onda e; E/e': relação de onda E e e'; TDE: tempo de desaceleração da onda e'; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; VVEd: volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: volume do ventrículo esquerdo na sístole; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; PPVEd: parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão.

4.3.2 Frequência cardíaca e pressão arterial

Não foi observado influência do número de cópias do gene da ECA ou do infarto na frequência cardíaca (ECA 1-7: $627 \pm 32,13$; ECA 2-7: $668 \pm 12,58$; ECA 3-7: $605 \pm 23,92$; ECA 1-28: $581 \pm 45,41$; ECA 2-28: $614 \pm 31,32$; ECA 3-28: $608 \pm 30,00$ bpm; $p = 0,523$), bem como na pressão arterial sistólica (ECA 1-7: $126,2 \pm 6,52$; ECA 2-7: $124,7 \pm 2,48$; ECA 3-7: $117,3 \pm 5,16$; ECA 1-28: $120,00 \pm 5,00$; ECA 2-28: $128,00 \pm 6,50$; ECA 3-28: $130,00 \pm 4,00$ mmHg; $p = 0,530$), diastólica (ECA 1-7: $93,50 \pm 3,0$; ECA 2-7: $90,57 \pm 2,15$; ECA 3-7: $85,28 \pm 2,46$; ECA 1-28: $80,25 \pm 4,25$; ECA 2-28: $89,80 \pm 3,15$; ECA 3-28: $90,88 \pm 2,50$ mmHg; $p = 0,068$) e média (ECA 1-7: $110,0 \pm 4,36$; ECA 2-7: $108,7 \pm 1,81$; ECA 3-7: $102,1 \pm 4,15$; ECA 1-28: $100,00 \pm 4,84$; ECA 2-28: $109,00 \pm 4,43$; ECA3-28: $110,2 \pm 3,17$ mmHg; $p = 0,318$) (Figura 24).

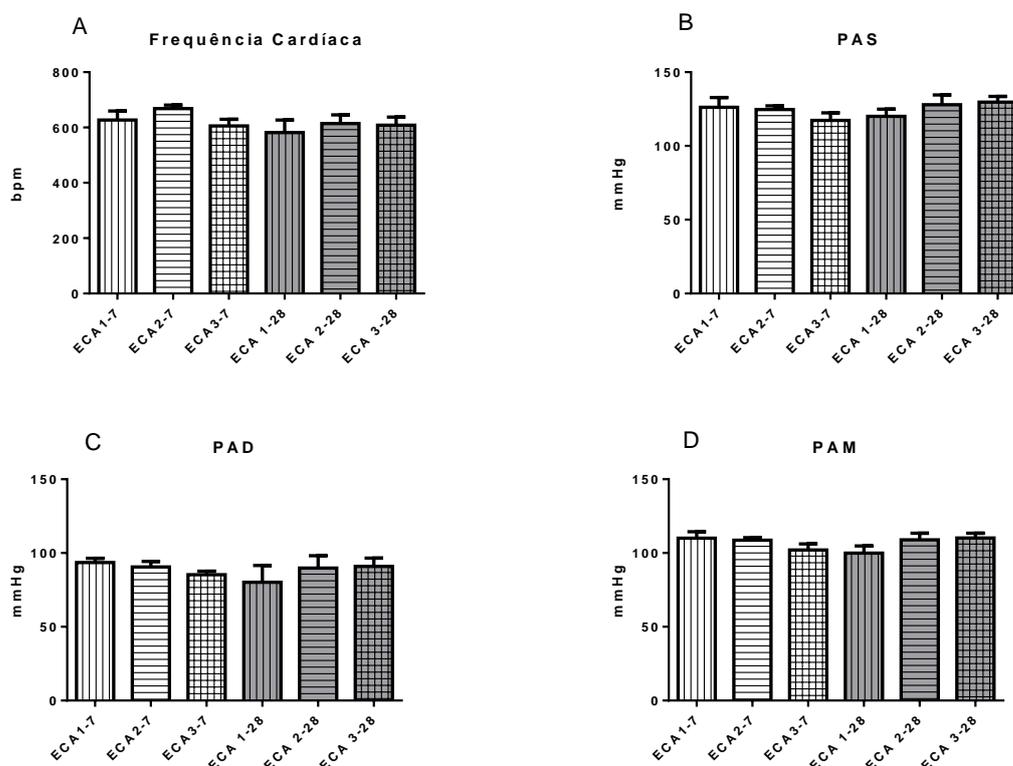


Figura 24 - Parâmetros hemodinâmicos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Paineis: A) Frequência cardíaca; B) PAS; C) PAD; D) PAM. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média.

Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 6; ECA 2-7: n = 6; ECA 3-7: n = 7; ECA 1-28: n= 7; ECA 2-28: n= 7; ECA 3-28: n=8.

4.3.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Avaliamos se o número de cópias do gene da ECA poderia interferir na VFC (no domínio do tempo e no domínio da frequência) em camundongos submetidos à IAM sete e 28 dias após o infarto.

Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo

Como pode ser observado na tabela 8, não foram observadas diferenças entre os grupos nos parâmetros da VFC no domínio do tempo.

Tabela 8 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio

	ECA 1-7	ECA 2-7	ECA 3-7	ECA 1-28	ECA 2-28	ECA 3-28	p
	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=8)	
SDIP (ms)	4,27 ± 0,35	5,58 ± 0,75	5,17 ± 0,43	4,26 ± 1,40	5,73 ± 1,10	4,21 ± 0,56	0,597
VARIP (ms ²)	18,76 ± 10,58	33,73 ± 8,91	28,11 ± 4,40	25,98 ± 17,66	39,00 ± 14,44	19,62 ± 4,96	0,550
RMSSD (ms)	6,00 ± 0,85	5,45 ± 0,55	5,20 ± 0,42	5,60 ± 2,93	5,38 ± 1,18	4,10 ± 0,78	0,913

SDIP: desvio padrão dos intervalos de pulso; VARIP: variância dos intervalos de pulso; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos de pulso consecutivos. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão.

Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência

Os dados da VFC no domínio da frequência são apresentados na tabela 9. Sete dias após infarto do miocárdio, o componente LF em valores absolutos foi maior no grupo ECA 3-7 comparado ao grupo ECA 1-7. Também observamos que o componente LF em valores absolutos era menor nos grupos ECA 1-28 e ECA 3-28 em comparação ao grupo ECA 3-7. Quanto ao LF em valores percentuais, o grupo ECA 3-7 apresentou maior LF que o grupo ECA 1-7.

Quanto ao balanço simpátovagal, observamos que o grupo ECA 3-7 apresentou maior balanço comparado ao grupo ECA 1-7, indicando uma maior predominância simpática nesse grupo. Para os demais parâmetros da VFC no domínio da frequência não houve diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 9 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio

	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=7)	ECA 1-28 (n=7)	ECA 2-28 (n=7)	ECA 3-28 (n=8)	p
VLF abs (ms ²)	3,56 ± 1,43	5,83 ± 2,27	3,83 ± 0,72	1,70 ± 0,96	2,01 ± 0,28	3,77 ± 0,65	0,240
LF abs (ms ²)	5,13 ± 1,88	7,93 ± 2,74	14,85 ± 2,36 †	4,09 ± 1,45 ‡	7,08 ± 1,46	6,04 ± 1,03 ‡	0,003
HF abs (ms ²)	6,97 ± 1,26	7,63 ± 1,95	9,73 ± 1,88	9,54 ± 6,11	5,66 ± 1,25	7,94 ± 1,71	0,882
VLF %	18,87 ± 4,63	19,40 ± 2,08	12,00 ± 0,62	11,60 ± 3,17	13,20 ± 0,96	20,00 ± 1,55	0,055
LF %	28,67 ± 5,50	33,60 ± 4,90	52,57 ± 3,42 †	34,00 ± 8,50	46,00 ± 5,20	34,86 ± 3,83	0,017
HF %	52,43 ± 10,09	46,80 ± 6,40	39,88 ± 4,07	54,80 ± 11,76	40,80 ± 4,84	46,30 ± 5,66	0,640
LF (nu)	37,98 ± 8,70	44,0 ± 5,77	59,5 ± 3,5	39,80 ± 10,66	53,00 ± 5,83	44,57 ± 5,78	0,200
HF (nu)	62,01 ± 8,70	57,40 ± 6,86	44,25 ± 5,00	60,20 ± 10,66	47,00 ± 5,83	55,43 ± 5,78	0,374
LF/HF	0,81 ± 0,25	1,07 ± 0,31	2,22 ± 0,17 †	1,00 ± 0,34	1,47 ± 0,47	1,15 ± 0,30	0,015

VLF abs: banda de muito baixa frequência em valores absolutos; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; HF: banda de alta frequência em valores absolutos; VLF %: banda de muito baixa frequência em valores percentuais; LF %: banda de baixa frequência em valores percentuais; HF%: banda de alta frequência em valores percentuais; LF (nu): banda de baixa frequência em valores normalizados; HF (nu): banda de alta frequência em valores normalizados LF/HF: balanço simpatovagal. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão. † p < 0,05 vs. ECA 1-7; ‡ p < 0,005 vs. ECA 3-7.

4.3.4 Variabilidade da Pressão Arterial

Não foi observado alterações nos índices de variabilidade da pressão arterial sistólica entre os grupos sete e 28 dias após IAM (Tabela 10).

Tabela 10 - Variabilidade da pressão arterial sistólica dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio

	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=7)	ECA 1-28 (n=8)	ECA 2-28 (n=7)	ECA 3-28 (n=9)	p
SDPAS (mmHg)	5,42 ± 0,62	4,70±0,22	5,07±0,61	4,08±0,26	4,10±0,21	5,26±0,64	0,33
VARPAS (mmHg ²)	31,34±6,63	22,01±2,15	28,76±7,00	16,96±2,10	17,06±1,86	29,34±6,66	0,28
LFPAS (mmHg ²)	13,32±3,58	13,17±1,85	14,22±1,70	8,37±3,14	8,00±1,64	9,40±1,33	0,13

SDPAS: desvio padrão da pressão arterial sistólica; VARPAS: variância da pressão arterial sistólica; LFPAS: banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão.

4.3.5 Barorreflexo espontâneo

Quanto ao barorreflexo espontâneo, avaliado pelo método da sequência (Tabela 11), observamos que o grupo ECA 1-28 apresenta maiores valores de eficiência do barorreflexo para as rampas em subida (Up BEI) e do barorreflexo como um todo (All BEI) em comparação com os grupos infartados em sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7).

Tabela 11 - Análise do barorreflexo espontâneo pelo método da sequência dos grupos infartados no período de sete (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio

	ECA 1-7 (n=6)	ECA 2-7 (n=6)	ECA 3-7 (n=7)	ECA 1-28 (n=8)	ECA 2-28 (n=7)	ECA 3-28 (n=9)	P
Rampas <i>Up</i> (n)	380,00 ± 50,70	513,20 ± 41,20	445,00 ± 82,00	392,3 ± 77,30	477,2 ± 45,10	542,6 ± 88,5	0,52
Rampas <i>Down</i> (n)	288,70 ± 32,20	380,00 ± 38,90	286,50 ± 40,78	301,2 ± 54,30	376,7 ± 61,90	392,2 ± 60,0	0,23
Rampas totais (n)	650,80 ± 74,40	894,20 ± 63,58	780,30 ± 140,80	693,5 ± 111,05	853,8 ± 85,30	934,8 ± 138,8	0,53
<i>BRR Up</i> (n)	65,00 ± 13,75	95,83 ± 12,00	70,50 ± 20,00	106,8 ± 13,60	127,3 ± 35,40	111,0 ± 15,80	0,54
<i>BRR Down</i> (n)	60,00 ± 21,00	60,00 ± 6,10	57,58 ± 11,35	80,0 ± 18,70	76,8 ± 27,50	80,8 ± 24,30	1,00
<i>All BRR</i> (n)	85,45 ± 24,88	154,80 ± 13,25	128,10 ± 30,00	186,7 ± 29,05	204,2 ± 61,57	190,8 ± 33,50	0,30
<i>Up BEI</i>	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,34 ± 0,03†&‡	0,19 ± 0,05	0,19 ± 0,03	0,0007
<i>Down BEI</i>	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,47
<i>All BEI</i>	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,28 ± 0,03†&‡	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,025
<i>Up Gain</i> (ms/mmHg)	3,40 ± 0,95	3,03 ± 0,70	2,60 ± 0,43	4,06 ± 1,80	2,30 ± 0,28	1,72 ± 0,30	0,70
<i>Down Gain</i> (ms/mmHg)	4,35 ± 1,10	2,70 ± 0,35	2,65 ± 0,62	2,55 ± 0,65	2,40 ± 0,66	1,68 ± 0,25	0,26
<i>All Gain</i> (ms/mmHg)	3,00 ± 0,50	3,00 ± 0,45	3,00 ± 0,50	3,65 ± 1,40	2,45 ± 0,38	1,90 ± 0,20	1,00

Rampas *Up*: número total de rampas em subida; Rampas *Down*: Número total de rampas em decida; *BRR Up*: Respostas de rampas barorreflexas em subida; *BRR Down*: Respostas de rampas barorreflexas em decida; *All BRR*: Número total de rampas barorreflexas; *Up BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em subida; *Down BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em decida; *All BEI*: Índice total de eficiência barorreflexa; *Up Gain*: Ganho barorreflexo em subida; *Down Gain*: Ganho barorreflexo em decida; *All Gain*: Ganho total. Variáveis numéricas expressas em média ± erro padrão. † p < 0,05 vs. ECA 1-7; & p < 0,05 vs. ECA 2-7; ‡ p < 0,005 vs. ECA 3-7.

4.3.6 *Peso corporal e tecidos*

Não foi observado diferença no peso corporal entre os grupos infartados sete e 28 dias após infarto do miocárdio (ECA 1-7: $29,47 \pm 0,78$; ECA 2-7: $27,57 \pm 1,20$; ECA 3-7: $28,45 \pm 0,88$; ECA 1-28: $30,76 \pm 1,09$; ECA 2-28: $31,40 \pm 1,46$; ECA 3-28: $31,17 \pm 0,924$ g; $p = 0,07$), bem como no peso do coração (ECA 1-7: $0,175 \pm 0,01$; ECA 2-7: $0,178 \pm 0,01$; ECA 3-7: $0,205 \pm 0,01$; ECA 1-28: $0,183 \pm 0,01$; ECA 2-28: $0,193 \pm 0,01$; ECA 3-28: $0,191 \pm 0,01$ g; $p = 0,07$) (Figura 25 A e B). Não houve diferença entre os grupos no peso do TAB (ECA 1-7: $0,311 \pm 0,09$; ECA 2-7: $0,450 \pm 0,08$; ECA 3-7: $0,368 \pm 0,06$; ECA 1-28: $0,571 \pm 0,09$; ECA 2-28: $0,577 \pm 0,06$; ECA 3-28: $0,665 \pm 0,08$ g; $p = 0,125$) (Figura 25 C), bem como no peso dos pulmões (ECA 1-7: $0,186 \pm 0,01$; ECA 2-7: $0,210 \pm 0,01$; ECA 3-7: $0,201 \pm 0,01$; ECA 1-28: $0,256 \pm 0,02$; ECA 2-28: $0,236 \pm 0,02$; ECA 3-28: $0,191 \pm 0,01$ g; $p = 0,09$) (Figura 25 D).

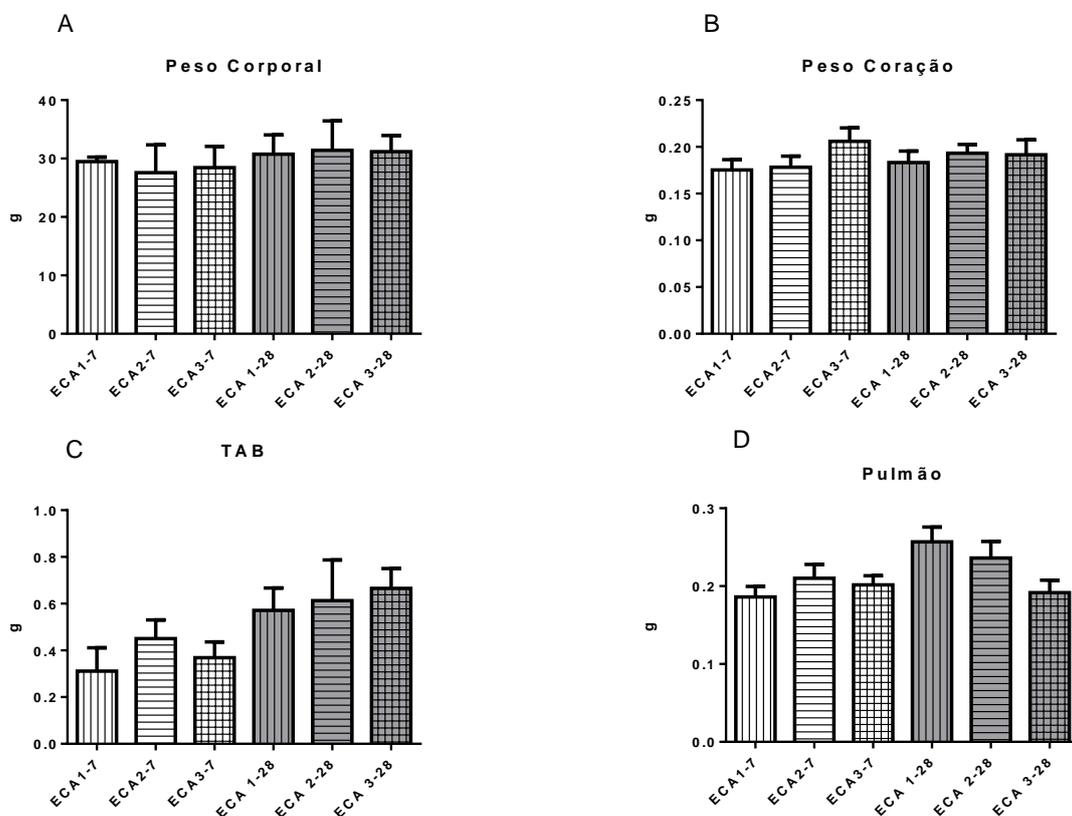


Figura 25 - Peso corporal e de tecidos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Peso Corporal; B) Peso Coração; C) TAB; D) Pulmão. TAB: tecido adiposo branco. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 9; ECA 2-7: n = 7; ECA 3-7: n = 8; ECA 1-28: n= 10; ECA 2-28: n=9; ECA 3-28: n= 9.

