

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências
Departamento de Educação Física
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCAR/UNESP

**INFLAMAÇÃO MIOCÁRDICA: PAPEL DA DEXAMETASONA E DO RAMIPRIL
NO REMODELAMENTO CARDÍACO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA.**

Aluna: Ms. Francine Duchatsch Ribeiro de Souza

Orientadora: Profa. Assoc. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Bauru
Abril 2023

Francine Duchatsch Ribeiro de Souza

**INFLAMAÇÃO MIOCÁRDICA: PAPEL DA DEXAMETASONA E DO RAMIPRIL
NO REMODELAMENTO CARDÍACO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara como requisito para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Fisiológicas**.

Orientadora: Profa. Assoc. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Bauru
Abril 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Francine Duchatsch Ribeiro de Souza, realizada em 26/04/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini (USP)

Prof. Dr. Thiago José Dionísio (USP)

Prof. Dr. Katashi Okoshi (UNESP)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Mauro e Patricia, à minha irmã Caroline, à minha vó Marta e ao meu marido Victor, dedico este trabalho que é o resultado dos valores que me foram ensinados. E aos meus avós Geraldo, Alzira, Marcionilo e ao meu cunhado Guilherme (in memorian) dedico este trabalho como forma de eternizar a vida de vocês que foram para mim reflexos de força e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Com o objetivo de se fazer entender esta nota de agradecimentos, gostaria de contextualizar o momento histórico na qual se deu este protocolo. O protocolo experimental deste estudo foi realizado em meio a pandemia da COVID-19, na qual o mundo inteiro paralisou suas atividades para que todos permanecessem em suas casas, ao mesmo tempo que muitas pessoas perdiam seus familiares. O presente manuscrito foi confeccionado diante do luto pelo mundo e pelos meus familiares que faleceram vítimas da COVID-19.

Gostaria de agradecer ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCAR/UNESP e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

Agradeço ao suporte financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, PROCESSO 88887.634304/2021-00).

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP (Campus de Bauru) e aos professores desta instituição, por me proporcionarem uma excelente formação durante a minha graduação e todo o período de minha formação acadêmica que foram realizados nesta universidade.

Aos meus colegas do Laboratório Experimental de Fisiologia do Exercício (LEFEx) pelo convívio diário, pois sem a presença de vocês certamente este processo teria sido mais difícil.

Ao Prof. Dr. Katashi Okoshi (Faculdade de Medicina, UNESP de Botucatu), pela parceria na realização da técnica de ecocardiografia, bem como na construção do conhecimento acerca deste tema. Bem, como agradeço ao Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos (Faculdade de Medicina, UNESP de Botucatu) pela parceria na realização da técnica de cirurgia de estenose aórtica, pelo suporte na manutenção dos animais operados e preparo para o protocolo de ecocardiografia.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e Dr. Thiago José Dionísio (Faculdade de Odontologia, USP de Bauru), pela parceria na realização da técnica de multiplex e suporte no entendimento da mesma.

Em especial, agradeço a minha amiga Danyelle Siqueira Miotto, não somente pela sua amizade, mas também por ser a minha rede de apoio durante todo o meu doutorado. Esteve presente

em todas as idas para São Paulo e Botucatu para a realização do protocolo, bem como me auxiliou nas análises experimentais e fez parte de toda a construção do conhecimento sobre o assunto aqui desenvolvido. Gratidão!

Gostaria de agradecer também a minha amiga Lidieli Pazin Tardelli pela sua amizade. Nos conhecemos no meio científico, porém desde o princípio nossa amizade transcendeu essa barreira e você passou a fazer parte da minha vida. Você foi a minha rede de apoio para que eu conseguisse finalizar este processo. Não me deixou desistir, obrigada!

Gostaria de agradecer a minha orientadora Prof^a. Assoc. Sandra Lia do Amaral Cardoso, por ter confiado a mim não só o seu projeto, mas também seu tempo, pois foi através de anos de muito ensino que me tornei a profissional que sou hoje. Uma vez me perguntaram, qual foi o melhor professor que eu já tive? E eu não precisei pensar muito para responder que você é a melhor professora que já conheci. Espero que você nunca se esqueça que você faz a diferença na vida das pessoas. Serei eternamente grata a você.

Aos meus pais Mauro de Souza Sobrinho e Patricia Mara Duchatsch Ribeiro de Souza. Certamente palavras não seriam suficientes para agradecer todos os valores que me ensinaram e que me fizeram chegar até aqui. Espero ser um dia para o Ben o que vocês são para mim hoje. Amo vocês!

A minha irmã Caroline Duchatsch Ribeiro de Souza, por todo o suporte e esforço para que eu finalizasse o meu doutorado. Você tem sido um exemplo para todos e espero um dia ser um pouquinho do ser humano que se tornou. Te amo!

A minha vó e madrinha Marta Duchatsch Ribeiro, por todo carinho e por ser tão presente nas minhas memórias e na minha vida. Para ela, até hoje vou para a escola e certamente ela não está errada. Te amo vó.

Ao meu eterno namorado Victor. Quando eu comecei a fazer iniciação científica você esteve lá. Quando eu estava fazendo mestrado, você esteve presente. E hoje, no meu doutorado, você está aqui, mas agora como meu marido. Você sempre foi a minha rede de apoio. Sem você, eu não seria capaz de continuar. Você segurou as pontas quando foi preciso, me deu bronca quando era necessário e entendeu as diversas noites e finais de semana trabalhando. Foi a minha banca diversas vezes e tantas outras leu o meu trabalho. Esse sonho é nosso. Obrigada por tudo. Te amo.

Aos meus familiares que já não se encontram mais aqui Alzira, Marcionilo e Geraldo (*in memorian*). Obrigada por todos os esforços de vocês. Em especial, ao meu cunhado Guilherme Donizete da Silva (*in memorian*) por toda dedicação em vida.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram envolvidos nesse processo. Obrigada por fazerem parte desse momento.

RESUMO

A inflamação cardíaca tem sido considerada um importante mecanismo envolvido na insuficiência cardíaca (IC). Anti-inflamatórios, como a dexametasona (DEX), podem ser usados para controlar a inflamação cardíaca, enquanto que os inibidores da enzima conversora de angiotensina demonstraram melhorar a sobrevivência por regridir a remodelação cardíaca na IC. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com dexametasona (DEX) ou ramipril na inflamação e remodelação cardíaca. Ratos Wistar foram submetidos a um protocolo de estenose aórtica (EA). Após 21 semanas foi realizado um ecocardiograma e após 24 semanas de cirurgia os animais foram tratados com DEX (50µg/kg, *s.c.*), ramipril (10mg/kg, via gavagem) ou salina. Após o tratamento, todos os ratos foram submetidos a um ecocardiograma e, ao final do protocolo experimental, os grupos foram eutanasiados e o ventrículo esquerdo foi removido para análise de citocinas e marcadores inflamatórios, bem como análises histológicas. Os resultados mostram que os animais com EA apresentaram aumento da espessura relativa do ventrículo esquerdo (+63%), enquanto que o tratamento com DEX atenuou esse aumento (-17%) e o tratamento com ramipril não promoveu nenhuma alteração. Embora a cirurgia de EA tenha promovido aumento da fibrose no coração (+70%), apenas o tratamento com DEX atenuou significativamente esse aumento (-23%). O remodelamento cardíaco promoveu piora da função cardíaca nos animais, a qual não foi reajustada em ambos os tratamentos. A melhora do remodelamento cardíaco no tratamento com DEX pode estar relacionada à melhora do perfil inflamatório cardíaco, pois houve redução das citocinas e marcadores inflamatórios que estavam aumentados com a EA. Embora o tratamento com ramipril não tenha promovido alterações significativas no remodelamento cardíaco, já foi possível observar uma atenuação do perfil inflamatório cardíaco nesses animais. Em conclusão, o presente estudo sugere que a DEX pode ser benéfica em mitigar a progressão da doença cardíaca devido a uma atenuação da remodelação cardíaca induzida por menor inflamação cardíaca. Além disso, embora o tratamento com ramipril tenha atenuado a inflamação cardíaca, não melhorou significativamente a remodelação ou a função cardíaca, sugerindo que períodos mais longos de tratamento com ramipril poderiam ser usados.

Palavras-chave: Estenose aórtica, ecocardiograma, dexametasona, ramipril, citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

Cardiac inflammation has been considered an important mechanism involved in heart failure (HF). Anti-inflammatories, such as dexamethasone (DEX), could be used to control cardiac inflammation, while that angiotensin-converting enzyme inhibitors have been shown to improve survival for regressing cardiac remodeling in HF. Thus, this work aimed to evaluate the effects of DEX treatment or ramipril treatment on inflammation and cardiac remodeling. Wistar rats were submitted to an aortic stenosis (AS) protocol. After 21 weeks, an echocardiogram was performed and, after 24 weeks of surgery, animals were treated with DEX (50µg/kg, *s.c.*), ramipril (10mg/kg, via gavage) or saline. After treatment, all rats were submitted to an echocardiogram and, at the end of experimental protocol, the groups were euthanized, and left ventricle was removed for analysis of cytokines and inflammatory markers, as well as histological analyzes. The results showed that the animals with AS had an increase in the relative thickness of the left ventricle (+63%), while the treatment with DEX attenuated this increase (-17%) and treatment with ramipril did not promote any change. Although the AS surgery promoted an increase in fibrosis in the heart (+70%), only the DEX treatment attenuated this increase significantly (-23%). This cardiac remodeling promoted worsening of cardiac function that was not readjusted with the improvement of cardiac remodeling with both treatments. The improvement in cardiac remodeling in the treatment with DEX may be related to the improvement in the inflammatory profile in the treatment, as there was a reduction in the cytokines and inflammatory markers that were increased with AS. Although treatment with ramipril did not promote any significant changes in cardiac remodeling, it is already possible to observe an attenuation of the cardiac inflammatory profile in these animals. In conclusion, the present study suggests that DEX may be beneficial in mitigating the progression of heart disease due to an attenuation of cardiac remodeling induced by lower cardiac inflammation. In addition, although treatment with ramipril attenuated cardiac inflammation, it did not significantly improve cardiac remodeling or function, suggesting that longer periods of ramipril treatment could be used.

Key words: Aortic stenosis, echocardiogram, dexamethasone, ramipril, inflammatory cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho experimental. Ratos Wistar foram submetidos a um protocolo de estenose aórtica (EA) ou cirurgia fictícia e 21 semanas após a cirurgia todos os ratos foram submetidos a teste de capacidade física e ecocardiografia transtorácica para divisão dos grupos. Após 24 semanas da cirurgia, os animais foram tratados com DEX (50 µg/kg/dia, s.c.) ou Ramipril (10mg/kg/dia, via gavagem) salina por 14 dias. Após o protocolo experimental, os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico e eutanásia.....31
- Figura 2:** Curva de sobrevivência. Os animais em preto representam o grupo sham, enquanto os animais em cinza representam os animais com estenose aórtica. Significância: $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....35
- Figura 3:** Teste de Capacidade Física Máxima. A barra em preto representa o grupo sham (n=20), enquanto a barra cinza representa os animais com estenose aórtica (EA, n=23). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: $+ p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....36
- Figura 4:** Ocorrência das características da insuficiência cardíaca (%) nos grupos tratados (n=9) ou não (n=9) com DEX. São características da insuficiência cardíaca: taquipneia, derrame pleural, trombo atrial, ascite e congestão hepática. Significância: $p < 0,05$36
- Figura 5:** Imagens representativas do coração de um rato Sham (S) e de um rato Estenose Aórtica (EA).....38
- Figura 6:** Análise proteica de citocinas e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco: interleucina 1 α (IL1- α), interleucina 1 β (IL1- β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ), fator transformador de crescimento β (TGF β), fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em todos os grupos: Sham (S, n=10), Sham DEX (SD, n=10), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=9). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....41
- Figura 7:** Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina e eosina (HE). A largura dos miócitos está demonstrada pela linha preta. Barra: 50 µm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise do diâmetro dos miócitos (µm) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....42
- Figura 8:** Painel superior: imagens representativas de cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina (HE) mostrando os capilares indicados pela seta preta. Barra: 50 µm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise de densidade capilar no ventrículo esquerdo (n/mm²) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8).

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....43

Figura 9: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com Picrosirius Red, mostrando a deposição de colágeno, em que as fibras colágenas podem ser vistas em vermelho e a musculatura cardíaca em amarelo. Barra: 100 μm / aumento de 200x. Painel inferior: Resultados densitométricos da área de deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (μm^2) e % da área de colágeno em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....44

Figura 10: Ocorrência das características da insuficiência cardíaca (%) nos grupos tratados (n=9) ou não (n=8) com ramipril. São características da insuficiência cardíaca: taquipneia, derrame pleural, trombo atrial, ascite e congestão hepática. Significância: $p < 0,05$45

Figura 11: Análise proteica de citocinas e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco: interleucina 1 α (IL1- α), interleucina 1 β (IL1- β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ), fator transformador de crescimento β (TGF β), fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em todos os grupos: Sham (S, n=10), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....50

Figura 12: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina e eosina (HE). A largura dos miócitos está demonstrada pela linha preta. Barra: 50 μm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise do diâmetro dos miócitos (μm) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....51

Figura 13: Painel superior: imagens representativas de cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina (HE) mostrando os capilares indicados pela seta preta. Barra: 50 μm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise de densidade capilar no ventrículo esquerdo (n/mm²) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. Sham).....52

Figura 14: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com Picrosirius Red, mostrando a deposição de colágeno, em que as fibras colágenas podem ser vistas em vermelho e a musculatura cardíaca em amarelo. Barra: 100 μm

/ aumento de 200x. Painel inferior: Resultados densitométricos da área de deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (μm^2) e % da área de colágeno em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. Sham).....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delta de peso corporal (PC) pré-tratamento e pós-tratamento com DEX ou salina, em todos os grupos: Sham (S), Sham DEX (SD), Controle de estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....37

Tabela 2: Comprimento do osso da tíbia, proporção de peso úmido/seco do fígado (u/s), proporção de peso úmido/seco do pulmão (u/s), coração, ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrios, músculo tibial anterior (TA) e peso da glândula adrenal (soma de ambas as glândulas adrenais) foram normalizados pelo comprimento do osso da tíbia em todos os grupos: Sham (S), Sham DEX (SD), Controle de estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....38

Tabela 3: Frequência Cardíaca (FC), Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo (DDVE), Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE), Espessura Diastólica da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (EDPP), Espessura Diastólica do Septo Interventricular (EDSIV), Diâmetro do Átrio Esquerdo (AE), Diâmetro da Aorta (AO), Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo (ESP. REL. VE), Massa do Ventrículo Esquerdo (MASSA VE), Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (ÍND. MVE), % de Encurtamento Endocárdico (%ENC. ENDO), % de Encurtamento Mesocárdio (%ENC. MESO), Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (VEPP), Fração de Ejeção (FE%), Índice de Performance Miocárdica (TEI INDEX), Onda E do Fluxo Transmitral (E MITRAL); Onda A do Fluxo Transmitral (A MITRAL); Tempo de Relaxamento Isovolumétrico do Ventrículo Esquerdo (TRIV), em todos os grupos: sham (S), sham tratado com DEX (SD), estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).....40

Tabela 4: Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl) e valor de p (p-valor), para as variáveis de delta de peso corporal (PC) pré-tratamento e pós-tratamento com ramipril ou salina, em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=9). Significância: $p < 0,05$46

Tabela 5: Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl), valor de p (p-valor) e pairwise, com correção de Bonferroni, para as variáveis: comprimento do osso da tíbia, proporção de peso úmido/seco do fígado (u/s), proporção de peso úmido/seco do pulmão (u/s), coração, ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrios, músculo tibial anterior (TA) e peso da glândula adrenal (soma de ambas as glândulas adrenais) que foram normalizadas pelo comprimento do osso da tíbia, em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=8). Significância: $p < 0,05$47

Tabela 6: Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl), valor de p (p-valor) e pairwise, com correção de Bonferroni, para as variáveis: Frequência Cardíaca (FC), Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo (DDVE), Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE), Espessura Diastólica da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (EDPP), Espessura Diastólica do Septo Interventricular (EDSIV), Diâmetro do Átrio Esquerdo (AE), Diâmetro da Aorta (AO), Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo (ESP. REL. VE), Massa do Ventrículo Esquerdo (MASSA VE), Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (ÍND. MVE), % de Encurtamento Endocárdico (%ENC. ENDO), % de Encurtamento Mesocárdio (%ENC. MESO), Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (VEPP), Fração de Ejeção (FE%), Índice de Performance Miocárdica (TEI INDEX), Onda E do Fluxo Transmitral (E MITRAL); Onda A do Fluxo Transmitral (A MITRAL); Tempo de Relaxamento Isovolumétrico do Ventrículo Esquerdo (TRIV), em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=8). Significância: $p < 0,05$48

LISTA DE ABREVIATURAS

1Q: Primeiro Quartil

3Q: Terceiro Quartil

%ENC. ENDO: % de Encurtamento Endocárdico

%ENC. MESO: % de Encurtamento Mesocárdio

A MITRAL: Onda A do Fluxo Transmitral

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AE: Diâmetro do Átrio Esquerdo

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

AMPK: Proteína Quinase ativada por Adenosina Monofosfato

ANG I: Angiotensina I

ANG II: Angiotensina II

ANG 1-7: Angiotensina 1-7

ANG 1-9: Angiotensina 1-9

ANOVA: Análise de Variância

AO: Diâmetro da Aorta

AT1: Receptor de Angiotensina tipo 1

AT2: Receptor de Angiotensina tipo 2

BCL-XL: Linfoma de células B - extragrande

CaMKII: Proteína Quinase II Dependente de Ca^{2+} /calmodulina

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos

DDVE: Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo

DEX: Dexametasona

DP: Desvio Padrão

DSVE: Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo

EA: Estenose Aórtica

EAD: Estenose Aórtica Tratado com DEX

EAR: Estenose Aórtica Tratado com Ramipril

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDHF: Fator Derivado da Hiperpolarização do Endotélio

EDSIV: Espessura Diastólica do Septo Interventricular

EDPP: Espessura Diastólica da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo

E MITRAL: Onda E do Fluxo Transmitral

EPM: Erro Padrão da Média

ESP. REL. VE: Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo

FC: Frequência Cardíaca

FE: Fração de Ejeção
GL: Graus de Liberdade
H: H de Kruskal-Wallis
HE: Hematoxilina-eosina
IC: Insuficiência Cardíaca
IFN- γ : Interferon Gama
IL1- α : Interleucina 1 α
IL1- β : Interleucina 1 β
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
ÍND. MVE: Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo
MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MASSA VE: Massa do Ventrículo Esquerdo
MÁX: Máximo
Md: Mediana
MÍN: Mínimo
MMP: Metaloproteinases
NCX: trocador sódio cálcio
PC: Peso Corporal
Phospho-Thr17-PLN: Fosfolambam Treonina 17
PP1: Fosfatase-1
S: Sham
SD: Sham Tratado com DEX
SERCA2: Bomba de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático
SHR: Ratos Espontaneamente Hipertensos
SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
S.C.: Subcutânea
STAT3: Transdutores e Ativadores de Sinal das Vias de Sinalização de Transcrição 3
TA: Tibial Anterior
TEI INDEX: Índice de Performance Miocárdica
TGF β : Fator de Crescimento Transformador β
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α
TNFR1: Receptor do Fator de Necrose Tumoral do tipo 1
TRIV: Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
VD: Ventrículo Direito
VE: Ventrículo Esquerdo
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEPP: Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Insuficiência Cardíaca	16
1.2 Remodelamento Cardíaco	17
1.3 Inflamação.....	19
1.4 Dexametasona.....	20
1.5 Ramipril.....	23
2 HIPÓTESE	26
3 OBJETIVO	27
3.1 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Protocolo Cirúrgico de Estenose Aórtica.....	28
4.2 Teste de Capacidade Física Máxima.....	29
4.3 Ecocardiograma.....	29
4.4 Grupos e Protocolos Experimentais.....	30
4.5 Caracterização da Insuficiência Cardíaca.....	31
4.6 Análises das Citocinas e Marcadores Inflamatórios.....	32
4.7 Análises Morfométricas.....	32
4.8 Métodos Estatísticos.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Resultados do Protocolo 1.....	35
5.2 Resultados do Protocolo 2.....	45
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO 1.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência Cardíaca

Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que afeta 23 milhões de pessoas no mundo (ROHDE et al., 2018). Possui alto índice de mortalidade e hospitalizações; além disso os portadores de IC apresentam comorbidades associadas, tratamento farmacológico complexo e sintomas limitantes, correspondendo a uma má qualidade de vida (HEART FAILURE SOCIETY OF AMERICA et al., 2010). Dessa forma, todos esses fatores associados resultam em uma taxa de 35% de sobrevivência após 5 anos de diagnóstico (ROHDE et al., 2018).

A IC é definida como uma anormalidade na estrutura cardíaca e/ou na função cardíaca. A presença dessas anormalidades faz com que o coração apresente altas pressões intracardíacas para manter a circulação sanguínea, contudo em um dado momento o débito cardíaco passa a não conseguir manter a perfusão de forma adequada durante o esforço e, com a progressão da doença, o baixo débito cardíaco é observado também em repouso (MCDONAGH et al., 2021).

São várias as etiologias da IC, como por exemplo: doença arterial coronariana, hipertensão, doenças valvares, arritmia, cardiomiopatia, doenças congênitas, doenças infecciosas, doenças causadas por drogas, doenças infiltrativas, doenças pericárdicas, doenças endomiocárdicas, distúrbios de armazenamento, doenças metabólicas, doenças neuromusculares, entre outras, que podem acometer a função sistólica, diastólica ou ambas (MCDONAGH et al., 2021). Dentro deste quadro, a IC pode ser classificada segundo sua fração de ejeção (FE). A IC com FE preservada é o quadro onde há presença de sinais e sintomas, porém a FE é $\geq 50\%$. A IC com FE levemente reduzida apresenta sinais e sintomas com uma FE entre 41-49%. E na IC com FE reduzida pode-se observar sinais e sintomas e a FE é $\leq 40\%$. Além disso, a IC pode ser descrita como crônica ou aguda, sendo a IC crônica aquela que apresenta uma progressão gradual da doença com o estabelecimento do diagnóstico, já a IC aguda é descrita como uma alteração no quadro da IC crônica de maneira abrupta precisando de tratamento hospitalar emergencial. E por último, a IC pode ser classificada segundo a progressão dos sinais e sintomas, sendo: classe I/ ausência de limitações na atividade física; classe II/ pequenas limitações em atividades físicas como falta de ar, fadiga e palpitações; classe III/ aumento da intensidade das limitações durante a atividade física; classe IV/ aparecimento dos sinais e sintomas em repouso e durante a atividade física (MCDONAGH et al., 2021).

Todos os órgãos sofrem com essa síndrome, mas a princípio o coração passa por algumas adaptações em decorrência da sobrecarga imposta. Diante de um quadro de estresse

cardíaco, primeiramente há uma resposta compensatória com o aumento do tamanho e da massa cardíaca com o objetivo de normalizar o estresse da parede e assim retornar a função cardiovascular normal, como visto por Grossman e colaboradores (1975). Com a evolução da doença e sob um estresse crônico, a resposta compensada do coração progride para uma resposta descompensada, na qual há uma dilatação ventricular, queda na função contrátil e progressão para IC (THAM et al., 2015). Efeitos deletérios nos tecidos periféricos, como por exemplo na musculatura esquelética, também são vistos na IC (ZIZOLA et al., 2013; LEE et al., 2016). Conjuntamente com a deficiência cardíaca, a deficiência periférica corrobora para a intolerância ao exercício. A musculatura esquelética pode ter uma deficiência na vasodilatação (LEE et al., 2016) ou até mesmo em alterações na morfologia, como a composição da fibra muscular, atrofia das fibras, infiltração gordurosa e diminuição de níveis enzimáticos (ZIZOLA et al., 2013). Ou seja, existe uma interação complexa entre todos os tecidos do corpo sob um quadro de IC.

