

**Leandro Reis Tavares**

**A ação do digital na  
fibrose miocárdica em modelo experimental**

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

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Charles Mady

São Paulo

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Leandro Reis

A ação digital na fibrose miocárdica em modelo experimental / Leandro Reis  
Tavares. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: Charles Mady.

Descritores: 1.Colágeno/metabolismo 2.Fibrose 3.Digitoxina 4.Remodelação  
ventricular 5.Modelos animais

USP/FM/DBD-470/10

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas.”

*Louis Pasteur*

## DEDICATÓRIA

À minha família por todo tempo junto que renunciamos para  
tornarmos esse sonho realidade.  
Em especial à minha filha Lara, motivo maior da minha  
vontade de viver.

## **AGRADECIMENTOS**

Adriana Oliveira  
Alfredo Cardoso  
Barbara Ianni  
Charles Mady  
Edmundo Arteaga  
Evandro Mesquita  
Fábio Fernandes  
Felix Ramires  
Fernanda Pessoa  
Lucia Oliveira  
Luciano Nastari  
Maurício Ceschin  
Orlando Ribeiro  
Paula Buck  
Rita Quarentei  
Roseli Chaves  
Vera Salemi  
Wanda Alcântara

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	<i>i</i>
RESUMO .....	<i>ii</i>
ABSTRACT.....	<i>iii</i>
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
A) Modelo Animal.....	14
B) Análise Morfológica .....	16
C) Ecocardiograma .....	17
D) Dosagem dos Níveis Séricos de Peptídeo Natriurético Tipo B.....	18
E) Zimografia – Detecção da Atividade de Metaloproteinase MMP-2 no Coração.....	20
F) Dosagem Sérica da Digitoxinemia.....	21
G) Método Estatístico .....	21
RESULTADOS.....	23
Características Clínicas .....	24
Digitoxinemia .....	25
Remodelamento Cardíaco.....	25
Função Cardíaca .....	31
Quantificação dos Níveis Séricos de Peptídeo Natriurético Tipo B (BNP)..	34
Quantificação de Metaloproteinases (MMP) por Zimografia .....	35
Correlações .....	37
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÕES .....	47
LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	49
REFERÊNCIAS .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta D$  - fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

BNP - Peptídeo Natriurético Tipo B

DDVE - diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo

DSVE - diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo

ERP - espessura relativa da parede

FVCI - fração do volume de colágeno intersticial

FVCP - fração do volume de colágeno perivascular

GA - grupo aldosterona

GAD - grupo aldosterona mais digitoxina

GC - grupo controle

IC - insuficiência cardíaca

IDM - índice de desempenho miocárdico

SIVDIA - espessura do septo interventricular durante a diástole

MMP - metaloproteinases

MVE - massa do ventrículo esquerdo

TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico

## RESUMO

Tavares LR. *A ação do digital na fibrose miocárdica em modelo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Estudos recentes sobre disfunção ventricular demonstram o potencial terapêutico da modulação da matriz extracelular. Isso se dá pela influência que a referida matriz tem sobre a função sistólica e a diastólica do coração. Outros estudos demonstram a influência do digital sobre os sistemas neurohormonais desbalanceados no cenário de disfunção ventricular levantando uma questão acerca do potencial do digital como modulador da deposição do colágeno intersticial e perivascular miocárdico. Sabendo-se da importância prognóstica que a concentração do colágeno no referido cenário tem, a literatura apresenta uma lacuna de conhecimento. **Objetivo:** Avaliar o papel do digital no remodelamento miocárdico em um modelo experimental. **Material e Métodos:** 60 ratos Wistar foram separados em 3 grupos de 20. Um grupo controle (GC); outro grupo submetido ao modelo experimental de uninefrectomia, administração de água de beber com 1% de NaCl e de aldosterona subcutânea (GA); e outro grupo submetido ao mesmo modelo experimental, mas também recebendo digitoxina na ração de comer na dose de 100 µg/Kg/dia (GAD). **Resultados:** A fração de volume de colágeno intersticial e perivascular mostrou-se maior no GA comparado aos outros dois grupos (GC e GAD). O índice de desempenho miocárdico mostrou diferença estatisticamente significativa entre o GA ( $0,49 \pm 0,08$ ) e o GC ( $0,32 \pm 0,06$ ) e o GAD ( $0,4 \pm 0,13$ ) ( $p=0,001$ ). Os níveis séricos de BNP mostraram diferença estatisticamente significativa entre o GA ( $1,07 \pm 0,32$  ng/ml) e o GC ( $0,75 \pm 0,19$  ng/ml) e o GAD ( $0,84 \pm 0,21$  ng/ml) ( $p=0,01$ ). Os níveis de metaloproteinases não diferiram entre os grupos. Houve uma correlação positiva entre uma maior fração de encurtamento e menores níveis séricos de BNP no GAD. **Conclusões:** Esses dados demonstram que a digitoxina teve efeito reduzindo a deposição de colágeno intersticial e perivascular e melhorando a função cardíaca avaliada pelo BNP e IDM nesse modelo experimental.

**Descritores:** colágeno/metabolismo; fibrose; digitoxina; remodelação ventricular; modelos animais



## ABSTRACT

Tavares LR. *Effects of digitoxin on myocardial collagen deposition process in a fibrosis experimental model* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Recent studies on myocardial dysfunction are highlighting the therapeutic potential of the myocardial extracellular matrix management. It's interesting to highlight the importance of the dynamics of the cardiac extracellular matrix, because even the systolic and diastolic functions are implicated on it. Other studies showed that digital compounds may regulates the neuroendocrin misbalance due to myocardial impairment and influencing these systems the digital compounds may regulates the interstitial collagen deposition.

**Objective:** To evaluate the role of the digital on a myocardial fibrosis in an experimental model, examining if the digital is able to prevent the collagen deposition. **Methods:** The sample was divided in 20 rats from the control group (CG); 20 rats submitted to a fibrosis experimental model in which the rats are uninefrectomized, drink water with 1% NaCl during the protocol and receive aldosterone through an osmotic minipump (AG); and 20 rats submitted to the same experimental model treated with digitoxin in a daily dose of 100 µg/Kg (DAG). **Results:** The interstitial and perivascular collagen volume fraction showed a significant difference between the AG and the other 2 groups (CG and DAG). The myocardial performance index showed a significant difference between the AG ( $0.49 \pm 0.08$ ) and the CG ( $0.32 \pm 0.06$ ) and the DAG ( $0.40 \pm 0.13$ ) ( $p=0.001$ ). The BNP levels showed a significant difference between the AG ( $1.07 \pm 0.32$  ng/ml) and the CG ( $0.75 \pm 0.19$  ng/ml) and the DAG ( $0.84 \pm 0.21$  ng/ml) ( $p=0.01$ ). The metalloproteinases levels did not differ among the groups and there was a positive correlation between the shortening fraction and the BNP levels among the GAD animals. **Conclusion:** These data demonstrate the digitoxin positive effect on the myocardial collagen deposition in this experimental model of interstitial fibrosis and could have a new therapeutic target previously unexplored.

**Key words:** collagen/metabolism; fibrosis; digitoxin; ventricular remodeling; animal models.

## INTRODUÇÃO

---

A Insuficiência Cardíaca é uma síndrome clínica consequente à disfunção do coração sendo acompanhada da perda de qualidade de vida e alta morbimortalidade.<sup>1</sup> Agressões miocárdicas (hipertensão arterial sistêmica, síndromes coronárias, agentes tóxicos ou infecciosos) podem levar à desorganização estrutural, geométrica e funcional do coração com consequente redução do débito cardíaco.<sup>2</sup> Os estudos sobre o processo de remodelamento ventricular e da ativação neuro-hormonal envolvida nele, criaram um novo conceito na insuficiência cardíaca e possibilitaram o desenvolvimento de novos medicamentos que tiveram grande impacto na história natural dessa síndrome<sup>3,4,5,6</sup>.

Os cardiomiócitos constituem cerca de 70% do volume do músculo cardíaco e seus aspectos morfo-funcionais têm sido bastante estudados no contexto do remodelamento miocárdico e disfunção ventricular. Modelos experimentais associados a avaliações imuno-histoquímica e de biologia molecular ajudaram a definir os mecanismos histopatológicos e moleculares responsáveis pela necrose, hipertrofia e apoptose celular.<sup>7</sup> A exposição constante dos cardiomiócitos à altas concentrações de epinefrina e de outros hormônios de estresse está diretamente associada ao processo de remodelamento.<sup>8</sup> Esse processo adaptativo hormonal promove a internalização de receptores  $\beta$  adrenérgicos, o desacoplamento da via intracelular de sinalização durante a expressão alterada de proteínas G, a diminuição da expressão dos canais de potássio e dos receptores ryanodínicos e a expressão aumentada dos canais

trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , resultando em menores concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular.<sup>8,9</sup> Adicionalmente, há indução da expressão de proteínas do sistema contrátil, resultando no aumento da massa muscular cardíaca e na reorganização dos miofilamentos.<sup>10</sup> Aliado a isso, ocorre uma resposta cardio-inflamatória que favorece o agravamento da disfunção cardíaca inicial, através do aumento da produção de citocinas miocárdicas e de processos apoptóticos.

Além do papel fundamental dos cardiomiócitos na geometria e função do coração, a matriz extracelular representa a estrutura organizadora e de sustentação do arcabouço miocárdico controlando e mediando a contração, sendo seu acúmulo inapropriado de importância maior na fisiopatologia da disfunção miocárdica.

Entre cardiomiócitos, nervos e vasos sanguíneos, o interstício que sustenta todas essas estruturas é composto principalmente pelo tecido conectivo. Nesse tecido existe a predominância de colágeno e de fibronectina, laminina e elastina em pequenas proporções.

O colágeno é sintetizado dentro de células e transportado para o meio extracelular, onde, através da ação de enzimas polimerizantes, tem sua estrutura formada em hélice-tripla. É composta basicamente por glicina (que representa 1/3 da seqüência), prolina e lisina. Os dois últimos são modificados para a forma de hidroxiprolina e hidroxilisina através de processos enzimáticos dependentes da vitamina C.

No coração adulto normal, as avaliações morfométricas indicam que aproximadamente 2-4% do miocárdio é composto de colágeno. O colágeno do tipo I é o predominante (> 50%), seguido pelo tipo III (entre 10 - 45%) e pelo tipo V (< 5%). Entretanto, pequenas alterações em sua concentração exercem importantes efeitos nas propriedades mecânicas ativas e passivas do coração.<sup>11-15</sup> Além da concentração de colágeno, as proporções relativas dos tipos de colágeno também têm forte influência nesse comportamento. Os tipos de colágeno diferem no diâmetro das fibras, no alinhamento espacial e no grau de entrelaçamento. Conseqüentemente, o tecido que contém mais colágeno do tipo I (fibras de grande diâmetro, e/ou com um alto nível de entrelaçamento) será mais duro do que o tecido com maiores concentrações de fibras do tipo III (fibras relativamente de pequeno diâmetro e sem entrelaçamento expressivo).<sup>16</sup> O colágeno tipo I tem uma potente força de tensão. É a proteína responsável pela estruturação do interstício e do espaço perivascular, mantendo assim a morfologia adequada para proporcionar uma boa contratilidade. Quando acumula excessivamente, ocorrem alterações na arquitetura cardíaca como hipertrofia, dilatação ventricular e fibrose miocárdica. O colágeno tipo III tem papel importante na distensibilidade do coração. O acúmulo de ambos (tipo I e tipo III) pode ser explicado pelo desequilíbrio na dinâmica entre síntese e degradação. Nesse processo, há degradação pelas metaloproteinases (MMP)<sup>17</sup>, que estão normalmente presentes em sua forma inativa na matriz extracelular. A MMP-1, quando estimulada, gera degradação em dois fragmentos.