Como pode ser observado na figura 26, também não houve diferença entre os grupos para o índice de hipertrofia renal (ECA 1-7: $85,02 \pm 4,05$; ECA 2-7: $92,67 \pm 5,68$; ECA 3-7: $82,68 \pm 2,40$; ECA 1-28: $83,37 \pm 10,73$; ECA 2-28: $80,20 \pm 5,02$; ECA 3-28: $82,37 \pm 2,75$ g; $p = 0,06$), peso do baço (ECA 1-7: $0,136 \pm 0,03$; ECA 2-7: $0,118 \pm 0,01$; ECA 3-7: $0,125 \pm 0,01$; ECA 1-28: $0,133 \pm 0,01$; ECA 2-28: $0,128 \pm 0,02$; ECA 3-28: $0,118 \pm 0,01$ g; $p = 0,370$) e peso do fígado (ECA 1-7: $1,30 \pm 0,130$; ECA 2-7: $1,33 \pm 0,06$; ECA 3-7: $1,46 \pm 0,06$; ECA 1-28: $1,50 \pm 0,07$; ECA 2-28: $1,52 \pm 0,06$; ECA 3-28: $1,52 \pm 0,06$ g; $p = 0,109$).

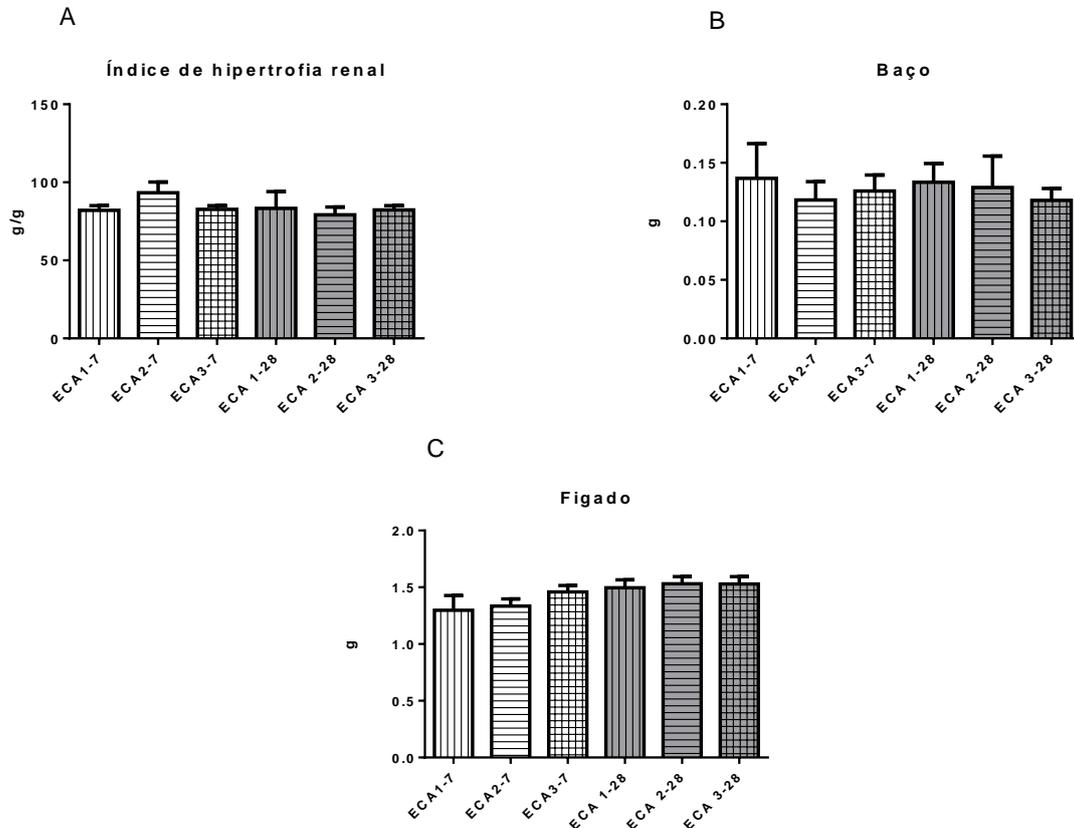


Figura 26 - Peso de tecidos dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Paineis: A) Índice de hipertrofia renal; B) Baço; C) Fígado. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 9; ECA 2-7: n = 7; ECA 3-7: n = 8; ECA 1-28: n = 10; ECA 2-28: n = 9; ECA 3-28: n = 9.

4.3.7 Avaliação histológica

A avaliação da deposição de colágeno por microscopia de luz mostrou que há uma influência do número de cópias do gene da ECA sete dias após o infarto do miocárdio, ocorrendo maior deposição de colágeno no tecido cardíaco do grupo ECA 2-7 comparado ao grupo ECA 1-7 (ECA 2-7: $41,20 \pm 2,87$ vs. ECA 1-7: $23,09 \pm 4,15$ mm²; p = 0,006). Também observamos menor deposição de colágeno no grupo ECA 1-28 comparado ao grupo ECA 2-7 (ECA 1-28: $22,09 \pm 5,41$ vs. ECA 2-7: $41,20 \pm 2,87$ mm²; p = 0,006), como pode ser visto na figura 27 A. Para os demais grupos não houve diferença na deposição de colágeno no tecido cardíaco (ECA 3-7: $35,67 \pm 2,65$; ECA 2-28: $39,88 \pm 6,63$; ECA 3-28: $27,78 \pm 3,50$ mm²).

Em relação a área de infarto, somente o grupo ECA 1-28 apresentou menor área de infarto do que o grupo ECA 3-7 (ECA 1-28: $33,62 \pm 2,40$ vs. ECA 3-7: $48,90 \pm 1,72$; ECA 1-7: $44,61 \pm 4,48$; ECA 2-7: $45,76 \pm 1,70$; ECA 2-28: $41,43 \pm 5,50$; ECA 3-28: $46,14 \pm 4,20$ mm²; p = 0,020) (Figura 27 B).

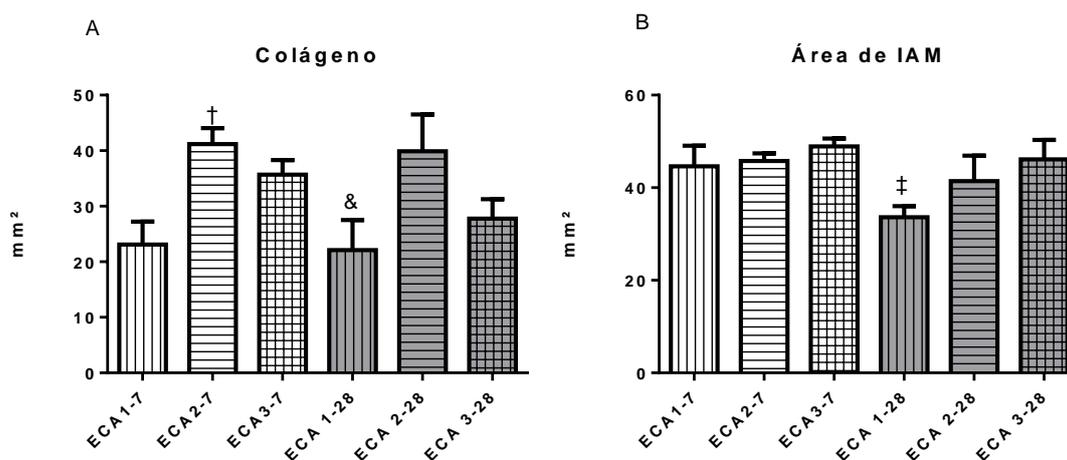


Figura 27 - Dados de histologia do tecido cardíaco dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Colágeno B) Área de IAM. IAM: infarto do miocárdio. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1-7: n = 8; ECA 2-7: n = 7; ECA 3-7: n = 7; ECA 1-28: n = 6; ECA 2-28: n = 7; ECA 3-28: n = 8. † p < 0,05 vs. ECA 1-7; & p < 0,05 vs. ECA 2-7; ‡ p < 0,005 vs. ECA 3-7.

4.3.8 Sumários dos resultados do capítulo 3

A tabela 12 apresenta o sumário dos resultados para os dados que apresentaram diferença significativa no capítulo 3 nos grupos infartados vinte oito dias após o IAM. Na tabela 13 são apresentados o sumário dos resultados dos dados histológicos nos grupos infartados sete e 28 dias após o IAM.

Tabela 12 - Sumário das alterações encontradas nos grupos infartados ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28.

VARIÁVEIS\GRUPOS	ECA 1-28	ECA 2-28	ECA 3-28
Ecocardiografia			
E/A	--	Menor (vs. ECA 3-7)	--
ESIVd (mm)	Menor (vs. ECA 1-7)	--	--
Massa VE (g)	Maior (vs. ECA 1-7)	Maior (vs. ECA 1-7)	--
VFC			
LF abs (ms ²)	Menor (vs. ECA 3-7)	--	Menor (vs. ECA 3-7)
Barorreflexo			
Up BEI	Maior (vs. ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7)	--	--
All BEI	Maior (vs. ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7)	--	--

E/A: relação de onda E e A; ESIVd: espessura do septo intraventricular na diástole; Massa VE: massa do ventrículo esquerdo; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; *Up BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em subida; *All BEI*: Índice total de eficiência barorreflexa;

Tabela 13 - Sumário dos dados histológicos nos grupos infartados ECA 1-7, ECA 2-7, ECA 3-7, ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28.

	ECA 1-7	ECA 2-7	ECA 3-7	ECA 1-28	ECA2-28	ECA 3-28
Colágeno (mm ²)	--	Maior (vs. ECA 1-7)	--	Menor (vs. ECA 2-7)	--	--
Área de IAM (mm ²)	--	--	--	Menor (vs. ECA 3-7)	--	--

IAM: infarto agudo do miocárdio

4.4 Capítulo IV- INTERAÇÕES

Neste último capítulo iremos avaliar, por meio de ANOVA de duas vias, a interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto. Também serão apresentados dados do perfil inflamatório e curva de sobrevivência.

4.4.1 Avaliação ecocardiográfica

A análise dos dados ecocardiográficos por meio de ANOVA de duas vias demonstrou não haver interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto para a onda a', sendo somente o fator infarto considerado significativo ($p < 0,0001$). Nossos dados mostram que a onda a' reduz ao longo do tempo de infarto sendo menor nos grupos ECA 1-7 e ECA 1-28 quando comparado ao grupo ECA 1 sem infarto (ECA 1-7: $8,90 \pm 2,05$ e ECA 1-28: $5,63 \pm 1,14$ vs. ECA 1: $15,20 \pm 0,8$ mm/s). O mesmo padrão de comportamento foi observado para os grupos com duas cópias (ECA 2-7: $7,34 \pm 2,40$ e ECA 2-28: $7,04 \pm 1,21$ vs. ECA 2: $18,04 \pm 1,7$ mm/s) e 3 cópias do gene da ECA (ECA 3-7: $6,45 \pm 0,88$ e ECA 3-28: $5,67 \pm 1,23$ vs. ECA 3: $15,21 \pm 1,2$ mm/s). (Figura 28 - A).

Para a onda e' também não foi encontrada interação significativa entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto e, mais uma vez, somente o infarto foi significativo ($p = 0,043$). Observamos que a onda e' apresentou maiores valores 28 dias após IAM no grupo ECA 2-28 comparado com o grupo ECA 2 (ECA 2-28: $25,32 \pm 2,73$ vs. ECA 2: $17,61 \pm 1,4$ mm/s) (Figura 28 - B). Também não houve interação significativa para a relação E/A entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, contudo, tanto o infarto ($p = 0,001$), quanto o número de cópias do gene da ECA ($p = 0,02$), foram considerados fonte de variação nessa análise. A relação E/A foi maior após 28 dias de infarto no grupo ECA 1-28 em comparação ao grupo ECA 1 sem infarto (ECA 1-28: $2,12 \pm 0,17$ vs. ECA 1: $1,08 \pm 0,14$ mm/s). Ainda, a relação E/A foi maior no grupo ECA 3-7 em comparação ao grupo ECA 3 sem infarto (ECA 3-7: $3,47 \pm 0,50$ vs. ECA 3: $1,80 \pm 0,14$ mm/s) (Figura 28 - C).

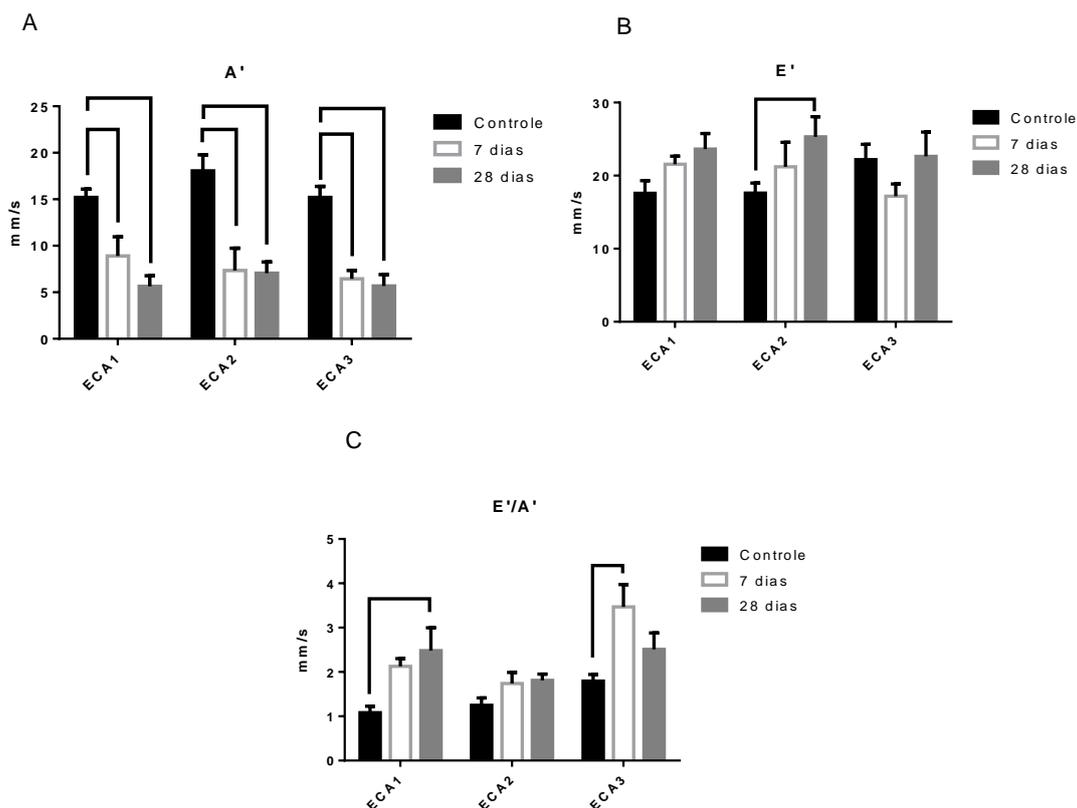


Figura 28 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Paineis: A) Onda A'; B) Onda E'; C) E'/A'. E'/A': relação da onda E pela onda A. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

Mais uma vez não observamos interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto para o tempo de desaceleração da onda E (TDE), sendo somente o infarto considerado fonte de variação ($p = 0,006$). O TDE foi maior ao final de sete dias de infarto no grupo ECA 1-7 em relação ao grupo ECA 1 (ECA 1-7: $24,20 \pm 5,04$ vs. ECA 1: $15,39 \pm 1,1$ ms) (Figura 29 – A).

Houve interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto do miocárdio para o TRIV corrigido pela FC ($p = 0,0071$), e somente o infarto foi considerado como fonte de variação ($p < 0,0001$). Observamos que ocorreu um aumento no TRIV corrigido pela FC em quase todos os grupos após o IAM, sendo maior no

grupo ECA 1-7 comparado com o grupo ECA 1 (ECA 1-7: $0,088 \pm 0,014$ vs. ECA 1: $0,046 \pm 0,005$ ms/bpm), bem como maior no grupo ECA 2-28 em relação ao grupo ECA 2 (ECA 2-28: $0,070 \pm 0,005$ vs. ECA 2: $0,047 \pm 0,002$ ms/bpm) e maior nos grupos ECA 3-7 e ECA 3-28 em relação ao grupo ECA 3 (ECA 3-7: $0,062 \pm 0,006$ e ECA 3-28: $0,070 \pm 0,08$ vs. ECA3: $0,041 \pm 0,003$ ms). Ainda, houve uma diminuição do TRIV corrigido pela FC no grupo ECA 1-28 quando comparado ao grupo ECA 1-7 (ECA 1-28: $0,056 \pm 0,004$ vs. ECA 1-7: $0,088 \pm 0,014$ ms/bpm) (Figura 29 – B).

De forma semelhante, houve interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto para a espessura do septo intraventricular na diástole (ESIVd) ($p = 0,031$), e somente o infarto foi considerado como fonte de variação ($p < 0,0001$). A ESIVd foi menor no grupo ECA 1-28 comparado com os grupos ECA 1 e ECA 1-7 (ECA 1-28: $0,63 \pm 0,03$ vs. ECA 1: $0,84 \pm 0,016$ e ECA 1-7: $0,87 \pm 0,06$ mm), bem como foi menor nos grupos ECA 3-7 e ECA 3-28 em relação ao grupo ECA 3 (ECA 3-7: $0,62 \pm 0,03$ e ECA 3-28: $0,67 \pm 0,02$ vs. ECA 3: $0,85 \pm 0,02$ mm) (Figura 29 - C).