1.2 Remodelamento Cardíaco

Remodelamento cardíaco são alterações que o coração sofre tanto em sua estrutura quanto em sua morfologia que podem, por sua vez, alterar a função cardíaca (AZEVEDO et al., 2015). Em resposta a um aumento crônico da carga cardíaca, há um aumento do tamanho e da massa do coração com o objetivo de normalizar o estresse da parede, aumentando assim o tamanho dos miócitos. Esse aumento da massa do coração é chamado de hipertrofia cardíaca (GROSSMAN et al., 1975). A hipertrofia cardíaca pode ser classificada segundo o estímulo que induziu o crescimento cardíaco, podendo ser do tipo fisiológico ou patológico. A hipertrofia fisiológica ocorre durante o crescimento pós-natal e, depois de adulto, ocorre na gravidez ou como resultado do treinamento físico. Por outro lado, a hipertrofia patológica é induzida por doenças cardiovasculares, contudo há também um grupo de doenças que são chamadas de cardiomiopatia hipertrófica, as quais podem ser induzidas também por mutações genéticas (BERNARDO et al., 2010).

Ambos os tipos de hipertrofia, fisiológica ou patológica, podem ser induzidas por sobrecarga de pressão ou sobrecarga de volume. A hipertrofia fisiológica pode ser induzida por sobrecarga de pressão, como por exemplo em exercícios resistidos, ou por sobrecarga de volume como no caso de exercícios de *endurance* (MORGANROTH et al., 1975; PLUIM et al., 2000; BERNARDO et al., 2010;). Assim como na hipertrofia fisiológica, a patológica pode ser induzida por sobrecarga de pressão como é caso da hipertensão arterial ou sobrecarga de

volume, como no caso das doenças valvulares regurgitantes (GROSSMAN et al., 1975; BERNARDO et al., 2010; YOU et al., 2018; KIM et al., 2019). O tipo de sobrecarga influencia as características de crescimento do coração. Em sobrecarga de pressão há adição de sarcômeros em paralelo, fazendo com que a parede do ventrículo esquerdo (VE) fique mais espessa e com mínimas alterações na dilatação do VE. A essa hipertrofia é dado o nome de concêntrica. Já, na sobrecarga de volume há uma adição de sarcômeros em séries, fazendo com que o VE aumente de tamanho e forma, assim como sua cavidade, sendo denominada hipertrofia excêntrica (GROSSMAN et al., 1975; MORGANROTH et al., 1975; PLUIM et al., 2000; BERNARDO et al., 2010; KIM et al., 2019;).

A hipertrofia fisiológica se diferencia da hipertrofia patológica, pois a hipertrofia fisiológica é caracterizada por crescimento cardíaco normal e proporcional, função normal ou melhorada, além de não estar associada ao desenvolvimento de IC (BERNARDO et al., 2010; WEEKS and MCMULLEN, 2011; SHIMIZU et al., 2016). A hipertrofia patológica, por sua vez, é caracterizada inicialmente por um aumento da massa e tamanho do coração com função cardíaca preservada, sendo denominada de estágio compensado. Com o avançar do tempo, a hipertrofia patológica compensada evolui para descompensada e, nesse estágio, a hipertrofia patológica é caracterizada por dilatação do VE, deposição de colágeno, degeneração de miócitos e disfunção cardíaca, o que determina uma IC (BERNARDO et al., 2010; WEEKS and MCMULLEN, 2011; HEIN et al., 2013; THAM et al., 2015; SHIMIZU et al., 2016).

Na hipertrofia cardíaca patológica, os miócitos e a matriz extracelular sofrem alterações em alguns processos naturais, como por exemplo no manuseio do cálcio, com diminuição do monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) que pode determinar uma diminuição do inotropismo cardíaco em pessoas com IC (FIELDMAN et al., 1987). Assim como diminuição da expressão proteica da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e da fosfolambam treonina 17 (phospho-Thr17-PLN), bem como aumento do trocador sódio cálcio (NCX) e fosfatase-1 (PP1) (ROLIM et al., 2007). Além disso, a hipertrofia patológica apresenta alterações no metabolismo cardíaco, ou seja, em situações normais, a principal fonte de energia para o coração são os ácidos graxos, porém em situações patológicas há uma diminuição do uso de ácidos graxos como fonte de energia e um aumento do uso de glicose como principal substrato para o fornecimento de energia (THAM et al., 2015). O mesmo ocorre com a fibrose cardíaca, condição presente na hipertrofia cardíaca patológica (HEIN et al., 2003; ROSSONI et al., 2010; RENGO et al., 2013; PAGAN et al., 2015). Essa condição é resultado de um acúmulo de matriz extracelular que acarreta em diminuição da função cardíaca, uma vez que a deposição de colágeno prejudica a contração-excitação do músculo cardíaco (JANICKI and BROWER,

2002; RENGO et al., 2013; PAGAN et al., 2015). A fibrose cardíaca pode ser induzida por diferentes processos, dentre eles a degradação de miócitos (KONG et al., 2014). No estudo de Hein e colaboradores (2003), os animais com FE reduzida demonstraram uma diminuição do número de miócitos, assim como um aumento da deposição de colágeno, que se correlacionaram de forma negativa e significativa. O estresse oxidativo, por sua vez, é uma condição biológica que também pode induzir a degradação dos miócitos e a deposição de colágeno, e vem sendo demonstrado em situações de patologia cardíaca (TSUTSUI et al., 2011; PAGAN, 2018). Outra alteração presente na hipertrofia patológica é a diminuição da densidade capilar no coração, quando comparado a um coração saudável (ROSSONI et al., 2010; RENGO et al., 2013) e todos esses processos citados acima podem estar ligados a uma condição de inflamação (ROSSONI et al., 2010; SILVA et al., 2017).

1.3 Inflamação

Assim como os demais órgãos do corpo, o coração apresenta um sistema de defesa que é o sistema imune, o qual é responsável por combater os agentes invasores através da resposta inflamatória. Sendo assim, a inflamação é definida como uma reação fisiológica que visa defender o organismo de infecções e danos ao tecido (SUTHAHAR et al., 2017). Fazem parte da resposta imunológica cardíaca após insulto cardíaco os macrófagos, monócitos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas, linfócitos B, células *Natural Killer* e os linfócitos T (LAFUSE et al., 2021).

A resposta inflamatória se dá após a apresentação de um insulto cardíaco na qual os padrões moleculares associados a danos (DAMP) levam a ativação de células imunes que, por sua vez resultam na liberação de citocinas e marcadores inflamatórios. Após a resposta inflamatória, um processo de fagocitose e eliminação das células danificadas é iniciado, bem como a liberação de citocinas que favorecem o processo de cicatrização tecidual via ativação da proliferação de miofibroblastos e neovascularização na região lesada (WAGNER et al., 2020). Essa resposta inflamatória pode ser classificada como inflamação aguda e inflamação crônica. A inflamação aguda corresponde a uma queda abrupta da função cardíaca, como é o caso da miocardite, já a inflamação crônica corresponde a uma lesão estrutural com grande deposição de colágeno, como por exemplo a presente na IC (RODRIGUES et al., 2014; SUTHAHAR et al., 2017).

Citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MULLER-EHMSEN and SCHWINGER, 2004; NERI SERNERI et al., 2004; FILHO et al., 2013;

SINAGRA et al., 2013; DE SOUZA et al., 2020; HANNA et al., 2020; MIAO et al., 2020), interleucina-1 (IL-1) (ABBATE et al., 2008; HWANG et al., 2001; DI RAIMONDO et al., 2012; HAROUKI et al., 2017; BUCKLEY and ABBATE, 2018; HANNA et al., 2020), interleucina-6 (IL-6) (NERI SERNERI et al., 2004; KUMAR et al., 2019; MARKOUSIS-MAVROGENIS et al., 2019; HANNA et al., 2020; RIDKER and RANE, 2021) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β) (PALANIYANDI et al., 2011; WESTERMANN et al., 2011) já foram bastante demonstrados no coração insuficiente. E esses mesmos marcadores são liberados na inflamação aguda para controle de sobrevivência e morte celular ou até mesmo para acionar uma resposta adicional de inflamação. Porém, o TNF- α , IL-1 e IL-6 também podem ser liberados na inflamação crônica com o objetivo de promover cicatrização e remodelamento cardíaco (NIAN et al., 2004). O TNF- α e a IL-1 são capazes de ativar as metaloproteinases (MMP), que são responsáveis pela degradação e síntese de colágeno (LI et al., 2000; NIAN et al., 2004), enquanto o TGF- β vem sendo considerado um dos principais estimuladores pró-fibróticos (BACMEISTER et al., 2019). Normalmente o colágeno é responsável por fornecer estrutura cardíaca e distribuição da força contrátil, contudo, quando há uma deposição de colágeno em forma de fibrose sob o tecido cardíaco que foi lesionado, pode haver um prejuízo no funcionamento cardíaco, pois além de afetar a estrutura do cardíaca, afeta também a contração cardíaca e a geração de força (KONG et al., 2014). Hein e colaboradores (2003) demonstraram em seu estudo que existe uma correlação negativa significativa entre a FE e a fibrose cardíaca de pacientes com disfunção cardíaca. Sendo assim, o uso de fármacos que atuam no perfil inflamatório cardíaco vem sendo investigado como novas formas de tratamento da IC, já que dessa forma a estrutura cardíaca e a função cardíaca estariam preservadas.

1.3.1 Dexametasona

Em 1949 os glicocorticoides foram introduzidos na prática médica para o tratamento de artrite reumatoide (HENCH et al., 1949), contudo atualmente os glicocorticoides podem ser utilizados para diversos tipos de tratamentos, tais como para o controle da asma, bronquite, inflamações crônicas, alergias e doenças autoimunes. A dexametasona (DEX) é um glicocorticoide sintético muito utilizado na clínica por ser uma droga com potentes efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios e imunossupressores (ANTI et al., 2008).

Os glicocorticoides podem também ter origem natural, como é caso do cortisol, e são conhecidos como hormônios esteroidais. O cortisol ou hidrocortisona em humanos têm sua

síntese a partir da liberação do fator liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e esse, por sua vez, age na hipófise anterior induzindo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH cai na circulação sanguínea e age no córtex das glândulas supra-renais, mais especificamente na zona fasciculada, sintetizando o cortisol. A liberação dos hormônios esteroidais pode sofrer influência do hormônio antidiurético, de ocitocinas, de catecolaminas ou pode ser mediado por situações como febre, hipoglicemia e estresse. Além disso, a principal função do cortisol é o controle do metabolismo, promovendo estímulos para gliconeogênese, menor utilização de glicose pelas células, aumento da glicose sanguínea, aumento de aminoácidos plasmáticos e mobilização de ácidos graxos (TSIGOS and CHROUSOS, 2002; ANTI et al., 2008).

Apesar dos potentes efeitos dos glicocorticoides sintéticos como anti-inflamatório, antialérgico e imunossupressor serem bem descritos, muitos pesquisadores, inclusive no nosso grupo, vêm desenvolvendo pesquisas que demonstram os efeitos deletérios que o tratamento com a DEX pode acarretar. Dentre esses efeitos deletérios estão a redução do peso corporal (PC), atrofia muscular (BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al., 2014; MACEDO et al., 2014; KRUG et al., 2016; HERRERA et al., 2016; CONSTANTINO et al., 2017), resistência periférica à insulina (SANTOS et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; GIOZZET et al., 2008; BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al., 2014; MACEDO et al., 2014; KRUG et al., 2016) e indução de hipertensão arterial (SUZUKI et al., 1982; DODIC et al., 1998; DODIC et al., 1999; PEERS et al., 2001; DODIC et al., 2006; MONDO et al., 2006; HERRERA et al., 2016; CONSTANTINO et al., 2017; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017).

Dentre os mecanismos responsáveis pela hipertensão arterial induzida por tratamento com DEX pode-se citar alterações do sistema nervoso autonômico (HOU and SLOTKIN, 1989; SEGAR et al., 2006; HERRERA et al., 2016; DUCHATSCH et al., 2018), redução da sensibilidade barorreflexa (CONSTANTINO et al., 2017) e aumento na atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (SUZUKI et al., 1982; SATO et al., 1994; FISHEL et al., 1995). Além disso, tem sido mostrado que o tratamento com a DEX promove remodelamento cardíaco em animais normotensos, caracterizado por hipertrofia (MUANGMINGSUK et al., 2000; DODIC et al., 2001; DE, et al., 2011; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017) e deposição de colágeno no VE (ROY et al., 2009; DE, et al., 2011; DE VRIES et al., 2012; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017) e, essas alterações resultam em menor função cardíaca (DODIC et al., 2001; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017). Porém, pesquisas recentes do nosso laboratório (DUCHATSCH et al., 2021) demonstraram que animais espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com pequenas doses de DEX não

apresentam alterações significativas de pressão arterial, atividade do sistema nervoso autonômico e barorreflexo, além daquelas que já são apresentadas pelo SHR controles. Ao contrário do observado em normotensos, o tratamento com a DEX foi capaz de promover um remodelamento cardíaco com aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), aumento da capilarização e redução da deposição de colágeno. Essas alterações estruturais, promovidas pela DEX, resultaram em uma melhora na função sistólica e diastólica.

Nada foi descrito anteriormente sobre o efeito do tratamento da DEX no miocárdio de portadores de IC, mas já foi descrito que em alguns tecidos os glicocorticoides são capazes de protegê-los da resposta apoptótica, como é o caso das células cardíacas e renais (GRUVER-YATES and CIDLOWSKI, 2013). Em 1978, Joyce e colaboradores já haviam demonstrado que o tratamento com a DEX após 1 hora da cirurgia de infarto seria capaz de diminuir o tamanho de infarto. Da mesma forma, o estudo de Xu e colaboradores (2011) demonstrou que o pré-tratamento com a DEX foi capaz de diminuir a área de infarto e reduzir a apoptose dos cardiomiócitos em animais que tiveram a coronária descendente anterior ocluída. Estes autores justificam que esta resposta ocorreu porque a DEX é capaz de ativar a transcrição da proteína antiapoptótica do tipo linfoma de células B - extragrande (BCL-XL). Esse estudo concorda com o estudo de Chen e colaboradores (2005) que demonstrou que células de cardiomiócitos tratadas com corticosteroides apresentaram redução da resposta apoptótica induzida por doxorubicina devido a um aumento da produção proteica da BCL-XL. Sendo assim, é plausível de se pensar que, com a redução da apoptose haverá menor tecido fibrótico com o tratamento com DEX, como demonstrado por El-Helou et al. (2008).

Em um estudo com cardiomiócitos H9C2 embrionários de rato e cardiomiócitos primários, a DEX promoveu aumento significativo no tamanho das células, assim como de marcadores hipertróficos (REN et al., 2012). Além disso, a DEX foi capaz de inibir a apoptose induzida por TNF- α e o uso de antagonistas do receptor de glicocorticoide (GR- RU486) aboliu a resposta antiapoptótica (REN et al., 2012). Estes resultados concordam com o estudo já feito por Kewalramani e colaboradores (2009), no qual foi demonstrado que a DEX protege os cardiomiócitos ventriculares de ratos normotensos da apoptose induzida pelo TNF- α pela ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Além disso, o tratamento com DEX tem se mostrado capaz de diminuir a produção proteica das MMP e melhorar função cardíaca por diminuir TNF- α em animais com IC crônica (XIA et al., 2007). Em suma, os resultados do tratamento com a DEX no coração são conflitantes, com efeitos deletérios e benéficos, como os encontrados por Oakley e colaboradores (2013) que propuseram o uso na prevenção de doenças cardíacas. Sendo assim, faz-se necessário entender os efeitos da

DEX no coração sob um quadro de IC, bem como dos marcadores inflamatórios envolvidos nesse processo, para assim encontrar um possível alvo terapêutico para IC.

1.3.2 Ramipril

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs) são fármacos que alteram a atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e são utilizados no tratamento da hipertensão arterial e no tratamento da doença cardíaca (BARROSO et al., 2021). O primeiro iECA desenvolvido foi o captopril e este foi criado em 1965, a partir de uma proteína encontrada no veneno da jararaca pelo cientista brasileiro Sérgio Henrique Ferreira. Além do captopril, existem vários outros iECAs como enalapril, lisinopril, quinapril, perindopril e o ramipril.

O SRAA é um sistema fisiológico endócrino responsável por regular a função cardiovascular, adrenal e renal, controlando o balanço eletrolítico. O precursor da cascata do SRAA é o angiotensinogênio, produzido pelo fígado, que é clivado pela renina que é produzida pelas células justaglomerulares no rim. O resultado dessa clivagem é a angiotensina I (ANG I) que é sequencialmente convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (ANG II), porém existem outras vias alternativas de formação de ANG II como é o caso da via de ação das quimases, elastase-2, bem como já foi proposto a existência de peptídeos ativos envolvidos nessa formação. A ANG II exerce sua função ao se ligar em seu receptor do tipo 1 (AT1) ou receptor do tipo 2 (AT2). Este eixo clássico do SRAA é conhecido como eixo constritor, porém existe um outro eixo do SRAA que é o vasodilatador. Este eixo é caracterizado pela formação de ANG (1-7) que tem seu efeito exercido pela ligação ao seu receptor MAS. A formação de ANG (1-7) depende da clivagem da ANG II pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) ou pela clivagem da ANG I pela ECA2, formando ANG (1-9) e esta, por sua vez, pela ECA, formando assim a ANG (1-7). Assim como no primeiro eixo apresentado, o segundo eixo apresenta vias alternativas de formação de ANG (1-7), bem como pode ter a participação de vários outros componentes na formação dessa cascata (SANTOS et al., 2015).

No vaso, a ligação da ANG II em seu receptor AT1 medeia ações de vasoconstrição, proliferação e inflamação, enquanto que a ligação da ANG II em seu receptor AT2 medeia ações opostas às observadas com o receptor AT1. Já a ligação da ANG (1-7) em seu receptor MAS medeia ações vasodilatadoras e anti-proliferativas (CAREY AND SIRAGY, 2003; BALAKUMAR and JAGADEESH, 2014). Estudos já evidenciaram a presença do SRAA em vários tecidos independente do SRAA circulante. Alguns desses tecidos são cérebro, coração,

rim, gônadas, ovários, osso, músculo esquelético, tecido adiposo, pâncreas, carótida, cordão umbilical, gengiva e polpa dental (CAMPBELL, 1987; PHILLIPS, SPEAKMAN and KIMURA, 1993; OBERMULLER et al., 2004; LEUNG, 2004; GOKER et al., 2005; SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2015).

Tem sido demonstrado que a atividade do SRAA está aumentada em várias doenças cardiovasculares e, dentre elas, na IC (KUMAR, SINGH and BAKER, 2009; GOMES-SANTOS et al., 2014; EMDIN et al., 2015), pois a ativação do receptor AT1 pela ligação da ANG II contribui para o aumento da atividade nervosa simpática (MOUSA et al., 2008), vasodilatação prejudicada (ABASSI et al., 1997) e remodelamento cardíaco (BREGAGNOLLO et al., 2005; XU et al., 2008; SEBASTIÃO et al., 2017), com aumento do estresse oxidativo, degradação e apoptose (RUSSEL et al., 2007; SEBASTIÃO et al., 2017). Por outro lado, a ativação do receptor MAS pela ligação da ANG (1-7) ativa propriedades anti-fibróticas e anti-proliferativas (SANTOS et al., 2013). Diante disso, fármacos que atuam no SRAA vêm sendo utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares (MCDONAGH et al., 2021).

Como os iECAs bloqueiam a conversão de ANG I em ANG II e, portanto, diminuem os efeitos da ligação da ANG II no receptor AT1, são eficientes em reduzir pressão arterial (FERRARI et al., 2005; SIMKO et al., 2009; MIOTTO et al., 2021), melhorar o remodelamento cardíaco com regressão da hipertrofia cardíaca (LITWIN et al., 1995; GONÇALVES et al., 2005; SIMKO et al., 2009; ARSENAULT et al., 2013; MULLER et al., 2013) e diminuir a deposição de colágeno (MULLER et al., 2013; QU, XU and TIAN, 2015; MIOTTO et al., 2021), respostas estas que contribuem para a melhora no remodelamento cardíaco com consequente melhora da função cardíaca (LITWIN et al., 1995; ARSENAULT et al., 2013; QU, XU and TIAN, 2015). Além disso, como a ECA é responsável também pelo controle da degradação da bradicinina, os iECAs são capazes de bloquear essa degradação e, portanto, aumentar a concentração da bradicinina, sendo esse um dos mecanismos de ação para os efeitos cardiovasculares com a utilização dos iECAs. Isso acontece porque a bradicinina aumenta a concentração de prostaciclina e do fator derivado da hiperpolarização do endotélio (EDHF), os quais induzem vasodilatação, efeitos anti-proliferativos e inibem agregação plaquetária (BRUNNER et al., 2005). É importante ressaltar que além dos iECAs, existem outros fármacos que alteram o SRAA como por exemplo os antagonistas/bloqueadores dos receptores de ANG II e os inibidores da renina (NUSSBERGER et al., 2008) e que a utilização destes fármacos pode resultar na melhora do remodelamento cardíaco também (MULLER et al., 2013).

Um dos mecanismos que podem estar envolvidos na melhora do remodelamento cardíaco promovido pelos iECAs é a atenuação do perfil inflamatório dos animais, como pode ser visto em alguns estudos com o ramipril, na qual ele tem-se mostrado eficiente em controlar as citocinas e os marcadores inflamatórios na inflamação (AKASHI, 2006; SANDMANN et al., 2006; RUDI et al., 2021). Sendo assim, com a atenuação do perfil inflamatório, há uma atenuação da destruição tecidual (NERI SERNERI et al., 2004; RUDI et al., 2021) e também o reparo tecidual, já que o bloqueio do SRAA reduz a fibrose (MULLER et al., 2013; QU, XU and TIAN, 2015; MIOTTO et al., 2021). Ou seja, a ANG II modula citocinas e marcadores inflamatórios que são importantes no desenvolvimento e manutenção da inflamação e, portanto, está relacionada ao desenvolvimento de doenças que apresentam características inflamatórias, como é o caso da IC.

Apesar do papel do SRAA no remodelamento cardíaco ser conhecido, mais pesquisas são necessárias para entender o efeito do ramipril na inflamação cardíaca em um modelo experimental de IC.

2. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho foi que fármacos com propriedades anti-inflamatórias poderiam causar um efeito cardioprotetor diante da resposta inflamatória miocárdica de ratos com IC, melhorando estrutura cardíaca, diminuindo deposição de colágeno e aumentando angiogênese, resultando em uma melhora da função cardíaca.

3. OBJETIVO

O objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento com anti-inflamatório da classe dos glicocorticoides sintéticos e inibidores da enzima conversora de angiotensina na inflamação cardíaca, na estrutura cardíaca e na função cardíaca em um modelo experimental de IC.

3.1 Objetivos Específicos

1/ Avaliar o remodelamento miocárdico, a função e inflamação cardíaca em modelo experimental de IC, induzido por estenose aórtica;

2/ Investigar os efeitos do tratamento com dexametasona no remodelamento cardíaco, função e inflamação cardíaca em um modelo experimental de IC, induzido por estenose aórtica;

3/ Investigar os efeitos do tratamento com o ramipril no remodelamento cardíaco, função e inflamação cardíaca em um modelo experimental de IC, induzido por estenose aórtica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Bauru, SP (#1044/2019 Vol. 1). Ratos wistar de 60 a 80 g (21 dias de idade) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Botucatu. Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Bauru, com água e ração (Biobase, Águas Frias, Santa Catarina, Brasil) fornecidas *at libitum*. Os animais foram alocados em uma sala com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) e em ciclo claro - escuro de 12:12 horas.