Posteriormente, ambos fragmentos serão degradados em sequência pela MMP-2 e pela MMP-9. A síntese e a degradação apresentam correlação com os níveis séricos de MMP, e têm sido implicados às diferentes formas clínicas e etiológicas de disfunção miocárdica.<sup>18</sup> Toda a ativação neurohormonal envolvida no remodelamento gênico, molecular, estrutural, geométrico e funcional do coração, tem ação direta na dinâmica da deposição do colágeno no interstício e ao redor dos vasos miocárdicos. Assim, a avaliação de diferentes intervenções que atuem direta ou indiretamente nessa ativação neuro-hormonal, que influencia diretamente na prevenção ou atenuação do remodelamento miocárdico, é de grande importância.

Na pesquisa básica, os modelos animais têm sido usados para estudar o remodelamento miocárdico e seus mecanismos fisiopatológicos, além dos efeitos da terapia medicamentosa. Em geral, o modelo animal ideal deve contemplar vários requisitos como os aspectos moleculares, estruturais, hemodinâmicos, neurohormonais e periféricos comparáveis com aqueles do gênero humano. Atualmente, ainda não existe um modelo que preencha todos esses critérios. Porém, importantes descobertas foram realizadas com os modelos disponíveis, permitindo o desenvolvimento de novos modelos mais complexos e completos.<sup>19</sup> Ratos são frequentemente usados na pesquisa cardiovascular, pois são de fácil manipulação, baixo custo e permitem estudos mais direcionados. Existem diversos modelos experimentais bem conhecidos e utilizados no estudo do remodelamento

miocárdico como os de isquemia miocárdica, hipertensão arterial sistêmica, sobrecarga de pressão, sobrecarga de volume, miocardites e hipertensão pulmonar.<sup>19</sup> Podem ser usados isoladamente ou combinados, dependendo do tipo de resposta fisiopatológica ou intervenção que se busca testar. Um modelo que combina a sobrecarga de volume com a agressão miocárdica direta é o que utiliza a infusão subcutânea de aldosterona.<sup>20</sup> O rato, neste modelo bastante difundido na literatura, desenvolve hipertrofia e fibrose miocárdica intersticial e perivascular, evoluindo para disfunção ventricular. Por isso, esse modelo experimental tem sido considerado muito apropriado para avaliar a influência de um fármaco no processo de deposição e degradação de colágeno.

O uso da *Digitalis Purpurea* foi descrito em 1785 por Sir William Withering, e recomendado para pacientes com pulso fraco e irregular, que apresentavam edema. Mais tarde, a digoxina foi isolada a partir dessa planta e identificada como substância responsável por esses efeitos. Os digitálicos são encontrados em diversas plantas e usualmente atuam como veneno protetor contra predadores herbívoros. A digoxina e a digitoxina, derivadas das folhas da *Digitalis Lanata*, são também esteróides cardíacos com poderes inotrópicos positivos e capazes de promover mudanças eletrofisiológicas no coração. Uma das diferenças é que a eliminação da digoxina é renal e a da digitoxina é hepática. A digoxina se tornou o glicosídeo mais usado devido às suas características farmacológicas. Estudos mais recentes demonstram a capacidade dessas drogas em

modular sistemas neurohormonais desbalanceados na insuficiência cardíaca.

O mecanismo de ação dos digitálicos constitui basicamente a inibição reversível da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Como resultado, ocorre aumento da entrada de Ca<sup>++</sup> na célula, devido ao acúmulo de Na<sup>+</sup> retido pela inibição da ATPase, através de um canal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>. O aumento da disponibilidade de Ca<sup>++</sup> proporciona o aumento da velocidade de encurtamento da fibra, resultando no desvio para a esquerda da curva de função ventricular. Esse conceito vai de encontro às teorias mais modernas da terapêutica de insuficiência cardíaca, que preconizam evitar um aumento potencialmente destrutivo do Ca<sup>++</sup> que alteraria a expressão e produção de proteínas e aumentaria a apoptose celular, além de se ligar às fibras contráteis retardando o relaxamento ventricular. Assim, o racional da utilização dos digitálicos no tratamento da disfunção ventricular estaria exclusivamente associado aos seus efeitos inotrópicos positivos, cujo objetivo é aumentar o débito cardíaco. No entanto, esse efeito inotrópico positivo não está associado diretamente a uma consistente melhora hemodinâmica, em animais e humanos. Por exemplo, em controles ou em casos de disfunção ventricular esquerda e hemodinâmica normal (ou normalizada por outras terapias), pode não ocorrer aumento do débito cardíaco ou mesmo haver queda após a administração do digital. Esse paradoxo foi inicialmente atribuído ao efeito vasoconstrictor do digital que aumenta a pós-carga e atenua o efeito inotrópico.<sup>10, 21, 22</sup> Entretanto, essa vasoconstrição periférica



é transitória e apenas se manifesta após rápida infusão intravenosa de digital, o que não explica totalmente a incapacidade em aumentar a função cardíaca quando a hemodinâmica está normal. Por outro lado, quando a digoxina é administrada de forma aguda em pacientes hemodinamicamente comprometidos com disfunção ventricular esquerda, foi verificado um aumento significativo no débito cardíaco e uma queda na pressão capilar pulmonar e na resistência vascular periférica.<sup>23</sup> Mason e Braunwald<sup>23</sup> foram os primeiros a relatarem os efeitos de digitálicos em humanos saudáveis comparados aos efeitos em pacientes com disfunção ventricular. Nesse estudo, a administração intravenosa de digital provocou vasoconstricção, enquanto nos pacientes com disfunção ventricular provocou vasodilatação. Ou seja, a resposta hemodinâmica à administração aguda de digital é inversamente proporcional ao grau de disfunção hemodinâmica instalada previamente.

Existem evidências que apontam o papel do digital como modulador de sistemas neuroendócrinos, como, por exemplo, o sistema adrenérgico e o sistema renina-angiotensina-aldosterona.<sup>24-26</sup> O digital pode exercer efeitos vasculares simpático-inibitórios, simpático-excitatórios e pode também, diretamente, promover vasoconstricção.<sup>27, 28</sup> A relativa predominância desses diferentes efeitos em resposta ao digital pode depender do estado de ativação dos sistemas neuroendócrinos e da dose do digital empregada. Outros estudos<sup>21, 22</sup> sugerem que a administração aguda de digital contribui para atenuar as anormalidades neuroendócrinas da

disfunção ventricular, reduzem a atividade da renina plasmática e, conseqüentemente, diminuem os níveis de angiotensina II e de aldosterona circulantes. Alguns<sup>29</sup> ainda sugerem que a administração crônica de digital pode promover efeitos semelhantes.

A ativação neuroendócrina continuada é um fator de manutenção e de progressão do remodelamento miocárdico e disfunção do coração. A deposição e acúmulo intersticial de colágeno é um importante item na progressão dessa disfunção.<sup>30</sup> A formação de fibrose está associada a mudanças na arquitetura ventricular e conseqüente deterioração do desempenho cardíaco, agregando um pior prognóstico ao paciente com insuficiência cardíaca. Agindo nesse sistema neuroendócrino desbalanceado, o digital promoveria a redução da velocidade e intensidade do remodelamento miocárdico e a deterioração da função cardíaca. Como a sobrevida na IC é inversamente proporcional à concentração sérica de norepinefrina e à atividade da renina plasmática<sup>8,31</sup>, é possível que intervenções que atuem na redução da ativação neuro-humoral, por ação direta no barorreflexo carotídeo com diminuição dos níveis circulantes de norepinefrina, possam restaurar a atividade fisiológica dos beta-receptores e atenuar o remodelamento miocárdico.

Dessa forma, a maioria dos dados disponíveis sobre digitálicos indica que, direta e/ ou indiretamente, o seu uso traria benefícios tanto no âmbito mecanicista e funcional quanto no neuro-hormonal, com impacto no

remodelamento, no balanço hemodinâmico e na redução de fibrose intersticial.

Apesar de todos os benefícios, muita controvérsia surgiu após o advento dos betabloqueadores sobre o uso clínico dos digitálicos. O principal estudo clínico com digital, o *Digitalis Investigation Group* (DIG Trial), reportou a melhora dos sintomas e diminuição das hospitalizações no grupo tratado com digital, apesar de não aumentar a sobrevida.<sup>32</sup> Essas evidências baseiam as diretrizes mais recentes<sup>33</sup>, onde o digital está indicado para tratamento de pacientes sintomáticos. No entanto, ainda não há evidências de que o uso prolongado (após a melhora clínica e compensação) de digitálicos possa trazer benefícios.

Em estudo posterior, Ahmed e sua equipe<sup>24</sup> demonstraram que o digital aumentou a sobrevida dos pacientes com IC, tanto com disfunção sistólica quanto com função sistólica preservada, quando os níveis séricos de digital estavam entre 0,5-0,9 ng/ml.

A literatura carece de estudos que avaliem quantitativamente a eficácia do digital no restabelecimento do balanço entre deposição e degradação do colágeno miocárdico intersticial, apesar de sua ação moduladora de sistemas neuroendócrinos ser bastante conhecida.<sup>7, 21, 22, 34</sup>

## **OBJETIVOS**

---

### **1) Objetivo Geral**

Avaliar o papel do digital no remodelamento miocárdico em um modelo experimental.

### **2) Objetivos Específicos**

a) Avaliar a ação do digital na prevenção da deposição de colágeno intersticial e perivascular no miocárdio.

b) Correlacionar o grau de deposição do colágeno intersticial com parâmetros funcionais e a ação do digital neste cenário.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## A) Modelo Animal

Foi estudado o miocárdio do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito de ratos machos *Wistar* com seis semanas de vida. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) e distribuídos em três grupos (20 ratos por grupo) sendo mantidos em gaiolas no biotério do InCor:

- 1) ratos não operados e não tratados como controles (GC)
- 2) ratos uninefrectomizados recebendo infusão de aldosterona (GA)
- 3) ratos uninefrectomizados recebendo infusão de aldosterona e digitoxina (GAD).

O experimento foi realizado de acordo com as diretrizes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*<sup>35</sup> e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal<sup>36</sup> (COBEA). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP sob o número SDC 2835/06/80 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) 733/06. O estudo foi realizado no laboratório da Unidade Clínica de Miocardiopatias do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Os animais receberam aldosterona por meio de minibombas osmóticas (type 2007; Alza Corp. Palo Alto, CA) implantadas no subcutâneo através de uma incisão na região dorsal sob anestesia com tribromoetanol na dosagem de 2 mg/kg via intraperitoneal. O subcutâneo foi diluído, a

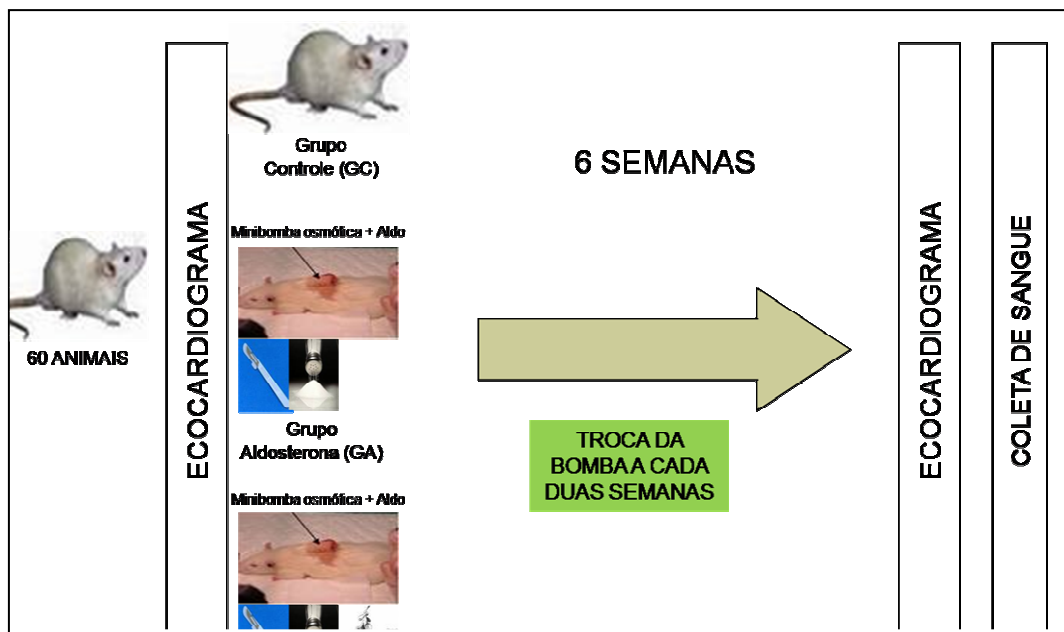
minibomba implantada e a pele fechada com cliques cirúrgicos. Essas minibombas osmóticas foram trocadas a cada duas semanas do protocolo. A dose utilizada foi de 0,75 µg/h, pelo período de seis semanas, associada ao suplemento de cloreto de sódio a 1% em água de beber. Todos os animais tratados com aldosterona também foram uninefrectomizados.<sup>20</sup> A uninefrectomia foi realizada sob anestesia com tribromoetanol (2 mg/kg) via intraperitoneal seguida por incisão mediana no abdome, sendo o rim esquerdo identificado, isolado com a ligadura de artéria, veia e ureter em bloco, com posterior remoção do órgão e fechamento da parede.