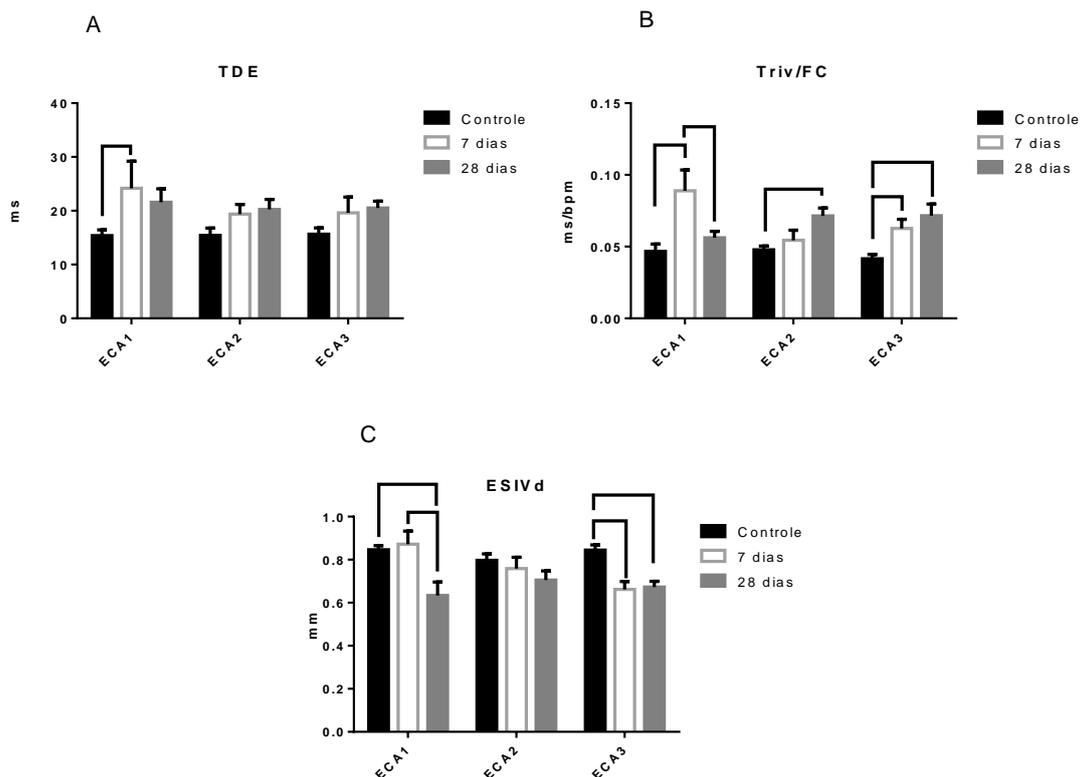


Figura 29 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Paineis: A) TDE; B) TRIV/FC; C) ESIVd. TDE: Tempo de desaceleração da onda E; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico; ESIVd: Espessura do septo intraventricular na diástole. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

Em relação aos índices que representam a função do ventrículo esquerdo, a mudança de área fracional (FAC), apresentou diferença somente para os grupos com três cópias do gene da ECA, sendo os valores menores sete e 28 dias após o infarto em relação ao grupo sem infarto (ECA 3-7: $21,30 \pm 1,47$ e ECA 3-28: $28,27 \pm 1,88$ vs. ECA 3: $40,68 \pm 1,3$ %), sendo que não houve interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, e a fonte de variação foi somente o infarto ($p < 0,0001$) (Figura 30 – A). A FE foi menor no grupo ECA 2-28 quando comparado com o grupo ECA 2 (ECA 2-28: $34,18 \pm 2,53$ vs. ECA 2: $48,63 \pm 1,3$ %), bem como foi menor nos grupos ECA 3-7 e ECA 3-28 em relação ao grupo ECA 3 (ECA 3-7: $30,94 \pm 3,40$ e ECA 3-28: $32,23 \pm$

6,32 vs. ECA 3: $48,11 \pm 2,5$ %), sendo que mais uma vez não observamos interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, e a fonte de variação foi somente o infarto ($p < 0,003$). O mesmo padrão foi observado para a FS, sendo que a FS foi menor no grupo ECA 2-28 em relação ao ECA 2 (ECA 2-28: $16,52 \pm 1,32$ vs. ECA 2: $24,31 \pm 0,7$ %) e nos grupos ECA 3-7 e ECA 3-28 em relação ao ECA 3 (ECA 3-7: $16,81 \pm 1,6$ e ECA 3-28: $14,96 \pm 2,15$ vs. ECA 3: $25,00 \pm 1,2$ %), sendo que novamente não houve interação e a fonte de variação foi o infarto ($p < 0,0001$) (Figura 30 - C).

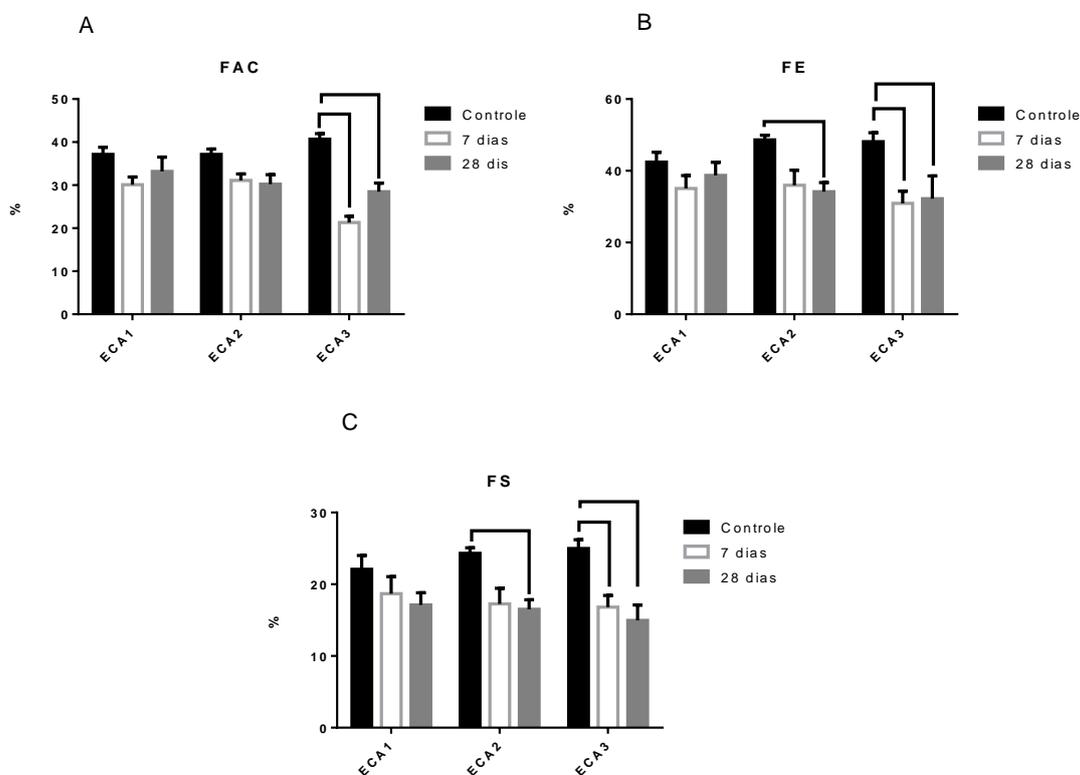


Figura 30 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) FAC; B) FE; C) FS. FAC: Mudança da área fracional; FE: Fração de ejeção; FS: Fração de encurtamento. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

A massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso foi maior nos grupos com uma cópia do gene da ECA 28 dias após o infarto do miocárdio em comparação com o grupo não infartado e com o grupo infartado sete dias após o IAM (ECA 1-28: $135,5 \pm$

15,4 vs. ECA 1-7: $94,93 \pm 8,3$ e ECA 1: $94,74 \pm 6,5$ g) e maior após 28 dias de infarto no grupo com duas cópias do gene da ECA em comparação com o grupo não infartado (ECA 2-28: $135,1 \pm 10,3$ vs. ECA 2: $91,74 \pm 4,4$ g). Não observamos interação entre os grupos para essa análise e a fonte de variação foi somente o infarto ($p < 0,0001$) (Figura 31 – A).

Nos animais com uma cópia do gene da ECA, o VVE na diástole foi maior 28 dias após o infarto em comparação com sete dias após o infarto e com o grupo sem infarto (ECA 1-28: $131,4 \pm 12,25$ vs. ECA 1-7: $78,65 \pm 8,42$ e ECA 1: $70,24 \pm 3,28$ ul). Para os grupos com duas e três cópias do gene da ECA houve diferença no VVE na diástole nos grupos 28 dias após o infarto em comparação com os grupos sem infarto (ECA 2-28: $131,5 \pm 13,00$ vs. ECA 2: $72,04 \pm 9,14$; ECA 3-28: $132,4 \pm 17,44$ vs. ECA 3: $82,00 \pm 4,95$ ul), sendo que mais uma vez não houve interação e somente o infarto foi considerado como fonte de variação ($p < 0,0001$) (Figura 31 – B).

Quanto ao VVE na sístole não observamos interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, sendo que somente o infarto foi considerado como fonte de variação ($p < 0,0001$). O VVE na sístole foi maior no grupo ECA 2-28 quando comparado com os grupos ECA 2-7 e ECA 2 (ECA 2-28: $89,08 \pm 11,93$ vs. ECA 2-7: $40,70 \pm 4,73$ e ECA 2: $39,70 \pm 6,3$ ul), bem como foi maior no grupo ECA 3-28 do que no grupo ECA 3 (ECA 3-28: $95,27 \pm 20,62$ vs. ECA 3: $42,60 \pm 4,5$ ul) (Figura 31 – C).

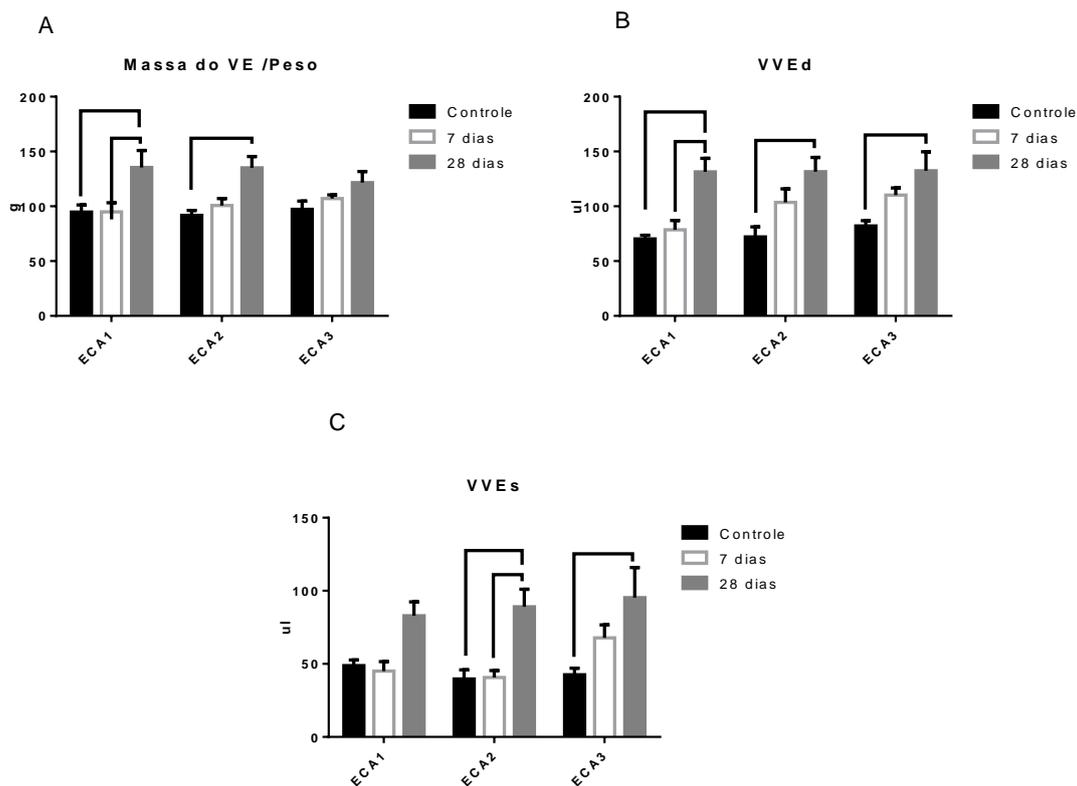


Figura 31 - Dados ecocardiográficos dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) Massa do VE/Peso; B) VVED; C) VVEs. Massa do VE/Peso: Massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso; VVED: Volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: Volume do ventrículo esquerdo na sístole. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

4.4.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os dados de VFC no domínio da frequência mostram que há um aumento na modulação simpática em valores absolutos nos animais com três cópias do gene da ECA sete dias após o infarto em comparação com os animais não infartados e 28 dias após o infarto (ECA 3-7: $14,85 \pm 2,36$ vs. ECA 3: $6,27 \pm 2,54$ e ECA 3-28: $6,04 \pm 1,03$ ms²). Para essa análise não observamos interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, contudo, tanto o infarto quanto o número de cópias do gene da ECA foram considerados fonte de variação (infarto: $p < 0,0301$; gene: $p < 0,0307$) (Figura 32 – A). Quando avaliado a modulação simpática em valores percentuais, observamos que o

grupo ECA 3-7 apresentou maiores valores de LF% quando comparado ao grupo ECA 3-28 (ECA 3-7: $52,57 \pm 3,42$ vs. ECA 3-28: $34,86 \pm 3,83$ %), porém diferente do índice anterior de modulação simpática somente observamos interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto ($p < 0,0389$), (Figura 32 – B).

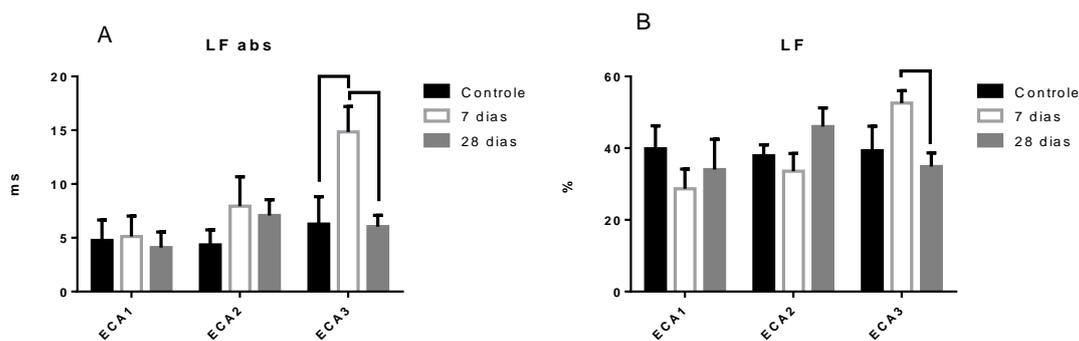


Figura 32 - Dados de variabilidade da frequência cardíaca dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Painel: A) LF abs; B) LF %. LF abs: Componente de baixa frequência em valores absolutos; LF %: Componente de baixa frequência em valores percentuais. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

4.4.3 Barorreflexo espontâneo

Quanto ao número de rampas barorreflexa obtidas pelo método da sequência, observamos que o número de rampas barorreflexas em descida (BRR Down) foi menor no grupo ECA 1-7 em comparação com o grupo ECA 1 (ECA 1-7: $60,00 \pm 21,00$ vs. ECA 1: $161,6 \pm 25,0$), e o que o número de rampas barorreflexas totais (BRR ALL) foi menor no grupo ECA 3 sete dias após o infarto em comparação com o grupo não infartado (ECA 3-7: $128,10 \pm 30,00$ vs. ECA 3: $245,7 \pm 60,0$). Para essas análises não houve interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto e somente o infarto foi considerado como fonte de variação (BRR Down: $p < 0,0001$; BRR All: $p < 0,026$) (Figura 33 – A e B).

O índice de eficiência do barorreflexo em subida (UP BEI) apresentou maiores valores nos animais com uma cópia do gene da ECA 28 dias após o infarto do miocárdio em comparação com os animais infartados sete dias após o infarto e com os animais não infartados (ECA 1-28: $0,34 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,15 \pm 0,02$ e ECA 1: $0,21 \pm 0,03$). Quanto a eficiência do barorreflexo para as rampas em descida (DOWN BEI), observamos maior eficiência no grupo ECA 1-28 do que no grupo ECA 1-7 (ECA 1-28: $0,28 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,13 \pm 0,03$). Tanto para o UP BEI quanto para o DOWN BEI não houve interação entre o número de cópias do gene da ECA e o infarto, e somente o infarto foi responsável pela variação (UP BEI: $p < 0,005$; DOWN BEI: $p < 0,035$). O índice que representa a eficiência total do barorreflexo (ALL BEI), foi maior no grupo ECA 1 após 28 dias de infarto comparado ao grupo ECA 1 após sete dias de infarto (ECA 1-28: $0,28 \pm 0,03$ vs. ECA 1-7: $0,15 \pm 0,02$), sendo mais uma vez somente o infarto a fonte de variação ($p < 0,022$) (Figura 33 – C, D e E).