4.1 Protocolo Cirúrgico de Estenose Aórtica

O protocolo de estenose aórtica (EA) foi realizado em ratos com 21 dias de vida (60 - 80g). Trinta e um ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, *i.p.*) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, *i.p.*). Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax dos ratos e, em seguida, os mesmos foram submetidos a uma toracotomia mediana. A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata de 0,6 mm de diâmetro interno foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Os ratos receberam soro fisiológico por via intraperitoneal (1 mL) e, durante a cirurgia, foram ventilados manualmente com pressão positiva de oxigênio a 100%. Esse protocolo é baseado na premissa de que conforme os animais fossem crescendo, o anel de prata promoveria uma estenose da aorta que causaria um aumento da pós-carga do animal (MOTA et al., 2020; OKOSHI et al., 2004). Outros vinte e quatro ratos foram submetidos a uma cirurgia fictícia (*sham*), na qual todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados, exceto a colocação do clipe de prata. De acordo com outros estudos, dezoito semanas após a cirurgia de EA seriam suficientes para induzir disfunção cardíaca (LITWIN et al., 1995). Assim, como o objetivo deste estudo foi investigar a disfunção cardíaca na IC, esperamos 24 semanas após a cirurgia para iniciar o protocolo de tratamento. O peso corporal (PC) foi medido semanalmente durante os meses e diariamente durante os períodos de tratamento¹.

¹ O protocolo de estenose aórtica foi realizado em parceria com o Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP.

4.2 Teste de Capacidade Física Máxima

Após 21 semanas da cirurgia, a avaliação da capacidade física máxima foi realizada com o objetivo de investigar os efeitos da estenose aórtica na capacidade física dos animais. O equipamento utilizado para a realização do teste foi uma esteira ergométrica adaptada para ratos (Inbramed, Millennium). Após 1 semana de adaptação dos animais na esteira (5 m/min/dia), todos os animais foram submetidos ao protocolo do teste de capacidade física máxima que se iniciava a 6 m/min com incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão, com 0% de elevação. O teste foi interrompido após a parada espontânea da corrida dos animais na esteira (DE SOUZA et al., 2020).

4.3 Ecocardiograma

Todos os ratos foram submetidos a avaliação ecocardiográfica após 21 semanas da cirurgia de estenose aórtica para homogeneizar o grupo de acordo com a progressão da doença e, 26 semanas após a cirurgia, no 13º dia de tratamento, para avaliar o efeito do tratamento nos parâmetros estruturais e funcionais do coração. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, *i.p.*) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg, *i.p.*) e após a anestesia foi feita a tricotomia da região anterior do tórax dos animais. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), com transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. A partir deste equipamento, com os ratos posicionados em decúbito lateral esquerdo, as variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita (OKOSHI et al., 2002; FIORETTO et al., 2002; MOREIRA et al., 2009). As estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography* (SAHN et al., 1978) em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior do VE; espessura diastólica (EDSIV) do septo interventricular e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A massa do VE foi calculada pela seguinte fórmula: $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - DDVE^3] \times 1,04$, em que 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (LITWIN et al., 1995). A espessura relativa do VE foi calculada a partir da fórmula: $[(2 \times EDPP) / DDVE]$ (GANAU et al., 1992). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo): $[(DDVE$

– DSVE)/DDVE]; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico ($\% \Delta$ meso): $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)$]; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior e 4) fração de ejeção (FE), que é a porcentagem de sangue do ventrículo esquerdo que é ejetada a cada batimento cardíaco. Adicionalmente foi calculado o índice de performance miocárdica do VE (índice de Tei) (TEI et al., 1997). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral e 2) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV)².

4.4 Grupos e Protocolos Experimentais

Foram formados 5 grupos que foram distribuídos em 2 protocolos.

Protocolo 1 / Quarenta e seis ratos wistar foram submetidos a uma cirurgia de estenose aórtica ou uma cirurgia fictícia (*sham*). Foram aguardadas 21 semanas para o desenvolvimento da IC e após as 21 semanas, foi realizado um exame ecocardiográfico para a divisão homogênea dos grupos de acordo com a evolução da doença. Os animais foram divididos em 4 grupos, a saber: 1/ *sham* tratado com salina (S, n=12), cirurgia fictícia e durante os últimos 14 dias foram tratados com salina por injeção subcutânea (*s.c.*); 2/ *sham* tratado com DEX (SD, n=12), cirurgia fictícia e nos últimos 14 dias foram tratados com dexametasona (DEX, Decadron®; 50µg/kg/dia, 9h, *s.c.*); 3/ Estenose aórtica controle (EA, n=9), cirurgia de estenose aórtica e durante os últimos 14 dias foram tratados com salina por injeção *s.c.* e 4/ Estenose aórtica tratados com DEX (EAD, n=9), cirurgia de estenose aórtica e nos últimos 14 dias foram tratados com dexametasona (DEX, Decadron®; 50µg/kg/dia, 9h, *s.c.*). No 13º dia de tratamento foi feito o exame ecocardiográfico e ao final do protocolo de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tecidos (miocárdio, tibial anterior, glândula adrenal, pulmão, fígado e a tibia) foram retirados para análise e armazenamento para futuras pesquisas (Figura 1). O pulmão e o fígado foram removidos para a determinação da razão de peso úmido/seco, utilizando-se o peso fresco das amostras retiradas e seu peso após acondicionamento por 48 horas a 60°C em estufa. Essa dose de DEX foi escolhida devido ao seu efeito benéfico no coração observado em ratos espontaneamente hipertensos, como previamente publicado pelo nosso grupo (DUCHATSCH et al., 2021).

² O exame de ecocardiografia foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Katashi Okoshi, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP.

Protocolo 2 / Os grupos controles do protocolo 1 (S e a EA) foram utilizados nas análises do protocolo 2. Adicionalmente, 9 ratos wistar foram submetidos a uma cirurgia de estenose aórtica, na qual foram aguardadas 21 semanas para o desenvolvimento da IC. Após as 21 semanas, foi feito um exame ecocardiográfico para a divisão homogênea dos grupos conforme a evolução da doença cardíaca. 1/Estenose aórtica tratados com ramipril (EAR, n=9), cirurgia de estenose aórtica e nos últimos 14 dias foram tratados com ramipril (10mg/kg/dia, 9h, via gavagem). No 13º dia de tratamento foi feito o exame ecocardiográfico e ao final do protocolo de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tecidos (miocárdio, tibial anterior, glândula adrenal, pulmão, fígado e a tibia) foram retirados para análise e armazenamento para futuras pesquisas (Figura 1). O pulmão e o fígado foram removidos para a determinação da razão de peso úmido/seco, utilizando-se o peso fresco das amostras retiradas e seu peso após acondicionamento por 48 horas a 60°C em estufa. A dosagem do ramipril utilizada no presente protocolo foi escolhida devido a seu efeito na modulação do perfil inflamatório (RUDI et al., 2021).

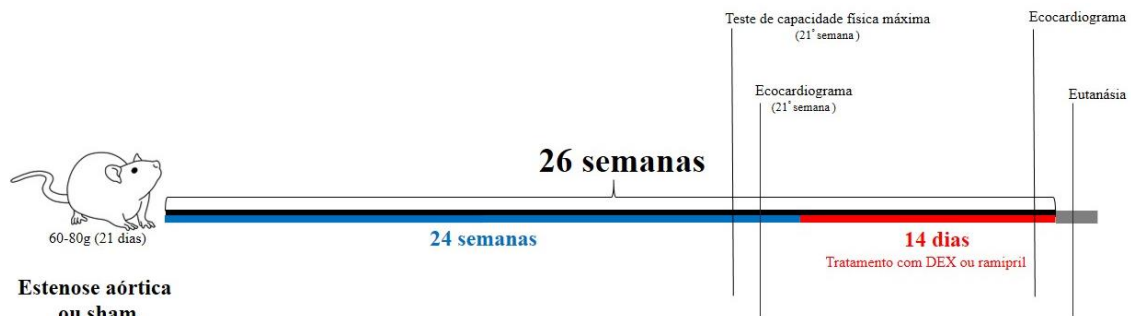


Figura 1: Desenho experimental. Ratos Wistar foram submetidos a um protocolo de estenose aórtica (EA) ou cirurgia fictícia e 21 semanas após a cirurgia todos os ratos foram submetidos a teste de capacidade física e ecocardiografia transtorácica para divisão dos grupos. Após 24 semanas da cirurgia, os animais foram tratados com DEX (50 µg/kg/dia, s.c.) ou Ramipril (10mg/kg/dia, via gavagem) salina por 14 dias. Após o protocolo experimental, os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico e eutanásia.

4.5 Caracterização da Insuficiência Cardíaca

Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico ANASEDAN® (cloridrato de xilazina 20 mg/kg), CEVA e DOPALEN® (cloridrato de cetamina 160 mg/kg), VETBRANDS do Brasil. Antes da anestesia foi investigada a presença de taquipneia e, após a anestesia, foram observados a presença de ascite, derrame pleural, trombos atriais e congestão hepática para a caracterização clínica da IC. Após a eutanásia, para avaliação da hipertrofia cardíaca, coração, átrios, VE e ventrículo direito (VD) foram removidos, separados e

pesados (MOTA et al., 2020). O VE foi removido e dividido em duas partes: uma foi armazenada em freezer -80°C para análise de citocinas e marcadores inflamatórios e a outra parte do VE foi armazenada em paraformaldeído em geladeira para análise histológica. Como o tratamento com DEX normalmente altera o PC, o comprimento do osso da tíbia foi usado para normalização dos tecidos. As glândulas adrenais foram removidas e pesadas para confirmação da eficácia do tratamento com DEX.

4.6 Análise das Citocinas e Marcadores Inflamatórios

Parte do VE que estava armazenado em freezer -80°C foi homogeneizada (IKA T18, Staufen, Alemanha) em solução RIPA (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) adicionada a um coquetel de inibidores de protease a 0,1% (Pic, Sigma Aldrich, SLM, EUA) e fluoreto de fenilmetanossulfonil a 1% (PMSF, Sigma Life Science, EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado a -20°C . As citocinas e marcadores inflamatórios foram analisados por imunoenensaio (MILLIPLEX®). Os seguintes painéis foram utilizados para verificar a presença de citocinas e marcadores inflamatórios no VE: kit RAT Immunology Rat Cytokine/Quimiokine (Cat. No. RECYTMAG-65K) 27 (Cat. No. RECYMAG65K27PMX) 27 (Bulk Cat. No. RECYMAG65PMX27BK), na qual foram investigadas as seguintes citocinas e marcadores: interleucina 1α (IL1- α), interleucina 1β (IL1- β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12p70 (IL-12), interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e kit Multi-Species TGF β – Singleplex (Cat. No. TGFBMAG-64K-01) (Bulk Cat. No. TGFBMAG-64K-01BK), na qual foi investigado o marcador fator de crescimento transformador β (TGF β). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as amostras, amostras de controle de qualidade e padrões foram preparados conforme recomendado nos protocolos do kit de ensaio de mapa MILLIPLEX® com diluentes fornecidos, seguindo as instruções do fabricante. A placa de ensaio foi então analisada com o instrumento Luminex® equipado com software xPONENT® e Multiplex Analyst 5.1. Os resultados foram obtidos em pg/mL (BERGAMO et al., 2020).

4.7 Análises Morfométricas

A outra parte do VE (corte transversal) foi fixada em solução de paraformaldeído 4% tamponado durante 24 horas. Em seguida, os tecidos foram lavados em álcool 70% para retirada do fixador. As amostras foram então destinadas para inclusão em Paraplast (Sigma, EUA). Para tanto, passaram por um processo de desidratação com etanol com as concentrações de 95% (2x

de 30 minutos) e 100% (3x de 30 minutos). Em seguida, passaram por uma etapa denominada diafanização, na qual as amostras foram mergulhadas em xilol (3x de 30 minutos). Em uma próxima etapa, as amostras foram submetidas ao processo de infiltração e inclusão, na qual as amostras permaneceram 3x de 30 minutos em vidros que continham paraplast, em estufa de 57-60°. Posteriormente foram emblocadas e foram colocadas em temperatura ambiente. Dos blocos foram feitos cortes histológicos, os quais foram seccionados em cortes transversais (5 ou 7 µm, dependendo da técnica de coloração) em micrótomo manual, utilizando navalhas descartáveis e foram colocados em lâminas. As lâminas com secções de 5 µm foram destinadas para rotinas de coloração com Hematoxilina-eosina (HE) para identificação da densidade capilar e diâmetro de miócito no VE. As lâminas com secções de 7 µm foram destinadas para rotinas histológicas de coloração com Picrossírius Red, para quantificar a área de colágeno no VE. Em cada lâmina foram colocados pelo menos 3 cortes (3-6) e, de cada corte foram feitas 3 fotos, totalizando 9 a 12 imagens por VE de cada rato.

Todas as imagens foram capturadas utilizando câmera Leica MC170 HD, acoplada ao microscópio Leica DM4 B (aumento de 200 a 400x). A análise (*off-line*) foi realizada usando software ImageJ. Nas fotos com aumentos de 400X e coloração com HE, foram feitas a contagem no número de capilares e a densidade capilar foi obtida pela média da contagem da quantidade de capilares identificados nas fotos, dividida pela área da imagem ($0,055488 \mu\text{m}^2$ /objetiva de 40x para o VE). Em seguida, a área foi normalizada em mm^2 e a densidade foi demonstrada em número de capilares/ mm^2 (DUCHATSCH et al., 2021). A partir da coloração com HE, os miócitos (tom de rosa) e os núcleos dos capilares de cada miócito (em tom de roxo), foram identificados para análise de diâmetro de miócitos, com regiões longitudinais capturadas em cada imagem com objetiva de 40x. Para cada miócito foi feito o reconhecimento do núcleo e das membranas limitantes entre um miócito e outro. Foi traçada uma linha reta entre as membranas que passasse pelo centro do núcleo. A medida em µm foi utilizada como diâmetro dos miócitos (DUCHATSCH et al., 2021). Nas fotos longitudinais, com aumentos de 200X e coloração de Picrossírius Red, foram identificados os miócitos (em amarelo) e as fibras de colágeno (em vermelho). A quantificação da área de colágeno e a % de área de colágeno foi realizada automaticamente pelo software Image J, a partir da detecção de coloração vermelha em uma determinada área (CURY et al., 2018).

4.8 Métodos Estatísticos

Para avaliar a normalidade das amostras foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Para as amostras com distribuição normal, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram utilizados testes paramétricos (Análise de variância de 2 caminhos ou teste T de Student), com post-hoc de Tukey. Para as amostras com distribuição anormal, os resultados foram apresentados como média, desvio padrão (DP), valor mínimo (Mín), valor máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md) e terceiro quartil (3Q). Nos casos em que houve diferença estatística no teste de Kruskal-Wallis foi realizada a comparação pairwise e os valores de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes. Para a realização da curva de sobrevivência foi utilizado o teste Log-rank (Mantel-Cox). Para a análise inferencial de associação entre as variáveis qualitativas nominais e os grupos foi realizado o teste Qui-quadrado. Para todas as análises foi considerado $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados do Protocolo 1

Com o objetivo de entender as diferenças entre os animais com EA e os animais sham, foi investigada a frequência de número de óbitos, na qual os animais com EA demonstraram morrer mais no pós-cirúrgico e ao longo da evolução da doença, quando comparado com os animais sham ($P < 0,01$), como observado na Figura 2.

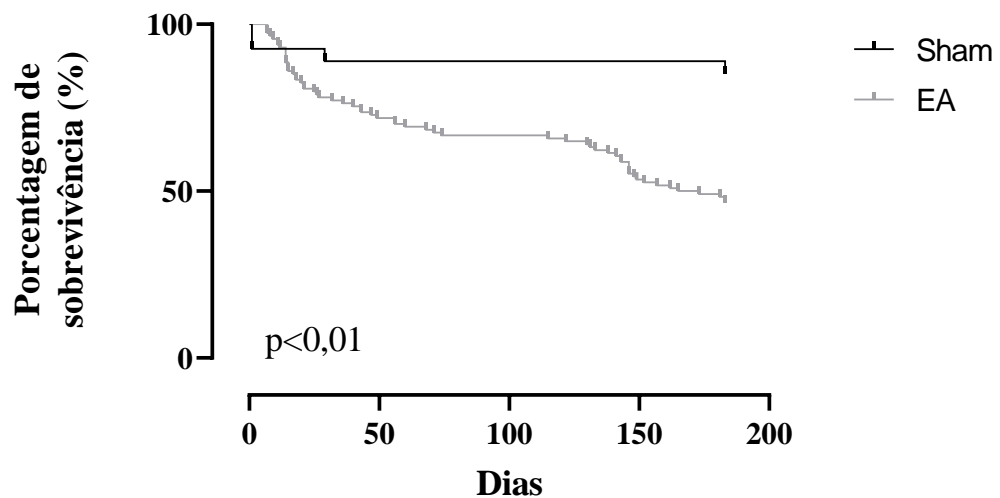


Figura 2: Curva de sobrevivência. Os animais em preto representam o grupo sham, enquanto os animais em cinza representam os animais com estenose aórtica. Significância: $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Um dos fatores que pode contribuir para os animais com EA morrerem mais é a diminuição da capacidade aeróbia e, portanto, a intolerância ao esforço, que foi investigada através do teste de capacidade física máxima. Conforme mostrado na Figura 3, os animais com EA correram por um menor período (-32%) quando comparado aos animais sham ($537 \pm 62s$ vs. $791 \pm 51s$, para EA vs. sham, $P=0,003$). É importante notar que esses resultados foram obtidos antes do tratamento com DEX.

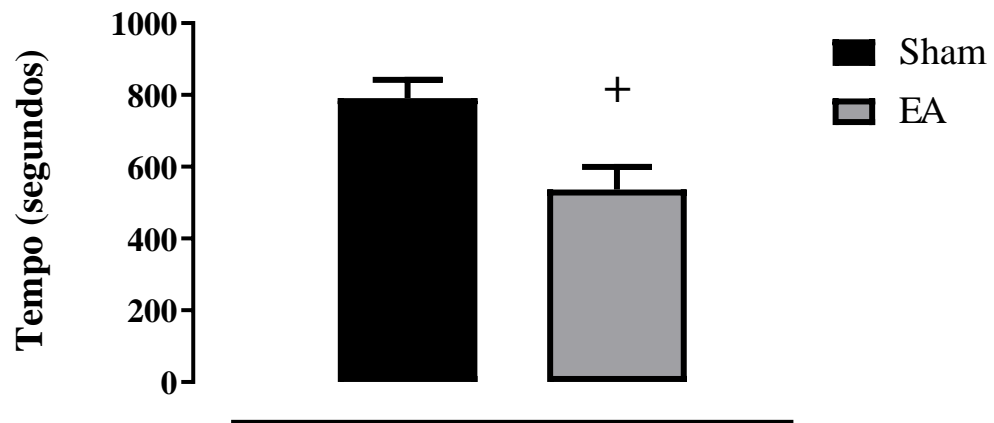


Figura 3: Teste de Capacidade Física Máxima. A barra em preto representa o grupo sham (n=20), enquanto que a barra cinza representa os animais com estenose aórtica (EA, n=23). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, significância: + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

A presença de características da IC pode contribuir com o resultado do aumento da intolerância ao esforço, encontrado anteriormente. Foram investigadas características de IC *in vivo* e *post-mortem*. *In vivo* foram observado comportamento apático, pêlo alterado e taquipneia e *post-mortem* foram observados: presença de derrame pleural, de trombos atriais, ascite e congestão hepática. Todas essas características foram observadas nos grupos com EA, porém os resultados de taquipneia, derrame pleural, trombos atriais, ascite e congestão hepática, foram reduzidos ou mantidos com o tratamento com DEX, exceto os trombos atriais (Figura 4).

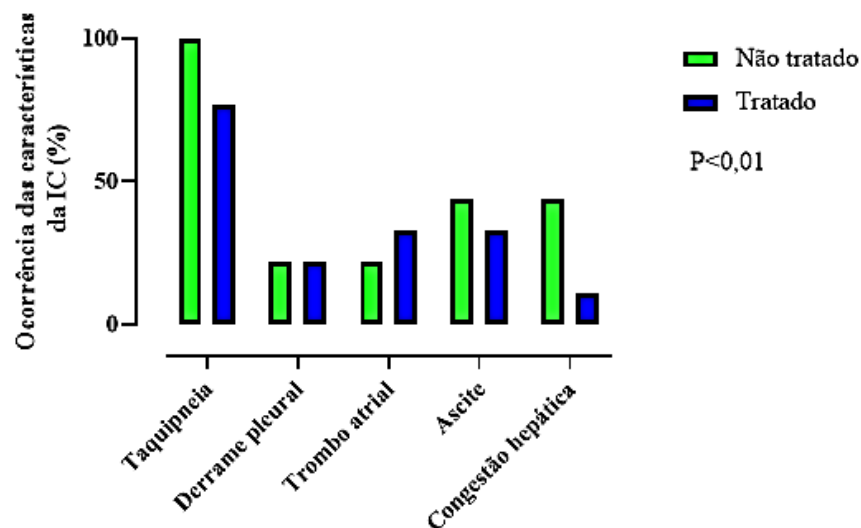


Figura 4: Ocorrência das características da insuficiência cardíaca (%) nos grupos tratados (n= 9) ou não (n=9) com DEX. São características da insuficiência cardíaca: taquipneia, derrame pleural, trombo atrial, ascite e congestão hepática. Significância: $p < 0,05$.

Como o objetivo de investigar os efeitos do tratamento da DEX em animais com EA, foi feito um levantamento de alguns resultados já conhecidos pela literatura, como é o caso do PC. Conforme mostrado na Tabela 1, todos os grupos tiveram aumento de PC semelhante durante as 24 semanas após a cirurgia ($\Delta=345 \pm 15\text{g}$, $361 \pm 20\text{g}$, $340 \pm 14\text{g}$ e $330 \pm 17\text{g}$, para S, SD, EA e EAD, respectivamente). No entanto, o tratamento com DEX reduziu significativamente o PC de ratos, quando comparado com seus respectivos controles (-1767% para SD vs. S e -588% para EAD vs. EA, $P<0,001$), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de peso corporal.

	S (n=12)	SD (n=11-12)	EA (n=9)	EAD (n=8-13)
Delta de PC período pré-tratamento (g)	345 ± 15	361 ± 20	340 ± 14	330 ± 17
Delta de PC período pós-tratamento (g)	3 ± 8	-50 ± 2*	8 ± 3	-55 ± 4*

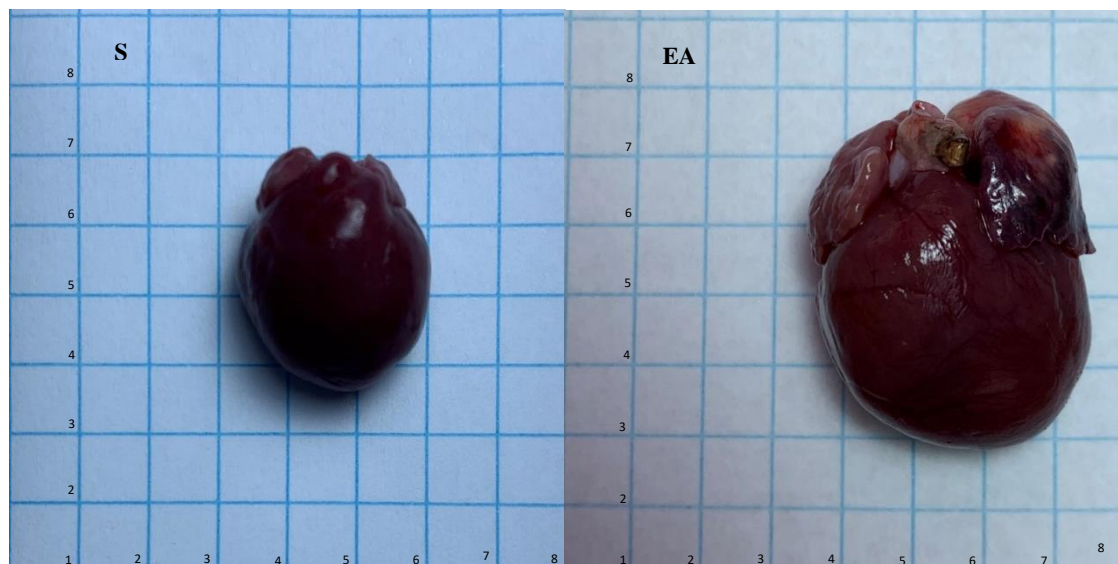
Delta de peso corporal (PC) pré-tratamento e pós-tratamento com DEX ou salina, em todos os grupos: Sham (S), Sham DEX (SD), Controle de estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Pode-se observar na Tabela 2 que a relação peso úmido/seco do pulmão foi reduzida após o tratamento com DEX apenas nos grupos sham ($3,998 \pm 0,168$ vs. $4,512 \pm 0,169$, para SD e S, $P= 0,020$). Os corações dos animais EA, independente do tratamento com DEX, foram mais pesados do que os animais sham (+67% para EA vs. S e +59% para EAD vs. SD, $P<0,001$ -figura 5), assim como o VE (+58%, para EA vs. S e +48%, para EAD vs. SD, $P<0,001$) e átrios (+188%, para EA vs. S e +224%, para EAD vs. SD, $P<0,001$ e $P= 0,002$ respectivamente). Por outro lado, o peso do músculo tibial anterior (TA) estava reduzido em animais com EA (-14%, para EA vs. S, $P=0,016$ e -17%, para EAD vs. SD, $P=0,007$). As glândulas adrenais estavam menores em ambos os grupos tratados com DEX, confirmando a eficácia da DEX (-35%, para SD vs. S e -45%, para EAD vs. EA, $P=0,002$ e $P<0,001$ respectivamente). Adicionalmente, o grupo EA apresentou peso da glândula adrenal 41% maior que seu respectivo controle ($P<0,001$). Importante observar que o comprimento do osso da tíbia foi semelhante entre os grupos.