Aos animais do grupo GAD também foi administrada digitoxina por todo o período do estudo. A ração comercial dos animais (Nuvilab®) foi triturada até virar pó e em seguida peneirada. A digitoxina foi diluída em álcool e posteriormente em água. Essa água com a digitoxina foi então misturada à ração em pó e a pasta reconstruída manualmente na forma de péletes que secaram por 24h à 80°C. A digitoxina misturada na ração foi ofertada aos ratos na dose de 100µg/Kg/dia mantendo-se um animal por gaiola e com comedouro apropriado. O alimento foi pesado diariamente a fim de se corrigir a dose da medicação administrada. O tratamento foi iniciado imediatamente após a cirurgia. Esse preparo de dieta segue protocolo já validado no qual os níveis séricos de digitoxina não apresentam diferença estatística dos alcançados por administração subcutânea.<sup>37</sup>

Os animais foram eutanaziados após 6 semanas sob anestesia com tribromoetanol 2mg/kg intraperitoneal. Foi realizada laparotomia



mediana, com dissecação da artéria aorta e coleta de sangue; em seguida foram feitas dissecação e punção da veia cava e administração de solução com cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80ml + KCl 19,9% 20ml) até a parada cardíaca. Os corações foram removidos por toracotomia mediana e divididos em 3 partes: a base (incluindo vasos da base, átrios e parte dos ventrículos) e a ponta foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e mantidos a  $-75^{\circ}\text{C}$ ; a porção média foi mantida em formol 10%.



## B) Análise Morfológica

A partir dos corações fixados em formol, cortes seriados em parafina ( $5\mu\text{m}$ ) foram montados em lâminas e corados com *picrosirius red*. Assim, as frações do volume de colágeno intersticial (FVCI) do ventrículo

esquerdo, direito e perivascular (FVCP) foram determinadas separadamente. A quantificação foi realizada por videomorfometria, usando-se um sistema de análise de imagens sob microscopia ótica (*Quantimet 520 Image Analysis System- Cambridge Instruments, Cambridge, UK*). A quantificação da FVCI foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se cortes seriados e múltiplos campos utilizando-se a objetiva de 10X (todos os campos de uma lâmina). A quantificação da FVCP foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a luz do vaso, analisando-se cortes seriados e múltiplos campos utilizando-se a objetiva de 10X (todos os vasos de uma lâmina).

### **C) Ecocardiograma**

O ecocardiograma transtorácico foi realizado em equipamento Sequóia 512 (Acuson, Mountain View, CA) equipado com transdutor linear de 13 MHz, que foi colocado sobre o hemitórax esquerdo, após a realização de tricotomia. Os exames foram filmados e as medidas realizadas posteriormente. Todos os exames foram realizados e analisados por um mesmo examinador o qual era cego para os grupos estudados. Os animais foram submetidos a esse procedimento no início e no final do estudo, sendo

previamente anestesiados com tribromoetanol via intraperitoneal, na dose de 2 mg/kg.

Inicialmente, a aquisição da imagens foi realizada utilizando a ecocardiografia bidimensional (2D) no corte para-esternal longitudinal, seguido do corte transversal e por fim do corte apical 4-câmaras. O modo M do ecocardiograma bidimensional foi usado para medida dos diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) finais de ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular (SIVDIA) e da parede posterior durante a diástole e espessura relativa da parede (ERP), todos no corte transversal e na altura dos músculos papilares e normalizadas pelo tamanho da tíbia X100. Esta foi obtida no momento final do estudo, após o sacrifício. Todas as medidas foram realizadas como previamente descrito<sup>38</sup>. A função sistólica do VE foi obtida pela fração de encurtamento ( $\Delta D(\%) = [(DD-DS)/DD] \times 100$ ) e a massa do VE (MVE) calculada a partir da formula do cubo pelo modo M assumindo-se uma geometria esférica do VE. O índice de desempenho miocárdico (IDM) foi avaliado pela fórmula: (a – tempo de ejeção) / tempo de ejeção, sendo “a” o intervalo entre o fechamento e a abertura da valva mitral. Esse índice foi usado para avaliação da função global do coração. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtido a partir do tempo entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral.

#### D) Dosagem dos Níveis Séricos de Peptideo Natriurético tipo B

Para a quantificação da proteína BNP, foram coletados 4 ml de sangue total dos animais dos grupos controle (GC), aldosterona (GA) e aldosterona digitoxina (GAD) utilizando-se tubos com anticoagulante EDTA. Essa coleta foi realizada ao final do protocolo, no momento do sacrifício dos animais. As amostras foram centrifugadas a uma temperatura de 4°C durante 15 minutos, e após o término da centrifugação o plasma foi transferido para um tubo seco sendo armazenado em freezer a -20°C até o momento da realização do teste.

A técnica de ELISA foi realizada conforme descrito pelo fabricante *Peninsula Laboratories*®, a saber:

em uma placa contendo 96 poços foi adicionado 50µL do padrão ou da amostra já diluídos, 25µL antisoro diluído em tampão EIA buffer e 25µL BT-tracer diluídos em EIA buffer. Nos poços que não foram adicionados os plasmas dos animais (brancos) foram adicionados 50µL do diluente e 25µL Bt-tracer. Essa placa foi incubada por aproximadamente 12 horas a 4°C e após esse período lavada com 300µL da solução tampão EIA, repetindo-se esse ciclo por 5 vezes. Após a fase de lavagem adicionou-se 100µL estreptavidina-HRP (1/200 em tampão EIA) em todos os poços e incubou-se durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada com solução tampão por 5 vezes, conforme mencionado anteriormente. Após essa

etapa adicionou-se 100µL da solução TMB solution inclusive nas amostras brancas e foi incubado em temperatura ambiente por 30-60 minutos. Para o término da reação foi adicionado 100µL HCL 2N e lido em espectrofotômetro com absorbância de 450nm.

### **E) Zimografia – Detecção da Atividade de Metaloproteinase MMP-2 no Coração**

Fragmentos do miocárdio foram pesados e aproximadamente 100 mg foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em tampão de lise Triton X-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol, 135mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0) e centrifugado a 14000 *g* por 10 minutos a 4°C. Após esse procedimento foi coletado o sobrenadante e feito a quantificação de proteínas através do método de Bradford (Bio-Rad). Trinta microgramas de proteína foram acrescida de tampão de amostra (2% de SDS, 60mM Tris pH6.8, 30% glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e carregadas em gel de 10% de poliacrilamida contendo 0.2% de gelatina. Depois de realizada a eletroforese, o gel foi lavado em 10 mM de Tris (pH8.0) contendo 2.5% de Triton X-100, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado em solução tampão reveladora do gel (50mM de tris pH 8.8, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02%NaN<sub>3</sub>) por 20 horas a 37° apenas na solução reveladora, e corado com Coomassie

Brilliant Blue R-250 (Amersham) por 4 horas. Em seguida foram descorados em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada. As metaloproteinases são identificadas por banda clara ao fundo azul do gel. Nas amostras controles e tratadas a expressão das proteínas analisadas foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público "Image J" criado por Wayne Rasband do *National Institutes of Mental Health*, NIH, USA.

#### **F) Dosagem Sérica da Digitoxinemia**

Para a dosagem sérica da digitoxinemia coletamos 4 ml de sangue dos animais em tubo de soro gel. Aguardamos a retração do coágulo, sendo depois o material centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm e realizada a dosagem no soro dos animais em seguida. O equipamento utilizado foi o *Immulite 2000* da *Siemens Healthcare Diagnostics* com o kit apropriado (Digitoxin Immulite 2000). Esse equipamento realiza dosagem automatizada a partir do soro pela metodologia de quimiluminescência.

#### **G) Método Estatístico**

Com o objetivo de verificar se existe diferença significativa nas variáveis entre os três grupos de tratamento (GC, GA e GAD) foram

aplicados métodos de Análise de Variância *one-way* ou Kruskal-Wallis de acordo com a distribuição. Os testes de Tukey ou de comparações múltiplas<sup>39</sup> foram aplicados para identificar quais os grupos que diferem entre si, ao nível de 5%.

O estudo da correlação entre as variáveis ecocardiográficas e os níveis de BNP e MMP foi feito pelo teste de Spearman. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo software SAS 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina).

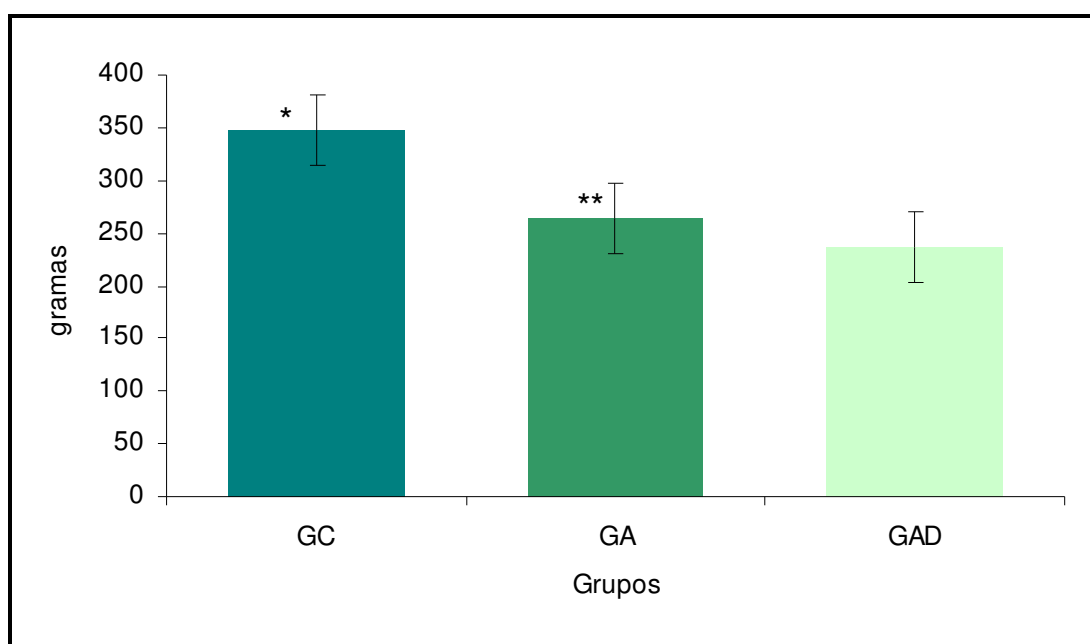
## **RESULTADOS**

---



## Características Clínicas

Observamos nos grupos submetidos ao modelo experimental animais mais prostrados, com alguma perda na pelagem e mais passivos na gaiola. Objetivamente, o peso dos animais dos diferentes grupos era semelhante no início do protocolo. No final, houve diferença de peso entre os animais dos diferentes grupos, sendo os do GC com maior peso ( $347 \pm 38$ g), os do GA com peso médio intermediário ( $263 \pm 40$ g), e os animais do GAD com menor peso ( $236 \pm 27$ g) ( $p=0,0001$ ) (Figura 1).