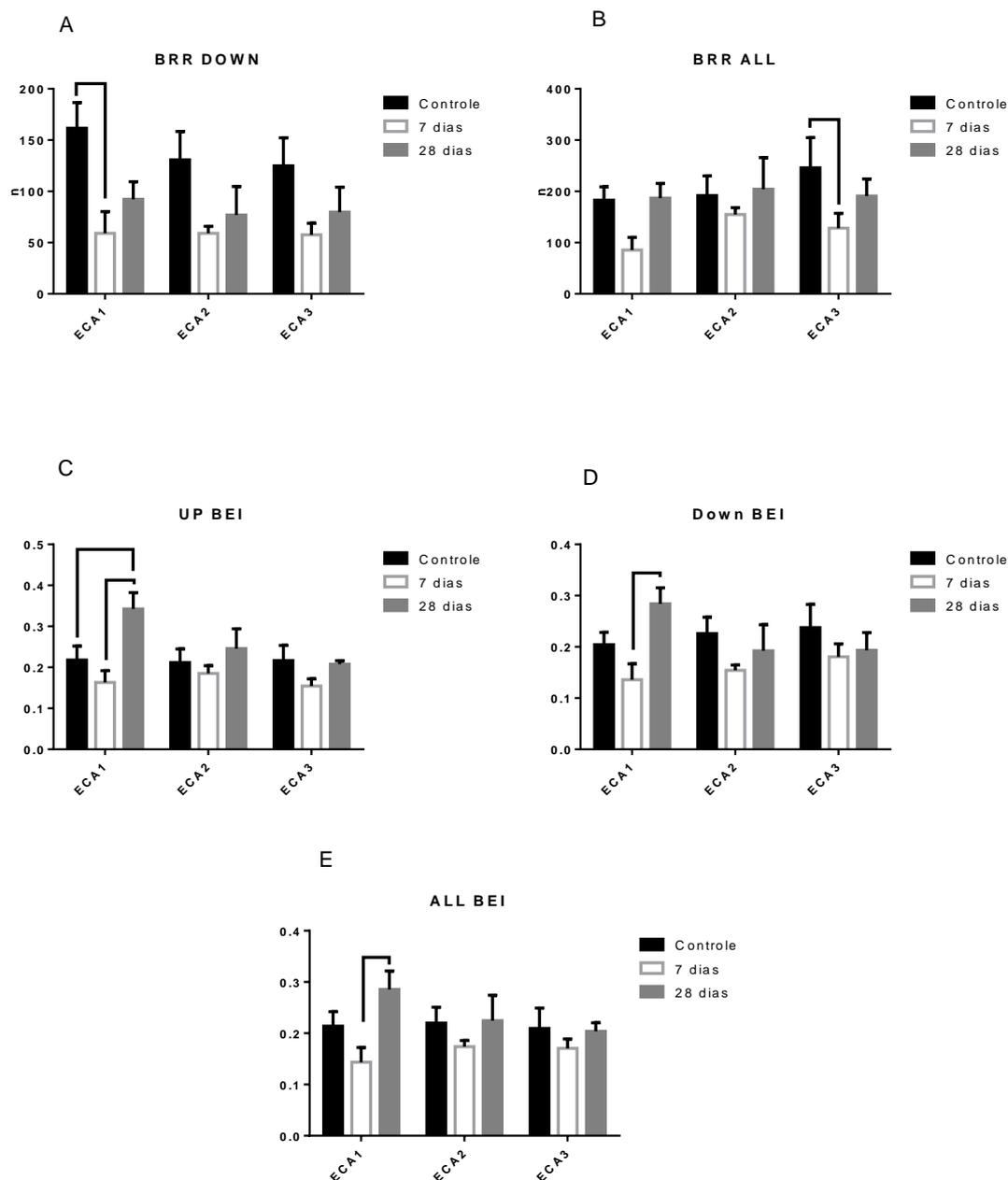


Figura 33 – Dados do barorreflexo espontâneo dos grupos sem infarto (ECA 1, ECA 2 e ECA 3) e dos grupos infartados no período de sete dias (ECA 1-7, ECA 2-7 e ECA 3-7) e 28 dias (ECA 1-28, ECA 2-28 e ECA 3-28) após infarto do miocárdio. Pannel: A) BRR DOWN; B) BRR ALL C) UP BEI; D) DOWN BEI; E) ALL BEI. BRR DOWN: Número de rampas barorreflexas em descida; BRR ALL: Número de rampas barorreflexas totais; UP BEI: Índice de eficiência do barorreflexo em subida; DOWN BEI: Índice de eficiência do barorreflexo em descida; ALL BEI: Índice de eficiência total das rampas barorreflexas. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão.

4.4.4 Análise do perfil inflamatório

Para a análise do perfil inflamatório do tecido cardíaco unimos os grupos infartados sete e 28 dias após o infarto do miocárdio que apresentam expressão normal do gene da ECA (ECA 2(7-28)) com os grupos que apresentam o aumento da expressão (ECA 3(7-28)) com o intuito de compará-los com os animais que apresentam sub expressão do gene da ECA (ECA 1(7-28)).

Os dados mostram que os animais com uma cópia do gene da ECA apresentam maiores valores de IL-10 comparados aos animais com duas e três cópias do gene da ECA ($65,04 \pm 5,90$ vs. $37,06 \pm 6,00$ pg/ml; $p = 0,005$) (Figura 34 – A). Já, os valores de TNF alfa não foram diferentes entre os animais com uma cópia do gene da ECA comparados aos animais com duas e três cópias (ECA 1(7-28): $151,4 \pm 18,52$ vs. ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28): $170 \pm 19,20$ pg/ml; $p = 0,055$) (Figura 34 – B). Para o TGF beta, os valores do grupo ECA 1(7-28) foram menores que os valores do grupo ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28) ($91,44 \pm 11,33$ vs. $122,0 \pm 8,00$ pg/ml; $p = 0,003$) (Figura 34 – C). Quanto aos valores de CXCL1 não houve diferença entre os grupos avaliados (ECA 1(7-28): 2002 ± 386 vs. ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28): $2050 \pm 330,40$ pg/ml; $p = 0,907$), (Figura 34 – D).

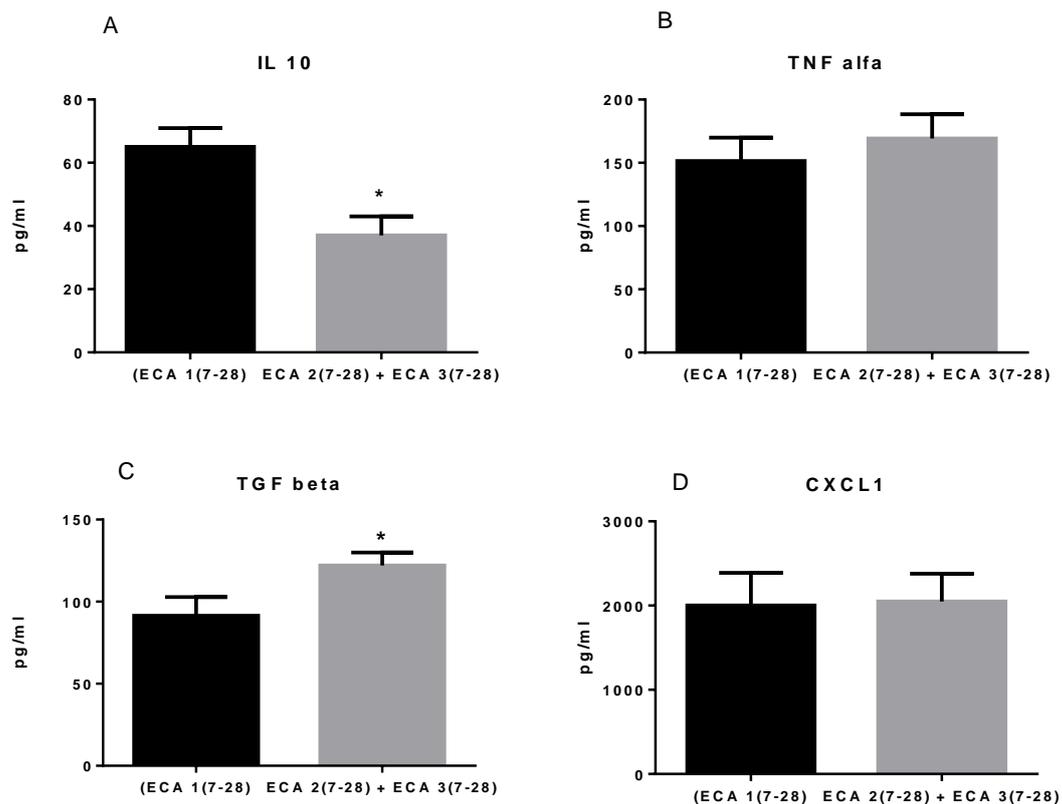


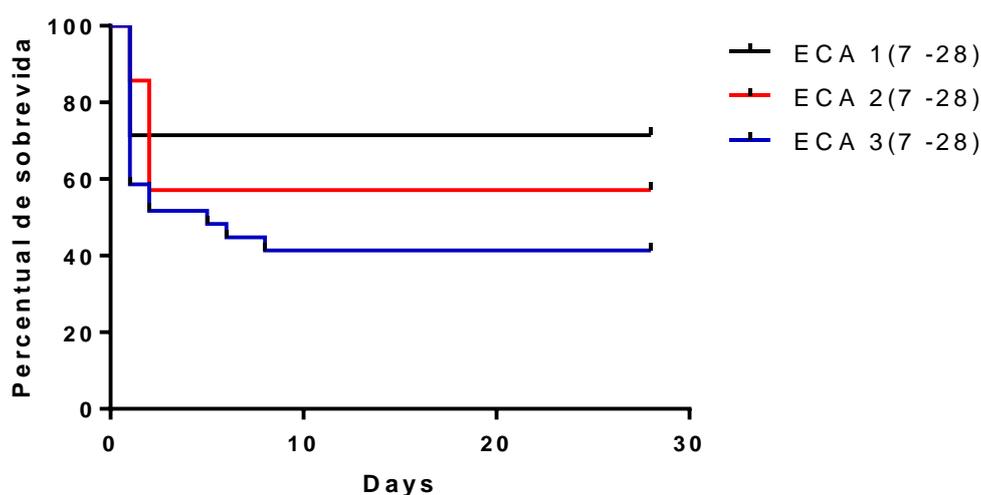
Figura 34 – Dados de perfil inflamatório dos grupos que foram submetidos ao procedimento de infarto do miocárdio (sete e 28 dias após o infarto) com uma (ECA 1(7-28)), duas (ECA 2(7-28)) e três (ECA 3(7-28)) cópias do gene da ECA. Painel: A) IL 10; B) TNF alfa; C) TGF beta; D) CXCL1. IL 10: Interleucina 10; TNF alfa: Fator de necrose tumoral alfa; TGF beta: Fator de crescimento transformador beta. Variáveis numéricas expressas em média \pm erro padrão. ECA 1(7-28): n = 9; ECA 2(7-28): n = 6; ECA 3(7-28): n = 7. * $p < 0,05$ vs. ECA 1(7-28).

4.4.5 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier

A curva de mortalidade de Kaplan-Meier foi calculada utilizando os dados dos grupos que foram submetidos ao infarto do miocárdio. Sendo que foram agrupados os animais no período de sete e 28 dias após o infarto para que obtivéssemos um maior tamanho amostral. Para que o óbito fosse computado na curva de mortalidade, esse deveria ocorrer 24 horas após o procedimento experimental de infarto, não sendo computados os óbitos que ocorreram antes desse período.

Como pode ser observado na figura 35, 28 dias após o infarto do miocárdio, os animais com uma cópia do gene da ECA apresentam percentual de sobrevivência de 71%, os animais com duas cópias apresentam percentual de sobrevivência de 57% e os animais com três cópias 41% de sobrevivência ($p = 0,02$).

Curva de sobrevivência após 28 dias de IAM



Porcentagem de sobrevivência

ECA 1 (7-28)	ECA 2 (7-28)	ECA 3 (7-28)	$p < 0,02$
71%	57%	41%	

Figura 35 – Curva de Kaplan-Meier (sobrevivência) dos grupos que foram submetidos ao procedimento de infarto do miocárdio (sete e 28 dias após o infarto) com uma (ECA 1(7-28)), duas (ECA 2(7-28)) e três (ECA 3(7-28)) cópias do gene da ECA.

4.4.6 Sumários dos resultados do capítulo 4

A tabela 14 apresenta o sumário dos resultados para os dados que apresentaram diferença significativa no capítulo 4. Na tabela 15 são apresentados o sumário dos resultados do perfil inflamatório dos animais infartados (sete e 28 dias após o IAM).

Quanto a curva de sobrevivência, observamos uma maior sobrevivência nos animais infartados com uma cópia do gene da ECA e menor sobrevivência nos animais com três cópias.

Tabela 14 Sumário das alterações encontradas de todos os grupos em análise temporal por número de cópias da ECA

VARIÁVEIS\GRUPOS	ECA 1	ECA 1-7	ECA 1-28	ECA 2	ECA 2-7	ECA 2-28	ECA 3	ECA 3-7	ECA 3-28
Ecocardiografia									
a' (mm/s)	--	Menor (vs. ECA 1)	Menor (vs. ECA 1)	--	Menor (vs. ECA 2)	Menor (vs. ECA 2)	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 3)
e' (mm/s)	--	--	--	--	--	Maior (vs. ECA 2)	--	--	--
E/A	--	--	Maior (vs. ECA 1)	--	--	--	--	Maior (vs. ECA 3)	--
TDE (ms)	--	Maior (vs. ECA 1)	--	--	--	--	--	--	--
TRIV/FC (ms/bpm)	--	Maior (vs. ECA 1)	Menor (vs. ECA 1-7)	--	--	Maior (vs. ECA 2)	--	Maior (vs. ECA 3)	Maior (vs. ECA3)
ESIVd (mm)	--	--	Menor (vs. ECA 1, ECA 1-7)	--	--	--	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 3)
FAC (%)	--	--	--	--	--	--	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 3)
FE (%)	--	--	--	--	--	Menor (vs. ECA 2)	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 3)
FS (%)	--	--	--	--	--	Menor (vs. ECA 2)	--	Menor (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA3)

continua

continuação

Variáveis \ Grupos	ECA 1	ECA 1-7	ECA 1-28	ECA 2	ECA 2-7	ECA 2-28	ECA 3	ECA 3-7	ECA 3-28
Massa VE/Peso (g/g)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 1-7)	--	--	Maior (vs. ECA 2)	--	--	--
VVEd (ul)	--	--	Maior (vs. ECA 1, ECA 1-7)	--	--	Maior (vs. ECA 2)	--	--	Maior (vs. ECA 3)
VVEs (ul)	--	--	--	--	--	Maior (vs. ECA 2 e ECA 2-7)	--	--	Maior (vs. ECA 3)
VFC									
LF abs (ms)	--	--	--	--	--	--	--	Maior (vs. ECA 3)	Menor (vs. ECA 3-7
LF (%)	--	--	--	--	--	--	Maior (vs. ECA 3- 28)	--	--
Barorreflexo									
BRR DOWN (n)	--	Menor (vs. ECA 1)	--	--	--	--	--	--	--

continua

conclusão

Variáveis \ Grupos	ECA 1	ECA 1-7	ECA 1-28	ECA 2	ECA 2-7	ECA 2-28	ECA 3	ECA 3-7	ECA 3-28
BRR ALL (n)	--	--	--	--	--	--	--	Menor (vs. ECA 3)	--
UP BEI	--	--	Maior (vs. ECA1 e ECA 1-7)	--	--	--	--	--	--
DOWN BEI	--	--	Maior (vs. ECA 1-7)	--	--	--	--	--	--
ALL BEI	--	--	Maior (vs. ECA 1-7)	--	--	--	--	--	--

a': velocidade tecidual da onda a; e': velocidade tecidual da onda e; E/A: relação de onda E e A; TDE: tempo de desaceleração da onda e'; TRIV/FC: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela FC; ESIVd: espessura do septo intraventricular na diástole; FAC: mudança da área fracional; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; MVE corr: massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; VVEd: volume do ventrículo esquerdo na diástole; VVEs: volume do ventrículo esquerdo na sístole; ; LF abs: banda de baixa frequência em valores absolutos; LF: banda de baixa frequência em porcentagem; *BRR Down*: Rampas barorreflexas em decida; *All BRR*: Número total de rampas barorreflexas; *Up BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em subida; *Down BEI*: Índice de eficiência barorreflexa para rampas em descida; *All BEI*: Índice total de eficiência barorreflexa;

Tabela 15 - Sumário das alterações no perfil inflamatório dos grupos infartados

	ECA 1(7-28)	ECA 2(7-28) + ECA 3(7-28)
IL 10 (pg/ml)	--	Maior
TGF BETA (pg/mlm)	--	Menor

IL10: Interleucina 10; TGF beta: Fator de transformação do crescimento beta

5.0 DISCUSSÃO

5.1 *Caracterização dos grupos controles*

As variações da enzima conversora de angiotensina desenvolvidas no modelo experimental que usamos neste trabalho foram descritos no trabalho de Kregg⁷³. O modelo foi desenvolvido para simular as possíveis variações da concentração da ECA que os humanos apresentam associadas com o polimorfismos de seu gene e sua possível relação com o risco cardiovascular ocasionado por essas flutuações fisiológicas da ECA. Cabe destacar que, a atividade da ECA no plasma dos animais com duas cópias do gene da ECA é 62 % maior que a dos animais com sub expressão (1 cópia) e 144% maior nos animais com três cópias.

5.1.1 *Ecocardiografia*

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou o modelo de polimorfismo da ECA pelo ecocardiograma em camundongos geneticamente modificados. Os dados de ecocardiografia podem apontar para as adaptações fisiológicas compensatórias sugeridas pelos autores que descreveram o modelo e já mencionadas anteriormente, uma vez que tanto a relação E'/A' quanto a FAC apontam para uma melhor função no modelo com 3 cópias, promovendo uma discreta eficácia neste índice influenciada pelo aumento da ECA. Porém como já esperado, nenhum outro índice foi alterado em virtude das flutuações fisiológicas promovidas. A pesquisadora Marta Rizzo, reconhecendo as possíveis alterações genéticas da ECA verificou se a hipertrofia do ventrículo esquerdo poderia ser influenciada por diferentes concentrações da ECA associadas ao polimorfismo (I/D) em adolescentes que passaram

por seções de treinamento. Em seu estudo não foram observadas diferenças entre os adolescentes do grupo controle, porém as alterações foram observadas entre os indivíduos treinados, tanto na morfologia quanto na função cardíaca pelo ecocardiograma. De forma interessante, o polimorfismo da ECA foi associado ao grau de hipertrofia, mas não com a ocorrência da hipertrofia do ventrículo esquerdo⁸⁶. O estudo de Duque, que avaliou a influência do polimorfismo genético da ECA em dados ecocardiográficos de pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica identificou uma piora da evolução dos pacientes na FE e nos diâmetros da cavidade de VE nos genótipos DD, que representam aumento das concentrações de ECA, seguidos do genótipo DI, sendo o II o de melhor evolução clínica e que representa uma sub expressão das níveis da ECA⁸⁷.