Tabela 2 - Dados morfológicos.

	S (n=12)	SD (n=11)	EA (n=9)	EAD (n=9)
Tíbia (cm)	4,217 ± 0,024	4,173 ± 0,045	4,211 ± 0,035	4,189 ± 0,039
Fígado (u/s)	3,083 ± 0,054	2,926 ± 0,218	2,903 ± 0,073	2,975 ± 0,072
Pulmão (u/s)	4,512 ± 0,169	3,998 ± 0,168*	4,763 ± 0,058	4,432 ± 0,180
Coração/tíbia (g/cm)	0,343 ± 0,027	0,308 ± 0,010	0,573 ± 0,040 ⁺	0,491 ± 0,047 ⁺
VE/tíbia (g/cm)	0,216 ± 0,012	0,208 ± 0,006	0,341 ± 0,015 ⁺	0,309 ± 0,014 ⁺
VD/tíbia (g/cm)	0,087 ± 0,013	0,069 ± 0,003	0,119 ± 0,012	0,093 ± 0,015
Átrios/tíbia (g/cm)	0,033 ± 0,003	0,024 ± 0,002	0,095 ± 0,018 ⁺	0,077 ± 0,018 ⁺
TA/tíbia (g/cm)	0,189 ± 0,007	0,174 ± 0,006	0,162 ± 0,009 ⁺	0,144 ± 0,008 ⁺
Glândula Adrenal/tíbia (g/cm)	0,014 ± 0,001	0,009 ± 0,000*	0,020 ± 0,002 ⁺	0,011 ± 0,001*

Comprimento do osso da tíbia, proporção de peso úmido/seco do fígado (u/s), proporção de peso úmido/seco do pulmão (u/s), coração, ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrios, músculo tibial anterior (TA) e peso da glândula adrenal (soma de ambas as glândulas adrenais) foram normalizados pelo comprimento do osso da tíbia em todos os grupos: Sham (S), Sham DEX (SD), Controle de estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * p <0,05, para efeitos de tratamento (vs. controle), + p <0,05, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

**Figura 5:** Imagens representativas do coração de um rato Sham (S) e de um rato Estenose Aórtica (EA).

Os resultados dos dados ecocardiográficos estruturais (Tabela 3) mostraram que os animais EA, independente do tratamento com DEX, apresentaram maior espessura da parede posterior e do septo interventricular, assim como a espessura relativa do VE, massa do VE e índice de massa do VE, comparados com seus respectivos controles. Além disso, houve

aumento do átrio esquerdo e AE/AO (grupos EA vs. seus respectivos controles). Ratos com EA tratados com DEX (EAD) apresentaram valores mais baixos de dados estruturais ecocardiográficos quando comparados com ratos controle com EA, como -19% na espessura da parede posterior ($P < 0,001$), -19% no septo interventricular ($P < 0,001$), -17 % na espessura relativa do VE ($P < 0,001$), -28% na massa do VE ($P = 0,006$), bem como -18% no índice da massa do VE ($P = 0,039$). Importante notar que o tratamento com DEX, por si só, não alterou os parâmetros cardíacos estruturais em ratos sham, conforme observado na Tabela 3. Em relação à função cardíaca, os animais EA exibiram uma diminuição na VEPP, o que sugere uma diminuição na função sistólica do VE e os aumentos de AE, AE/AO, E mitral e aumento de E/A (mesmo que não significativo) sugerem uma disfunção diastólica. Além disso, a manutenção da FE demonstra ser um modelo experimental de IC com FE preservada. Quando o grupo EA foi tratado com DEX, observam-se os mesmos resultados, porém com aumento significativo da piora do desempenho miocárdico (índice tei).

Tabela 3- Valor da frequência cardíaca e dados ecocardiográficos estruturais e funcionais em todos os grupos.

	S (n=12)	SD (n=11)	EA (n=9)	EAD (n=9)
FC (bpm)	277± 15	316 ± 17	274 ± 5	280 ± 11
DDVE (mm)	8,382 ± 0,305	7,812 ± 0,179	8,464 ± 0,368	8,291 ± 0,378
DSVE (mm)	4,368 ± 0,339	3,544 ± 0,211	4,107 ± 0,423	3,750 ± 0,550
EDPP (mm)	1,313 ± 0,009	1,290 ± 0,009	2,166 ± 0,102 ⁺	1,758 ± 0,045 ⁺⁺
EDSIV (mm)	1,314 ± 0,009	1,299 ± 0,009	2,166 ± 0,102 ⁺	1,758 ± 0,045 ⁺⁺
AE (mm)	5,663 ± 0,164	5,556 ± 0,140	8,144 ± 0,404 ⁺	7,753 ± 0,471 ⁺
AE/AO	1,343 ± 0,025	1,340 ± 0,024	1,956 ± 0,099 ⁺	1,889 ± 0,101 ⁺
Esp. Rel. VE	0,316 ± 0,008	0,332 ± 0,008	0,515 ± 0,024 ⁺	0,428 ± 0,013 ⁺⁺
Massa VE (g)	0,785 ± 0,058	0,677 ± 0,027	1,601 ± 0,183 ⁺	1,146 ± 0,120 ⁺⁺
ÍND. MVE (g/kg)	1,667 ± 0,099	1,533 ± 0,055	3,532 ± 0,332 ⁺	2,903 ± 0,258 ⁺⁺
% ENC. ENDO	48,479 ± 2,053	54,914 ± 1,918	52,346 ± 2,847	56,116 ± 4,273
% ENC. MESO	28,780 ± 1,348	33,312 ± 1,146	30,362 ± 1,476	32,850 ± 3,008
VEPP (mm/s)	39,899 ± 1,666	43,419 ± 2,306	32,812 ± 1,692 ⁺	33,867 ± 2,729 ⁺
FE %	0,856 ± 0,018	0,903 ± 0,012	0,882 ± 0,022	0,896 ± 0,029
Tei index	0,484 ± 0,020	0,454 ± 0,015	0,556 ± 0,042	0,561 ± 0,042 ⁺
E Mitral (cm/s)	74,636 ± 2,248	68,857 ± 1,600	106,778 ± 11,289 ⁺	99,444 ± 12,721 ⁺
A Mitral (cm/s)	45,545 ± 2,538	53,000 ± 3,601	49,000 ± 8,949	61,333 ± 11,438
E/A	1,686 ± 0,098	1,369 ± 0,112	3,298 ± 0,819	2,795 ± 0,965
TRIV (ms)	27,250 ± 0,946	24,818 ± 1,327	23,222 ± 2,165	22,444 ± 1,796

Frequência Cardíaca (FC), Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo (DDVE), Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE), Espessura Diastólica da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (EDPP), Espessura Diastólica do Septo Interventricular (EDSIV), Diâmetro do Átrio Esquerdo (AE), Diâmetro da Aorta (AO), Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo (ESP. REL. VE), Massa do Ventrículo Esquerdo (MASSA VE), Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (ÍND. MVE), % de Encurtamento Endocárdico (%ENC. ENDO), % de Encurtamento Mesocárdio (%ENC. MESO), Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (VEPP), Fração de Ejeção (FE%), Índice de Performance Miocárdica (TEI INDEX), Onda E do Fluxo Transmitral (E MITRAL); Onda A do Fluxo Transmitral (A MITRAL); Tempo de Relaxamento Isovolumétrico do Ventrículo Esquerdo (TRIV), em todos os grupos: sham (S), sham tratado com DEX (SD), estenose aórtica (EA) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * p <0,05, para efeitos de tratamento (vs. controle), + p <0,05, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Conforme ilustrado na Figura 6, o perfil inflamatório dos animais EA mostrou um aumento nos níveis de citocinas e marcadores pró e anti-inflamatórios, como a IL1- α (+382% para EA vs. S, P<0,001), IL1- β (+331% para EA vs. S, P<0,001), IL-4 (+174% para EA vs. S, P=0,002), IL-6 (+86% para EA vs. S, P<0,001), IL-10 (+280% para EA vs. S, P<0,001), IL-12p70 (+60% para EA vs. S, P<0,001), IFN- γ (+60% para EA vs. S, P=0,007), TGF β (+82%

para EA vs. S, $P < 0,001$), $\text{TNF}\alpha$ (+281% para EA vs. S, $P < 0,001$) e VEGF (+112% para EA vs. S, $P < 0,001$). Por outro lado, o tratamento com DEX bloqueou o aumento de citocinas e marcadores pró e anti-inflamatórios. O grupo EAD apresentou valores mais baixos de IL1- α (-57% para EAD vs. EA, $P = 0,002$), IL1- β (-70% para EAD vs. EA, $P < 0,001$), IL-4 (-45% para EAD vs. EA $P = 0,028$), IL-6 (-50% para EAD vs. EA, $P < 0,001$), IL-10 (-41% para EAD vs. EA, $P = 0,037$), IL-12 (-25% para EAD vs. EA, $P = 0,021$), IFN- γ (-49% para EAD vs. EA, $P < 0,001$), TGF β (-33% para EAD vs. EA, $P < 0,001$), $\text{TNF}\alpha$ (-61% para EAD vs. EA, $P < 0,001$) e VEGF (-54% para EAD vs. EA, $P < 0,001$).

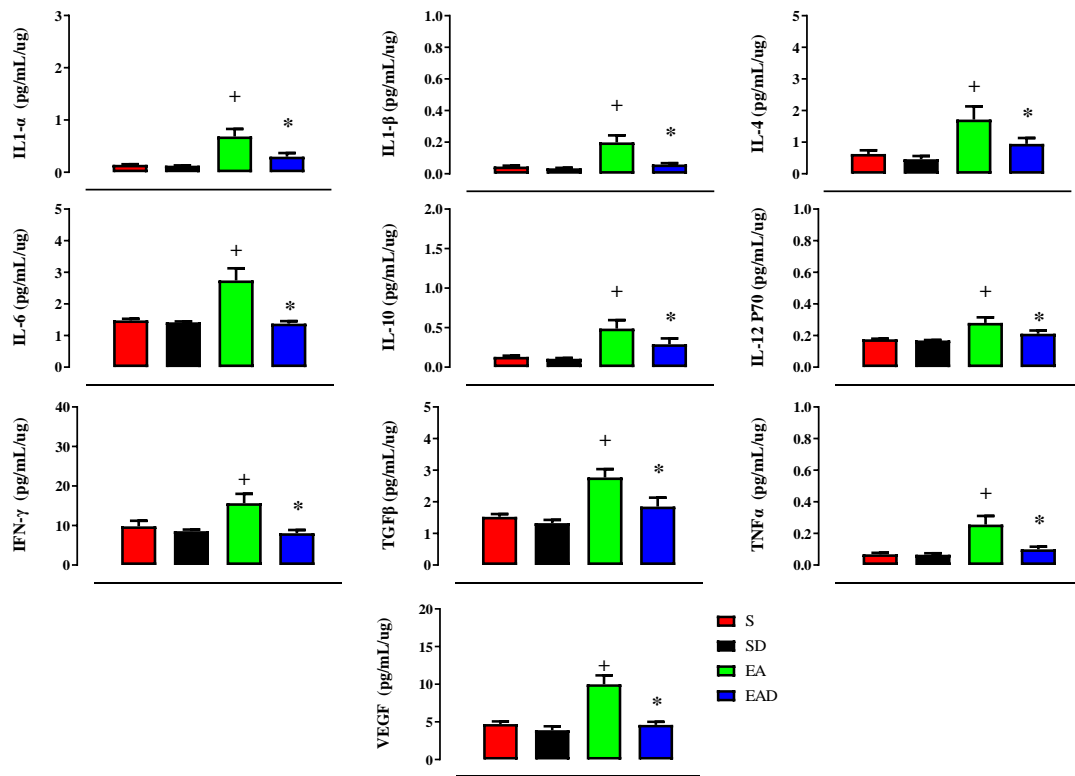


Figura 6: Análise proteica de citocinas e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco: interleucina 1 α (IL1- α), interleucina 1 β (IL1- β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ), fator transformador de crescimento β (TGF β), fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em todos os grupos: Sham (S, n=10), Sham DEX (SD, n=10), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=9). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

A Figura 7, no painel superior, ilustra um corte longitudinal do coração de um rato de cada grupo corado com HE. O painel inferior da Figura 7 mostra que o diâmetro dos miócitos foi maior em animais com EA (+15% para EA vs. S, $P < 0,001$ e +12% para EAD vs. SD, $P = 0,006$) e o tratamento com DEX não foi capaz de atenuar esse aumento. Isso se deve ao fato que o clipe de prata ainda estava presente em volta da aorta.

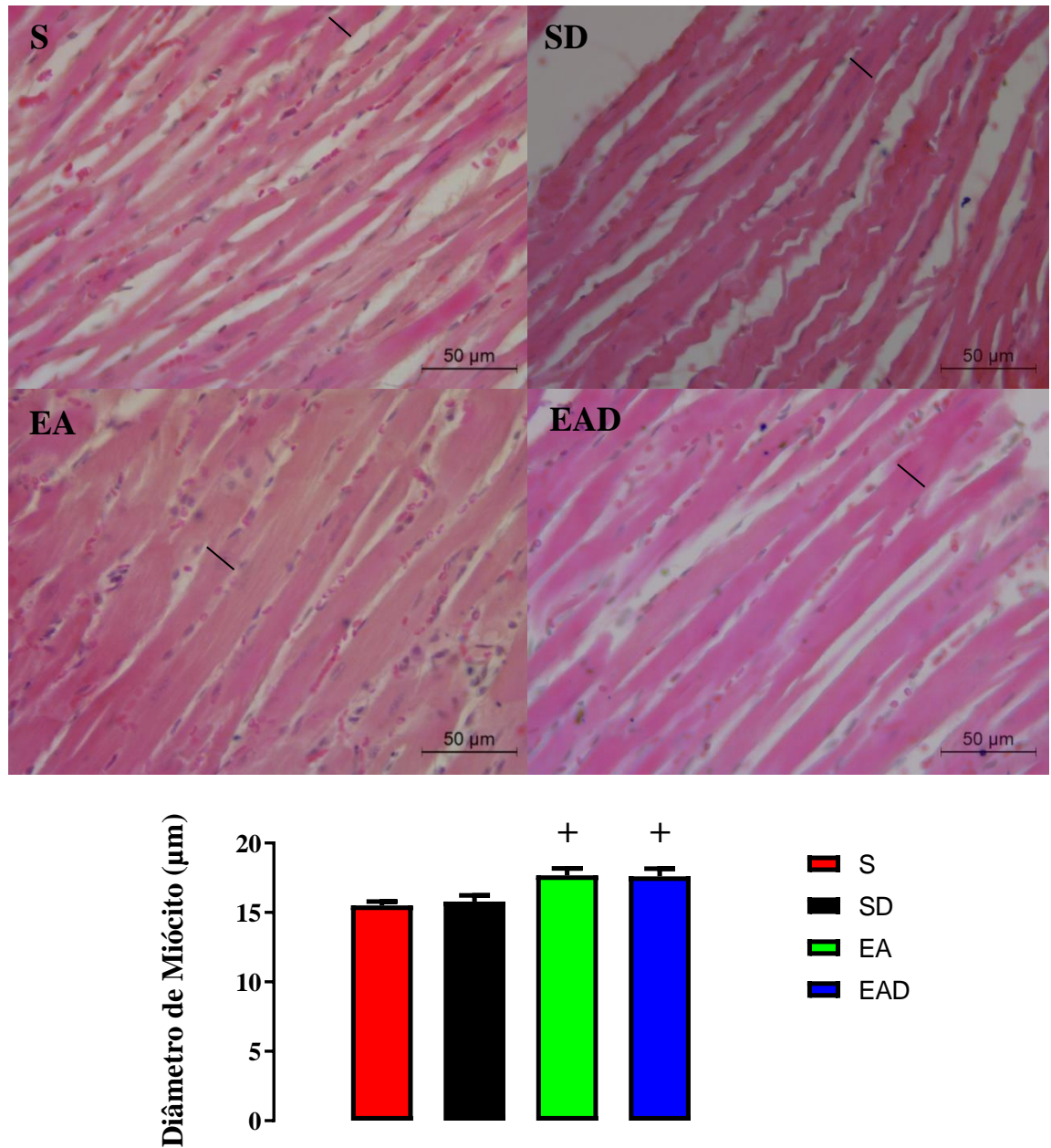


Figura 7: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina e eosina (HE). A largura dos miócitos está demonstrada pela linha preta. Barra: 50 µm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise do diâmetro dos miócitos (µm) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Na Figura 8, o painel superior, ilustra um corte transversal do coração de um rato de cada grupo corado com HE, enquanto que o painel inferior mostra que não houve diferença significativa na densidade capilar no VE entre os grupos.

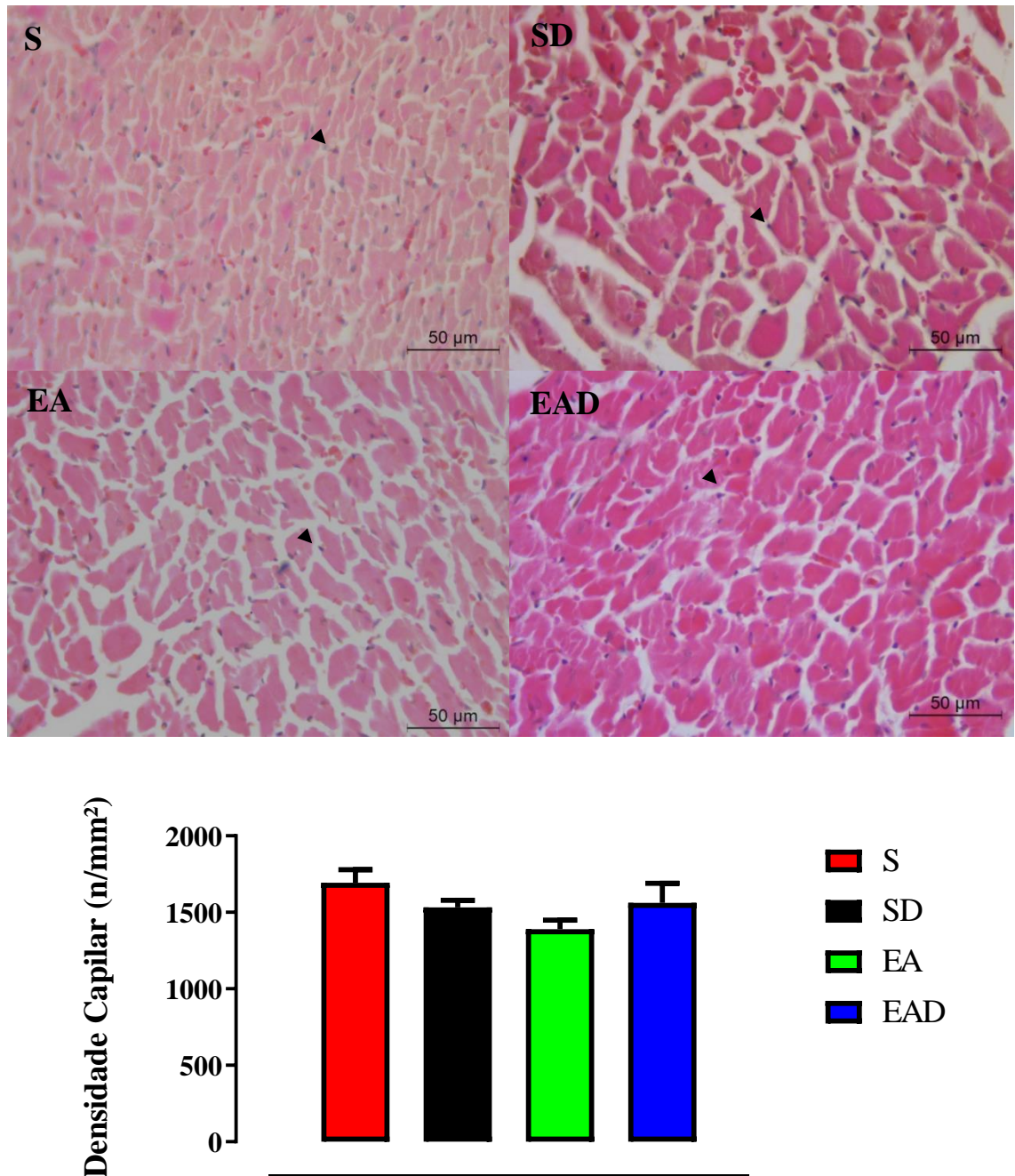


Figura 8: Painel superior: imagens representativas de cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina (HE) mostrando os capilares indicados pela seta preta. Barra: 50 μm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise de densidade capilar no ventrículo esquerdo (n/mm²) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * p <0,05, para efeitos de tratamento (vs. controle), + p <0,05, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Na Figura 9, no painel superior, há uma ilustração de um corte longitudinal do coração de um rato de cada grupo corado com Picosirius Red, enquanto que o painel inferior mostra que os animais com EA apresentaram aumento na deposição de colágeno e o tratamento com DEX atenuou esse aumento (+70% para EA vs. S, $P < 0,001$; +68% para EAD vs. SD, $P = 0,004$ e - 23% para EAD vs. EA, $P = 0,031$), como observado na Figura 9.