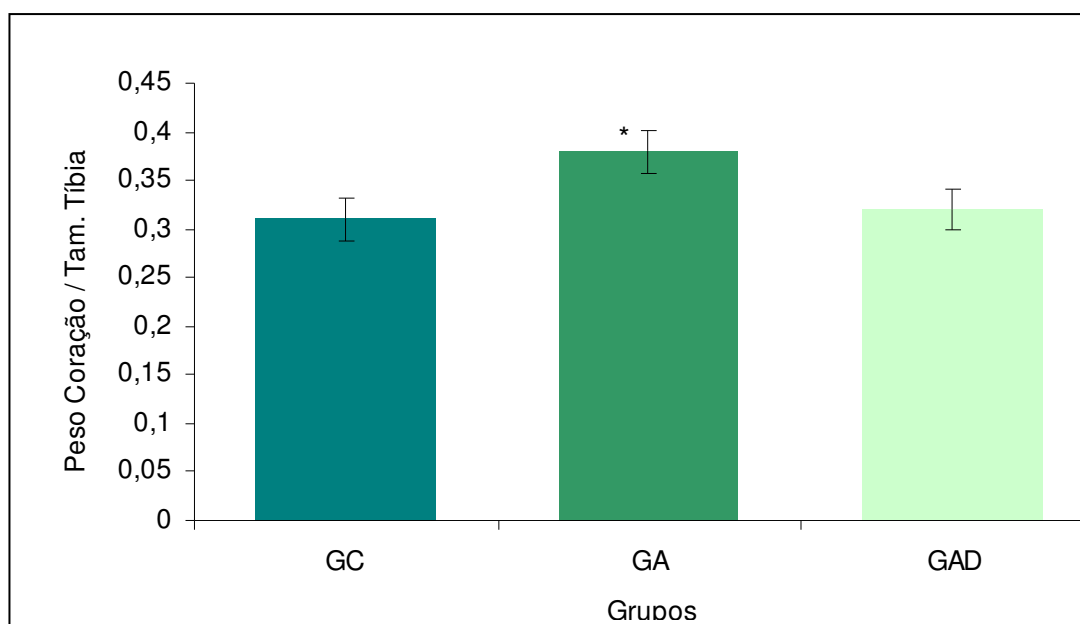
**Figura 1** - Peso final médio dos animais. \* $p=0,0001$  GC vs GA e GAD e \*\* $p<0,0001$  GA vs GAD

## **Digitoxinemia**

Para garantir que os animais ingerissem alimentação suficiente para atingir digitoxinemia sérica compatível com o descrito na literatura, optou-se por dosar o nível sérico de digitoxina nos animais tratados. Verificou-se que a digitoxinemia sérica média era de  $37 \pm 15$  ng/ml. Estes níveis são compatíveis com os descritos na literatura e com o modelo utilizado neste estudo.<sup>37</sup>

## **Remodelamento Cardíaco**

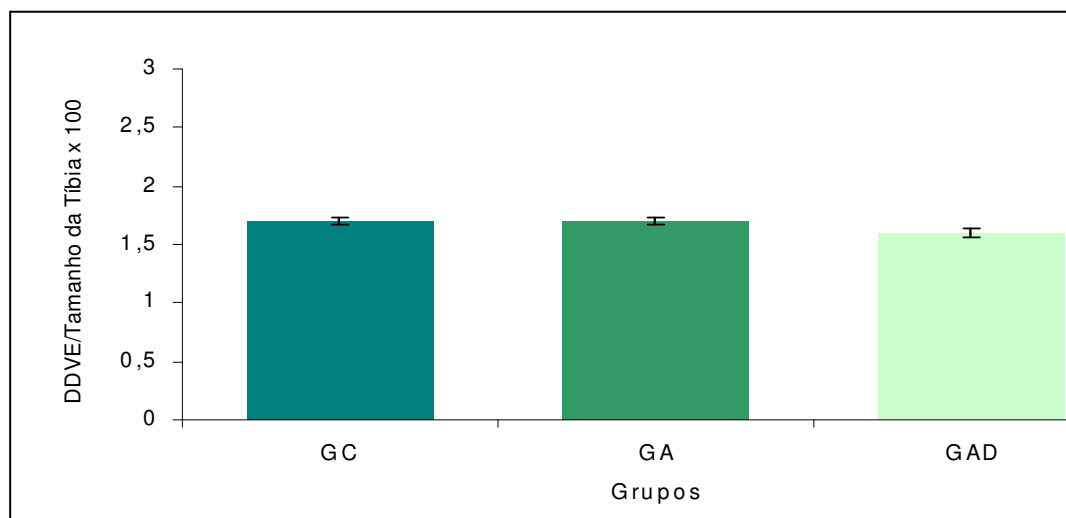
Utilizou-se o peso do coração e sua razão sobre o tamanho da tibia para uma avaliação grosseira do remodelamento miocárdico. Foi observado que o peso desse órgão apresentou diferença estatisticamente significativa, pois os corações dos animais dos grupos GC e GAD têm menor peso quando comparados ao GA (GC:  $1,21 \pm 0,18$ g; GA:  $1,4 \pm 1,14$ g; GAD:  $1,14 \pm 0,11$ g;  $p = 0,0001$ ). De forma semelhante, a razão do peso do coração pela tibia também mostrou diferença estatística significativa, apresentando o GA índice aumentado em relação aos demais grupos (GC:  $0,31 \pm 0,04$  g; GA:  $0,38 \pm 0,04$  g; GAD:  $0,32 \pm 0,03$  g;  $p = 0,0001$ ) (Figura 2).



**Figura 2** - Razão do peso do coração sobre o tamanho da tíbia (\*p = 0,0001 GA vs GC e GAD)

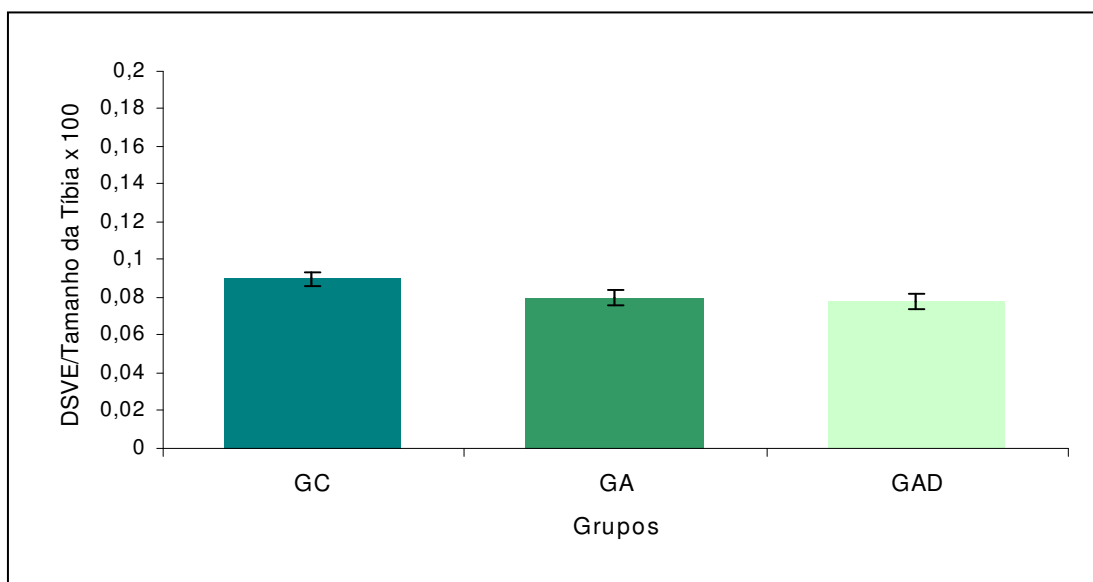
Também foram utilizadas para a análise do remodelamento cardíaco, variáveis ecocardiográficas como diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo, indexados pelos tamanhos das tíbias dos animais x100, a espessura relativa de parede (ERP), a espessura diastólica do septo interventricular (SIVDIA) indexada pelo tamanho das tíbias dos animais x100 e a massa do ventrículo esquerdo (MVE).

Os animais apresentavam os seguintes diâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo no momento inicial, GC:  $0,52 \pm 0,07$ cm; GA:  $0,49 \pm 0,05$  cm; GAD:  $0,48 \pm 0,06$  cm ( $p=0,13$ ); observamos que a razão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo tamanho da tíbia x100 ao final do estudo também não teve diferença estatística (GC:  $0,17 \pm 0,01$ ; GA:  $0,17 \pm 0,1$ ; GAD:  $0,16 \pm 0,03$ ;  $p=0,19$ ) (Figura 3).



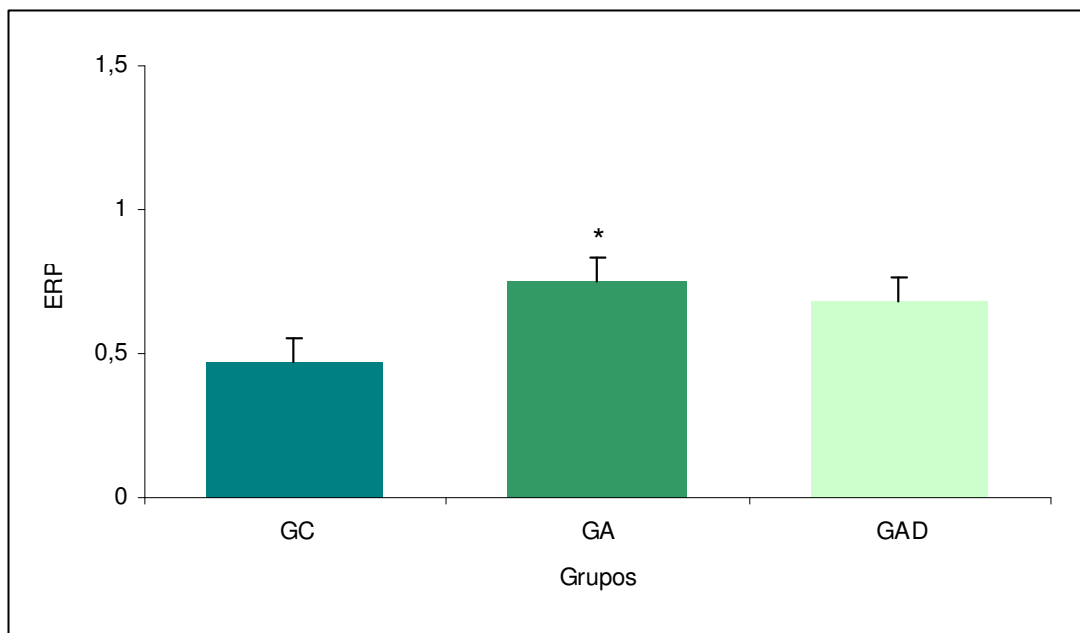
**Figura 3** - Razão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) sobre o tamanho da tíbia ( $p=0,19$ )

Ao final do estudo, o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo indexado também não mostrou diferença na comparação entre os grupos (GC:  $0,09 \pm 0,01$ ; GA:  $0,08 \pm 0,02$ ; GAD:  $0,07 \pm 0,03$ ;  $p=0,21$ ) (Figura 4).