5.1.2 Pressão Arterial e Frequência cardíaca

Ainda de acordo com Krege, não há diferença ocasionada pelos diferentes números de cópias do gene de ECA na pressão arterial. De forma semelhante, não identificamos diferença nas pressões sistólica, diastólica e média em nosso estudo, o que está de acordo com outros trabalhos nos quais houve a modificação dos genes do SRA e não houve alteração perceptível na pressão arterial^{88,89}. No entanto, em outros mamíferos, como nos humanos, é reportada a maior prevalência do alelo D na hipertensão, que corresponde ao aumento do número de cópias da ECA e também dos valores plasmáticos da ECA. Dessa forma, embora o modelo experimental tenha sido criado para responder questões associadas ao desenvolvimento da hipertensão essencial em humanos⁹⁰, as alterações no número de cópias da ECA apresentadas no modelo não levam a alteração da pressão arterial.

A concentração plasmática de angiotensina II é dependente não apenas do estímulo da produção da renina, mas também da ECA. A atividade desta enzima é conhecida por estar sob controle genético como resultado da herança do polimorfismo de inserção/deleção (I/D) dentro do próprio gene. Esse polimorfismo corresponde às flutuações séricas e teciduais da ECA, com indivíduos homozigotos para o alelo D apresentando níveis séricos de ECA duas vezes maiores que indivíduos homozigotos para o alelo I⁹¹.

No modelo experimental, a modificação do número de cópias do gene parece interferir na frequência cardíaca uma vez que os animais que possuem três cópias do gene possuem valores de frequência cardíaca menores que uma ou duas cópias, sendo que há uma redução na frequência cardíaca de aproximadamente 2,3% por número de cópia do gene, que segundo Krege devem-se à adaptações compensatórias fisiológicas e anatômicas. Porém, em nosso estudo não observamos menor frequência cardíaca no grupo ECA 3, como também não foram observadas diferenças em órgãos alvo (pulmão, rim, fígado e coração), que pudessem apoiar as adaptações compensatórias fisiológicas e anatômicas descritas, uma vez que as concentrações de ECA tecidual dos órgãos, a exemplo do pulmão, variam de acordo com o número de cópias da ECA (uma cópia: $60 \pm 7\%$; duas cópias: $100 \pm 8\%$ e três cópias: $138 \pm 16\%$; unidades/miligramas de proteína em porcentagem)⁷³. No estudo de Ceroni⁹², com modelo de indução de hipertensão renovascular nesses animais geneticamente modificados, não foram observadas diferenças na pressão arterial do animais controles com 2 ou 3 cópias do gene da ECA, como também não foram observadas diferenças na frequência cardíaca⁹². As diferenças só apareceram após a ligadura da artéria renal induzindo maior PA nos animais com três cópias.

Em recente trabalho do nosso grupo avaliando os efeitos do diabetes por estreptozotocina no modelo de polimorfismo da ECA, utilizando o mesmo modelo experimental ⁹³ também não foram observadas diferenças significativas na pressão arterial nos animais com maior número de cópias da ECA em comparação ao grupo controle; contudo, os autores que desenvolveram o modelo descrevem que as variações promovidas pelas diferentes variações fisiológicas da ECA são observáveis quando acompanhadas de mudanças em fatores ambientais ou genéticos ⁷³. Além disso, deve ser ressaltado que no trabalho que descreve o modelo, as avaliações hemodinâmicas foram realizadas por pressão caudal diferente da avaliação de medida direta de pressão utilizada por nós, o que poderia explicar diferenças nos valores numéricos observados. De qualquer forma não se observou diferença nos valores de PA ou frequência cardíaca associadas com o número diferente de cópias do gene da ECA.

5.1.3 Variabilidade da frequência cardíaca

É interessante observar que as modificações do número de cópias em nosso modelo experimental não provocaram alterações no componente simpático da VFC. Pois, de forma clássica, alterações no sistema renina angiotensina são acompanhadas de aumento da atividade do sistema nervoso central, mais especificamente maior atividade simpática como ocorre na hipertensão arterial, por exemplo ⁹⁴. Contudo, observamos que o VLF% está elevado como pode ser observado na figura 9, no animal com duas cópias (ECA 2) *versus* uma cópia (ECA 1). Estudos demonstraram que o sistema renina-angiotensina está relacionado com a banda VLF como foi demonstrado por Akserold em 1981 ⁹⁵. Dois mecanismos atuam na banda de VLF: 1) termo regulação (pois alterações lentas do tônus vascular periférico podem ser alteradas por estímulos térmicos em baixas frequências como sugerido por Taylor e colaboradores ⁹⁶; 2) SRA

evidenciado por técnicas de bloqueio farmacológico no qual ficou evidente que a banda de VLF era modulada por bloqueio da ECA. Ainda, o VLF ainda tem sido associado a prognóstico de doenças cardiovasculares⁹⁷ e inflamação crônica⁹⁸.

O aumento do número de cópias do gene da ECA não promoveu alteração da variabilidade da pressão arterial sistólica. A redução da variabilidade da pressão é desejável pois índices elevados tem sido relacionado com lesão de órgão alvo a exemplo da hipertensão e também por predizer futuros eventos cardiovasculares⁹⁹. O aumento como também a redução dos genes da ECA não foram eficazes em promover (em condições basais) alteração na modulação simpática periférica, que é muito importante para manutenção do tônus do vaso, sendo extremamente prejudicial a perda do seu controle a exemplo do que corre com a doença de Chagas resultando em hipotensão¹⁰⁰.

De todos os índices associados ao barorreflexo e que foram avaliados neste trabalho, o único que apresentou alteração foi o Down Gain como demonstrado na tabela 2, o que pode representar um maior controle do barorreflexo durante momentos de queda da pressão. Vale destacar que, como não há alterações no simpático periférico bem como na variabilidade da pressão, é possível que esta pequena diferença seja em virtude das flutuações fisiológicas no grupo ECA 3 (3 cópias) comparado ao ECA 2 (duas cópias) e ECA 1 (uma cópia). O barorreflexo é um mecanismo de controle da pressão arterial momento a momento e, os barorreceptores, estão localizados em regiões sensíveis a alterações na pressão arterial, como o seio carotídeo e o arco aórtico¹⁰¹. Quanto maior a atividade do barorreflexo, maior controle fino da pressão é exercido, a exemplo do trabalho de Silveira e colaboradores que demonstraram a perda do controle da pressão após a desnervação sino aórtica¹⁰².

5.1.4 *Peso Corporal e tecidos*

Não foram observadas diferenças no peso corporal e esses dados estão de acordo com o trabalho que descreve o modelo no qual somente se evidenciou diferença do peso em fêmeas ⁷³. O peso do coração não foi diferente entre os grupos em nosso estudo, contudo, Krege e colaboradores mostraram que o peso do coração corrigido pelo peso corporal é significativamente afetado pelo número de cópias do gene da ECA. Em nosso estudo mostramos o peso úmido absoluto e no trabalho de Krege é apresentado uma relação do peso do órgão pelo peso corporal, o que poderia explicar essa diferença. Krege ainda evidencia o efeito da “dose resposta”, com redução de $-0,26 \pm 0,09$ mg/g por cópia do gene da ECA, representando uma redução de aproximadamente 5% no peso do coração por aumento de unidade do número de genes.

Em nosso estudo, o tecido adiposo branco (TAB) não foi diferente entre os grupos como observado por Heinamm e colaboradores ¹⁰³ que observaram a influência dos genes no desenvolvimento da obesidade em função do aumento dos números de cópias do gene da ECA. Esse estudo, que utilizou os mesmos animais da nossa linhagem, mostra que não há diferença promovida pela variação do número de cópias do gene da ECA, porém quando fornecida alimentação rica em gordura o aumento dos genes promoveu aumento da gordura peri-epididimal ¹⁰³.

Ainda no estudo de Krege que apresenta o modelo, o peso do pulmão foi fortemente afetado pelo sexo, mas não foi significativamente afetado pelo número de genes da ECA ou mesmo pela interação entre genes e sexo ⁷³. Nossos dados também não apresentaram diferença entre os grupos, dessa maneira indo de encontro ao estudo de Krege.

Além do TAB, o índice de hipertrofia renal, não apresentou diferença pela influência do gene da ECA, assim mostrando um equilíbrio a nível da resposta renal

nesses modelos, como também já demonstrado no trabalho de Bertoncetto ¹⁰⁴. Entretanto, quando induzido o diabetes por estreptozotocina (STZ) ocorre aumento do volume urinário acompanhado de aumento da hipertrofia renal nos animais com uma e três cópias da ECA.

5.2 Efeito do IM em período sub agudo (7 dias)

Optamos por avaliar o período subagudo do infarto em sete dias devido às características inflamatórias desta fase e por ser um período crítico para a carga do ventrículo esquerdo, uma vez que o remodelamento do VE é o maior determinante de sobrevivência pós IAM ¹⁰⁵. Esse período do infarto é conhecido como fase proliferativa e dura de 2-7 dias em camundongos ¹⁰⁶. Nesse momento as interferências ambientais que poderiam influenciar nas respostas associadas às modificações genéticas, como sugerido no capítulo anterior, poderiam ser evidenciadas.

5.2.1 Ecocardiografia

A exemplo do que ocorreu no capítulo anterior, o aumento do número de cópias poderia apresentar modificações nas respostas à isquemia cardíaca e aqui de forma mais evidente. Devido ao infarto é esperado nesse momento que ocorra dilatação ventricular com o afinamento na parede da região acometida pelo evento, o que poderia resultar em ruptura ventricular ou mesmo formação de aneurisma ¹⁰⁵. Seria dessa forma que se estabeleceria o comprometimento da bomba cardíaca. O aumento do estresse da parede é um poderoso estímulo para a hipertrofia mediada por mecanorreceptores e traduzida para a sinalização intracelular, em parte pela liberação de Ang II, mas também pela inibição da bradicinina, o que iniciaria o aumento da síntese dos mecanismos contrateis ¹⁰⁷. O estresse de parede também é um dos principais determinantes para o

desempenho cardiovascular ¹⁰⁸. É interessante observar que o aumento do número de cópias promoveu maior comprometimento após o infarto, pois o grupo com três cópias do gene da ECA apresentou com redução da FE% (ECA 3-7 vs. ECA 3 e ECA1), redução da FS% (ECA 3-7 vs. ECA 3 e ECA 1) e menor espessura do septo intraventricular (ECA 3-7 vs. ECA3, ECA1 e ECA1-7) que demonstram prejuízos clássicos promovidos pelo infarto ¹⁰⁹.

Outro dado que apresenta boa correlação com a FE tanto em condições patológicas quanto normais é a FAC ¹¹⁰, que no estudo de Benavides-Vallve ¹⁰⁹ mostrou perda da função cardíaca após sete dias de infarto e permaneceu com redução da função até os seis meses ao final do estudo. Nossos dados de FAC também apontam para essa alteração em sete dias de IAM (Tabela 4). Todos os grupos infartados apresentaram redução na FAC comparados aos grupos controles, no entanto mais uma vez o grupo ECA 3-7 foi o mais prejudicado, com menores valores comparados aos demais grupos infartados, sugerindo novamente que mais cópias da ECA pode induzir prejuízo adicional. Outro dado interessante é a ESIVd, que foi menor no grupo ECA 3-7 (ECA 3-7 vs. ECA 1 e ECA 3) e que não foi diferente no grupo com uma cópia do gene sete dias após o infarto (ECA 1-7) em relação aos grupos não infartados. O aumento da espessura do septo contribui para manter a ejeção do coração após injúria do infarto, e aumento desse índice é importante pois na fase precoce do infarto ela atua para manutenção do mecanismo de Frank-Starling, também aumentando a fração de encurtamento ¹¹¹.

A deposição de colágeno no tecido cardíaco poderia contribuir para essa hipótese de que menor quantidade de ECA possa atuar de forma cardioprotetora. A angiotensina I é convertida pela ECA em angiotensina II, o que é um importante mediador na hipertrofia do miocárdio e também na fibrose. Já foi demonstrado em

estudos com losartana (antagonista dos receptores de angiotensina I), redução na concentração de colágeno e na expressão de colágeno tipo I no ventrículo esquerdo^{112,113}. Em nosso estudo os animais do grupo ECA 1-7 apresentar menor quantidade de colágeno (figura 27). Essa hipótese foi levantada no trabalho de Ocaranza⁶³, onde foi evidenciado que o polimorfismo do gene da ECA em ratos Lewis determina desenvolvimento distinto de fibrose miocárdica. Isso nos faz imaginar que também há um menor processo inflamatórios na sub expressão de ECA como também menor MMP-9 (metaloproteinase 9). No estudo de Messadi¹¹⁴, que avaliou a tolerância à isquemia no polimorfismo da ECA foi evidenciado que há menor processo inflamatório no grupo ECA 2 do que no grupo ECA 3 após oclusão e reperfusão; contudo nesse estudo não foi avaliado o modelo com uma cópia.

O aumento do VVE foi observado em sete dias de infarto sendo maior nos grupos ECA 3-7 (ECA 3-7 vs. ECA 1 e ECA 2), na sístole e (ECA 3-7 vs. ECA 2 e ECA 3) na diástole. No trabalho de Harvey e colaboradores, foram avaliados 605 pacientes que passaram por infarto do miocárdio. Os autores concluem que o volume sistólico final é o primeiro preditor de sobrevivência após infarto do miocárdio sendo superior à fração de ejeção quando a fração de ejeção é menor que 50% ou quando o volume sistólico é maior do que 100 ml, sendo assim o tratamento do infarto deveria ser direcionado para limitação da área de infarto e prevenção da dilatação ventricular¹⁰⁵.

Observando a função diastólica, a fase de enchimento rápido representada pela onde e' não foi afetada pelo número de cópias da ECA no infarto em sete dias, como também ficou evidenciado no trabalho de Benavides-Vallve¹⁰⁹. Porém a fase de contração atrial representada pela onda a' foi afetada pelo infarto (Tabela 4), similar ao que ocorreu no trabalho de Benavides-Vallve, que avaliou por longo período de tempo o infarto do miocárdio em camundongos usando novas estratégias de ecocardiografia e

que mostra que ocorre redução da onda a' no mesmo período avaliado por nós. A relação E/A não foi afetada pelo infarto no trabalho de Benavides-Vallve, porém nós observamos que o aumento do número de cópias da ECA 3-7 promoveu prejuízo para esse parâmetro em comparação aos grupos controles não infartados (ECA 3-7 vs. ECA 1, ECA 2 e ECA 3). A literatura aponta para uma grande possibilidade de prejuízo ocorrendo neste período de tempo do infarto, sendo difícil apontar para um em fator específico que possa *per se* promover essa alteração^{58,115,116}. Foi observado aumento no TRIV corrigido pela frequência cardíaca, após sete dias de infarto no grupo ECA 1 comparado aos grupos controles. Ainda corroborando com os nossos dados não há diferença no tempo de desaceleração da onda e' (TDE) em sete dias de infarto, como foi observado por Benavides-Vallve¹⁰⁹.

5.2.2 *Frequência cardíaca e pressão arterial*

A frequência cardíaca após infarto do miocárdio parece não sofrer alterações a curto e a longo prazo em camundongos, como demonstrado em estudo de Benavides-Vallve¹⁰⁹ avaliando o infarto por um período de até 90 dias. No estudo de Yang Fan, (2002)¹¹⁷, que avaliou o efeito do remodelamento no infarto do miocárdio em camundongos, também não foram observado alterações na frequência cardíaca no período do estudo que durou seis meses, como outros estudos também observaram o mesmo padrão¹¹⁸. No entanto os autores não especulam os motivos pelo qual não há redução da frequência cardíaca ao longo do tempo. Outro estudo do curso temporal da remodelação do VE em camundongos mostra que o volume sistólico final do VE se estabiliza dentro de um mês após infarto do miocárdio seguido de reperfusão^{119,120}. Essa observação sugere que a progressão do remodelamento do VE é proporcional à frequência cardíaca, uma vez que tanto a FC (por volta de 600 bpm) quanto a

progressão do remodelamento do VE (1 mês) são aproximadamente 10 vezes mais rápidas do que encontradas em humanos. Assim é possível que os mecanismos neurohumorais que foram ativados promovam a manutenção da frequência cardíaca especificamente neste modelo ¹²¹. Evidências adicionais apoiam o conceito da relação da frequência cardíaca associada ao remodelamento e são relatadas na literatura clínica, uma vez que o efeito cronotrópico negativo do betabloqueio pode ser um importante mecanismo de contribuições subjacente à eficácia dessa classe de drogas em ensaios clínicos ¹²¹.

A frequência cardíaca em nosso estudo não foi alterada mesmo após o infarto do miocárdio, fato que nos é estranho pois as alterações promovidas nos animais pela isquemia poderiam servir como um gatilho para a manifestação das modificações genéticas impostas, se expressarem. Em humanos é relatada a queda da pressão arterial após infarto do miocárdio em pacientes que passaram por infarto sendo que os valores para a pressão sistólica apresentam queda de 7,9 mmHg e pressão diastólica com valores reduzidos em 3,6 mmHg em média ¹²². Porém essa resposta não é uniforme entre os mamíferos. Em ratos infartados a pressão média aumenta ao longo de 28 dias de infarto ⁶⁹, em estudo de Srikanthe com ratos e IAM a pressão foi menor ao final de protocolo com duração de 90 dias ¹²³ em camundongos que também passaram pela oclusão da coronária a pressão sistólica permaneceu inalterada ao longo de quatro meses ¹¹⁷. Os mecanismos que levam à redução da frequência cardíaca em humanos são descritos no estudo de Framingham, e esta redução em parte se deve ao prejuízo do coração como bomba devido à perda de mecanismos reflexos que elevam a pressão arterial ou até a perda dos mecanismos moduladores ¹²⁴.