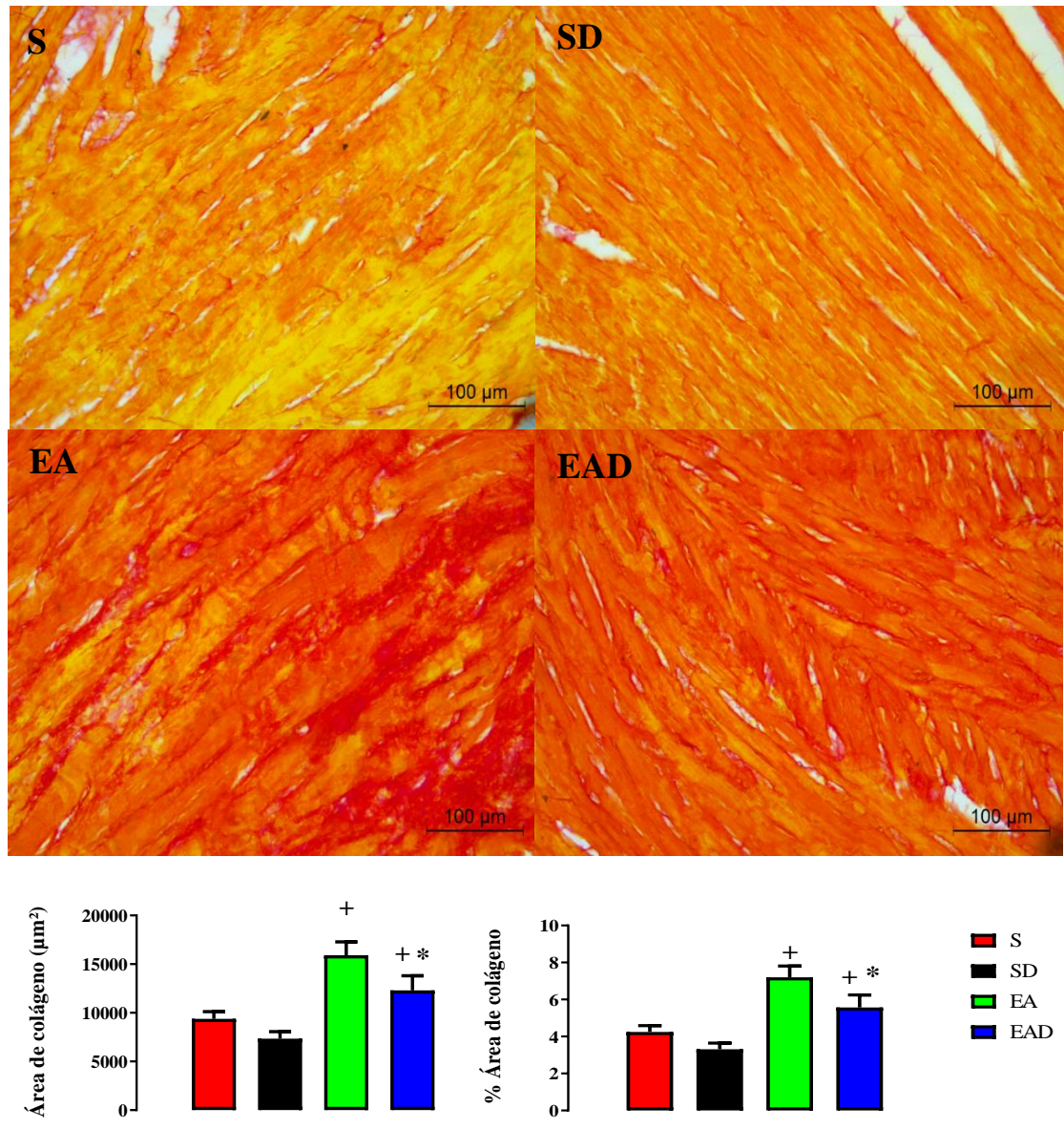


Figura 9: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com Picosirius Red, mostrando a deposição de colágeno, em que as fibras colágenas podem ser vistas em vermelho e a musculatura cardíaca em amarelo. Barra: 100 μm / aumento de 200x. Painel inferior: Resultados densitométricos da área de deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (μm²) e % da área de colágeno em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), sham DEX (SD, n=12), controle da estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com DEX (EAD, n=8). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

5.2. Resultados do Protocolo 2

Conforme já demonstrado anteriormente, os animais com EA apresentam maior mortalidade e menor tolerância ao esforço. Em se tratando dos sinais de IC apresentados nos animais com EA, *in vivo* foram observados comportamento apático, pêlo alterado e taquipneia e *post-mortem* foram observados: presença de derrame pleural, de trombos atriais, ascite e congestão hepática. O grupo EA tratado com ramipril apresentou o mesmo resultado para taquipneia quando comparado ao grupo não tratado, enquanto que a ocorrência de derrame pleural, trombo atrial e ascite foram maiores com o tratamento. Porém, a congestão hepática apresenta uma leve redução nas ocorrências após o tratamento (Figura 10).

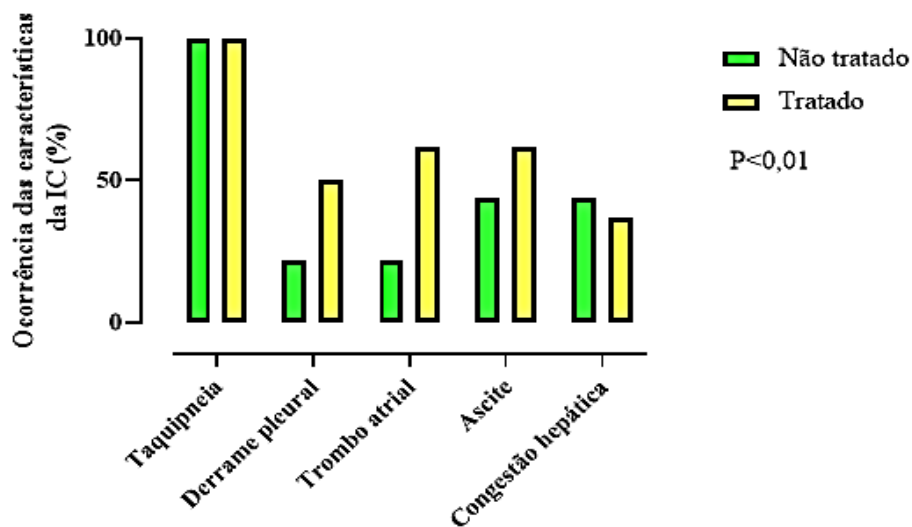


Figura 10: Ocorrência das características da insuficiência cardíaca (%) nos grupos tratados (n= 9) ou não (n=8) com ramipril. São características da insuficiência cardíaca: taquipneia, derrame pleural, trombo atrial, ascite e congestão hepática. Significância: $p < 0,05$.

Com relação aos dados de PC, houve um aumento do PC ao longo da evolução da doença em todos os grupos ($\Delta = 345 \pm 53g$, $340 \pm 42g$ e $324 \pm 45g$, para S, EA e EAR, respectivamente) e o tratamento com ramipril não promoveu nenhuma alteração significativa no PC durante o tratamento ($\Delta = 3 \pm 28g$, $-8 \pm 8g$ e $-16 \pm 11g$, para S, EA e EAR, respectivamente), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de peso corporal.

Variável	Grupo	Média	DP	Mín	Máx	1Q	Md	3Q	H	gl	p-valor
Delta PC Pré-tratamento	S	345,08	52,67	219,00	427,00	324,00	353,00	372,00	1,655	2	0,437
	EA	339,67	42,35	298,00	428,00	311,50	323,00	372,00			
	EAR	323,78	45,05	249,00	394,00	295,50	311,00	364,50			
Delta PC Pós-tratamento	S	2,67	27,79	-19,00	83,00	-13,50	-4,50	4,00	4,099	2	0,129
	EA	-7,89	8,12	-17,00	7,00	-15,00	-9,00	-1,00			
	EAR	-16,13	10,88	-32,00	-3,00	-27,00	-16,00	-5,00			

Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl) e valor de p (p-valor), para as variáveis de delta de peso corporal (PC) pré-tratamento e pós-tratamento com ramipril ou salina, em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=9). Significância: $p < 0,05$.

Os dados morfológicos demonstram uma redução da relação peso úmido/seco do pulmão nos animais EAR ($4,17 \pm 0,50$ vs. $4,76 \pm 0,17$, para EAR e EA, $P=0,022$). Houve uma hipertrofia do coração nos animais que passaram pela cirurgia de estenose aórtica (+67% para EA vs. S, $P=0,002$ e +59% para EAR vs. S, $P=0,005$), bem como é possível observar um aumento do VE (+58% para EA vs. S, $P=0,001$ e +54% para EAR vs. S, $P=0,002$) e nos átrios (+188% para EA vs. S, $P=0,001$ e +233% para EAR vs. S, $P=0,004$). O peso do TA se comportou de forma diferente, com redução do seu peso nos animais EAR (-21% para EAR vs. S, $P=0,001$). As glândulas adrenais foram maiores nos animais com EA (+41% para EA vs. S, $P=0,041$). Importante observar que o comprimento do osso da tíbia foi semelhante entre os grupos.

Tabela 5 - Dados morfológicos.

Variável	Grupo	Média	DP	Mín	Máx	1Q	Md	3Q	H	gl	p-valor	Pairwise
Tíbia (cm)	S	4,22	0,08	4,10	4,40	4,20	4,20	4,28	0,194	2	0,908	
	EA	4,21	0,11	4,10	4,40	4,10	4,20	4,30				
	EAR	4,19	0,08	4,00	4,30	4,20	4,20	4,20				
Fígado (u/s)	S	3,08	0,19	2,84	3,58	3,00	3,04	3,15	2,834	2	0,242	
	EA	2,90	0,22	2,47	3,12	2,77	2,99	3,09				
	EAR	3,06	0,32	2,70	170,50	200,25	0,00	0,00				
Pulmão (u/s)	S	4,51	0,59	3,53	5,47	4,04	4,55	4,97	7,194	2	0,027	EA>EAR (p=0,022)
	EA	4,76	0,17	4,53	5,00	4,61	4,77	4,95				
	EAR	4,17	0,50	3,33	5,05	3,83	4,20	4,37				
Coração/ Tíbia (g/cm)	S	0,34	0,09	0,26	0,61	0,29	0,32	0,37	15,558	2	0,000	EA>S (p=0,002) EAR>S (p=0,005)
	EA	0,57	0,12	0,46	0,86	0,49	0,56	0,60				
	EAR	0,54	0,14	0,38	0,79	0,41	0,55	0,63				
VE/ Tíbia (g/cm)	S	0,22	0,04	0,17	0,32	0,19	0,21	0,23	18,103	2	0,000	EA>S (p=0,001) EAR>S (p=0,002)
	EA	0,34	0,05	0,28	0,44	0,31	0,34	0,36				
	EAR	0,34	0,05	0,28	0,42	0,30	0,34	0,40				
VD/ Tíbia (g/cm)	S	0,09	0,04	0,05	0,21	0,06	0,07	0,10	5,309	2	0,070	
	EA	0,12	0,04	0,07	0,18	0,09	0,11	0,15				
	EAR	0,10	0,04	0,06	0,15	0,06	0,11	0,13				
Átrios/ Tíbia (g/cm)	S	0,03	0,01	0,02	0,07	0,03	0,03	0,04	15,919	2	0,000	EA>S (p=0,001) EAR>S (p=0,004)
	EA	0,09	0,05	0,04	0,22	0,06	0,08	0,11				
	EAR	0,10	0,06	0,03	0,17	0,04	0,10	0,16				
TA/ Tíbia (g/cm)	S	0,19	0,02	0,14	0,22	0,17	0,19	0,21	12,936	2	0,002	S>EAR (p=0,001)
	EA	0,16	0,03	0,10	0,20	0,16	0,16	0,17				
	EAR	0,15	0,01	0,13	0,17	0,14	0,15	0,16				
Adrenais/ Tíbia (g/cm)	S	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	6,161	2	0,046	EA>S (p=0,041)
	EA	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02				
	EAR	0,02	0,00	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02				

Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl), valor de p (p-valor) e pairwise, com correção de Bonferroni, para as variáveis: comprimento do osso da tíbia, proporção de peso úmido/seco do fígado (u/s), proporção de peso úmido/seco do pulmão (u/s), coração, ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrios, músculo tibial anterior (TA) e peso da glândula adrenal (soma de ambas as glândulas adrenais) que foram normalizadas pelo comprimento do osso da tíbia, em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=8). Significância: $p < 0,05$.

Com relação aos dados estruturais do coração segundo o ecocardiograma, é possível observar que os animais com estenose aórtica, independente do tratamento, apresentaram um aumento da variável EDPP e EDSIV (66% para EA vs. S, $P=0,001$ e 70% para EAR vs. S, $P<0,001$), da variável AE (44% para EA vs. S, $P=0,001$ e 47% para EAR vs. S, $P=0,002$), AE/AO (46% para EA vs. S, $P=0,001$ e 53% para EAR vs. S, $P=0,001$), ESP REL VE (59% para EA vs. S, $P=0,002$ e 81% para EAR vs. S, $P<0,001$), massa VE (105% para EA vs. S, $P>0,001$ e 86% para EAR vs. S, $P=0,003$) e Índ MVE (111% para EA vs. S, $P=0,001$ e 104%

para EAR vs. S, P=0,001). A variável VEPP, que está relacionada a função cardíaca, teve uma redução nos animais com estenose, independente do tratamento, de -18% (EA vs. S, P=0,044) e -26% (EAR vs. S, P=0,002), enquanto a variável TRIV teve uma redução apenas no grupo EAR de -22% (EAR vs. S, P=0,043), apesar disso os aumentos de AE, AE/AO, E mitral (não significativo) e aumento de E/A (não significativo) sugerem uma disfunção diastólica. Com a manutenção dos valores da FE, assim como no protocolo 1, o modelo experimental de IC deste estudo pode se caracterizado como um modelo de IC com FE preservada.

Tabela 6- Valor da frequência cardíaca e dados ecocardiográficos estruturais e funcionais.

Variável	Grupo	Média	DP	Mín	Máx	1Q	Md	3Q	H	gl	p-valor	Pairwise
FC (bpm)	S	277,25	53,02	219,00	390,00	235,50	271,00	297,00	0,812	2	0,666	
	EA	273,67	14,65	254,00	295,00	257,00	275,00	285,00				
	EAR	262,00	36,89	198,00	312,00	246,00	254,00	299,50				
DDVE (mm)	S	8,38	1,06	7,64	11,58	7,79	8,14	8,47	2,684	2	0,261	
	EA	8,46	1,10	7,01	10,04	7,74	8,01	9,75				
	EAR	7,78	0,83	6,81	9,17	7,01	7,68	8,51				
DSVE (mm)	S	4,37	1,17	3,32	7,72	3,61	4,17	4,66	0,749	2	0,688	
	EA	4,11	1,27	2,91	6,35	3,06	3,53	5,25				
	EAR	4,04	1,73	2,08	6,23	2,30	3,76	5,96				
EDPP (mm)	S	1,31	0,03	1,25	1,37	1,29	1,31	1,33	20,629	2	0,000	EA>S (p=0,001)
	EA	2,17	0,31	1,62	2,41	1,86	2,32	2,39				EAR>S (p<0,001)
	EAR	2,23	0,24	1,89	2,49	1,97	2,33	2,46				
EDSIV (mm)	S	1,31	0,03	1,25	1,37	1,29	1,32	1,33	20,665	2	0,000	EA>S (p=0,001)
	EA	2,17	0,31	1,62	2,41	1,86	2,32	2,39				EAR>S (p<0,001)
	EAR	2,23	0,24	1,89	170,50	200,25	0,00	0,00				
AE (mm)	S	5,66	0,57	5,11	7,01	5,20	5,47	5,93	17,226	2	0,000	EA>S (p=0,001)
	EA	8,14	1,21	5,84	9,42	7,12	8,54	9,09				EAR>S (p=0,002)
	EAR	8,33	1,93	5,84	10,73	6,47	7,88	10,41				
AE/AO	S	1,34	0,09	1,22	1,52	1,27	1,34	1,41	18,155	2	0,000	EA>S (p=0,001)
	EA	1,96	0,30	1,39	2,29	1,70	2,03	2,17				EAR>S (p=0,001)
	EAR	2,05	0,46	1,46	2,68	1,59	1,98	2,51				
Esp. rel. VE	S	0,32	0,03	0,23	0,34	0,31	0,32	0,33	21,341	2	0,000	EA>S (p=0,002)
	EA	0,51	0,07	0,40	0,61	0,46	0,50	0,58				EAR>S (p<0,001)
	EAR	0,58	0,04	0,52	0,64	0,54	0,56	0,63				
Massa VE (g)	S	0,78	0,20	0,64	1,39	0,66	0,74	0,80	18,238	2	0,000	EA>S (p>0,001)
	EA	1,60	0,55	0,95	2,36	1,00	1,61	2,17				EAR>S (p=0,003)
	EAR	1,45	0,42	0,92	2,00	1,00	1,54	1,81				
Índ.MVE (g/kg)	S	1,67	0,34	1,39	2,67	1,48	1,58	1,73	18,835	2	0,000	EA>S (p=0,001)
	EA	3,53	1,00	2,26	5,09	2,54	3,43	4,50				EAR>S (p=0,001)
	EAR	3,40	0,86	2,02	4,51	2,68	3,52	4,23				
%enc.	S	48,48	7,11	33,33	59,41	43,32	49,00	53,03	0,880	2	0,644	

endo	EA	52,35	8,54	36,75	62,31	45,91	54,51	59,17				
	EAR	49,25	18,20	21,67	69,81	31,94	50,86	67,27				
	S	28,78	4,67	18,05	34,06	25,37	29,59	32,85	0,469	2	0,791	
%enc. meso	EA	30,36	4,43	22,33	37,08	27,66	30,68	33,91				
	EAR	26,71	11,75	9,63	41,44	15,49	27,35	38,55				
	S	39,90	5,77	32,43	51,56	35,74	39,92	44,07	12,903	2	0,002	S>EA (p=0,044)
VEPP (mm/s)	EA	32,81	5,08	22,95	39,37	29,39	34,13	36,74				S>EAR (p=0,002)
	EAR	29,53	5,15	22,58	36,73	25,03	29,48	34,87				
	S	0,86	0,06	0,70	0,93	0,82	0,87	0,90	0,880	2	0,644	
FE%	EA	0,88	0,07	0,75	0,95	0,84	0,91	0,93				
	EAR	0,82	0,17	0,52	0,97	0,68	0,87	0,96				
	S	0,48	0,07	0,42	0,61	0,43	0,46	0,54	1,840	2	0,398	
TEI index	EA	0,56	0,13	0,40	0,74	0,44	0,57	0,67				
	EAR	0,50	0,05	0,43	0,57	0,45	0,52	0,54				
	S	74,64	7,79	59,00	84,00	68,00	75,00	82,00	3,950	2	0,139	
E mitral	EA	106,78	33,87	69,00	148,00	74,00	98,00	141,00				
	EAR	93,88	34,48	54,00	138,00	65,00	83,00	133,75				
	S	45,55	8,79	36,00	68,00	40,00	43,00	51,00	1,959	2	0,376	
A mitral	EA	49,00	26,85	21,00	89,00	25,50	42,00	77,00				
	EAR	36,38	21,63	16,00	68,00	18,25	26,50	59,25				
	S	1,69	0,34	1,15	2,28	1,34	1,76	1,88	1,113	2	0,573	
E/A	EA	3,30	2,46	0,78	6,67	0,97	2,33	5,69				
	EAR	3,98	3,00	0,95	8,63	0,99	3,67	6,56				
	S	27,25	3,28	22,00	33,00	24,50	26,00	30,00	6,403	2	0,041	S>EAR (p=0,043)
TRIV (ms)	EA	23,22	6,50	15,00	33,00	16,50	22,00	29,00				
	EAR	21,13	4,45	15,00	26,00	18,00	20,00	26,00				

Grupo, média, desvio padrão (DP), mínimo (Mín), máximo (máx), primeiro quartil (1Q), mediana (Md), terceiro quartil (3Q), H de Kruskal-Wallis (H), graus de liberdade (gl), valor de p (p-valor) e pairwise, com correção de Bonferroni, para as variáveis: Frequência Cardíaca (FC), Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo (DDVE), Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE), Espessura Diastólica da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (EDPP), Espessura Diastólica do Septo Interventricular (EDSIV), Diâmetro do Átrio Esquerdo (AE), Diâmetro da Aorta (AO), Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo (ESP. REL. VE), Massa do Ventrículo Esquerdo (MASSA VE), Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (ÍND. MVE), % de Encurtamento Endocárdico (%ENC. ENDO), % de Encurtamento Mesocárdio (%ENC. MESO), Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (VEPP), Fração de Ejeção (FE%), Índice de Performance Miocárdica (TEI INDEX), Onda E do Fluxo Transmitral (E MITRAL); Onda A do Fluxo Transmitral (A MITRAL); Tempo de Relaxamento Isovolumétrico do Ventrículo Esquerdo (TRIV), em todos os grupos: Sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratado com ramipril (EAR, n=8). Significância: p <0,05.

Na Figura 11 pode-se observar que as citocinas e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco dos animais EA estavam aumentadas quando comparadas às dos animais controles, como a IL-6 (+86% para EA vs. S, P=0,004), IL-12p70 (+60% para EA vs. S, P=0,044), TGFβ (+82% para EA vs. S, P=0,001), TNFα (+281% para EA vs. S, P=0,015) e VEGF (+112% para EA vs. S, P=0,010).

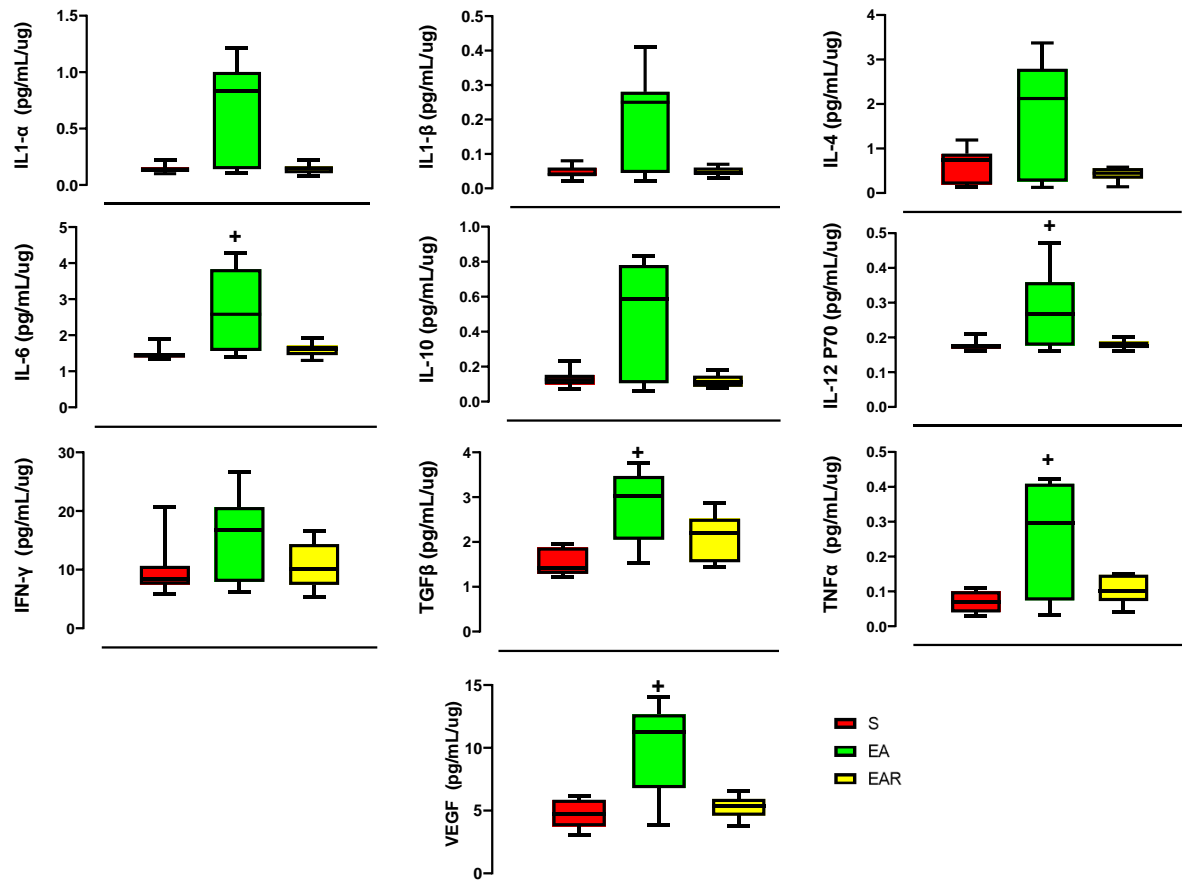


Figura 11: Análise proteica de citocinas e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco: interleucina 1α (IL1-α), interleucina 1 β (IL1-β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN-γ), fator transformador de crescimento β (TGFβ), fator de necrose tumoral α (TNFα) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em todos os grupos: Sham (S, n=10), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * p <0,05, para efeitos de tratamento (vs. controle), + p <0,05, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

Na Figura 12, está ilustrado no painel superior, um corte longitudinal do coração de um rato de cada grupo corado com HE, enquanto que o painel inferior mostra o resultado da análise do diâmetro de miócitos. Pode-se observar um aumento no tamanho dos miócitos nos animais com EA, independente do tratamento com ramipril (+15% para EA vs. S, $P=0,001$ e +14% para EAR vs. S, $P=0,002$).