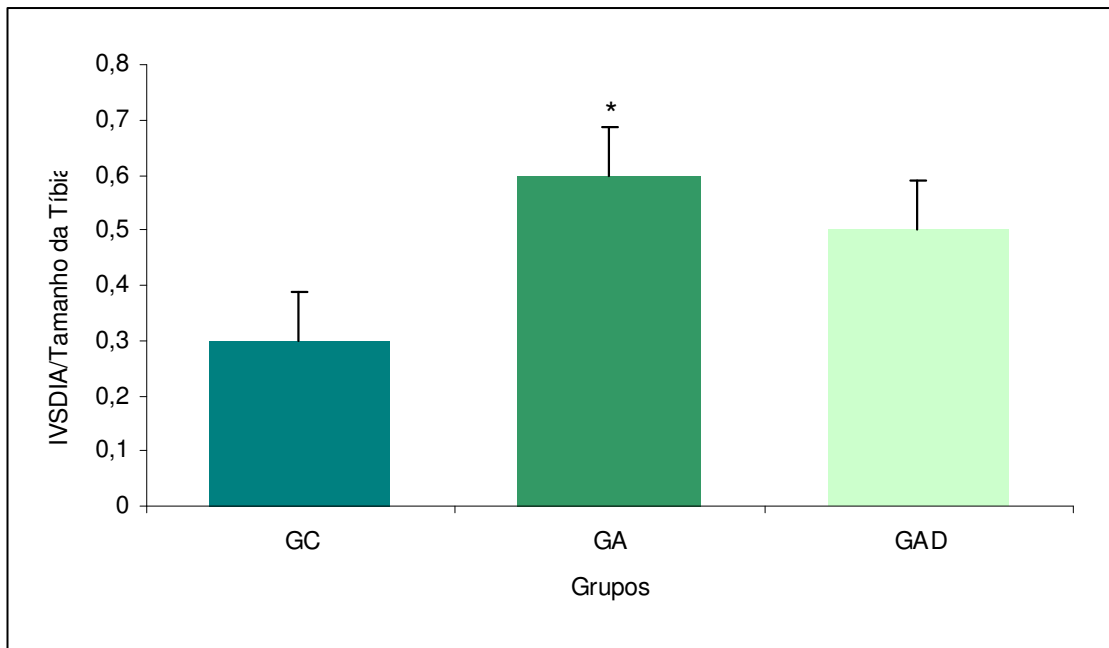


**Figura 4** - Razão do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) sobre o tamanho da tíbia ( $p=0,21$ )

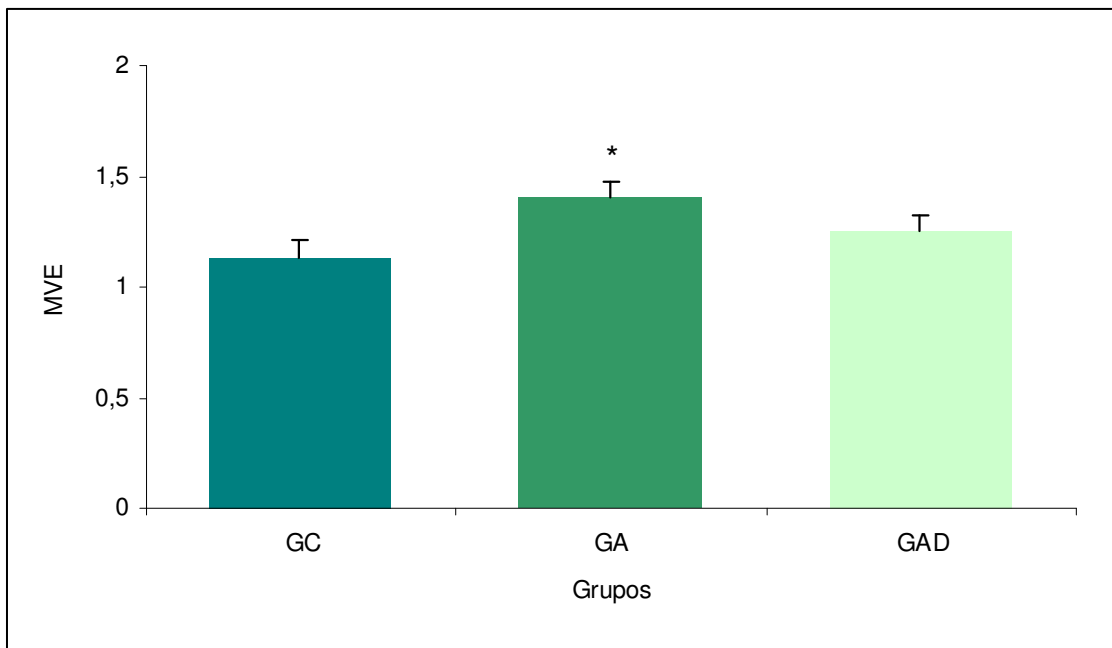
A análise da ERP no momento inicial não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,33$ ), entretanto, no final o GA apresentava espessura maior que os outros dois grupos (GC:  $0,47 \pm 0,07$ ; GA:  $0,75 \pm 0,22$ ; GAD:  $0,68 \pm 0,15$ ;  $p=0,001$ ). O mesmo padrão ocorreu ao analisarmos a SIVDIA indexado pelo tamanho da tíbia dos animais (GC:  $0,3 \pm 0,04$ ; GA:  $0,6 \pm 0,07$ ; GAD:  $0,5 \pm 0,09$ ;  $p=0,001$ ) e a MVE (GC:  $1,13 \pm 0,08$  g; GA:  $1,4 \pm 0,14$  g; GAD:  $1,25 \pm 0,1$  g;  $p=0,001$ ). (Figuras 5, 6,7).



**Figura 5** – Espessura relativa de parede (ERP) final. (\* $p= 0,001$  GA vs GC e GAD)



**Figura 6** – Relação SIVDIA/Tamanho da Tíbia (\*p= 0,001 GA vs GC e GAD)

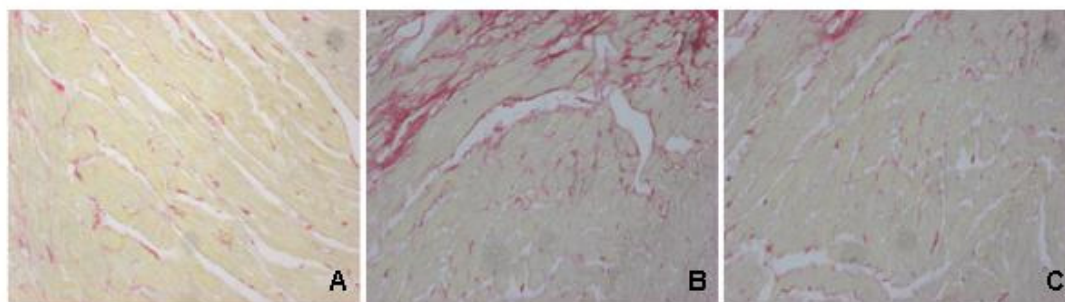


**Figura 7** – Massa do ventrículo esquerdo (MVE) ao ecocardiograma final (\*p=0,001 GA vs GC e GAD)

A quantificação da FVCI demonstrou maior acúmulo de colágeno no interstício dos animais do GA, com diferença estatisticamente significativa entre este grupo, quando comparado ao GC e ao GAD. A quantificação da FVCI no miocárdio do ventrículo direito também mostrou diferença estatisticamente significativa entre o GA e os demais grupos. Ainda, a quantificação da FVCI e FVCP também mostrou diferença estatística entre o grupo GA quando comparado aos GC e GAD (tabela 1) (Figura 8).

**Tabela 1** - Fração do volume de colágeno intersticial nos ventrículos esquerdo, direito e perivascular dos animais sacrificados no final do experimento

	Grupos			P
	Controle	GA	GAD	
<b>Ventrículo esquerdo</b> %	1,38 ± 0,69	4,26 ± 1,70*	2,17 ± 1,36	*p<0,001
<b>Ventrículo direito</b> %	2,24 ± 1,15	4,39 ± 2,37*	2,55 ± 1,21	*p = 0,002
<b>Perivascular</b> %	3,48 ± 0,96	4,59 ± 1,12*	3,38 ± 1,31	*p < 0,001

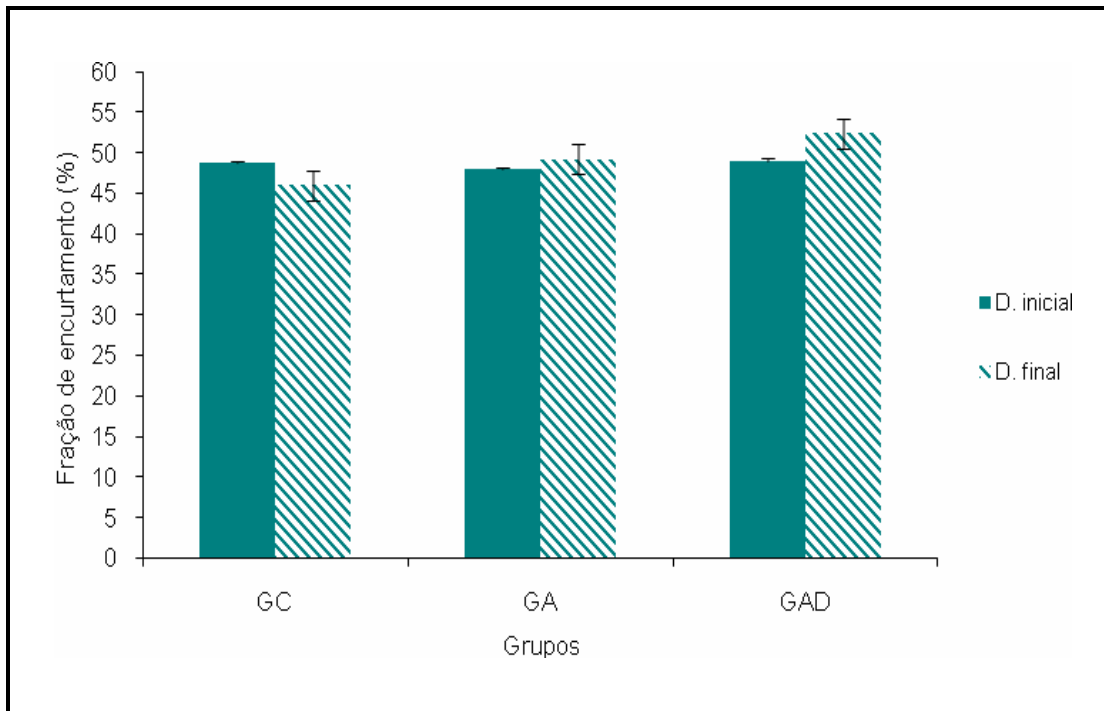


**Figura 8** - Fotomicrografia do miocárdio corado com *picrosirius red* (10X): em vermelho o colágeno  
**A** – grupo controle; **B** – grupo aldosterona; **C** – grupo aldosterona digitoxina