5.2.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca

O sistema nervoso autonômico possui um importante papel na homeostase cardiovascular pois as descargas vagais e simpáticas interferem diretamente nos parâmetros cardiovasculares e vasculares, como por exemplo modificando a frequência cardíaca, resistência vascular periférica e pressão arterial ^{69,125,126}. Nosso estudo mostra que a modulação simpática evidenciada pelo LF abs na figura 16, foi influenciada pela concentração da ECA pois estava maior nos grupos ECA3-7 sugerindo que o aumento do número de cópias da ECA promoveu aumento adicional do simpático. Outro dado que nos chama a atenção apesar de não haver diferença estatística é o componente HF% que representa a modulação vagal. Como pode ser observado na figura 17. Ocorreu uma redução progressiva em ECA1-7, ECA2-7 e ECA3-7. Isso demonstra que em paralelo ao aumento do simpático ocorreu a retirada vagal ¹²⁷ e esta resposta pode estar ligada ao número de cópias da ECA. Assim nossos dados mostram que o componente LF é a alça mais afetada pelo infarto, representado pelo LF abs mas também pelo balanço simpatovagal. No entanto isso pode ser dependente do modelo experimental uma vez que Aires mostrou maior comprometimento do ramo vagal em ratos ⁶⁹. Adicionalmente, o balanço autonômico basal é diferente entre ratos e camundongos, como previamente demonstrado por nosso grupo em animais C57 ¹²⁸. A alça simpática não é somente influenciada pelo infarto mas também pelo polimorfismo da ECA com o aumento do número de cópias. De forma estranha não foi observado diferença na frequência cardíaca como já discutido acima, uma vez que seria esperado que a modulação simpática tem efeito cronotrópico positivo sendo geralmente observada na fase aguda da oclusão coronariana e considerado um efeito isolado da ativação simpática ^{129,130}. O aparecimento de taquicardias e arritmias é mais frequente na fase aguda do infarto, e pode depender não somente da ativação do simpático mas da

remoção do controle vagal. Assim a recuperação progressiva da modulação vagal e a consequente redução simpática pode prevenir o desenvolvimento de arritmias e taquicardias ⁶⁹. Nossos dados de VLF % apontam para um aumento após infarto do miocárdio nos grupos ECA 1-7 e ECA 2-7. O índice de VLF possui mais de uma resposta dentro do espectro do sinal, como a regulação neuro humoral da circulação incluindo o SRA e termo regulação ^{131,132}. Outros estudos mostram a redução do VLF como consequência da redução resposta miogênica nas arteríolas ¹³³. A redução da resposta miogênica nos vasos periféricos pode ser compensatória para a redução da carga de trabalho do coração pós infarto ⁶⁹.

Após a publicação de Wolf em 1978 ¹³⁴, mostrando pela primeira vez a relação entre infarto do miocárdio e HRV, vários estudos de grande importância surgiram, com o ATRAMI (Autonomic Tone and Reflex After Myocardial Infarction) ⁷². Nesse estudo foram avaliados 1248 pacientes com infarto do miocárdio, e foi investigado os dois mais populares índices autonômicos o SDNN e a sensibilidade barorreflexa (que será discutida mais adiante).

No estudo ATRAMI foram avaliados estes índices como preditores de mortalidade cardiovascular durante o percurso de um ano. O SDNN quando menor que 70 ms se mostrou uma fator independente e potente preditor de mortalidade cardiovascular (risco relativo de 3,2). Os dados de SDNN são derivados da frequência cardíaca e usam o intervalo r-r por isso chama-se de “normal to normal interval”. Os dados de FC utilizados por nós são procedentes da onda de pressão por isso falamos em intervalo de pulso, porém isso não configura prejuízo para a análise. Nossos dados não apresentam alteração após infarto mesmo nos grupos com três cópias da ECA. Resultado que também foi encontrado com Steeds ⁶⁶, avaliando pacientes que passaram por infarto do miocárdio e foram subdivididos de acordo com os diferentes

polimorfismos do gene da ECA e avaliados tanto pelo SDNN como pelo RMSSD. Steeds comenta que o polimorfismo da ECA em humanos não exerce maior influência seja nos parâmetros de HRV após infarto ou de HRV após tratamento com IECA. Para Steeds os dados refletem relativa falta de importância do polimorfismo I/D e da atividade da ECA em determinar concentrações plasmáticas e teciduais de angiotensina II após o estímulo do SRA frente ao infarto.

5.2.4 Variabilidade da Pressão Arterial

Os dados de variabilidade da pressão não sofreram alteração ao em virtude do infarto ou do número de cópias da ECA. De fato, nossos dados conferem com os de Grans e colaboradores que também não observaram alterações na variabilidade da pressão após infarto, bem como na variância da pressão ¹³⁵.

5.2.5 Barorreflexo espontâneo

Como já mencionado anteriormente o barorreflexo tem grande importância clínica uma vez que alterações no barorreflexo contribuem para o desenvolvimento e progressão de muitos distúrbios cardiovasculares ¹³⁶. Em nosso estudo não observamos alterações no barorreflexo espontâneo avaliado pelo método da sequência. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos como o de Ylitalo e colaboradores que foi o primeiro estudo a investigar as variações do polimorfismo em função do controle da pressão arterial por meio do barorreflexo ¹³⁷. Ou ainda pelo estudo de Steeds ⁶⁶, que não observou alterações no barorreflexo no polimorfismo de pacientes infartados. A ausência de resposta em nossos dados provavelmente se encontra na mesma explicação que ocorre em humanos. O aumento da ECA em associação ao polimorfismo da ECA (D) em humanos e ECA3 em nosso estudo resulta em aumento de angiotensina II ¹³⁸ e

redução de bradicinina ¹³⁹. Estudos com humanos e animais mostram que a Ang II facilita a atividade simpática e inibe a atividade vagal. A redução da bradicinina seria responsável pela redução da sensibilidade barorreflexa ¹⁴⁰ e atividade vagal ¹⁴¹.

5.2.6 *Peso corporal e tecidos*

Após sete dias de infarto não foram observadas alterações no peso corporal. De fato nossos dados correspondem aos do estudo de Lutgens e colaboradores, ¹⁴², que não encontraram diferença no peso corporal de camundongos infartados após cinco semanas de protocolo. Os dados de Lutgens mostram uma pequena redução no peso após a primeira semana de protocolo porém não são estatisticamente significativos ¹⁴², estes resultados também estão de acordo com o trabalho de Yang ¹¹⁷.

Ainda no estudo de Lutgens, o peso do coração corrigido pelo peso corporal não foi diferente ao final do protocolo em relação ao grupo controle mesmo sob influência do infarto do miocárdio ¹⁴². De forma diferente Yang ¹¹⁷, mostra que o coração sofre influência no peso mesmo na primeira semana de infarto, além disso esse aumento no peso é em virtude do peso do VE. Outro trabalho com alterações genéticas na ECA que mostra aumento do peso do coração é o estudo de Ceroni ⁹². No trabalho que mimetiza a hipertensão renovascular por clipagem renal os animais que possuem três cópias do gene da ECA possuem maior peso do coração em comparação ao grupo controle, mas após o clipe o peso do coração aumenta tanto nos animais com duas cópias como com três cópias. O peso do coração em nosso estudo assim como no estudo de Ceroni, mostra a influência prejudicial do aumento do gene da ECA em modelos experimentais.

O tecido adiposo contém um SRA totalmente funcional e a angiotensina II parece desempenhar um papel no crescimento e diferenciação de adipócitos ¹⁴³. A

ativação do SRA tem sido envolvida com a homeostasis da gordura corporal, e em nosso trabalho ela foi claramente afetada ^{144,145}.

O pulmão não apresentou aumento de peso o que poderia representar edema após o infarto, porém no trabalho de Yang também não ocorreu aumento de peso; contudo, segundo o autor, existe uma tendência no aumento de peso até seis semanas quando se encerrou o protocolo ¹¹⁷.

A redução da filtração glomerular é uma disfunção renal que após o infarto do miocárdio pode apresentar piores desfechos clínicos como já bem descrito por Naghesh ¹⁴⁶. Em nosso trabalho avaliamos a alteração renal apenas pelo índice de hipertrofia, porém não observamos diferença nesse parâmetro.

5.3 Efeito do IAM em 28 dias

Nesse período mais tardio do infarto do miocárdio o remodelamento é representado por hipertrofia de miócitos e alterações na arquitetura ventricular para distribuir as tensões de parede aumentadas de maneira mais uniforme, à medida que a matriz extracelular forma uma cicatriz de colágeno para estabilizar as forças de distensão e evitar mais deformação.

5.3.1 Ecocardiograma

Após 28 dias de infarto os dados ecocardiográficos mostram que a relação E/A foi prejudicada no grupo ECA 2-28 comparada ao grupo ECA3-7. A FAC ao final do protocolo não apresentou diferença, o que provavelmente representa ausência de disfunção diastólica causada pelo remodelamento do ventrículo esquerdo. No estudo de Benavides-Vallve ¹⁰⁹, a evolução da FAC avaliada pelo de infarto mostra que a disfunção diastólica que pode ser visível em sete dias de infarto é diretamente ligada a

progressão da dilatação do ventrículo esquerdo e com o aumento do volume sistólico e diastólico final. Os volumes sistólicos e diastólicos ao final do protocolo mostram aumento do diâmetro da cavidade, no entanto não foram diferentes. Ainda segundo Benavides-Vallve essas modificações podem não ser tão evidentes sendo necessário a avaliação do TRIV para melhor diagnóstico¹⁰⁹. Em nosso estudo o TRIV corrigido pela frequência cardíaca não foi diferente entre sete dias de infarto e 28 dias de infarto, sendo em nosso protocolo somente observada disfunção diastólica pelo infarto do miocárdio no grupo ECA 2-28 se somente considerado a relação E/A. Outro dado relevante é a maior espessura de septo no grupo ECA 1-28 e maior massa do ventrículo esquerdo também no grupo ECA 1-28 como no grupo ECA 2-28. A espessura de septo pode ter sido responsável para manter a função cardíaca uma vez que a FE e FS não apresentaram alteração ao final do protocolo, como observado no estudo de Chen¹⁴⁷ com ratos infartados tratados com tetratiroxina.

5.3.2 Frequência cardíaca e pressão arterial

Ao final do protocolo as pressões sistólica, diastólica e média não foram diferentes bem como a frequência cardíaca comparado ao grupo sete dias de infarto. Ao final do estudo, nossos dados são compatíveis com os dados de outras pesquisas^{109,148,149}. Dessa forma é possível que neste modelo experimental a compensação do prejuízo do miocárdio esteja ocorrendo por algum dos mecanismos que contribuem para o remodelamento do ventrículo esquerdo (expansão precoce do infarto; extensão subsequente do infarto do miocárdio não infartado de região adjacente e hipertrofia tardia na região remota do ventrículo esquerdo)⁷⁷.

5.3.3 *Variabilidade da Frequência Cardíaca*

Gehrmann estudou a eletrofisiologia de camundongos FVB em um período de 14 dias pós IAM, nos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca. Os parâmetros no domínio do tempo da variabilidade não foram alterados em virtude do infarto como RMSSD, SDNN e intervalo RR. Ao final do protocolo tudo indica que o infarto pode ser um agravo de tamanho porte a ponto de ocultar modificações discretas nesses parâmetros de variabilidade ou ainda como sugerido por Steeds⁶⁶ no capítulo anterior, ocultar alterações mais sutis associadas às modificações fisiológicas induzidas geneticamente em nosso modelo¹⁴⁹.

Nesse momento não observamos mais diferenças entre os grupos para o VLF em sete dias comparado a 28 dias de infarto em comparação ao capítulo anterior (controle vs. sete dias de infarto). Isso pode ser um indicativo das alterações neurohumorais, principalmente ativação do SRA, que atuam em um período mais precoce do infarto e que poderiam estar sendo atenuadas¹³¹. Outro dado que merece atenção é o LF abs (tabela 9) indicativo da modulação simpática, que apresenta redução ao final de 28 dias (ECA 3-28 e ECA 1-28 vs. ECA 1-7). No entanto a recuperação vagal não foi observada mesmo que os valores dos índices que representam este parâmetro (HF%, HF nu) estarem maiores ao final do protocolo. Outro trabalho que avaliou a variabilidade mostra que ocorre aumento de todos os índices de variabilidade da frequência cardíaca em um período de três a cinco dias após infarto, porém nestes estudos não foram evidenciadas diferenças na modulação vagal bem como simpática¹⁴⁹.

5.3.4 *Variabilidade da Pressão Arterial e Barorreflexo*

A análise espectral da pressão não revelou diferenças na modulação simpática periférica avaliado pela modulação simpática (LF PAS) como também alterações na

variabilidade da pressão, em todos os seis grupos infartados. O baixo poder discriminativo da análise espectral também foi confirmado pela ausência de mudanças na sensibilidade barorreflexa em quase todos os parâmetros estimada por análise espectral. Contudo o grupo ECA 1-28 demonstra ter maior ativação barorreflexa no aumento da pressão com maior ativação do barorreflexo quando avaliado o número total de rampas. Já foi demonstrado que o barorreflexo possui papel importante não somente no controle da pressão arterial, mas também na angiogênese após isquemia em modelos experimentais ¹⁵⁰. No entanto outros índices não foram eficientes em identificar modificações barorreflexas. Segundo Tobaldini ¹⁵¹, a análise do barorreflexo espontâneo pela análise espectral, pode hipotetizar perda de poder discriminativo dos parâmetros espectrais na variabilidade da pressão, o método de avaliação da variabilidade por análise espectral pode não ter sensibilidade suficiente em modelos em que pode haver instabilidade das respostas autonômicas frente a mudanças homeostáticas de grande porte ¹⁵¹.

5.3.5 Peso corporal e tecidos

O peso dos tecidos parece não ser afetado ao final do protocolo pelo infarto do miocárdio como também pelo número de cópias da ECA. O crescimento dos animais não foi alterado quando avaliado pelo peso em outros estudos ¹¹⁷. Em nosso estudo o peso do coração parece não sofrer alterações após a fase de sete dias e que representa o período inflamatório e de infiltração celular. Diferente de outros estudos que avaliaram o peso úmido dos ventrículos no qual foi observado diferença no ventrículo esquerdo em 30 dia de protocolo como também quando o peso do coração foi corrigido pelo peso corporal também em 30 dias ¹⁵². No trabalho de Ocaranza ⁶³ que avaliou ratos no polimorfismo da ECA associado ao isoproterenol forma identificadas alterações no peso

do coração tanto nos modelos com sub expressão da ECA quanto no modelo com maior número de cópias ⁶³. Os pulmões que possuem atividade da ECA similar a atividade da ECA plasmática ⁷³ não sofreram alterações ao final do protocolo como já demonstrado em outros trabalhos ¹¹⁷.

5.4 Interações

5.4.1 Deposição de colágeno, área de infarto e perfil inflamatório

A avaliação histológica do coração mostrou que os animais que possuíam uma cópia do gene da ECA apresentavam menores quantidades de colágeno em 28 dias. Resultados semelhantes foram observados por Ocaranza ⁶³, que avaliou a fibrose mediada pelo isoproterenol em ratos. Os animais utilizados nesse estudo, a exemplo dos nossos, também possuíam alterações genéticas para expressar diferentes concentrações plasmática da ECA. As alterações observadas na quantidade total de colágeno sofrem influência em virtude do aumento do número de cópias ⁶³. Ocaranza mostra que a sub expressão da ECA induziu menores quantidades de colágeno que o grupo com duas cópias, mas o grupo com três genes da ECA também apresentou maiores quantidades de colágeno, inclusive maior do que todos os grupos.

A deposição de colágeno é resultado de síntese e degradação de ambos os colágenos (I e III), e seus fragmentos parcialmente degradados são substratos para as metaloproteinases (MMPs) ¹⁵³. O aumento observado no acúmulo de colágeno sugere maior concentração dessas fibras em determinadas áreas em quanto a degradação ocorre em locais posteriores a lesão ¹⁵⁴. Assim existe uma resposta heterogênea para o acúmulo de colágeno sendo tempo-dependente para o reparo da lesão, evidenciado também pelas MMP-2 e MMP9 ^{155,156}. Apesar das alterações terem sido mais pronunciadas em ratos

com três cópias da ECA esse resultado não foi associado com alterações no mRNA da ECA no VE, receptor de AT1 no VE ou ainda níveis de AII no VE ⁶³.

Já foi demonstrado em camundongos que a deposição de colágenos permanece proeminente aumentando até o completo substituição por tecido fibroso, segundo ¹¹⁷. A formação de tecido cicatricial ocorre por volta de três semanas após IAM. Em nosso protocolo não podemos demonstrar o pico de deposição de colágeno como observado por Fang, pois ocorre por volta de quatro meses em camundongos ¹¹⁷. O tamanho da área de infarto tende a diminuir ao longo do tempo em humanos ^{117,157} e modelos experimentais ¹⁵⁸ atingindo o seu menor tamanho aos seis meses em camundongos ¹¹⁷. Isso ocorre devido a hipertrofia da região não infartada ¹¹⁷. A área observada por nós somente foi menor no grupo ECA 1-28, sendo assim é possível que a resposta inflamatória observada durante a fase de proliferação (1 – 4 dias) em camundongos esteja atenuada ¹⁵⁹ em virtude de menor potencial de resposta dos receptores AT1 sob influência das alterações das alterações da ECA no modelo ¹⁶⁰.

Em nosso estudo as mortes pós infarto do miocárdio se concentraram em um período de até sete dias. Assim também como no estudo de Yang e colaboradores ¹¹⁷. Os autores descrevem rupturas cardíacas ocorrendo por volta de 3-4 dias após infarto do miocárdio, período que coincide com o pico mais alto de neutrófilos, fato que também ocorre em humanos ¹⁶¹. De fato, foram identificados animais que possuíam ruptura cardíaca em nosso estudo. Nesse período os macrófagos que tem forte função fagocitária promovem a limpeza da região necrosada e produzem citocinas (TGF beta, FGF-beta), estimulando a neovascularização e proliferação de fibroblastos ¹⁶². Assim pode se estabelecer um ponto inicial de coparticipação entre inflamação e reparo do miocárdio. As células inflamatórias em C57JB no infarto do miocárdio surgem após dois dias de IAM até atingirem 14 dias, então gradualmente reduzem sugerindo a

transformação da inflamação aguda para crônica como também início da transição entre inflamação e reparo do dano ¹⁶². Os nossos dados apontam para resultados muito parecidos com os avaliados na clínica onde é consenso geral que os IECA e inibidores dos receptores da ANG II possuem papel anti fibrótico na formação do colágeno ¹⁶³, sugerindo que a extensão da fibrose no infarto em pacientes não tratados pode ser maior sendo que uma região menor com tecido mais compacto seria o desejável ⁷⁷.