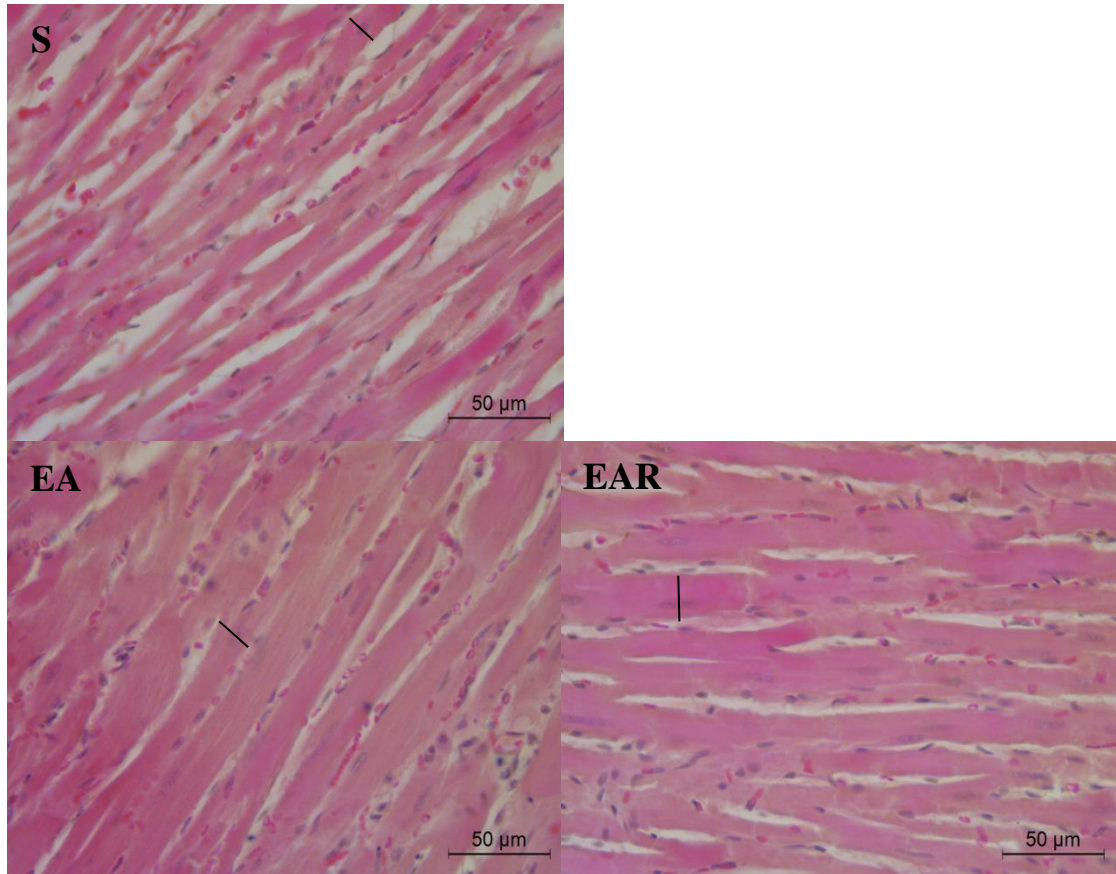


Figura 12: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina e eosina (HE). A largura dos miócitos está demonstrada pela linha preta. Barra: 50 µm / aumento de 400x. Painel inferior: Análise do diâmetro dos miócitos (µm) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. sham).

No painel superior da Figura 13, um corte transversal do coração de um rato de cada grupo corado com HE está ilustrado, enquanto que no painel inferior está demonstrado os resultados de densidade capilar que não foram alterados pela cirurgia de estenose aórtica, bem como pelo tratamento com ramipril.

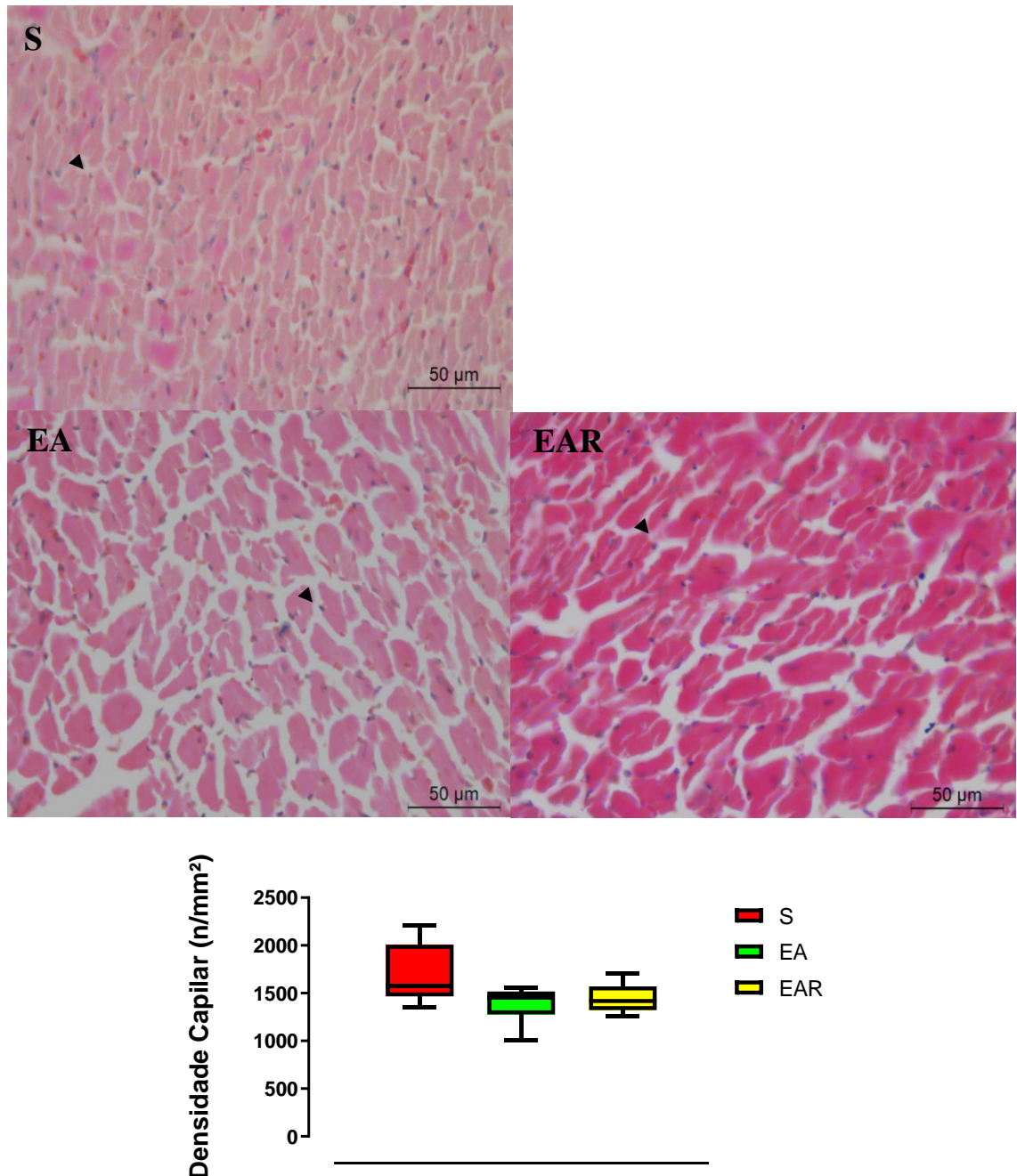


Figura 13: Painel superior: imagens representativas de cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina (HE) mostrando os capilares indicados pela seta preta. Barra: 50 μ m / aumento de 400x. Painel inferior: Análise de densidade capilar no ventrículo esquerdo (n/mm²) em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * p <0,05, para efeitos de tratamento (vs. controle), + p <0,05, para efeitos de estenose aórtica (vs. Sham).

No painel superior da Figura 14, há uma ilustração de um corte longitudinal do coração de um rato de cada grupo corado com Picosirius Red, enquanto que o painel inferior mostra que os animais com EA apresentaram aumento na deposição de colágeno quando comparado com os animais sham (+70% para EA vs. S, $P=0,008$). E apesar de haver uma atenuação da deposição de colágeno no tratamento com ramipril, não foi significativo.

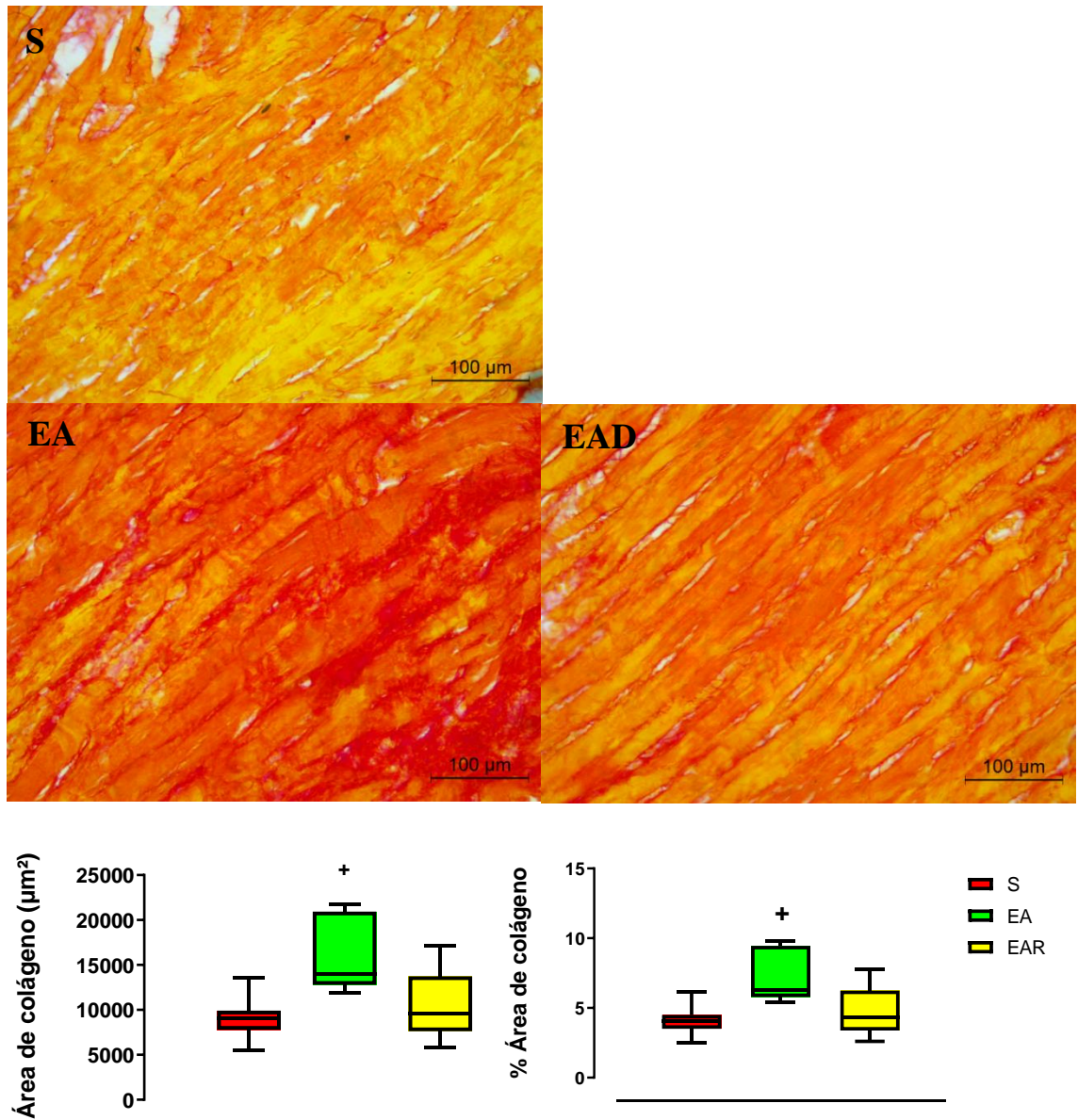


Figura 14: Painel superior: imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo, corados com Picosirius Red, mostrando a deposição de colágeno, em que as fibras colágenas podem ser vistas em vermelho e a musculatura cardíaca em amarelo. Barra: 100 µm / aumento de 200x. Painel inferior: Resultados densitométricos da área de deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (µm²) e % da área de colágeno em todos os grupos analisados: sham (S, n=12), estenose aórtica (EA, n=9) e estenose aórtica tratada com ramipril (EAR, n=8). Os resultados são apresentados como mediana, do mínimo ao máximo, significância: * $p < 0,05$, para efeitos de tratamento (vs. controle), + $p < 0,05$, para efeitos de estenose aórtica (vs. Sham).

6. DISCUSSÃO

A hipótese inicial desse trabalho foi que fármacos que atuam no perfil inflamatório poderiam causar um efeito cardioprotetor diante da resposta inflamatória miocárdica de ratos com IC, melhorando estrutura cardíaca, diminuindo deposição de colágeno e aumentando angiogênese, resultando em uma melhora da função cardíaca. No entanto, os principais resultados desse trabalho foram que o tratamento com a DEX melhora o remodelamento cardíaco por atenuar hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno, os quais não foram suficientes para melhorar a função cardíaca. E esses resultados estão associados com a redução do perfil inflamatório cardíaco de animais com IC. Em contrapartida, o tratamento com ramipril não promoveu melhoras nem no remodelamento nem na função cardíaca, apesar de ter determinado reduções no perfil inflamatório cardíaco dos animais.

A IC é uma síndrome definida como uma anormalidade na estrutura cardíaca e/ou na função cardíaca (MCDONAGH et al., 2021), que apresenta altas taxas de mortalidade, altas taxas de hospitalizações e sintomas limitantes, como retenção de líquidos, falta de ar, fadiga e intolerância ao esforço, os quais levam a uma baixa qualidade de vida (HEART FAILURE SOCIETY OF AMERICA et al., 2010). A EA, além de fazer parte do grupo das etiologias da IC clínica, é um modelo experimental de IC, pois determina características que se assemelham com o que é observado na IC. Uma dessas características é a alta taxa de mortalidade, como observada no presente estudo. Os animais que passaram pela cirurgia de EA apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente maior que os animais que passaram pela cirurgia fictícia. Uma segunda característica é a apresentação de sintomas limitantes, dentre eles a intolerância ao esforço, que também foi observada neste estudo, uma vez que os animais com EA percorreram uma menor distância na esteira durante o teste de capacidade física máxima, quando comparados aos animais sham. Esse resultado de intolerância ao esforço concorda com os achados de De Souza e colaboradores (2020). São sintomas limitantes observados também nesse modelo experimental e no presente estudo, a taquipneia, ascite, derrame pleural, trombos atriais e congestão hepática. A congestão apresentada por esses animais pode ser uma possível explicação para a manutenção do PC, como também observada por outros estudos (OKOSHI et al., 2004; MENDES et al., 2013; SILVEIRA et al., 2017; DE SOUZA et al., 2020; MAZETO et al., 2021), uma vez que houve atrofia na musculatura esquelética. Além desses sinais de IC, esse modelo experimental de estenose aórtica é muito utilizado por apresentar uma hipertrofia

cardíaca gradual com a evolução da doença (RIBEIRO et al., 2003; SANT'ANA et al., 2018; DE SOUZA et al., 2020; BREGAGNOLLO et al., 2005).

A hipertrofia cardíaca observada nesse modelo experimental ocorre devido à sobrecarga de pressão imposta pela estenose aórtica, ou seja, o coração ajusta sua estrutura como mecanismo adaptativo frente ao aumento da pós-carga. Essa adaptação estrutural é chamada de remodelamento cardíaco e inclui mudanças no tamanho, forma e função do coração (LITWIN et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003; OKOSHI et al., 2004; MENDES et al., 2010; MENDES ET AL., 2013; SILVEIRA et al., 2017; BAKAEEN et al., 2017; SANT'ANA et al., 2018; DE SOUZA et al., 2020). O presente estudo mostra que os animais com EA apresentaram um aumento no peso do coração, do VE e dos átrios na balança, os quais concordaram com os resultados observados no ecocardiograma, entre eles, aumento da EDPP, EDSIV, AE, AE/AO, ESP. REL. VE; massa VE e IND. MVE. Além disso, as análises histológicas confirmaram os resultados hipertrofia cardíaca observados no presente estudo, uma vez que o diâmetro dos miócitos do grupo EA estava maior que os dos animais sham, como já observado na literatura (LITWIN et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003; OKOSHI et al., 2004; MENDES et al., 2010; MENDES ET AL., 2013; SILVEIRA et al., 2017; BAKAEEN et al., 2017; SANT'ANA et al., 2018; DE SOUZA et al., 2020).

Um fator bastante importante é a classificação da IC quanto à FE pois essa é uma classificação que corresponde ao funcionamento cardíaco. A IC pode ser classificada como: 1/ FE preservada, que é um quadro onde há presença de sinais e sintomas, porém a FE é $\geq 50\%$; 2/ FE levemente reduzida, caracterizada pela presença de sinais e sintomas com uma FE entre 41-49% e 3/ FE reduzida, na qual pode-se observar sinais e sintomas com FE $\leq 40\%$. No presente estudo, os animais com EA não apresentaram alterações significativas na FE, o que caracteriza um modelo experimental de IC com FE preservada, porém a EA piorou a função cardíaca desses animais, evidenciada pela redução da VEPP, o que indica uma redução da função sistólica. Os aumentos de AE, AE/AO, E mitral e aumento de E/A (mesmo que não significativo) sugerem uma também disfunção diastólica. Além disso, o índice Tei foi maior nos grupos EA, o que pode indicar uma piora do desempenho miocárdico. Esses dados concordam com os resultados de disfunção cardíaca encontrados no mesmo modelo em outros estudos (LITWIN et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003; MENDES et a., 2010; SILVEIRA et al., 2017; SANT'ANA et al., 2018; MOTA et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Existem vários mecanismos que estão envolvidos no desenvolvimento e na evolução da IC, uma vez que a progressão da doença está diretamente associada com a progressão do remodelamento cardíaco. Um desses mecanismos é a inflamação cardíaca (PALANIYANDI et

al., 2011; DE SOUZA et al., 2020). A inflamação cardíaca é iniciada após um insulto cardíaco, que induz hipertrofia cardíaca, apoptose, degradação de proteínas da matriz e deposição de colágeno, que podem contribuir para diminuir a função cardíaca (HANNA et al., 2020). O grupo EA do presente estudo apresentou aumento dos níveis de citocinas e marcadores inflamatórios cardíacos, como IL1- α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TGF β , TNF α e VEGF, o que concorda com estudos anteriores (NERI SERNERI et al., 2004; PALANIYANDI et al., 2011; WESTERMANN et al., 2011; KUMAR et al., 2019; DE SOUZA et al., 2020; MIAO et al., 2020). Isto acontece pois após lesão miocárdica são liberados marcadores e citocinas inflamatórias com o objetivo de reparação e adaptação tecidual (SUTHAHAR et al., 2017). É durante esse processo de reparação e adaptação tecidual que ocorre a hipertrofia cardíaca, na qual alguns marcadores podem influenciar diretamente no aumento da massa cardíaca, como é o caso do TNF α que, pela ligação ao receptor TNF 1 (TNFR1), induz hipertrofia cardíaca (MIAO et al., 2020). Outro estudo mostra que a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e Proteína quinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) - transdutores e ativadores de sinal das vias de sinalização de transcrição 3 (STAT3) por IL-6 também induzem hipertrofia cardíaca após um insulto cardíaco (KUMAR et al., 2019). É importante ressaltar que algumas citocinas também podem estimular a secreção de outras citocinas e marcadores inflamatórios, como por exemplo a IL-1, que estimula a secreção de IL-6 (SZABO-FRESNAIS et al., 2010).

Além da inflamação estar envolvida no processo de hipertrofia cardíaca, a inflamação está intimamente associada com a deposição de colágeno no coração após um sofrimento cardíaco (HWANG et al., 2001; HUO et al., 2021). Citocinas e marcadores inflamatórios como TNF- α e IL-1, são capazes de ativar metaloproteinases (MMP) que são responsáveis pela degradação e síntese de colágeno (LI et al., 2000; NIAN et al., 2004). Os resultados de histologia do coração no presente estudo demonstraram que os animais com EA apresentaram maior deposição de colágeno quando comparados aos animais sham. Apesar dessas alterações observadas no coração de animais com EA, não houve nenhuma alteração na angiogênese miocárdica, uma vez que a densidade capilar foi semelhante entre os grupos.

Normalmente, as alterações cardíacas podem determinar sinais e sintomas nos animais. O presente estudo mostrou que o tratamento com a DEX atenuou a taquipneia, ascite e congestão hepática exceto a presença de trombos atriais, indicando uma melhora nos sinais de IC com o tratamento com a DEX. Apesar da atenuação de alguns dos sinais de IC, o tratamento com a DEX reduziu o PC dos animais, independente da cirurgia de EA, e esse é um dos efeitos deletérios vistos com o tratamento da DEX (BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al., 2014;

MACEDO et al., 2014; KRUG et al., 2016; HERRERA et al., 2016; CONSTANTINO et al., 2017; DUCHATSCH et al., 2021).

Com relação aos dados do peso das estruturas cardíacas, o tratamento com a DEX não promoveu alterações nem no grupo sham nem no grupo com EA, contudo os resultados do ecocardiograma mostraram que o tratamento com DEX atenuou o aumento das variáveis EDPP, EDSIV, ESP.REL.VE, Massa VE e IND.MVE induzidos pela cirurgia de EA. Esses resultados indicam uma atenuação da hipertrofia cardíaca observada nos animais com EA. O efeito do tratamento da DEX no remodelamento cardíaco é conflitante, e pode depender da dose, tempo de tratamento e do modelo experimental utilizado, ou seja, em animais normotensos a DEX, em altas doses, pode promover hipertrofia cardíaca (MUANGMINGSUK et al., 2000; DODIC et al., 2001; DE et al., 2011; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017), no entanto, em baixas doses estes efeitos não são observados (DUCHATSCH et al., 2021). Em ratos SHR, o tratamento com DEX, em baixas doses e por um período crônico, não promoveu alterações adicionais na hipertrofia cardíaca além daquelas já observadas em animais hipertensos (DUCHATSCH et al., 2021). A atenuação da hipertrofia cardíaca, observada no presente estudo pela técnica do ecocardiograma, não foi acompanhada de atenuação do aumento do diâmetro de miócitos e possivelmente esta resposta se deve à manutenção do clipe em torno da aorta. Para vencer a pós carga aumentada, pela ação do clip de prata, é necessário aumento de força cardíaca, para a manutenção de perfusão adequada para os tecidos. Portanto, a atenuação das espessuras do coração pode estar relacionada à diminuição de outros componentes presentes no miocárdio, como as proteínas colágeno e elastina.

Adicionalmente, a atenuação da hipertrofia cardíaca não refletiu em melhora da função cardíaca, uma vez que a disfunção cardíaca observada nos animais EA estava presente também nos animais tratados com a DEX, o que difere do que foi observado no estudo de Duchatsch e colaboradores (2021), uma vez que o tratamento com a DEX, demonstrou melhorar a função diastólica em animais SHR. É importante salientar, que apesar do presente estudo demonstrar que o tratamento com a DEX não melhorou função cardíaca em animais com IC, o tratamento também não promoveu disfunção cardíaca adicional como visto em outros estudos (DODIC et al., 2001; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos responsáveis pela hipertrofia cardíaca, o presente estudo analisou a quantidade proteica de citocinas e marcadores inflamatórios no miocárdio de animais com estenose aórtica tratados com DEX. Pode-se observar que o tratamento com a DEX resultou em uma redução da produção de citocinas e marcadores tanto anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios no coração de animais com EA,

sem alteração nos animais sham. Assim, pode-se sugerir que o aumento do perfil inflamatório no miocárdio, principalmente após um insulto cardíaco, tenha participação importante na hipertrofia cardíaca (SZABO-FRESNAIS et al., 2010; KUMAR et al., 2019; MIAO et al., 2020). Da mesma forma, o bloqueio do aumento de citocinas e dos marcadores inflamatórios cardíacos pode estar relacionado com a atenuação da deposição de colágeno observada no VE no presente estudo, concordando com os resultados observados em Duchatsch et al., (2021). Neste estudo os animais SHR tratados com DEX apresentaram menor deposição de colágeno quando comparados aos animais normotensos. Diferentemente, outros autores têm demonstrado que o tratamento com a DEX aumentava a deposição de colágeno no coração (ROY et al., 2009; DE et al., 2011; DE VRIES et al., 2012; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017). A menor deposição de colágeno no coração de animais com EA tratados com DEX pode ser justificada pelo bloqueio da produção de citocinas e dos marcadores inflamatórios, pois a inflamação é responsável por promover a síntese e degradação do colágeno (LI et al., 2000; HWANG et al., 2001; NIAN et al., 2004; HUO et al., 2021). Apesar da deposição de colágeno ser menor no miocárdio de ratos com EA tratados com DEX, os resultados de densidade capilar não foram alterados pelo tratamento com a DEX.