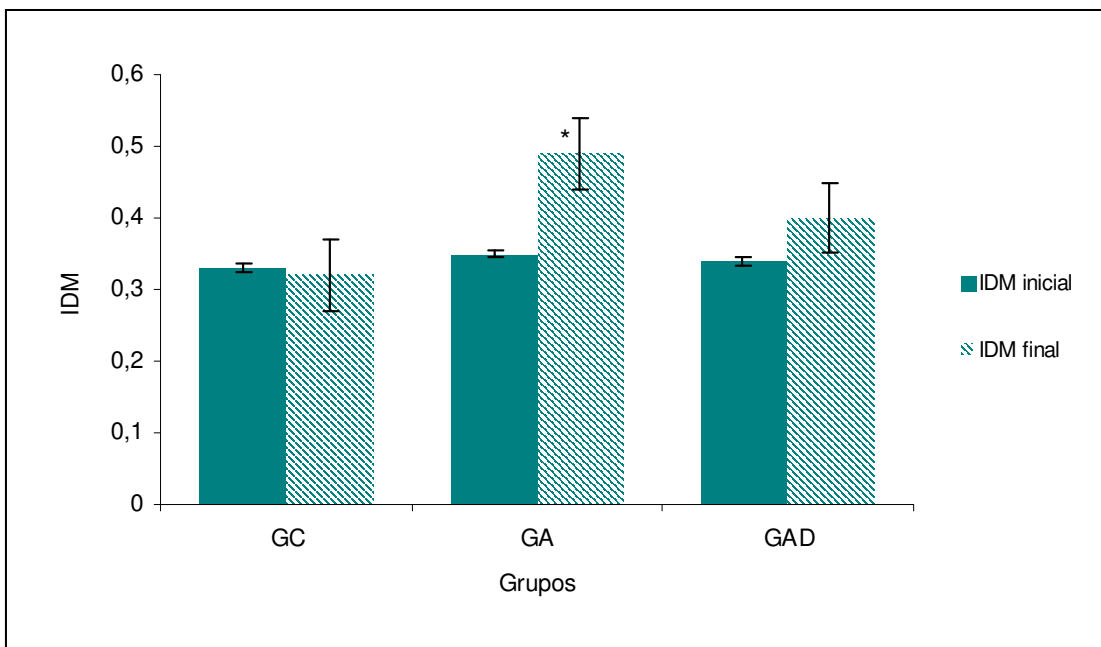
### Função Cardíaca

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada pela fração de encurtamento ( $\Delta D$ ). No início do estudo, não houve diferença estatística entre os grupos. O exame realizado no final do estudo também não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando analisada a  $\Delta D$  (Figura 9). Para avaliar a função global do ventrículo esquerdo usamos o índice de desempenho miocárdico (IDM) que, no momento inicial, não mostrou diferença entre os grupos (GC:  $0,33 \pm 0,10$ ; GA:  $0,34 \pm 0,08$ ; GAD:  $0,35 \pm 0,09$ ;  $p = 0,68$ ). Este índice mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no ecocardiograma final (GC:  $0,32 \pm 0,06$ ; GA:  $0,49 \pm 0,08$ ; GAD:  $0,40 \pm 0,13$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 10).



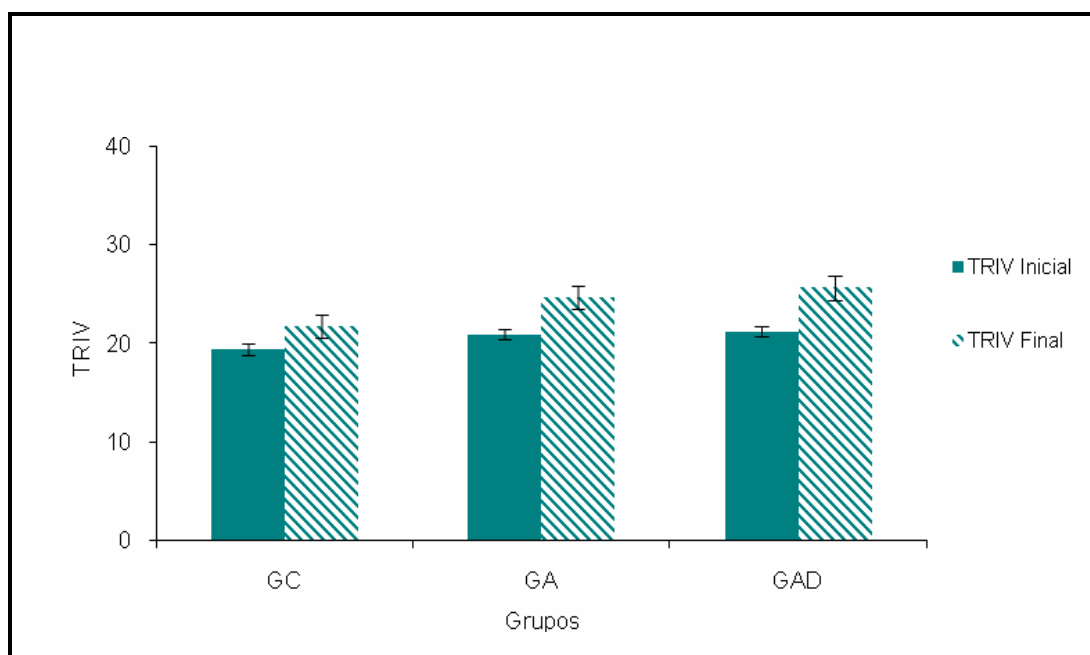


**Figura 9** - Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ( $\Delta D$ ) ( $p=0,91$  inicial e  $p= 0,19$  final)

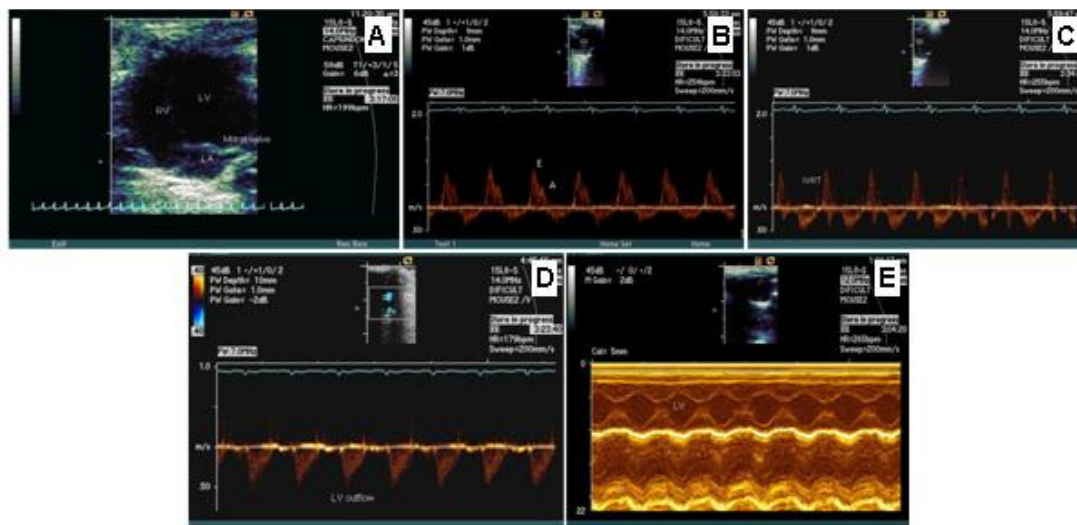


**Figura 10** - Índice de desempenho miocárdico (IDM) (\* $p=0,001$  GAD vs GA e GC)

A análise da função diastólica do ventrículo esquerdo foi feita pelo tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido), que revelou não haver diferenças significativas entre os grupos nos ecocardiogramas realizados (Figura 11).



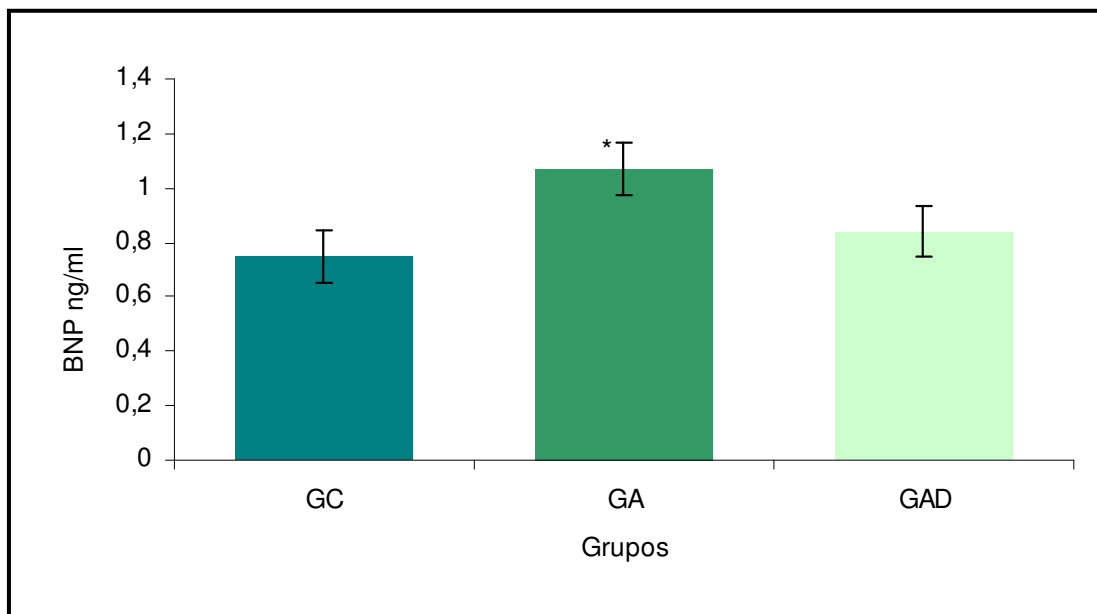
**Figura 11** -Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido)



**Figura 12-** (A) Corte para-esternal em eixo curto do ventrículo esquerdo; (B) Doppler pulsátil do fluxo mitral mostrando ondas E (relaxamento precoce) e A (sístole atrial); (C) Doppler pulsátil mostrando o tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; (D) Doppler pulsátil mostrando o tempo de ejeção do ventrículo esquerdo; (E) Modo M do ventrículo esquerdo.

### Quantificação dos Níveis Séricos de Peptídeo Natriurético Tipo B (BNP)

O BNP foi quantificado no sangue coletado dos animais ao final do estudo e comparado entre os grupos. O GC apresentou níveis séricos médios de  $0,75 \pm 0,19$  ng/ml, o GA apresentou  $1,07 \pm 0,32$  ng/ml e o GAD apresentou  $0,84 \pm 0,21$  ng/ml. A diferença entre os níveis encontrados nos grupos GAD e GC comparados ao GA é estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ), e a diferença entre os grupos GAD e GC não é estatisticamente significativa. (Figura 13)



**Figura 13** -Níveis séricos de BNP (\*p= 0,01 GA vs GC e GAD)

### Quantificação de Metaloproteinases (MMP) por Zimografia

Constataram-se maiores níveis de MMP nos corações do GA ( $3480 \pm 2017$  U/A), seguido pelos níveis no grupo GAD ( $2557 \pm 1637$  U/A) e os níveis no grupo GC ( $2401 \pm 1218$  U/A). No entanto, essas diferenças não apresentaram significância estatística (Figuras 14 e 15).