Em relação a Ang II dois receptores (e outros sub-tipos) são reconhecidos, AT1 e AT2 além do receptor Mas da ANG1-7 caracterizados no miocárdio e em outros tecidos ^{164,165}.

A angiotensina II exerce seus efeitos pressóricos principalmente via AT1, além disso este receptor é também conhecido por mediar o crescimento celular, proliferação, migração e estresse oxidativo, enfim, todos os processos que contribuem para a remodelação do coração e da vasculatura, levando ao desenvolvimento e progressão de várias doenças cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca e aterosclerose ^{165,166}. Sendo assim os antagonistas ou bloqueadores da AT1, bloqueando os efeitos da Ang II foram propostos para terapia após o IAM, de forma combinada ou isolada com IECA, que diminuem a formação da Ang II via ECA ^{164,167}.

O conceito de que o receptor AT2 se torna funcional após infarto do miocárdio foi primeiramente demonstrado durante trabalho de isquemia e reperfusão em corações isolados de ratos além disso atuaria se opondo aos efeitos promovidos pelo AT1 ¹⁶⁰. E por fim temos o papel do receptor, Mas, mediado via ação da ECA 2 ¹⁶⁸. O papel da angiotensina 1-7 como também do receptor MAS no remodelamento cardíaco reflete em significativa cardioproteção. Este eixo tem sido relatado por suprimir apoptose, fibrose e hipertrofia em corações infartados e melhorar o remodelamento cardíaco ¹⁶⁹.

O perfil inflamatório encontrado em nosso modelo experimental corrobora com os estudos de infarto do miocárdio em modelos experimentais ^{170,171}. Mais uma vez nossos dados apontam para uma redução da cascata inflamatória como também menor presença da cascata do SRA, evidenciado por maior IL10 nos grupos ECA 1, como também menor TGF beta também no grupo ECA 1. O TGF beta é descrito por influenciar cada um dos componentes do processo de remodelamento como fibrose do miocárdio ¹⁷², apoptose ¹⁷³, e hipertrofia cardíaca e redução da fração de ejeção em pacientes infartados ¹⁷⁴. A citocina IL 10 é reconhecida por ser um forte desativador de monócitos e supressor de mediadores pró inflamatórios ^{175,176}, e não somente isso, a IL 10 recebe sinais da via do SRA para a sua desativação ¹⁷⁷.

5.4.2 Avaliação ecocardiográfica

A análise ecocardiográfica (figura 28-A), apresenta a disfunção diastólica evidenciada pela redução acentuada da onda A' em todos os grupos do estudo após IAM ¹⁷⁸. Contudo a relação E'/A', que também representa disfunção diastólica ¹⁷⁹ somente foi alterada nos grupo com menos ou mais cópias do gene da ECA. O tempo de relaxamento isovolumétrico também foi afetado de forma negativa nos grupos ECA 1 e ECA 3. Outro resultado que chama a atenção é a espessura do septo, mais uma vez é possível observar que a redução ou aumento do número de cópias não se mostrou favorável uma vez que o grupo ECA 2 não apresentou alteração ao final de 28 dias de infarto.

Os mecanismos de ativação do sistema renina angiotensina discutidos no capítulo anterior ^{90,180} parecem estar muito presentes quando se avalia a função cardíaca pelo ecocardiograma ⁶⁹. É interessante observar que a redução da FAC, FE e FS nos grupos ECA 2 e ECA 3 avaliados em função do tempo (sete ou 28 dias de IAM) é

acompanhada com pouco prejuízo no grupo ECA 1. Ao que tudo indica a redução da inflamação com já evidenciado, promove menor síntese de colágeno assim reduzindo os prejuízos ao final do protocolo ⁶³. Os índices de função somados a espessura de septo são resultados esperados no infarto do miocárdio e que não foram observados nos capítulos anteriores.

5.4.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca e barorreflexo espontâneo

O aumento da modulação simpática se torna evidente em função do aumento do número de cópias sendo esse outro fator que corrobora com os nossos dados apresentados anteriormente, no qual a cascata do SRA indica estar mais presente nos animais com três cópias, pois é observado aumento da modulação simpática ^{181,182}, diretamente ligado a presença de Ang II ¹¹⁸, com consequente redução do barorreflexo ^{137,183}. O inverso pode ser observado no grupo com uma cópia da ECA 28 dias após o IAM, não somente por ausência do incremento da modulação simpática, mas por maior eficiência do barorreflexo avaliado ^{137,184}.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A exemplo do que ocorre em humanos, os animais com diferentes cópias da ECA não apresentaram alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca, bem como alterações importantes nos parâmetros ecocardiográficos, na modulação autonômica e no barorreflexo no seu estado fisiológico basal.

Como esperado, após o IAM fica evidente o prejuízo ocasionado ao coração em todos os grupos que passaram por esta intervenção em nosso estudo. Contudo, as alterações genéticas promovidas no modelo tornam os animais susceptíveis as alterações fenotípicas impostas pelo nosso estudo. Na fase proliferativa do IAM, momento mais precoce do estudo (em sete dias de IAM), observamos que o aumento do número de genes da ECA (ECA 3) promoveu prejuízo adicional neste período do protocolo nos parâmetros ecocardiográficos, como uma redução na espessura do septo intraventricular, prejuízo maiores ao volume de ventrículo e maiores relação de enchimento ventricular, bem como maior prejuízo da função ventricular, evidenciado pela mudança de área fracional (FAC) e pela fração de encurtamento. Em relação aos parâmetros autonômicos, os animais com três cópias da ECA apresentaram maior modulação simpática cardíaca e maior balanço simpatovagal, evidenciando uma maior predominância simpática nesses animais.

Quando observamos o período mais tardio (28 dias após IAM), não é mais tão evidente o prejuízo ocasionado pelo aumento do número de cópias do gene da ECA (ECA 3). Contudo, neste ponto do estudo, há uma melhor recuperação do infarto nos grupos que possuem uma cópia do gene da ECA (ECA 1), a exemplo do que ocorre com a utilização dos IECA no tratamento do IAM. Os animais com uma cópia do gene da

ECA 28 dias após o IAM (ECA 1-28) apresentaram uma menor espessura do septo intraventricular, menor modulação simpática cardíaca e melhor eficiência do barorreflexo. Para o grupo com duas cópias da ECA não observamos uma pior evolução neste momento, porém não há sinais de recuperação a exemplo do que foi observado nos animais com uma cópia do gene da ECA. Ainda, o grupo com uma cópia apresentou menor deposição de colágeno no tecido cardíaco, bem como menor área de infarto.

Ao analisarmos o perfil inflamatório, os animais infartados com subexpressão do gene da ECA (ECA 1) apresentaram maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e menores níveis de TGF beta do que os animais com valores fisiológicos normais (ECA 2) e com valores aumentados (ECA 3). Ainda, a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier mostra que a maior mortalidade ocorreu no período de até sete dias após o IAM (fase proliferativa), sendo que a menor taxa de sobrevivência foi observada nos animais com três cópias do gene da ECA, enquanto os animais com uma cópia foram os que apresentaram uma maior sobrevivência.

Por fim, nossos resultados mostram, como esperado, que o IAM promoveu prejuízos na função cardíaca, função autonômica cardiovascular e no perfil inflamatório no modelo experimental em todos os grupo. Contudo, de maneira geral, os nossos resultados de função cardíaca, função autonômica cardiovascular, perfil inflamatório, área de infarto e curva de sobrevivência indicam que os animais com três cópias do gene da ECA apresentaram pior evolução após o IAM em relação aos animais com uma cópia do gene da ECA. Porém, ainda é possível que alterações específicas no sistema nervoso autonômico em virtude das alterações do polimorfismo da ECA possam ter sido mitigadas pelo infarto do miocárdio.

6.0

ANEXOS

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA - APROVAÇÃO CEUA DO PROTOCOLO DE PESQUISA SDC
4376/16/042**



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Infarto agudo do miocárdio em modelos de polimorfismo da enzima conversora de angiotensina”, registrada com o nº 091/16, sob a responsabilidade de Maria Cláudia Irigoyen e Oscar Albuquerque de Moraes, apresentado pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 10.08.16

Será utilizado como defesa de tese do aluno Oscar Albuquerque de Moraes.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 31-03-2016 Término: 30-03-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico eca
Nº de animais	90
Peso/Idade	10-15 gr
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 10 de Agosto de 2016

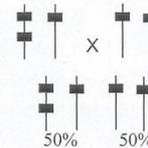
Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B – ESQUEMA DE ACASALAMENTO

Esquema de Acasalamento Camundongo (Knock-in)

Experimento A

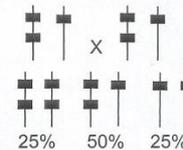
Heteroz. importado x Homoz. C57 Bl / 6 (1:2) ± 6 animais



OBS: filhotes corta-se orelhas para genotipagem e separa-se animais para acasalamento que vão originar Experimento B (1:2) ± 20 animais. Os animais selecionados para os acasalamentos do experimento B são heterozigotos.

Experimento B

Heteroz. Experimento B x Heteroz. Experimento B

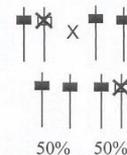


OBS: filhotes corta-se orelhas para genotipagem e depois serão utilizados em experimentos no laboratório. Os animais resultante desse acasalamento possuem 2, 3 ou 4 cópias do gene da ECA, como mostra o esquema acima.

Esquema de Acasalamento Camundongo (Knock-out)

Experimento 1

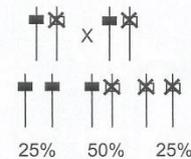
Heteroz. importado x Homoz. C57 Bl / 6 (1:2) ± 6 animais



OBS: filhotes corta-se orelhas para genotipagem e separa-se animais para acasalamento que vão originar Experimento 2 (1:2) ± 20 animais. Os animais selecionados para os acasalamentos do experimento 2 são heterozigotos.

Experimento 2

Heteroz. Experimento 2 x Heteroz. Experimento 2



OBS: filhotes corta-se orelhas para genotipagem e depois serão utilizados em experimentos no laboratório. Os animais resultante desse acasalamento possuem 0,1 ou 2 cópias do gene da ECA, como mostra o esquema acima.

Manejo do Animais :

- Forma-se o casal logo depois de receber o nº dos machos, esses animais ficam reproduzindo até completarem 8 meses, depois sacrifica-se o casal e forma-se outro. Caso o macho morra, espera-se um tempo para averiguar se a fêmea está prenha, caso não esteja, sacrifica-se a mesma.
- Os machos que serão utilizados nos acasalamentos dos Experimentos A e 1 são originários do Experimentos B e 2.
- As fêmeas que serão utilizadas nos acasalamentos dos Experimentos A e 1 vêm da instituição (Centro de Bioterismo-FMUSP) e são da linhagem C57 Bl / 6.
- O desmame dos filhotes deverá ser feito com 30 dias, não antes.
- A maravalha utilizada para cama dos animais deve ser autoclavada (30 min para esterilização e 20 min para secagem), $\pm 120^{\circ}$ C.
- A ração (Nuvital) deve ser própria para autoclave e a mesma deverá ser autoclavada.
- A água de beber deve ser autoclavada e acidificada.

ANEXO C – ESQUEMA DE ACASALAMENTO

A → TAATTCCTTGGGAGGCAGCACT

B → AGTGGAGGGTATTTGTCAGGGC

C → TAAAGCGCATGCTCCAGACTGC

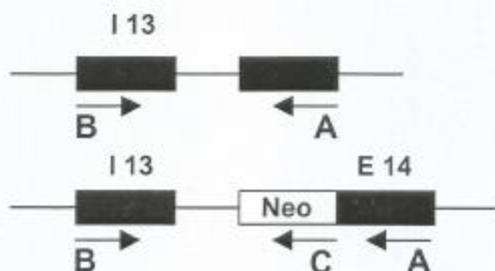


Figura 1. Esquema da reação de PCR. A união dos "primers" A e B irá resultar na amplificação de uma seqüência de 265 pares de bases (animais normais – duas cópias do gene da ECA). Já a união dos primers B e C resultará na amplificação de uma seqüência de 300 pares de bases (animais Knockout).

Para animais "Knockin" foram utilizados dois "primers" : D11M⁺ e D11M⁻: O "primer" D11M⁺ amplifica uma seqüência de 130 pares de bases (pb) (animais normais – 2 cópias do gene da ECA), e o "primer" D11M⁻ amplifica uma seqüência de 166 pb (animais com uma cópia a mais do gene da ECA).

As seqüências dos "primers" são as seguintes:

D11M⁺ - AAACAGAGATAAACCACGGGG

D11M⁻ - TGTGGA ACTA ACTCTCAGAAGGC

7.0

REFERÊNCIAS

1. Andersson C, Vasan RS. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Apr;15(4):230-240.
2. World Health Organization [Internet]. WHO. [update 2017 May 17; cited 2018 Oct 01]. Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
3. Sociedade Brasileira de Cardiologia [Internet]. SBC. [atualizada em 2015; acesso em 01 out 2018]. Disponível em: <http://www.cardiol.br/dados/mortalidade.html#mapa1>
4. DATASUS Tecnologia da Informação a Serviço do Sus [internet]. Ministério da Saúde. [acesso em 01 out 2018]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
5. Mayo Clinic [Internet]. [update 2018 May 30; cited 2018 Oct 01]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/heart-attack/symptoms-causes/syc-20373106>.
6. Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2014 May;11(5):276-89.
7. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018 Mar 20;137(12):e67-e492.
8. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.
9. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012 Oct;33(20):2569-619.
10. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985 Jul;57(1):84-95.

11. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 1985 Aug;72(2):406-12.
12. Choi IS, Park IB, Lee K, Ahn TH, Kim JH, Ahn Y, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Provide Better Long-Term Survival Benefits to Patients With AMI Than Angiotensin II Receptor Blockers After Survival Hospital Discharge. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018 [cited 2018/10/10]:1074248418795897.
13. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res*. 2006 May 12;98(9):1123-33.
14. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1977 Apr;57(2):313-70.
15. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62.
16. Simoes-e-Silva AC, Baracho NC, Passaglio KT, Santos RA. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 1997 Apr;30(4):503-13.
17. Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, Dos Santos RA. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013 Feb;15(1):31-8.
18. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000 Jan;13(1 Pt 2):31S-38S.
19. Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):R236-42.
20. Linderman JR, Greene AS. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. *Microcirculation*. 2001 Aug;8(4):275-81.
21. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*. 2004;116:263-272.
22. Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl*. 1998 Sep;67:S95-9.

23. El-Sabban ME, Hassan KA, Birbari AE, Bitar KM, Bikhazi AB. Angiotensin II binding and extracellular matrix remodelling in a rat model of myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000 Dec;1(4):369-78.
24. Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J Biol Chem.* 1992 Jul 5;267(19):13398-405.
25. Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:395-412.
26. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens.* 1991 Jan;9(1):3-15.
27. Touyz RM. Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone? *J Hypertens.* 2003 Dec;21(12):2235-8.
28. Vaughan DE. Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis. *Am J Cardiol.* 2001;87(8, Supplement 1):18-24.
29. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999 Feb;33(2):613-21.
30. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest.* 1998 Feb 1;101(3):527-35.
31. Searles CD, Harrison DG. The interaction of nitric oxide, bradykinin, and the angiotensin II type 2 receptor: lessons learned from transgenic mice. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(8):1013-4.
32. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 2013 Apr 12;112(8):1104-11.
33. Ueda S, Masumori-Maemoto S, Ashino K, Nagahara T, Gotoh E, Umemura S, et al. Angiotensin-(1-7) Attenuates Vasoconstriction Evoked by Angiotensin II but Not by Noradrenaline in Man. *Hypertension.* 2000 April 1, 2000;35(4):998-1001.

34. Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol.* 1994 Mar;111(3):652-4.
35. Etelvino GM, Peluso AA, Santos RA. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr Hypertens Rep.* 2014 Jun;16(6):433.
36. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1999 Oct 1;85(7):643-50.
37. Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 2):H313-9.
38. Andreatta SH, Averill DB, Santos RA, Ferrario CM. The ventrolateral medulla. A new site of action of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1988 Feb;11(2 Pt 2):I163-6.
39. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Sep;9(9):1716-22.
40. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci.* 2000;66(1):67-76.
41. Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 2):R89-94.
42. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Apr;280(4):R994-R1000.
43. Couto AS, Baltatu O, Santos RA, Ganten D, Bader M, Campagnole-Santos MJ. Differential effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of transgenic rats with low brain angiotensinogen. *J Hypertens.* 2002 May;20(5):919-25.

44. Isa K, Arnold AC, Westwood BM, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-converting enzyme inhibition, but not AT(1) receptor blockade, in the solitary tract nucleus improves baroreflex sensitivity in anesthetized transgenic hypertensive (mRen2)27 rats. *Hypertens Res.* 2011 Dec;34(12):1257-62.
45. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell.* 2001 Sep 7;106(5):619-32.
46. Nishimura S, Uno M, Kaneta Y, Fukuchi K, Nishigohri H, Hasegawa J, et al. MRGD, a MAS-related G-protein Coupled Receptor, Promotes Tumorigenesis and Is Highly Expressed in Lung Cancer. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e38618.
47. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2015 January 27, 2015;131(4):e29-e322.
48. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Nov 27;50(22):2173-95.
49. Dakik HA, Mahmarian JJ, Verani MS, Farmer JA, Zhao G, Marian AJ. Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with myocardial ischemia and patency of infarct-related artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Jun;29(7):1468-73.
50. Thayer JF, Merritt MM, Sollers JJ, 3rd, Zonderman AB, Evans MK, Yie S, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism DD genotype on high-frequency heart rate variability in African Americans. *Am J Cardiol.* 2003 Dec 15;92(12):1487-90.
51. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 1992 Oct 15;359(6396):641-4.
52. Poirier O, Georges JL, Ricard S, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, et al. New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. *J Hypertens.* 1998 Oct;16(10):1443-7.