Os resultados do presente estudo são importantes pois o tratamento da IC, por ser uma doença com heterogeneidade fisiopatológica, é considerado complexo, fazendo-se necessário o uso de vários fármacos diferentes. No entanto controlar o remodelamento cardíaco ainda é um dos mecanismos que podem contribuir para o sucesso do tratamento (ABBATE et al., 2008; FILHO et al., 2013; HAROUKI et al., 2017). Embora a inflamação seja um dos mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco e, portanto, no desenvolvimento e progressão da doença (PALANIYANDI et al., 2011; DE SOUZA et al., 2020), tem sido demonstrado que alguns inibidores de citocinas inflamatórias não obtiveram resultados positivos na clínica (SINAGRA et al., 2013). Apesar do uso da DEX ter resultados conflitantes no coração (DE SALVI GUIMARAES et al., 2017; DUCHATSCH et al., 2021), o primeiro protocolo deste presente estudo, sugere que baixa dose de DEX pode ser benéfica em atenuar o remodelamento cardíaco, por atenuar perfil inflamatório, mesmo que ainda não resulte em uma melhora da função.

Apesar da melhora observada na produção de citocinas e marcadores inflamatórios, bem como na atenuação na hipertrofia cardíaca, a DEX ainda não é considerada um tratamento de escolha na clínica de IC, principalmente pelos seus efeitos deletérios (SUZUKI et al., 1982; DODIC et al., 1998; DODIC et al., 1999; PEERS et al., 2001; DODIC et al., 2006; MONDO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; GIOZZET et al., 2008; BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al., 2014; MACEDO et al., 2014; KRUG et al., 2016; HERRERA et

al., 2016; CONSTANTINO et al., 2017; DE SALVI GUIMARÃES et al., 2017). Assim, o segundo protocolo deste estudo avaliou os efeitos de outro fármaco com função anti-inflamatória. Tem sido demonstrado que o Angiotensina II, além de controlar fluídos no organismo, estimula a síntese de citocinas inflamatórias (SOUZA-OLIVEIRA, 2010; OLIVEIRA, 2015). Neste sentido, o uso de alguns inibidores do SRAA (iECA), tais como o ramipril, têm-se mostrado eficiente em controlar as citocinas e os marcadores inflamatórios sob um quadro de inflamação (AKASHI, 2006; SANDMANN et al., 2006; RUDI et al., 2021).

O tratamento com ramipril no presente estudo demonstrou não alterar a taquipneia que já estava alterada com a EA, porém promoveu um aumento adicional no número de ocorrências de edema pulmonar, trombo atrial e ascite. Já a ocorrência da congestão hepática estava levemente reduzida com o tratamento com ramipril. Ao longo da evolução da doença, os animais sham, e com EA, tratados ou não com ramipril, apresentaram um ganho de PC semelhante, apesar dos animais tratados com ramipril apresentarem menor peso do músculo TA, quando comparados aos animais sham. O efeito dos iECAs no PC ainda é controverso, ou seja, Gonçalves e colaboradores (2015) demonstram que o tratamento com lisinopril (20mg/kg) por 6 semanas reduziu PC, enquanto o presente estudo, com ramipril (10mg/kg) por 14 dias não alterou PC.

O tratamento com ramipril não alterou o peso muscular das estruturas cardíacas na balança e, da mesma forma, não promoveu nenhuma alteração adicional além da já observada nos animais com EA, ou seja, os valores de EDPP, EDSIV, AE, ESP. REL. VE, Massa VE e IND. MVE não foram atenuados com o tratamento. Somado a esses parâmetros, os resultados do diâmetro de miócitos também não demonstraram qualquer alteração após o tratamento com ramipril. Esses resultados são divergentes de outros estudos utilizando iECAs em diferentes dosagens, formas e períodos de tratamento (LITWIN et al., 1995; GONÇALVES et al., 2005; SIMKO et al., 2009; ARSENAULT et al., 2013; MULLER et al., 2013). Além disso, a manutenção das estruturas cardíacas aumentadas nos grupos EA, contribuiu para a manutenção da disfunção cardíaca vista nos animais que foram submetidos à cirurgia, o que também difere de outros estudos (LITWIN et al., 1995; ARSENAULT et al., 2013; QU, XU and TIAN, 2015).

Por outro lado, as citocinas e marcadores inflamatórios investigados no presente estudo, que estavam aumentados após a cirurgia de EA, apresentaram um comportamento diferente com o tratamento com ramipril, ou seja, todos os marcadores apresentam valores iguais aos sham controles. Estes resultados apenas sugerem um efeito do tratamento, uma vez que os resultados não foram significativos, devido a distribuição não normal desses grupos. A redução do perfil inflamatório cardíaco desses animais concorda com resultados vistos anteriormente (NERI

SERNERI et al., 2004; RUDI et al., 2021). Apesar de haver uma redução no perfil inflamatório cardíaco destes animais, não foi possível observar melhoras significativas no remodelamento cardíaco do grupo EA tratado com ramipril. Sabe-se que a inflamação é um dos mecanismos que podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão da IC (SUTHAHAR et al., 2017), porém o aumento do estresse oxidativo (TSUTSUI et al., 2011; PAGAN, 2018); o aumento do desbalanço autonômico (IMPROTA-CARIA et al., 2021), podem estar envolvidos na piora do remodelamento cardíaco, o que não foi estudado no presente estudo, mas pode ser um dos mecanismos pelos quais não foram observadas melhoras significativas no remodelamento do grupo tratado com ramipril.

Assim como observado nas citocinas e marcadores inflamatórios, o tratamento com ramipril determinou redução não significativa da fibrose cardíaca no coração dos animais com EA (MULLER et al., 2013; QU, XU and TIAN, 2015; MIOTTO et al., 2021). Já a respeito da densidade capilar observada pela histologia, o tratamento com ramipril não promoveu nenhuma alteração significativa, concordando com o estudo de Miotto e colaboradores (2021), na qual foi realizado o tratamento com perindopril. Assim, no presente estudo, o tratamento com ramipril em um modelo experimental de IC não demonstrou ser efetivo na regressão da hipertrofia cardíaca observada em animais com EA. Contudo, o tempo de tratamento com o inibidor foi um período curto quando comparado com outros estudos de iECAs que observam essa regressão. Apesar disso, o período curto de tratamento já indica um comportamento diferente na deposição de colágeno e no perfil inflamatório cardíaco, mesmo que não significativo. Essas alterações sugerem que são as alterações no perfil inflamatório que promoverão as melhoras no remodelamento cardíaco, bem elucidadas anteriormente. Sendo assim, tempos maiores de tratamento com ramipril poderiam trazer maiores benefícios para a IC.

7. CONCLUSÃO

Em suma, o presente estudo sugere que o tratamento com a DEX pode ser benéfico em mitigar a progressão da doença cardíaca devido a uma atenuação da remodelação cardíaca induzida por menor inflamação cardíaca. Além disso, embora o tratamento com ramipril tenha atenuado a inflamação cardíaca, não melhorou significativamente a remodelação ou a função cardíaca, sugerindo que períodos mais longos de tratamento com ramipril poderiam ser usados.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, A.; SALLOUM, F.N.; VECILE, E.; DAS, A.; HOKE, N.N.; STRAINO, S.; BIONDI-ZOCCAI, G.G.; HOUSER, J.E.; QURESHI, I.Z.; OWNBY, E.D.; GUSTINI, E.; BIASUCCI, L.M.; SEVERINO, A.; CAPOGROSSI, M.C.; VETROVEC, G.W.; CREA, F.; BALDI, A.; KUKREJA, R.C.; DOBRINA, A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. **Circulation** v.117, p.2670-2683, 2008.
- ABASSI, Z.A.; GURBANOV, K.; MULRONEY, S.E.; POTLOG, C.; OPGENORTH, T.J.; HOFFMAN, A.; HARAMATI, A.; WINAVER, J. Impaired nitric oxide-mediated renal vasodilation in rats with experimental heart failure: role of angiotensin II. **Circulation** v.96, p.3655–3664, 1997.
- AKASHI, A.P. **Efeitos do Ramipril sobre a doença periodontal induzida por experiemntalmente em ratos.** Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral. Bauru, 2016.
- AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** v.18, n.11, p.1563-1572, 2000.
- ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein.** v.6, n.1, p.S159-S165, 2008.
- ARSENAULT, M.; ZENDAOU, A.; ROUSSEL, E.; DROLET, M.C.; DHAHRI, W.; GRENIER, A.; GASCON, S.; SARRHINI, O.; ROUSSEAU, J.A.; LECOMTE, R.; COUET, J. Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation. **Circ Heart Fail.** v.6, n.5, p.1021-8, 2013.
- AZEVEDO, P.S.; POLEGATO, B.F.; MINICUCCI, M.F.; PAIVA, S.A.R.; ZORNOFF, L.A.M. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arq Bras Cardiol.** [online].ahead print, PP.0-0, 2015.
- BACMEISTER, L.; SCHWARZL, M.; WARNKE, S.; STOFFERS, B.; BLANKENBERG, S.; WESTERMANN, D.; LINDNER, D. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure. **Basic Res Cardiol.** v.114, n.3, p.19, 2019.
- BAKAEEN, F.G.; ROSENGART, T.K.; CARABELLO, B.A. Aortic Stenosis. **Annals of internal medicine** v.166, p.ITC1-ITC16, 2017.
- BALAKUMAR, P. and JAGADEESH, G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. **Cell Signal.** v.26, n.10, p.2147-60, 2014.
- BAREL, M.; PEREZ, O.A.; GIOZZET, V.A.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R.; AMARAL, S.L. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol.** v.108, n.5, p.999-1007, 2010.
- BARRETTI, D.L.M.; CARMO, E.C.; ROSA, K.T.; IRIGOYEN, M.C.C.; OLIVEIRA, E.M. Treinamento físico aeróbio previne à hipertrofia cardíaca patológica e melhora a função diastólica em ratos Zucker obesos. **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte,** v.25, n.4, p.593-605, 2011.
- BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos brasileiros de cardiologia,** v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021.
- BERGAMO, M.T.O.P.; VITOR, L.L.R.; LOPES, N.M.; LOURENCO NETO, N.; DIONISIO, T.J.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA RODINI, C.; SANTOS, C.F.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, T.M. Angiogenic protein synthesis after photobiomodulation therapy on SHED: a preliminary study. **Lasers in medical science** v.35, p.1909-1918, 2020.

BERNARDO, B.C.; WEEKS, K.L.; PRETORIUS, L.; McMULLEN J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiachypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther.** v.128, n.1, p.191-227, 2010.

BOCCHI, E.A. et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arq Bras Cardiol.** São Paulo, v.93, n.1, p. 1-71, 2009.

BREGAGNOLLO, E.A.; OKOSHI, K.; BREGAGNOLLO, I.F.; PADOVANI, C.R.; OKOSHI, M.P.; CICOGNA, A.C. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. **Arquivos brasileiros de cardiologia** v.84, p.225-232, 2005.

BRUNNER, H.; COCKCROFT, J.R.; DEANFIELD, J.; DONALD, A.; FERRANNINI, E.; HALCOX, J.; KIEWSKI, W.; LÜSCHER, T.F.; MANCIA, G.; NATALI, A.; OLIVER, J.J.; PESSINA, A.C.; RIZZONI, D.; ROSSI, G.P.; SALVETTI, A.; SPIEKER, L.E.; TADDEI, S.; WEBB, D.J.; WORKING GROUP ON ENDOTHELINS AND ENDOTHELIAL FACTORS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. **J Hypertens.** v.23, n.2, p.233-46, 2005.

CAMPBELL, D.J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J Clin Invest.** v.79, n.1, p.1-6, 1987.

CAREY, R.M. and SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr Rev.** v.24, n.3, p.261-71, 2003.

CHEN, Q.M.; ALEXANDER, D.; SUN, H.; XIE, L.; LIN, Y.; TERRAND, J.; MORRISSY, S.; PURDOM, S. Corticosteroids inhibit cell death induced by doxorubicin in cardiomyocytes: Induction of antiapoptosis, antioxidant, and detoxification genes. **Mol. Pharmacol.** v.67, p.1861-1873, 2005.

CONSTANTINO, P.B.; DIONÍSIO, T.J.; DUCHATSCH, F.; HERRERA, N.A.; DUARTE, J.O.; SANTOS, C.F.; CRESTANI, C.C.; AMARAL, S.L. Exercise attenuates dexamethasone-induced hypertension through an improvement of baroreflex activity independently of the renin-angiotensin system. **Steroids.** v.128, p.147-154, 2017.

COSTA-FERREIRA, W.; VIEIRA, J.O.; ALMEIDA, J.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C.C. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Front Pharmacol.** v.18, n. 7, p. 262, 2016.

DATASUS - Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre morbidade.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nibr.def>>. Acesso em: 20/04/2019.

DE, P.; ROY, S.G.; KAR, D.; BANDYOPADHYAY, A. Excess of glucocorticoid induces myocardial remodeling and alteration of calcium signaling in cardiomyocytes. **J Endocrinol.** v.209, n.1, p.105-114, 2011.

DE SALVI GUIMARÃES, F.; DE MORAES, W.M.; BOZI, L.H.; SOUZA, P.R.; ANTONIO, E.L.; BOCALINI, D.S.; TUCCI, P.J.; RIBEIRO, D.A.; BRUM, P.C.; MEDEIROS, A. Dexamethasone-induced cardiac deterioration is associated with both calcium handling abnormalities and calcineurin signaling pathway activation. **Mol Cell Biochem.** v.424, n.1-2, p.87-98, 2017.

DE SOUZA, S.L.B.; MOTA, G.A.F.; DA SILVA, V.L.; SANT'ANA, P.G.; VILEIGAS, D.F.; DE CAMPOS, D.H.S.; PADOVANI, C.R.; RODRIGUES, M.A.M.; DO NASCIMENTO, A.F.; SUGIZAKI, M.M.; BAZAN, S.G.Z.; BRUM, P.C.; CICOGNA, A.C. Adjustments in beta-Adrenergic Signaling Contribute to the Amelioration of Cardiac Dysfunction by Exercise Training in Supravalvular Aortic Stenosis. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology** v.54, p.665-681, 2020.

DE VRIES, W.B.; LEIJ, F.R.V.; BAKKER, J.M.; KAMPHUIS, P.J.G.H.; OOSTERHOUT, M.F.M.V.; SCHIPPER, M.E.I.; SMID, G.B.; BARTELD, B.; FRANK VAN BEL, F.V. Alterations in Adult Rat Heart after Neonatal Dexamethasone Therapy. **Pediatric Research**, v.52; n.6, 2002.

DI RAIMONDO, D.; TUTTOLOMONDO, A.; BUTTA, C.; MICELI, S.; LICATA, G.; PINTO, A. Effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor blockers on inflammation. **Current pharmaceutical design** v.18, p.4385-4413, 2012.

DIONISIO, T.J.; LOUZADA, J.C.; VISCELLI, B.A.; DIONISIO, E.J.; MARTUSCELLI, A.M.; BAREL, M.; PEREZ, O.A.; BOSQUEIRO, J.R.; BROZOSKI, D.T.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Horm Metab Res.** v.7, p.484-489, 2014.

DODIC, M.; MCALINDEN, A.T.; JEFFERIES, A.J.; WINTOUR, E.M.; COCK, M.L.; MAY, C.N.; EVANS, R.G.; MORITZ, K.M. Differential effects of prenatal exposure to dexamethasone or cortisol on circulatory control mechanisms mediated by angiotensin II in the central nervous system of adult sheep. **J Physiol.** v.571, n.3, p.651-660, 2006.

DODIC, M.; SAMUEL, C.; MORITZ, K.; WINTOUR, E.M.; MORGAN, J.; GRIGG, L.; WONG, J. Impaired Cardiac Functional Reserve and Left Ventricular Hypertrophy in Adult Sheep After Prenatal Dexamethasone Exposure. **Circ Res.** v.89, n.7, p.623-639, 2001.

DODIC, M.; WINTOUR, E.M.; WHITWORTH, J.A.; COGHLAN, J.P. Effect of steroid hormones on blood pressure. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.26, n.7, p.550-552, 1999.

DODIC, M.; MAY, C.N.; WINTOUR, E.M.; COGHLAN, J.P. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. **Clin Sci (Lond).** v.94, n.2, p.149-155, 1998.

DUCHATSCH, F.; TARDELLI, L.P.; HERRERA, N.A.; RUIZ, T.F.R.; VICENTINI, C.A.; OKOSHI, K.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Dexamethasone and Training-Induced Cardiac Remodeling Improve Cardiac Function and Arterial Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v.26, n.2, p.189-199, 2021.

DUCHATSCH, F.; CONSTANTINO, P.B.; HERRERA, N.A.; FABRÍCIO, M.F.; TARDELLI, L.P.; MARTUSCELLI, A.M.; DIONÍSIO, T.J.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Short-term exposure to dexamethasone promotes autonomic imbalance to the heart before hypertension. **J Am Soc Hypertens.** v.12, n.8, p.605-613, 2018.

EL-HELOU, V.; PROULX, C.; GOSSELIN, H.; CLEMENT, R.; MIMÉE, A.; VILLENEUVE, L.; CALDERONE, A. Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region. **J Appl Physiol (1985).** v.104, n.1, p.150-156, 2008.

EMDIN, M.; FATINI, C.; MIRIZZI, G.; POLETTI, R.; BORRELLI, C.; PRONTERA, C.; LATINI, R.; PASSINO, C.; CLERICO, A.; VERGARO, G. Biomarkers of activation of renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: how useful, how feasible? **Clin Chim Acta.** v.30, n.443, p.85-93, 2015.

MCDONAGH, T. A. et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. **Eur Heart J.** v. 42, n.36, p.3599-3726, 2021.

FELDMAN, M.D.; COPELAS, L.; GWATHMEY, J.K.; PHILLIPS, P.; WARREN, S.E.; SCHOEN, F.J.; GROSSMAN, W.; MORGAN, J.P. Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. **Circulation.** v. 75, n. 2, p. 331-339, 1987.

FERRARI R.; PASANISI G.; NOTARSTEFANO P.; CAMPO G.; GARDINI E.; CECONI C. Specific properties and effect of perindopril in controlling the renin-angiotensin system. **Am J Hypertens.** v.18, n. 9, p. 142-154, 2005.

FILHO, A.G.; KINOTE, A.; PEREIRA, D.J.; RENNO, A.; DOS SANTOS, R.C.; FERREIRA-MELO, S.E.; VELLOSO, L.A.; BORDIN, S.; ANHE, G.F.; MORENO JUNIOR, H. Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **European journal of pharmacology** v.700, p.201-209, 2013.

- FIORETTO, J.R.; QUEIROZ, S.S.; PADOVANI, C.R.; MATSUBARA, L.S.; OKOSHI, K.; MATSUBARA, B.B. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.282, n.4, p.H1327-H1333, 2002.
- FISHEL, R.S.; EISENBERG, S.; SHAI, S.Y.; REDDEN, R.A.; BERNSTEIN, K.E.; BERK, B.C. Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. **Hypertension.** v.25, n.3, p.343-349, 1995.
- GANAU, A.; DEVEREUX, R.B.; ROMAN, M.J.; De SIMONE, G.; PICKERING, T.G.; SABA, P.S.; VARGIU, P.; SIMONGINI, I.; LARAGH, J.H. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. **J Am Coll Cardiol.** v.19, n.7, p.1550-1558, 1992.
- GIOZZET, V.A.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSQUEIRO, J.R. dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment rats. **Metabolism.** v.57, n.5, p. 617-24, 2008.
- GONÇALVES, G.; ZORNOFF, L.A.M.; RIBEIRO, H.B.; OKOSHI, M.P.; CORDARO, F.R.S.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C.R.; ARAGON, F.F.; CICOGNA, A.C. O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. **Arq. Bras. Cardiol.** v.84, n.4; 2005.
- GOKER, H.; HAZNEDAROGLU, I.C.; BEYAZIT, Y.; AKSU, S.; TUNCER, S.; MISIRLIOGLU, M.; BAYRAMOGLU, F.; KEKILLI, M.; BÜYÜKASIK, Y.; SAYINALP, N.; OZCEBE, O.; DUNDAR, S.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Local umbilical cord blood renin-angiotensin system. **Ann Hematol.** v.84, n.5, p.277-81, 2005.
- GOMES-SANTOS, I.L.; FERNANDES, T.; COUTO, G.K.; FERREIRA-FILHO, J.C.; SALEMI, V.M.; FERNANDES, F.B.; CASARINI, D.E.; BRUM, P.C.; ROSSONI, L.V.; DE OLIVEIRA, E.M.; NEGRAO, C.E. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS One.** v.9, n.5, p.e98012, 2014.
- GROSSMAN, W.; JONES, D.; McLAURIN, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest.** v.56, n.1, p.56-64, 1975.
- GRUVER-YATES, A.L. e CIDLOWSKI, J.A. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. **Cells.** v.2, n.2, p.202-223, 2013.
- HANNA, A.; FRANGOIANNIS, N.G. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. **Cardiovascular drugs and therapy** v.34, p.849-863, 2020.
- HAROUKI, N.; NICOL, L.; REMY-JOUET, I.; HENRY, J.P.; DUMESNIL, A.; LEJEUNE, A.; RENET, S.; GOLDING, F.; DJERADA, Z.; WECKER, D.; BOLDOC, V.; BOULY, M.; ROUSSEL, J.; RICHARD, V.; MULDER, P. The IL-1beta Antibody Gevokizumab Limits Cardiac Remodeling and Coronary Dysfunction in Rats With Heart Failure. **JACC Basic to translational science** v.2, p.418-430, 2017.
- HEART FAILURE SOCIETY OF AMERICA et al. Executive summary: HFSA 2010 comprehensive heart failure practice guideline. **Journal of cardiac failure,** v. 16, n. 6, p. 475-539, 2010.
- HEIN, S.; ARNON, E.; KOSTIN, S.; SCHÖNBURG, M.; ELSÄSSER, A.; POLYAKOVA, V.; BAUER, E.P.; KLÖVEKORN, W.P.; SCHAPER, J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation.** v.107. n.7, p.984-991, 2003.
- HENCH, P.S.; KENDALL, E.C.; SLOCUMB, C.H.; POLLEY, H.F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. **Proc Staff Meet Mayo Clin.** v.24, n.8, p.181-197, 1949.
- HERRERA, N.A.; JESUS, I.; DIONÍSIO, E.J.; DIONÍSIO, T.J.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Exercise Training Prevents Dexamethasone-induced Rarefaction. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.70, n.3, p.194-201, 2017.

HERRERA, N. A.; JESUS, I.; SHINOHARA, A.L.; DIONÍSIO, T.J.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart. Sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **J Hypertens.** v.34, n.10, p.1967-1976, 2016.

HOU, Q.C. and SLOTKIN, T.A. Effects of prenatal dexamethasone or terbutaline exposure on development of neural and intrinsic control of heart rate. **Pediatr Res.** v.26, n.6, p.554-557, 1989.

HUO, S.; SHI, W.; MA, H.; YAN, D.; LUO, P.; GUO, J.; LI, C.; LIN, J.; ZHANG, C.; LI, S.; LV, J.; LIN, L. Alleviation of Inflammation and Oxidative Stress in Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling and Heart Failure via IL-6/STAT3 Inhibition by Raloxifene. **Oxidative medicine and cellular longevity** v.2021, p.6699054, 2021.