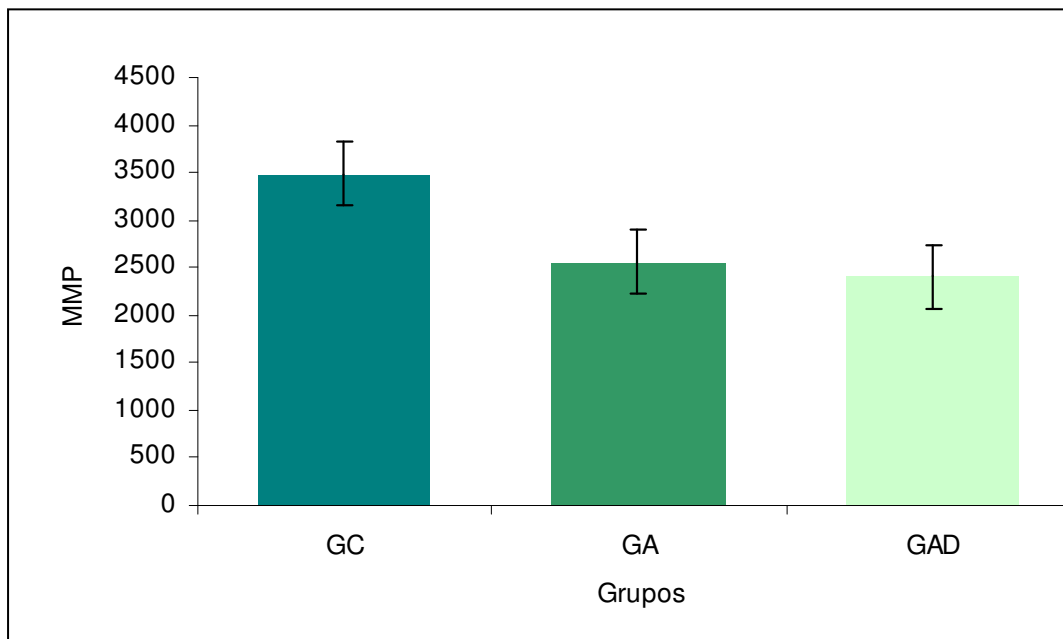


Figura 14 -Quantificação de MMP

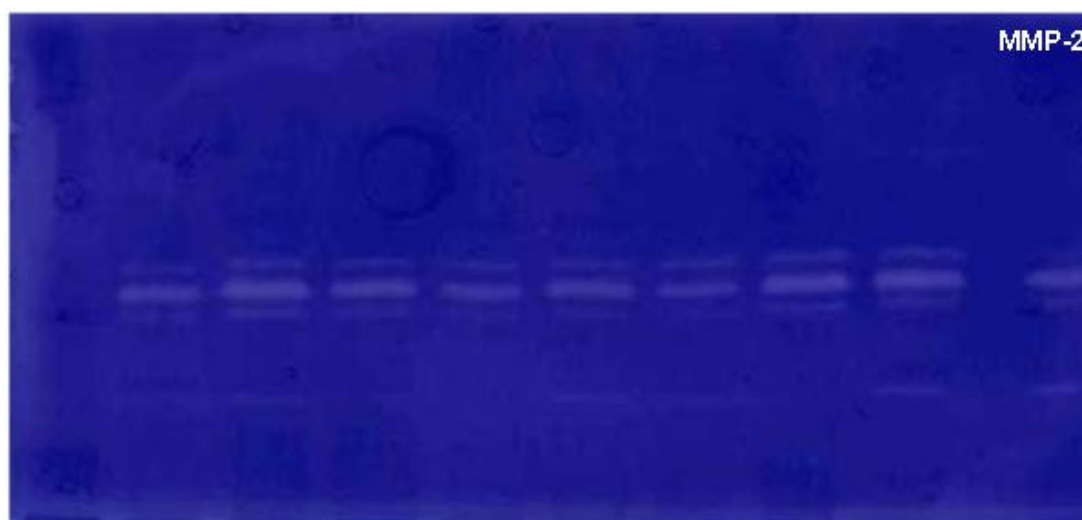
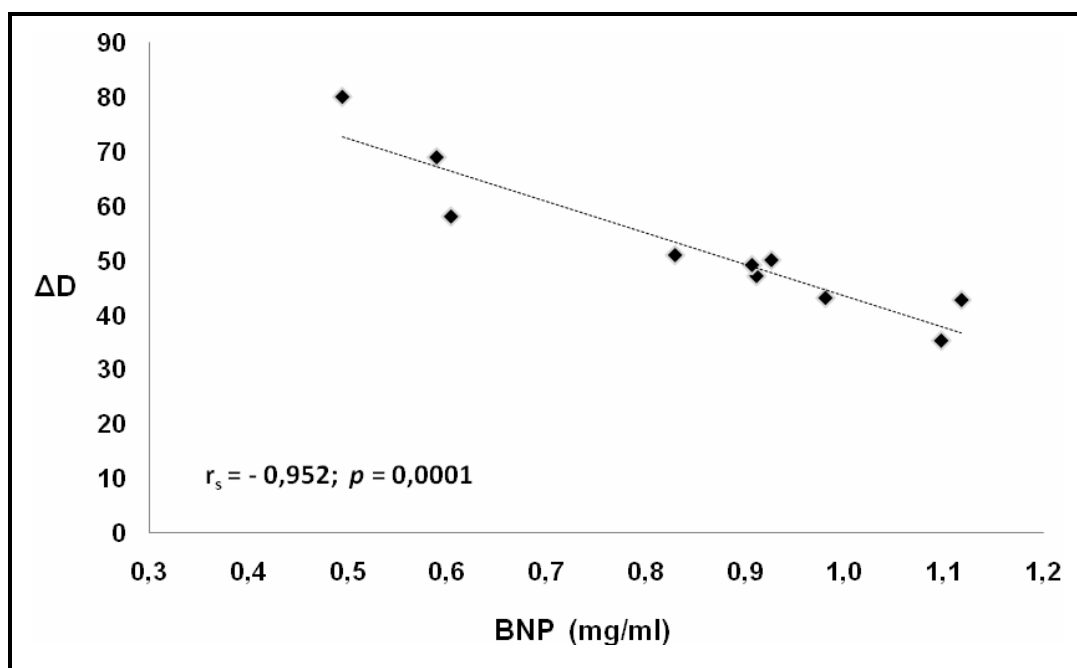


Figura 15 -Gel para quantificação de MMP (bandas claras)

## Correlações

Foi verificada uma correlação inversa entre o  $\Delta D$  e os níveis de BNP ( $r=0,95$ ;  $p=0,0001$ ) no GAD (Figura 16). Nesse grupo de animais um melhor  $\Delta D$  esteve relacionado a menores concentrações de BNP. Não foram encontradas outras correlações entre parâmetros funcionais medidos no ecocardiograma e níveis de BNP e de MMP.



**Figura 16** -Correlação entre BNP e  $\Delta D$  no GAD

## **DISCUSSÃO**

---

Vários estudos<sup>4-6</sup> demonstraram o benefício do uso do digital no cenário da disfunção ventricular. O digital comprovou-se benéfico na modulação neuro-hormonal<sup>8-9</sup>, na melhora do desempenho ventricular<sup>10</sup>, e na melhora de sintomas e hospitalizações<sup>32</sup>, entretanto, não fica claro na literatura o seu papel na modulação da fibrose miocárdica. O presente estudo foi desenhado para avaliarmos em um modelo experimental se o digital, por suas ações diretas e/ou indiretas, é capaz de modular a deposição do colágeno intersticial miocárdico bem como o perivascular. Vale ressaltar que a concentração de colágeno intersticial e perivascular influencia o prognóstico de pacientes com disfunção ventricular<sup>30</sup>. A influência do digital no acúmulo dessa proteína pode ter um papel central não só como fármaco inotrópico positivo, mas também como um modulador da fibrose miocárdica. Nesse contexto, Turto<sup>40</sup> demonstrou que ratos tratados com digital apresentaram menores níveis de prolina quando comparados com placebo, em um modelo animal de sobrecarga de pressão por constrição da aorta, o que sugere uma atenuação na formação de colágeno e desenvolvimento de fibrose. A prolina é um dos principais compostos do colágeno. Apesar disso, poucos estudos experimentais vêm analisando o papel do digital e os cenários apropriados a sua utilização.

No presente estudo a análise do peso corpóreo dos animais ao final do protocolo mostrou que o GC apresentava animais de maior peso, seguido pelos animais do GA, sendo os animais de menor peso os do GAD. Uma possível explicação para esse achado é o fato de que no GC os



animais não foram manipulados e estavam hígidos. Os animais do GA e GAD foram submetidos a procedimentos cirúrgicos já descritos que acarretam dor, inflamação, diminuição da ingestão de alimentos e aumentam o catabolismo. Quando avaliamos os pesos dos animais do GA e do GAD verificamos que os animais do GAD apresentaram pesos médios menores ( $p=0,001$ ), o que se explica pela resposta que os animais desse grupo apresentaram à administração de digitoxina ficando, provavelmente, com menor congestão e menor peso. Nossos dados sobre o efeito da digitoxina sobre a função cardíaca corroboram essas afirmações. O IDM foi maior no GA mostrando que esses animais sofreram um comprometimento mais severo da função cardíaca global. Quando comparamos os demais dados verificamos que os animais do GAD têm desempenho cardíaco pelo IDM melhor que o dos animais do GA e comparáveis aos do GC, pois a digitoxina provavelmente agiu melhorando o desempenho do coração, diminuindo a congestão e o peso dos animais. Comportamento semelhante foi detectado ao dosarmos o BNP. Os animais do GA apresentaram níveis séricos superiores aos dos demais grupos ( $p=0,001$ ), enquanto não houve diferença estatística entre os animais do GC e GAD. Esses dados confirmam os resultados de um estudo em humanos que revela redução nos níveis de BNP plasmáticos após administração de digital. O BNP é um biomarcador que está diretamente relacionado à gravidade da disfunção cardíaca. É inicialmente liberado no ventrículo esquerdo em resposta à sobrecarga de pressão e de volume. Ainda pelos nossos dados, uma melhor função

ventricular, avaliada pelo  $\Delta D$  (fração de encurtamento), esteve correlacionada a menores níveis de BNP no GAD ( $r=0,95$ ;  $p=0,0001$ ). A análise do TRIV corrigido não demonstrou diferença estatística entre os grupos, sugerindo que o digital possa não ter influenciado na função diastólica cardíaca neste modelo ou pelo período deste protocolo.

Para termos maior certeza sobre a digitalização dos animais, apesar do modelo de administração do fármaco já ser previamente validado, optamos pela dosagem dos níveis séricos de digitoxinemia. Encontramos níveis séricos compatíveis com os descritos na literatura e capazes de digitalizar os animais<sup>37</sup>.

Muitos estudos na literatura demonstram a importância da ativação neuro-hormonal<sup>7,21,22,34</sup> que ocorre na disfunção ventricular e no remodelamento estrutural do coração. É íntima a relação do sistema renina-angiotensina-aldosterona com a modulação da deposição de colágeno intersticial miocárdico em ambos os ventrículos. Estudos com angiotensina II<sup>41</sup>, bradicinina<sup>42</sup> e endotelina<sup>43</sup> também demonstraram suas relações com a fibrose intersticial miocárdica. Além dos efeitos sistêmicos, os efeitos autócrinos e parácrinos da angiotensina II e da bradicinina foram documentados como determinantes de fibrose. Complementarmente aos estudos que analisaram as inter-relações fisiopatológicas entre esses hormônios e a fibrose miocárdica, outros foram desenvolvidos comprovando que o antagonismo do sistema renina-angiotensina-aldosterona promove a atenuação da deposição do colágeno intersticial miocárdico. A literatura,

então, deixou claro como esses hormônios agem e como os medicamentos que os antagonizam atenuam suas ações. Matsubara e col apresentaram recentemente resultados de dois estudos experimentais. O primeiro<sup>44</sup> é com um modelo de infusão de aldosterona, no qual os autores comprovam a atenuação da inflamação, necrose e fibrose intersticiais miocárdicas pela administração de um bloqueador dos canais de cálcio (Felodipina). O outro<sup>45</sup> estudo foi realizado com infusão de angiotensina II demonstrando o efeito protetor que um bloqueador dos receptores  $\beta$  (Carvedilol) teve em também reduzir inflamação, necrose e fibrose intersticiais miocárdicas. Ainda no campo da modulação neuro-hormonal, alguns estudos foram conduzidos para avaliar o papel que o digital tem nesta modulação na disfunção ventricular. Estes dados indicam que o digital modula direta e/ou indiretamente tanto o sistema renina-angiotensina-aldosterona, por influir na renina e aldosterona circulantes, quanto por influir na ativação simpática que se encontra desbalanceada na disfunção ventricular<sup>24-26</sup>. Entretanto, pouco existe correlacionando esta modulação exercida pelo digital com uma possível atenuação da fibrose miocárdica. Em nosso estudo, a digitoxina mostrou-se capaz de reduzir a fração de volume de colágeno intersticial e perivascular no miocárdio, além de melhorar a função cardíaca global. A análise dos dados que refletem o processo de remodelamento estrutural cardíaco apontam para importantes achados. De forma mais grosseira, usamos o peso absoluto dos corações, bem como seu valor indexado pela tibia dos animais, para uma análise inicial. O peso absoluto dos corações,

bem como o indexado pelas túbias do GA, é maior em média que os do GC e GAD. Estes dados indicam que o digital promoveu uma atenuação no remodelamento estrutural do coração. Por fim, a maior FVCI e FVCP no GA se comparado aos GC e GAD (que não diferiram entre si) demonstram de forma clara que a digitoxina promoveu a atenuação da fibrose intersticial e perivascular miocárdicas. Este dado traz a possibilidade de aprofundarmos os estudos com digital no cenário da disfunção ventricular, pois demonstra a influência direta da digitoxina na deposição do colágeno intersticial e perivascular miocárdicos. A relevância de comprovação da influência do digital na dinâmica de deposição de colágeno se evidencia em estudos clínicos<sup>46</sup>. Estudos clínicos e básicos também demonstram a influência que a ativação neuro-hormonal crônica presente na disfunção ventricular tem sobre o remodelamento geométrico do coração. O desequilíbrio neuro-hormonal leva a um processo, conseqüente às alterações estruturais, de progressiva mudança na estrutura das cavidades cardíacas, levando inicialmente a uma disfunção diastólica que é seguida de disfunção sistólica, não exclusivamente pelas alterações estruturais cardíacas, mas também pela perda da geometria cardíaca. A modulação, bem como o antagonismo dos hormônios envolvidos no desbalanço neuro-hormonal ao qual nos referimos, também é atenuante deste processo de remodelamento geométrico cardíaco. Manicucci e col<sup>47</sup> em um estudo experimental com modelo de infarto em rato demonstram isso de forma bastante contemporânea. Dados ecocardiográficos obtidos no nosso estudo (DDVE e