53. Bai Y, Wang L, Hu S, Wei Y. Association of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism with heart failure: a meta-analysis. *Mol Cell Biochem.* 2012 Feb;361(1-2):297-304.
54. Evans AE, Poirier O, Kee F, Lecerf L, McCrum E, Falconer T, et al. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. *Q J Med.* 1994 Apr;87(4):211-4.
55. Dzau VJ. Short- and long-term determinants of cardiovascular function and therapy: contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14 Suppl 4:S1-5.
56. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res.* 1991 Aug;69(2):475-82.
57. Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension.* 1994 Feb;23(2):258-68.
58. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990 Apr;81(4):1161-72.
59. Middlekauff HR, Mark AL. The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Intern Med.* 1998 Feb;37(2):112-22.
60. Reis Filho JRdAR, Cardoso JN, Cardoso CMdR, Pereira-Barretto AC. Reverse Cardiac Remodeling: A Marker of Better Prognosis in Heart Failure. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104:502-506.
61. Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, Udelson JE, Melin J, Stewart D, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. *Circulation.* 1992 August 1, 1992;86(2):431-8.
62. Malik FS, Lavie CJ, Mehra MR, Milani RV, Re RN. Renin-angiotensin system: genes to bedside. *Am Heart J.* 1997 Sep;134(3):514-26.

63. Ocaranza MP, Diaz-Araya G, Carreno JE, Munoz D, Riveros JP, Jalil JE, et al. Polymorphism in gene coding for ACE determines different development of myocardial fibrosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Feb;286(2):H498-506.
64. Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, et al. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):13330-4.
65. Hmimech W, Idrissi HH, Diakite B, Korchi F, Baghdadi D, Tahri Joutey Hassani Idrissi H, et al. Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene on myocardial infarction susceptibility among young Moroccan patients. *BMC Res Notes*. 2017;10:763.
66. Steeds RP, Fletcher J, Parry H, Chowdhary S, Channer KS, West J, et al. The angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and heart rate variability following acute myocardial infarction. *Clin Auton Res*. 2002 Apr;12(2):66-71.
67. Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity*. 2017;46(6):927-942.
68. Huikuri HV, Stein PK. Clinical Application of Heart Rate Variability after Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in Physiology*. 2012;3:41.
69. Aires R, Pimentel EB, Forechi L, Dantas EM, Mill JG. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 2017 Jan 9;50(1):e5511.
70. Chattipakorn N, Incharoen T, Kanlop N, Chattipakorn S. Heart rate variability in myocardial infarction and heart failure. *Int J Cardiol*. 2007;120(3):289-296.
71. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Jr., Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1987;59(4):256-262.
72. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*. 1998 Feb 14;351(9101):478-84.

73. Krege JH, Kim HS, Moyer JS, Jennette JC, Peng L, Hiller SK, et al. Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):150-7.
74. Smithies O, Kim HS. Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1994 Apr 26;91(9):3612-5.
75. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2735-9.
76. Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, et al. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*. 1995 May 11;375(6527):146-8.
77. French BA, Kramer CM. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2007;4(3):185-196.
78. Flecknell P. Advances in the assessment and alleviation of pain in laboratory and domestic animals. *Journal of Veterinary Anaesthesia*. 1994;21(2):98-105.
79. Heeren MV, De Sousa LE, Mostarda C, Moreira E, Machert H, Rigatto KV, et al. Exercise improves cardiovascular control in a model of dyslipidemia and menopause. *Maturitas*. 2009 Feb 20;62(2):200-4.
80. De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci*. 2009 Jan 28;145(1-2):3-10.
81. Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol*. 2008 Jan;93(1):83-94.
82. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978 Jun;41(3):267-74.
83. Piedade MC, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, de Toledo OM. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008 Sep;48(5):403-11.

84. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med.* 1998 Mar-Apr;26(2):172-6.
85. Natarajan S, Remick DG. The ELISA Standard Save: Calculation of sample concentrations in assays with a failed standard curve. *J Immunol Methods.* 2008;336(2):242-245.
86. Rizzo M, Gensini F, Fatini C, Piero M, Pucci N, Capalbo A, et al. ACE I/D Polymorphism and Cardiac Adaptations in Adolescent Athletes. 2003. p. 1986-90.
87. Duque GS, Silva DA, Albuquerque FN, Schneider RS, Gimenez A, Pozzan R, et al. Influence of Angiotensin-Converting-Enzyme Gene Polymorphism on Echocardiographic Data of Patients with Ischemic Heart Failure. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Nov;107(5):446-454.
88. Esther CR, Jr., Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest.* 1996 May;74(5):953-65.
89. Kregge JH, Moyer JS, Langenbach LL, Peng L, Zhang SH, Maeda N, et al. Angiotensin-converting enzyme gene and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Jul;17(7):1245-50.
90. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med.* 2003 Dec 31;35(6):545-9.
91. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation.* 1995 Sep 15;92(6):1387-8.
92. Ceroni A, Moreira ED, Mostarda CT, Silva GJ, Krieger EM, Irigoyen MC. Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010 Apr;37(4):490-5.

93. Moraes OA, Flues K, Scapini KB, Mostarda C, Evangelista FS, Rodrigues B, et al. ACE gene dosage determines additional autonomic dysfunction and increases renal angiotensin II levels in diabetic mice. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018 Aug 2;73:e246.
94. Wyss JM. The role of the sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993 Mar;2(2):265-73.
95. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*. 1981 Jul 10;213(4504):220-2.
96. Taylor JA, Carr DL, Myers CW, Eckberg DL. Mechanisms underlying very-low-frequency RR-interval oscillations in humans. *Circulation*. 1998 Aug 11;98(6):547-55.
97. Guzzetti S, La Rovere MT, Pinna GD, Maestri R, Borroni E, Porta A, et al. Different spectral components of 24 h heart rate variability are related to different modes of death in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2005 Feb;26(4):357-62.
98. Stein PK, Barzilay JI, Chaves PH, Traber J, Domitrovich PP, Heckbert SR, et al. Higher levels of inflammation factors and greater insulin resistance are independently associated with higher heart rate and lower heart rate variability in normoglycemic older individuals: the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc*. 2008 Feb;56(2):315-21.
99. Eguchi K. Effects of Antihypertensive Therapy on Blood Pressure Variability. *Curr Hypertens Rep*. 2016 Oct;18(10):75.
100. Irigoyen MC, Moreira ED, Cestari IA, Krieger EM. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24(2):219-22.
101. Fisher JP, Kim A, Young CN, Fadel PJ. Carotid baroreflex control of arterial blood pressure at rest and during dynamic exercise in aging humans. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010;299(5):R1241-R1247.
102. Silveira NP, Moreira ED, Drager LF, Silva GJ, Krieger EM. Effects of sinoaortic denervation on hemodynamic parameters during natural sleep in rats. *Sleep*. 2008 Mar;31(3):328-33.

103. Heimann AS, Favarato MH, Gozzo FC, Rioli V, Carreno FR, Eberlin MN, et al. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. *Physiol Genomics*. 2005 Jan 20;20(2):173-82.
104. Bertoncetto N, Moreira RP, Arita DY, Aragão DS, Watanabe IKM, Dantas PS, et al. Diabetic Nephropathy Induced by Increased Ace Gene Dosage Is Associated with High Renal Levels of Angiotensin (1–7) and Bradykinin. *Journal of Diabetes Research*. 2015;2015:674047.
105. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987 Jul;76(1):44-51.
106. Ratcliffe MB. Non-ischemic infarct extension: A new type of infarct enlargement and a potential therapeutic target. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(6):1168-1171.
107. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. 1997 Dec 2;96(11):4065-82.
108. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 1992 May 25;267(15):10551-60.
109. Benavides-Vallve C, Corbacho D, Iglesias-Garcia O, Pelacho B, Albiasu E, Castano S, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41691.
110. Schaefer A, Meyer GP, Hilfiker-Kleiner D, Brand B, Drexler H, Klein G. Evaluation of Tissue Doppler Tei index for global left ventricular function in mice after myocardial infarction: comparison with Pulsed Doppler Tei index. *Eur J Echocardiogr*. 2005 Oct;6(5):367-75.
111. Lew WY, Chen ZY, Guth B, Covell JW. Mechanisms of augmented segment shortening in nonischemic areas during acute ischemia of the canine left ventricle. *Circ Res*. 1985 Mar;56(3):351-8.

112. Masutomoto K, Makino N, Fushiki MS. Effects of losartan on the collagen degradative enzymes in hypertrophic and congestive types of cardiomyopathic hamsters. *Mol Cell Biochem.* 2001 Aug;224(1-2):19-27.
113. Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2001 Feb 13;103(6):789-91.
114. Messadi E, Vincent MP, Griol-Charhbil V, Mandet C, Colucci J, Kregge JH, et al. Genetically determined angiotensin converting enzyme level and myocardial tolerance to ischemia. *FASEB J.* 2010 Dec;24(12):4691-700.
115. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):1110-9.
116. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic Peptides. *N Engl J Med.* 1998;339(5):321-328.
117. Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* 2002 Sep;87(5):547-55.
118. Wan W, Powers AS, Li J, Ji L, Erikson JM, Zhang JQ. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *Am J Med Sci.* 2007 Oct;334(4):265-73.
119. Ross AJ, Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Petersen WC, Oshinski JN, et al. Serial MRI evaluation of cardiac structure and function in mice after reperfused myocardial infarction. *Magn Reson Med.* 2002 Jun;47(6):1158-68.
120. Silva SD, Jr., Jara ZP, Peres R, Lima LS, Scavone C, Montezano AC, et al. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. *PLoS ONE.* 2017;12(12):e0189535.
121. Sabbah HN. Biologic rationale for the use of beta-blockers in the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2004 Apr;9(2):91-7.

122. Forman S. Blood pressure in survivors of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1984;4(6):1135-1147.
123. Srikanth G, Prakash P, Tripathy N, Dikshit M, Nityanand S. Establishment of a rat model of myocardial infarction with a high survival rate: A suitable model for evaluation of efficacy of stem cell therapy. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*. 2009;5(1):30-36.
124. Kannel WB, Sorlie P, Castelli WP, McGee D. Blood pressure and survival after myocardial infarction: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1980 Feb;45(2):326-30.
125. Yamamoto Y, Hughson RL, Peterson JC. Autonomic control of heart rate during exercise studied by heart rate variability spectral analysis. *J Appl Physiol* (1985). 1991 Sep;71(3):1136-42.
126. Robinson BF, Epstein SE, Beiser GD, Braunwald E. Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circ Res*. 1966 Aug;19(2):400-11.
127. White DW, Raven PB. Autonomic neural control of heart rate during dynamic exercise: revisited. *J Physiol*. 2014 Jun 15;592(12):2491-500.
128. De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Jun;96(6):2174-8.
129. Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jul 28;54(5):375-85.
130. Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Aug 13;106(7):793-7.
131. Radaelli A, Castiglioni P, Centola M, Cesana F, Balestri G, Ferrari AU, et al. Adrenergic origin of very low-frequency blood pressure oscillations in the unanesthetized rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(1):H357-H364.

132. Gouedard O, Blanc J, Gaudet E, Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of the renin-angiotensin system to short-term blood pressure variability during blockade of nitric oxide synthesis in the rat. *Br J Pharmacol*. 1996 Nov;119(6):1085-92.
133. Stauss HM. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):362-8.
134. Wolf MM, Varigos GA, Hunt D, Sloman JG. Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. *Med J Aust*. 1978 Jul 15;2(2):52-3.
135. Grans CF, Feriani DJ, Abssamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C, et al. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Jul;103(1):60-8.
136. La Rovere MT, Pinna GD, Maestri R, Sleight P. Clinical value of baroreflex sensitivity. *Neth Heart J*. 2013 Feb;21(2):61-3.
137. Ylitalo A, Airaksinen KE, Hautanen A, Kupari M, Carson M, Virolainen J, et al. Baroreflex sensitivity and variants of the renin angiotensin system genes. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jan;35(1):194-200.
138. Muller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragun D, Costerousse O, Menard J, et al. Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 1):98-104.
139. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation*. 2000 Aug 22;102(8):829-32.
140. Caligiorne SM, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Cardiovascular effects produced by bradykinin microinjection into the nucleus tractus solitarii of anesthetized rats. *Brain Res*. 1996;720(1):183-190.
141. Schaefer S, Valente RA, Laslett LJ, Longhurst JC. Cardiac reflex effects of intracoronary bradykinin in humans. *J Invest Med*. 1996 Apr;44(4):160-7.
142. Lutgens E, Daemen MJAP, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JFM. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional change1. *Cardiovasc Res*. 1999;41(3):586-593.

143. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin–angiotensin–aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003;35(6):807-825.
144. Crandall DL, Armellino DC, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology*. 1999 Jan;140(1):154-8.
145. Panahloo A, Andres C, Mohamed-Ali V, Gould MM, Talmud P, Humphries SE, et al. The insertion allele of the ACE gene I/D polymorphism. A candidate gene for insulin resistance? *Circulation*. 1995 Dec 15;92(12):3390-3.
146. Anavekar NS, McMurray JJV, Velazquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau J-L, et al. Relation between Renal Dysfunction and Cardiovascular Outcomes after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1285-1295.
147. Chen YF, Weltman NY, Li X, Youmans S, Krause D, Gerdes AM. Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. *J Transl Med*. 2013 Feb 14;11:40.
148. Ramirez TA, Iyer RP, Ghasemi O, Lopez EF, Levin DB, Zhang J, et al. Aliskiren and valsartan mediate left ventricular remodeling post-myocardial infarction in mice through MMP-9 effects. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:326-335.
149. Gehrmann J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol*. 2001 May-Jun;96(3):237-50.
150. Yu J-G, Song S-W, Shu H, Fan S-J, Liu A-J, Liu C, et al. Baroreflex deficiency hampers angiogenesis after myocardial infarction via acetylcholine- α 7-nicotinic ACh receptor in rats. *Eur Heart J*. 2013;34(30):2412-2420.
151. Tobaldini E, Porta A, Wei SG, Zhang ZH, Francis J, Casali KR, et al. Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. *Auton Neurosci*. 2009 Oct 5;150(1-2):21-6.
152. Chen Y-F, Weltman NY, Li X, Youmans S, Krause D, Gerdes AM. Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. *J Transl Med*. 2013 February 14;11(1):40.

153. Sullivan KE, Quinn KP, Tang KM, Georgakoudi I, Black LD. Extracellular matrix remodeling following myocardial infarction influences the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014;5(1):14-14.
154. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *The American Journal of Pathology*. 1995;147(2):325-338.
155. Iyer RP, Jung M, Lindsey ML. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jul 1;311(1):H190-8.
156. Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. 2004 Aug;10(4):328-33.
157. Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart* [10.1136/heartjnl-2015-307855]. 2015.
158. Lee YM, Peng YY, Ding YA, Yen MH. Losartan attenuates myocardial ischemia-induced ventricular arrhythmias and reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1997 Aug;10(8):852-8.
159. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2567-78.
160. Ford WR, Clanachan AS, Jugdutt BI. Opposite effects of angiotensin AT1 and AT2 receptor antagonists on recovery of mechanical function after ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Circulation*. 1996 Dec 15;94(12):3087-9.
161. Zidar N, Jeruc J, Balazic J, Stajer D. Neutrophils in human myocardial infarction with rupture of the free wall. *Cardiovasc Pathol*. 2005 Sep-Oct;14(5):247-50.
162. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*. 2000 Apr;135(4):316-23.
163. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*. 2003 Sep 16;108(11):1395-403.

164. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993 Jun;45(2):205-51.
165. McKinney CA, Fattah C, Loughrey CM, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin Sci.* 2014 Jun;126(12):815-27.
166. Wassmann S, Nickenig G. Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens Suppl.* 2006 Mar;24(1):S15-21.
167. Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation.* 1995 Mar 1;91(5):1461-71.
168. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Sun Y. Angiotensin 1-7 promotes cardiac angiogenesis following infarction. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(1):37-42.
169. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, Gonzalez-Pacheco FR, Barrios C, Evora K, et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2010 Jan;55(1):90-8.
170. He Q, Zhou W, Xiong C, Tan G, Chen M. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015 Jan;11(1):374-8.
171. Frangogiannis NG. The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium. *Journal of Thoracic Disease.* 2016:S52-S63.
172. Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M, et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation.* 2005 May 17;111(19):2430-7.
173. Schneiders D, Heger J, Best P, Michael Piper H, Taimor G. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):87-96.

174. Talasaz AH, Khalili H, Jenab Y, Salarifar M, Broumand MA, Darabi F. N-Acetylcysteine Effects on Transforming Growth Factor- β and Tumor Necrosis Factor- α Serum Levels as Pro-Fibrotic and Inflammatory Biomarkers in Patients Following ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Drugs in R&D*. 2013;13(3):199-205.
175. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *The Journal of Immunology* [10.4049/jimmunol.165.5.2798]. 2000;165(5):2798.
176. Yao L, Huang K, Huang D, Wang J, Guo H, Liao Y. Acute myocardial infarction induced increases in plasma tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 are associated with the activation of poly(ADP-ribose) polymerase of circulating mononuclear cell. *Int J Cardiol*. 2008 Jan 24;123(3):366-8.
177. Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8602-6.
178. Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Punzengruber C, Kvas E, Eber B. Prolonged mechanical systole and increased arterial wave reflections in diastolic dysfunction. *Heart*. 2006;92(11):1616.
179. Mitter SS, Shah SJ, Thomas JD. A Test in Context: E/A and E/e' to Assess Diastolic Dysfunction and LV Filling Pressure. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(11):1451-1464.
180. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:503-513.
181. Solomon SD, Pfeffer MA. Renin-angiotensin system and cardiac rupture after myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Oct 22;106(17):2167-9.
182. Yoshiyama M, Nakamura Y, Omura T, Izumi Y, Matsumoto R, Oda S, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor prevents left ventricular remodelling after myocardial infarction in angiotensin II type 1 receptor knockout mice. *Heart* [10.1136/hrt.2004.035618]. 2005;91(8):1080.

183. Vaile JC, Fletcher J, Littler WA, Coote JH, Townend JN. Angiotensin II modulates cardiovascular autonomic control in the absence of baroreflex loading. *Heart*. 1998 Aug;80(2):127-33.
184. Head GA, Saigusa T, Mayorov DN. Angiotensin and baroreflex control of the circulation. *Braz J Med Biol*. 2002 Sep;35(9):1047-59.