HWANG, M.W.; MATSUMORI, A.; FURUKAWA, Y.; ONO, K.; OKADA, M.; IWASAKI, A.; HARA, M.; MIYAMOTO, T.; TOUMA, M.; SASAYAMA, S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. **Journal of the American College of Cardiology** v.38, p.1546-1553, 2001.

IMPROTA-CARIA, A.C.; ARAS, M.G.; NASCIMENTO, L.; SOUSA, R.A.L.; ARAS-JÚNIOR, R.; SOUZA, B.S.F. MicroRNAs Regulating Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Sympathetic Nervous System and Left Ventricular Hypertrophy in Systemic Arterial Hypertension. **Biomolecules**, v.11, n.12, p.1771, 2021.

ISHISE, H.; ASANOI, H.; ISHIZAKA, S.; JOHO, S.; KAMEYAMA, T.; UMENO, K.; INOUE, H. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. **J Appl Physiol.** v.84, n.4, p.1234-1241, 1985.

JANICKI, J.S. and BROWER, G.L. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. **J Card Fail.** v.8, n. 6, p.S319-325, 2002.

JOYCE, L.D.; MACCARTER, D.J.; SHATNEY, C.H.; LILLEHEI, R.C. Effects of dexamethasone and multiple-dose methylprednisolone on infarct size in experimental infarction. **J Surg Res.** v.24, n.3, p.210-218, 1978.

KEWALRAMANI, G.; PUTHANVEETIL, P.; WANG, F.; KIM, M.S.; DEPPE, S.; ABRAHANI, A.; LUCIANI, D.S.; JOHNSON, J.D.; RODRIGUES, B. AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- α -induced cardiac cell death. **Cardiovasc. Res.** v. 84, p.42-53, 2009.

KIM, K.H.; KIM, H.M.; PARK, J.S.; KIM, Y.J. Differential Transcriptome Profile and Exercise Capacity in Cardiac Remodeling by Pressure Overload versus Volume Overload. **J Cardiovasc Imaging.** v. 27, n.1, p.50-63, 2019.

KONG, P.; CHRISTIA, P.; FRANGOIANNIS, N.G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. **Cell Mol Life Sci.** v.71, n.4, p.549-574, 2014.

KRUG, A.L.; MACEDO, A.G.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle & Nerve** v.53, n.5, p.779-788, 2016.

KUMAR, R. SINGH, V.P.; BAKER, K.M. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. **Curr Hypertens Rep.** v.11, n.2, p.104-110, 2009.

KUMAR, S.; WANG, G.; ZHENG, N.; CHENG, W.; OUYANG, K.; LIN, H.; LIAO, Y.; LIU, J. HIMF (Hypoxia-Induced Mitogenic Factor)-IL (Interleukin)-6 Signaling Mediates Cardiomyocyte-Fibroblast Crosstalk to Promote Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. **Hypertension** v.73, p.1058-1070, 2019.

LAFUSE, W.P.; WOZNIAK, D.J.; RAJARAM, M.V.S. Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. **Cells.** v.10, n.1, p.51, 2021.

LEE, J.F.; BARRETT-O'KEEFE, Z.; NELSON, A.D.; GARTEN, R.S.; RYAN, J.J.; NATIVI-NICOLAU, J.N.; RICHARDSON, R.S.; WRAY, D.W.

Impaired skeletal muscle vasodilation during exercise in heart failure with preserved ejection fraction. **Int J Cardiol.** v.211, p.14-21, 2016.

LEUNG, P.S. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. **Curr Protein Pept Sci.** v.5, n.4, p.267-73, 2004.

LI, Y.Y.; FENG, Y.Q.; KADOKAMI, T.; MCTIERNAN, C.F.; DRAVIAM, R.; WATKINS, S.C.; FELDMAN, A.M. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.97, n.23, p.12746-12751, 2000.

LITWIN, S.E.; KATZ, S.E.; WEINBERG, E.O.; LORELL, B.H.; AURIGEMMA, G.P.; DOUGLAS, P.S. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation.** v.91, n.10, p.2642-2654, 1995.

MACEDO, A.G.; KRUG, A.L.; HERRERA, N.A.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.; AMARAL, S.L. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.143, p.357-364, 2014.

MARKOUSIS-MAVROGENIS, G. TROMP, J.; OUWERKERK, W.; DEVALARAJA, M.; ANKER, S.D.; CLELAND, J.G.; DICKSTEIN, K.; FILIPPATOS, G.S.; VAN DER HARST, P.; LANG, C.C.; METRA, M.; NG, L.L.; PONIKOWSKI, P.; SAMANI, N.J.; ZANNAD, F.; ZWINDERMAN, A.H.; HILLEGE, H.L.; VAN VELDHUISEN, D.J.; KAKKAR, R.; VOORS, A.A.; VAN DER MEER, P. The clinical significance of interleukin-6 in heart failure: results from the BIOSTAT-CHF study. **European journal of heart failure** v.21, p. 965-973, 2019.

MAZETO, I.F.S.; OKOSHI, K.; SILVEIRA, C.; SANT'ANA, P.G.; SILVA, V.L.D.; MOTA, G.A.F.; SOUZA, S.L.B.; VILEIGAS, D.F.; PADOVANI, C.R.; CICOGNA, A.C. Calcium homeostasis behavior and cardiac function on left ventricular remodeling by pressure overload. **Brazilian journal of medical and biological research** v.54, p.e10138, 2021

MENDES, O.C.; SUGIZAKI, M.M.; CAMPOS, D.S.; DAMATTO, R.L.; LEOPOLDO, A.S.; LEOPOLDO-LIMA, A.P.; BALDISSERA, V.; PADOVANI, C.R.; OKOSHI, K.; CICOGNA, C. Exercise tolerance in rats with aortic stenosis and ventricular diastolic and/or systolic dysfunction. **Arq Bras Cardiol.** v.100, n.1, p.44-51, 2013.

MENDES, O.D.E.C.; CAMPOS, D.H.; DAMATTO, R.L.; SUGIZAKI, M.M.; PADOVANI, C.R.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A.C. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. **Arquivos brasileiros de cardiologia** v.94, p.62-70, 2010.

MIAO, K.; ZHOU, L.; BA, H.; LI, C.; GU, H.; YIN, B.; WANG, J.; YANG, X.P.; LI, Z.; WANG, D.W. Transmembrane tumor necrosis factor alpha attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy via tumor necrosis factor receptor 2. **PLoS biology** v.18, p.e3000967, 2020.

MIOTTO, D.S.; DUCHATSCH, F.; MACEDO, A.G.; RUIZ, T.F.R.; VICENTINI, C.A.; AMARAL, S.L. Perindopril Reduces Arterial Pressure and Does Not Inhibit Exercise-Induced Angiogenesis in Spontaneously Hypertensive Rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.77, n.4, p.519-528, 2021.

MONDO, C.K.; YANG, W.S.; ZHANG, N.; HUANG, T.G. Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.33, n.11, p.1029-1034, 2006.

MONTERA, M.W. et al. II Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Aguda. **Arq Bras Cardiol.** São Paulo, v.93, n.3, p.1-65, 2003.

MOREIRA, V.O.; PEREIRA, C.A.; SILVA, M.O.; FELISBINO, S.L.; CICOGNA, A.C.; OKOSHI, K.; ARAGON, F.F.; PADOVANI, C.R.; OKOSHI, M.P.; CASTRO, A.V. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.36, n.9, p.325-330, 2009.

MOTA, G.A.F.; DE SOUZA, S.L.B.; DA SILVA, V.L.; GATTO, M.; DE CAMPOS, D.H.S.; SANT'ANA, P.G.; VILEIGAS, D.F.; PADOVANI, C.R.; CASARINI, D.E.; DE OLIVEIRA, E.M.; BAZAN, S.G.Z.; FERNANDES, T.; SUGIZAKI, M.M.; GOMES, E.R.M.; CICOGNA, A.C. Cardioprotection Generated by Aerobic Exercise Training is Not Related to the Proliferation of Cardiomyocytes and Angiotensin-(1-7) Levels in the Hearts of Rats with Supravalvar Aortic Stenosis. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology** v.54, p.719-735, 2020.

MOUKBEL, Y.C.; CICOGNA, A.C.; OKOSHI, M.P.; OKOSHI, K. Long-Term Low Intensity Physical Exercise Attenuates Heart Failure Development in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. **Cell Physiol Biochem.** v.36, n.1, p.61-74, 2015.

MOUSA, T.M.; LIU, D.; CORNISH, K.G.; ZUCKER, I.H. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **J Appl Physiol** v.5850, p.616–624, 2008.

MUANGMINGSUK, S.; INGRAM, P.; GUPTA, M.P.; ARCILLA, R.A.; GUPTA, M. Dexamethasone induced cardiac hypertrophy in newborn rats is accompanied by changes in myosin heavy chain phenotype and gene transcription. **Mol Cell Biochem.** v.209, n.1-2, p.165-173, 2000.

MÜLLER, P.; KAZAKOV, A.; SEMENOV, A.; JAGODA, P.; FRIEDRICH, E.B.; BÖHM, M.; LAUFS, U. Ramipril and telmisartan exhibit differential effects in cardiac pressure overload-induced hypertrophy without an additional benefit of the combination of both drugs. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v.18, n.1, p.87-93, 2013.

MULLER-EHMSSEN, J. and SCHWINGER, R.H. TNF and congestive heart failure: therapeutic possibilities. **Expert opinion on therapeutic targets** v.8, p.203-209, 2004.

NERI SERNERI, G.G.; BODDI, M.; MODESTI, P.A.; COPPO, M.; CECIONI, I.; TOSCANO, T.; PAPA, M.L.; BANDINELLI, M.; LISI, G.F.; CHIAVARELLI, M. Cardiac angiotensin II participates in coronary microvessel inflammation of unstable angina and strengthens the immunomediated component. **Circulation research** v.94, p.1630-1637, 2004.

NIAN, M.; LEE, P.; KHAPER, N.; LIU, P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res.** v.94, n.12, p.1543-1553, 2004.

NUSSBERGER, J.; AUBERT, J.F.; BOUZOURENE, K.; PELLEGRIN, M.; HAYOZ, D.; MAZZOLAI, L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. **Hypertension**, v.51, p.1306-1311, 2008.

OAKLEY, R.H.; REN, R.; CRUZ-TOPETE, D.; BIRD, G.S.; MYERS, P.H.; BOYLE, M.C.; SCHNEIDER, M.D.; WILLIS, M.S.; CIDLOWSKI, J.A. Essential role of stress hormone signaling in cardiomyocytes for the prevention of heart disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.110, n.42, p.17035-17040, 2013.

OBERMÜLLER, N.; GENTILI, M.; GAUER, S.; GRETZ, N.; WEIGEL, M.; GEIGER, E.; GASSLER, N. Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. **J Histochem Cytochem.** v.52, n.4, p.545-8, 2004.

OKOSHI, K.; RIBEIRO, H.B.; OKOSHI, M.P.; MATSUBARA, B.B.; GONCALVES, G.; BARROS, R.; CICOGNA, A.C. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. **Japanese heart journal** v.45, p.647-656, 2004.

OKOSHI, K.; MATSUBARA, L.S.; OKOSHI, M.P.; CICOGNA, A.C.; FIORETTO, J.R.; PADOVANI, C.R.; ARAGON, F.F.; MATSUBARA, B.B. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. **Nutr Res.** v.22, p.1353-1364, 2002.

OLIVEIRA, T.C.S. **Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. São Paulo, 2015.

PAGAN, L.U.; DAMATTO, R.L.; CEZAR, M.D.; LIMA, A.R.; BONOMO, C.; CAMPOS, D.H.; GOMES, M.J.; MARTINEZ, P.F.; OLIVEIRA, S.A.Jr.; GIMENES, R.; ROSA, C.M.; GUIZONI, D.M.; PAGAN, L.U.

Influência do Exercício Físico no Remodelamento Cardíaco, Estresse Oxidativo e Vias de Sinalização das MAPK e do NF- κ B de Ratos Espontaneamente Hipertensos. Tese apresentada a Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica. Botucatu. 2018.

PALANIYANDI, S.S.; FERREIRA, J.C.; BRUM, P.C.; MOCHLY-ROSEN, D. PKC β II inhibition attenuates myocardial infarction induced heart failure and is associated with a reduction of fibrosis and pro-inflammatory responses. **Journal of cellular and molecular medicine** v.15, p.1769-1777, 2011.

PEERS, A.; CAMPBELL, D.J.; WINTOUR, E.M.; DODIC, M. The peripheral renin-angiotensin system is not involved in the hypertension of sheep exposed to prenatal dexamethasone. **Clin Exp Pharmacol Physiol** v.28, n.4, p.306–311, 2001.

PHILLIPS, M.I.; SPEAKMAN, E.A.; KIMURA, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul Pept.** v.43, n.1-2, p.1-20, 1993.

PLUIM, B.M.; ZWINDERMAN, A.H.; VAN DER LAARSE, A.; VAN DER WALL, E.E. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. **Circulation.** v.101, n.3, p.336-344, 2000.

QU, Z.; XU, H.; TIAN, Y. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and bradykinin peptides in rats with myocardial infarction. **Int J Clin Exp Pathol.** v.8, n.3, p.3410-7, 2015.

RAFACHO, A.; ROMA, L.P.; TABOGA, S.R.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85, n.5, p.536-45, 2007.

REN, R.; OAKLEY, R.H.; CRUZ-TOPETE, D.; CIDLOWSKI, J.A. Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. **Endocrinology** v.153, p.5346-5360, 2012.

RENGO, G.; CANNAVO, A.; LICCARDO, D.; ZINCARELLI, C.; DE LUCIA, C.; PAGANO, G.; KOMICI, K.; PARISI, V.; SCALA, O.; AGRESTA, A.; RAPACCIUOLO, A.; PERRONE FILARDI, P.; FERRARA, N.; KOCH, W.J.; TRIMARCO, B.; FEMMINELLA, G.D.; LEOSCO, D. Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of β -blocker therapy on cardiac function, angiogenesis, and remodeling in heart failure. **Circ Heart Fail.** v. 6, n. 6, p. 1259-1267, 2013.

RIBEIRO, H.B.; OKOSHI, K.; CICOONA, A.C.; BREGAGNOLLO, E.A.; RODRIGUES, M.A.; PADOVANI, C.R.; ARAGON, F.F.; JAMAS, E.; OKOSHI, M.P. Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supravalvular aortic stenosis. **Arquivos brasileiros de cardiologia** v.81, p.569-575, 562-568, 2003.

RIDKER, P.M., and RANE, M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. **Circulation research** v.128,p. 1728-1746, 2021.

RODRIGUES, B.; LIRA, F.S.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; ROCHA, J.A.; CAPERUTO, E.C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. **Mediators Inflamm.** v.2014, p.702473, 2014.

ROHDE, L. E. P. et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arq Bras Cardiol**, v. 111, n. 3, p. 436-539, 2018.

ROLIM, N.P.; MEDEIROS, A.; ROSA, K.T.; MATTOS, K.C.; IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M.; KRIEGER, J.E.; NEGRÃO, C.E.; BRUM, P.C. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. **Physiol Genomics.** v.29, n.3, p.246-252, 2007.

ROSSONI, L.V.; OLIVEIRA, R.A.; CAFFARO, R.R.; MIANA, M.; SANZ-ROSA, D.; KOIKE, M.K.; DO AMARAL, S.L.; MICHELINI, L.C.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** v.29, n.12, p.2349-2358, 2011.

- ROY, S.G.; DE, P.; MUKHERJEE, D.; CHANDER, V.; KONAR, A.; BANDYOPADHYAY, D.; BANDYOPADHYAY, A. Excesso f glucocorticoid induces cardiac dysfunction via Activating Angiotensin II pathway. **Cell Physiol Biochem**. v.24, p.01-10, 2009.
- RUDI, W.S.; MOLITOR, M.; GARLAPATI, V.; FINGER, S.; WILD, J.; MÜNDEL, T.; KARBACH, S.H.; WENZEL, P. ACE Inhibition Modulates Myeloid Hematopoiesis after Acute Myocardial Infarction and Reduces Cardiac and Vascular Inflammation in Ischemic Heart Failure. **Antioxidants (Basel)**. v.10, n.3, p.396, 2021.
- RUSSELL, S.T.; ELEY, H.; TISDALE, M.J. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. **Cell Signal** v.19, p.1797–1806, 2007.
- SANDMANN, S.; LI, J.; FRITZENKÖTTER, C.; SPORMANN, J.; TIEDE, K.; FISCHER, J.W.; UNGER, T. Differential effects of olmesartan and ramipril on inflammatory response after myocardial infarction in rats. **Blood Press**. v.15, n.2, p.116-128, 2006.
- SAHN, D.J.; De MARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**. v.58, n.6, p.1072-1083, 1978.
- SANT'ANA, P.G.; BATAH, S.S.; LEO, P.S.; TEODORO, W.R.; DE SOUZA, S.L.B.; FERREIRA MOTA, G.A.; VILEIGAS, D.F.; DA SILVA, V.L.; DE CAMPOS, D.H.S.; OKOSHI, K.; CAPELOZZI, V.L.; CICOGNA, A.C.; FABRO, A.T. Heart remodeling produced by aortic stenosis promotes cardiomyocyte apoptosis mediated by collagen V imbalance. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology** v.25, p.373-379, 2018.
- SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci J**, v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.
- SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the reninangiotensin system. **J Endocrinol** v.216, p.R1–R17, 2013.
- SANTOS, C.F.; MORANDINI, A.C.; DIONÍSIO, T.J.; FARIA, F.A.; LIMA, M.C.; FIGUEIREDO, C.M.; COLOMBINI-ISHIKIRIAMA, B.L.; SIPERT, C.R.; MACIEL, R.P.; AKASHI, A.P.; SOUZA, G.P.; GARLET, G.P.; RODINI, C.O.; AMARAL, S.L.; BECARI, C.; SALGADO, M.C.; OLIVEIRA, E.B.; MATUS, I.; DIDIER, D.N.; GREENE, A.S. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. **PLoS One** v.10, n.8, p.e0134601, 2015.
- SATO, A.; SUZUKI, H.; MURAKAMI, M.; NAKAZATO, Y.; IWAITA, Y.; SARUTA, T. Glucocorticoid increases angiotensin II type1 receptor and its gene expression. **Hypertension**, v. 23, n. 1, p. 25-30, 1994.
- SILVA, S.D.JR.; JARA, Z.P.; PERES, R.; LIMA, L.S.; SCAVONE, C.; MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M.; CASARINI, D.E.; MICHELINI, L.C. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PLoS One**. v.12; n.12, p.e0189535, 2017.
- SEGAR, J.L.; ROGHAI, R.D.; SEGAR, E.M.; BAILEY, M.C.; SCHOLZ, T.D.; LAMB, F.S. Early gestation dexamethasone alters baroreflex and vascular responses in newborn lambs before hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.291, n.2, p.R481-488, 2006.
- SILVA, S.D. JR.; JARA, Z.P.; PERES, R.; LIMA, L.S.; SCAVONE, C.; MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M.; CASARINI, D.E.; MICHELINI, L.C. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PLoS One**. v.12. n.12, p.e0189535, 2017.
- SILVEIRA, C.; CAMPOS, D.H.S.; FREIRE, P.P.; DEUS, A.F.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C.R.; CICOGNA, A.C. Importance of SERCA2a on early isolated diastolic dysfunction induced by supravalvular aortic stenosis in rats. **Brazilian journal of medical and biological research** v.50, p.e5742, 2017.

- SIMKO, F.; PECHANOVA, O.; PELOUCH, V.; KRAJCIROVICOVA, K.; MULLEROVA, M.; BEDNAROVA, K.; ADAMCOVA, M.; PAULIS, L. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens Suppl.** v.27, n.6, p.S5-10, 2009.
- SINAGRA, E.; PERRICONE, G.; ROMANO, C.; COTTONE, M. Heart failure and anti tumor necrosis factor-alpha in systemic chronic inflammatory diseases. **European journal of internal medicine** v.24,p. 385-392, 2013.
- SOUZA, P.P.C.; FUKADA, S.Y.; CUNHA, F.Q.; COSTA, C.A.S.; COSTA-NETO, C.M. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. **Regulatory Peptides**, v. 140, n. 1-2, p. 27-31, 2007.
- SOUZA-OLIVEIRA, T.C. **Ação da angiotensina II associada ao bloqueio dos receptores AT1 e AT2 no processo inflamatório das lesões vasculares.** Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. São Paulo, 2010.
- SUTHAHAR, N.; MEIJERS, W.C.; SILLJÉ, H.H.W.; DE BOER, R.A. From Inflammation to Fibrosis-Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities. **Curr Heart Fail Rep.** v.14, n.4, p.235-250, 2017.
- SUZUKI, H.; HANDA, M.; KONDO, K.; SARUTA, T. Role of renin-angiotensin system in glucocorticoid hypertension in rats. **Am J Physiol.** v.243, n.1, p. E48-51, 1982.
- SZABO-FRESNAIS, N.; LEFEBVRE, F.; GERMAIN, A.; FISCHMEISTER, R.; POMERANCE, M. A new regulation of IL-6 production in adult cardiomyocytes by beta-adrenergic and IL-1 beta receptors and induction of cellular hypertrophy by IL-6 trans-signalling. **Cellular signalling** v.22, p.1143-1152, 2010.
- TEI, C.; NISHIMURA, R.A.; SEWARD, J.B.; TAJIK, A.J. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. **J Am Soc Echocardiogr.** v.10, p.169-178, 1997.
- THAM, Y.K.; BERNARDO, B.C.; OOI, J.Y.; WEEKS, K.L.; MCMULLEN, J.R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. **Arch Toxicol.** v.89, n.9, p.1401-1438, 2015.
- TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res.** v.53, n.4, p.865-871, 2002.
- TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.301, n.6, p.H2181-2190, 2011.
- WAGNER, M.J.; KHAN, M.; MOHSIN, S. Healing the Broken Heart; The Immunomodulatory Effects of Stem Cell Therapy. **Front. Immunol.** v.11, p.639, 2020.
- WEEKS, K.L.; MCMULLEN, J.R. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? **Physiology** . n.2, p.97-105, 2011.
- WESTERMANN, D.; LINDNER, D.; KASNER, M.; ZIETSCH, C.; SAVVATIS, K.; ESCHER, F.; VON SCHLIPPENBACH, J.; SKURK, C.; STEENDIJK, P.; RIAD, A.; POLLER, W.; SCHULTHEISS, H.P.; TSCHOPE, C. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. **Circulation Heart failure** v.4, n.1, p.44-52, 2011.
- XIA, Q.; NA, T.; GUO, Y.; BI, Y.; ZHANG, H.; DAI, D. Improvement of chronic heart failure by dexamethasone is not associated with downregulation of leptin in rats 1. **Acta pharmacologica sinica**, v. 28, n. 2, p. 202-210, 2007.
- XU, B.; STROM, J.; CHEN, Q.M. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia. **Eur J Pharmacol.** v.668, n.1-2, p.194-200, 2011.

XU, X.; WAN, W.; JI, I.; LAO, S.; POWERS, A.S.; ZHAO, W.; ERIKSON, J.M.; ZHANG, J.Q. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. **Cardiovasc Res.** v.78, n.3, p.523-32, 2008.

YOU, J.; WU, J.; ZHANG, Q.; YE, Y.; WANG, S.; HUANG, J.; LIU, H.; WANG, X.; ZHANG, W.; BU, L.; LI, J.; LIN, L.; GE, J.; ZOU, Y. Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.314, n.3, p.H552-H562, 2018.

ZIZOLA, C.; SCHULZE, P.C. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. **Heart Fail Rev.** v.18, n.5, p.623-630, 2013.

ANEXO 1



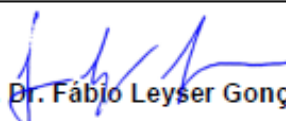
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Inflamação miocárdica: papel das citocinas inflamatórias no remodelamento cardíaco de ratos com insuficiência cardíaca", registrada com o nº 1044/2019 Vol. 1, sob a responsabilidade da Prof^a Assoc. SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO - que envolve a produção, manutenção 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 nº11.794, 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 da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 12/11/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 30/08/2019 a 31/03/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	De 60 a 250g/de 21 a 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP


Prof. Dr. Fábio Leyser Gonçalves
Vice-Coordenador da CEUA