DSVE) não permitem afirmar que houve dilatação do coração dos animais, entretanto, parte dos estudos na literatura demonstra que a dilatação cardíaca neste modelo por nós utilizado inicia-se pela décima semana, enquanto que a fibrose miocárdica ocorre já na quarta semana. Dessa forma, nossos dados são similares aos da literatura. Apesar de não ter havido dilatação, pois o tempo do nosso protocolo foi de seis semanas, outros dados sugerem que o digital atenuou o remodelamento geométrico do coração. A ERP é menor no GC tal como a SIVDIA e a MVE quando comparados aos dados dos GA e GAD. Mais uma vez não há diferenças estatísticas entre os dados do GC e do GAD indicando que o digital colaborou na preservação da MVE, da espessura do septo interventricular (SIVDIA) e da ERP, medida objetiva de remodelamento geométrico.

No presente estudo, a administração de digitoxina não influenciou as concentrações de MMP. Apesar disso, a quantificação de MMP no tecido cardíaco apresentou diferenças entre os 3 grupos. Em ordem decrescente, maiores níveis de MMP foram detectados nos corações do GA ( $3480 \pm 2017$  U/A), seguido dos níveis no GAD ( $2557 \pm 1637$  U/A), seguido de menores níveis no GC (controle) ( $2401 \pm 1218$  U/A). Apesar das diferenças evidenciadas, estas não alcançaram significância estatística (Figuras 14 e 15). Nossos dados são compatíveis com os da literatura. A partir do modelo de constrição de aorta em ratos<sup>48</sup>, foram observados níveis de MMP-2 e de TIMP-2 aumentados, acompanhada da hipertrofia miocárdica por sobrecarga de pressão após 8 semanas. Aliado a isso, essas

alterações estiveram associadas ao acometimento funcional do ventrículo esquerdo desses ratos. Retirando-se a constrição aórtica em ratos com hipertrofia miocárdica por sobrecarga de pressão, ocorre a normalização dos níveis MMP-2, apesar de persistirem elevados os níveis de colágeno. Outros estudos da literatura discutem a influência que a MMP tem na deformação do coração, podendo o seu papel, no desbalanço do metabolismo do colágeno intersticial miocárdio encontrado nos cenários de disfunção ventricular, ser relevante para o remodelamento geométrico e estrutural deste coração. Nossos dados sugerem o mesmo caminho, visto que os maiores níveis de MMP foram encontrados no GA, com os corações mais remodelados, conforme os dados já discutidos.

O digital tem sido utilizado na prática clínica há mais de 200 anos, tendo sido introduzido praticamente sem uma base experimental em estudos de animais, portanto, é extremamente importante o retorno ao laboratório de ciência básica para estudá-lo à luz dos novos conceitos sobre insuficiência cardíaca e das modernas tecnologias de análise imuno-histoquímica e de biologia molecular. Estes estudos permitirão uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação do digital abrindo novas oportunidades na compreensão da fisiopatologia da disfunção ventricular e nas formas de atenuá-la, impedi-la ou de promover sua regressão. Nosso estudo deixa claro o papel do digital como modulador da deposição do colágeno intersticial miocárdico e outros estudos devem ser realizados com

outras metodologias para aprofundar este conhecimento bem como para analisar a aplicação clínica de tal informação.

## CONCLUSÕES

---



Neste modelo experimental de fibrose miocárdica:

- 1- a digitoxina atenuou o remodelamento estrutural intersticial e perivascular do miocárdio
- 2- a digitoxina confirmou sua função na melhora da função global do coração
- 3- a administração de digitoxina não influenciou a dinâmica de degradação do colágeno
- 4- existiu correlação entre a função ventricular esquerda com os níveis de BNP no grupo de animais tratados com digitoxina.

## LIMITAÇÕES DO ESTUDO

---

- 1- A precisa avaliação da função sistólica isolada do coração ficou prejudicada visto que os animais não desenvolveram disfunção ventricular significativa ao ecocardiograma.
- 2- O tempo do estudo não permitiu a maior dilatação ventricular limitando, portanto, a análise do papel do digital nesse cenário.
- 3- A utilização exclusiva do TRIV como parâmetro de função diastólica limitou a análise dessa função.

## REFERÊNCIAS

---

1. Andersson B, Waagstein F. Spectrum and outcome of congestive heart failure in a hospitalized population. *Am Heart J.* 1993;126:632-40.
2. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22:6A-13A.
3. May CW, Diaz MN. The role of digoxin in the treatment of heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008;1:206-7.
4. Hood WB, Youngblood M; Ghali JK, Reid M, Rogers WJ, Howe D, Teo KK, LeJemtel TH. Initial blood pressure response to enalapril in hospitalized patients (SOLVD). *Am J Cardiol.* 1991;68:1465-8.
5. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality of patients with symptomatic heart failure: randomized trial – the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000;355:1582-7.
6. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001;344:1651-8.
7. Diez J, Laviades C. Monitoring fibrillar collagen turnover in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res.* 1997;35:202-5.

8. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1984;311:819-23.
9. Covit AB, Schaer GL, Sealey JE, Laragh JH, Cody RJ. Suppression of the renin-angiotensin system by intravenous digoxin in chronic congestive heart failure. *Am J Med*. 1983;75:445-7.
10. Ribner HS, Plucinski DA, Hsieh AM, Bresnahan D, Molteni A, Askenazi J, Lesch M. Acute effects of digoxin on total systemic vascular resistance in congestive heart failure due to dilated cardiomyopathy: a hemodynamic-hormonal study. *Am J Cardiol*. 1985;56:896-904.
11. Mays PK, Bishop JE, Laurent GJ. Age-related changes in the proportion of types I and III collagen. *Mech Ageing Dev*. 1988;45:203-12.
12. Medugorac I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol*. 1982;77:589-98.
13. Mukherjee D, Sen S. Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1990;67:1474-80.
14. Mukherjee D, Sen S. Alteration of cardiac collagen phenotypes in hypertensive hypertrophy: role of blood pressure. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:185-96.

15. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res*. 1988;62:757-65.
16. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest*. 1982;46:158-64.
17. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1281-92.
18. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;30:604-10.
19. Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res*. 2000;41:605-12.
20. Ramires FJ, Sun Y, Weber KT. Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:475-83.
21. Gheorghide M, St Clair J, St Clair C, Beller GA. Hemodynamic effects of intravenous digoxin in patients with severe heart failure initially treated with diuretics and vasodilators. *J Am Coll Cardiol*. 1987;9:849-57.

- 
22. Cohn K, Selzer A, Kersh ES, Karpman LS, Goldschlager N. Variability of hemodynamic responses to acute digitalization in chronic cardiac failure due to cardiomyopathy and coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1975;35:461-8.
  23. Mason DT, Braunwald E. Studies on digitalis X effects of ouabain on forearm vascular resistance and venous tone in normal subjects and in patients in heart failure. *J Clin Invest.* 1964;43:532-43.
  24. Ahmed A, Rich MW, Love TE, Lloyd-Jones DM, Aban IB, Colucci WS, Adams KF, Gheorghide M. Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in heart failure: a comprehensive post hoc analysis of the DIG trial. *Eur Heart. J* 2006;27:178-86.
  25. Williams MH Jr, Zohman LR, Ratner AC. Hemodynamic effects of cardiac glycosides on normal human subjects during rest and exercise. *J Appl Physiol.* 1958;13:417-21.
  26. Corbalan R, Jalil J, Chamorro G, Casanegra P, Valenzuela P. Effects of captopril versus milrinone therapy in modulating the adrenergic nervous system response to exercise in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1990;65:644-9.
  27. Daggett WM, Weisfeldt ML. Influence of the sympathetic nervous system on the response of the normal heart to digitalis. *Am J Cardiol.* 1965;16:394-405.



- 
28. Ferguson DW, Berg WJ, Sanders JS, Roach PJ, Kempf JS, Kienzle MG. Sympathoinhibitory responses to digitalis glycosides in heart failure patients. Direct evidence from sympathetic neural recordings. *Circulation*. 1989;80:65-77.
  29. Arnold SB, Byrd RC, Meister W, Melmon K, Cheitlin MD, Bristow JD, Parmley WW, Chatterjee K. Long-term digitalis therapy improves left ventricular function in heart failure. *N Engl J Med*. 1980;303:1443-48.
  30. Mady C, Ianni BM, Arteaga E, Montes GS, Caldini EG, Andrade G, Giorgi MC, Saldiva PH. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am J Cardiol*. 1999;84:354-6.
  31. Swedberg K. Is neurohormonal activation deleterious to the long-term outcome of patients with congestive heart failure? II. Protagonist's viewpoint. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:550-4.
  32. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *N Engl J Med*. 1997;336:525-33.
  33. II Diretrizes para o diagnóstico e tratamento da Insuficiência Cardíaca da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(Sup IV):1-30.

34. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147:325-38.
35. Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals. Office of Laboratory Animal Welfare. Disponível em: <http://www.grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>; 2002.
36. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: [http://www.cobea.org.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=55&Itemid=69](http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=69).
37. Helber I, Kanashiro RM, Alarcon EA Jr, Antonio EL, Tucci PJ. A novel inexpensive murine model of oral chronic digitalization. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:365-6.
38. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr.* 2005;6:41-6.
39. Hollander M, Wolf DA. *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons; 1973:114-37.
40. Turto H. Collagen metabolism in experimental cardiac hypertrophy in the rat and the effect of digitoxin treatment. *Cardiovasc Res.* 1977;11:358-66.

- 
41. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data. *News Phus Sci.* 1991;6:227-32.
42. Baumgarten CR, Linz W, Kunkel G, Scholkens BA, Wiemer G. Ramaprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br J Pharmacol.* 1993;108:293-5.
43. Tonnessen T, Christensen G, Naess PA, Offstad J, Ilebekk A. Endothelin is released from the porcine heart after 10 minute coronary artery occlusion. *Circulation.* 1993;86 (Suppl I):I-430.
44. Matsubara BB, Franco M, Janicki JS, Matsubara LS. Effect of felodipine on myocardial and renal injury induced by aldosterone-high salt hypertension in uninephrectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:506-14.
45. Vailati M do C, Rocha NS, Matsubara LS, Padovani CR, Schwartz DS, Matsubara BB. Protective effects of carvedilol on systemic vascular damage induced by angiotensin II: organ-specific effects independent of antihypertensive effects. *Med Sci Monit.* 2010;16:BR6-10.
46. Arteaga E, Araújo AQ, Bernstein M, Ramires FJ, Ianni BM, Fernandes F, Mady C. Prognostic value of the collagen volume fraction in hypertrophic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92:210-20.

47. Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Zornoff LA. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2010;Sep 24. pii: S0066-782X2010005000130. [Epub ahead of print].
48. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87:1285-342.S