



**Daniela dos Santos
Monteiro e Sousa**

**Efeitos Miocárdicos da Endotelina-1 na Insuficiência
Cardíaca**



**Daniela dos Santos
Monteiro e Sousa**

**Efeitos Miocárdicos da Endotelina-1 na Insuficiência
Cardíaca**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira, Professor Associado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, e co-orientação do Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares, Professor Catedrático, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Amadeu Soares
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Adelino Leite-Moreira
Professor Associado, Universidade do Porto

Prof. Doutora Carmen Brás-Silva
Professora Auxiliar, Universidade do Porto

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Adelino Leite-Moreira pela oportunidade profissional de trabalhar no seu grupo, orientação e conhecimentos partilhados.

Ao Professor Doutor Amadeu Soares pela presença, disponibilidade e por ter aceite ser co-orientador nesta importante etapa académica.

À Professora Doutora Carmen Brás-Silva pela convivência diária, amizade, motivação, paciência, por tudo o que me ensinou e pelo apoio prestado neste trabalho.

À Dr.^a Ana Joana Duarte, Dr.^a Nádia Gonçalves, Dr.^a Ana Luísa Pires, Dr.^a Inês Falcão e Dr.^a Ana Patrícia Sousa pelo carinho, pela convivência diária, companheirismo e amizade.

À Dr.^a Marta Oliveira, Dr.^a Antónia, D. Francelina, D. Rosinha e ao Sr. Armando Jorge pela amabilidade com que me receberam e pela disponibilidade demonstrada para resolver qualquer imprevisto laboratorial.

A todos os elementos do Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pelo apoio científico que me concederam e pela forma com que me receberam.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional, preocupação constante e incentivo.

Ao Gonçalo pelo encorajamento e apoio incondicional.

Aos meus amigos e família que me encorajaram.

Palavras-chave

endotelina-1, endotélio endocárdico, insuficiência cardíaca, propriedades diastólicas, distensibilidade miocárdica, doxorubicina.

Resumo

A presente dissertação teve como principal objectivo esclarecer os efeitos intrínsecos da ET-1 na regulação da função miocárdica em corações saudáveis e na presença de IC induzida experimentalmente. O estudo foi levado a cabo em coelhos brancos Neo-Zelandeses saudáveis (Grupo Controlo) e com IC induzida pela doxorubicina (1mg/kg, *iv*, 2 vezes por semana, durante 8 semanas; Grupo IC).

A função cardíaca foi avaliada *in vivo* e *in situ* através de estudos ecocardiográficos e hemodinâmicos, respectivamente. Os efeitos miocárdicos de doses crescentes de ET-1 (0,1; 1 e 10 nM) foram avaliados *in vitro* em músculos papilares isolados do ventrículo direito do Grupo IC e do Grupo Controlo na presença de: (i) endotélio endocárdico (EE) intacto, (ii) EE danificado, (iii) N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA; inibidor da síntese de NO) e (iv) Indometacina (INDO; inibidor da ciclooxigenase).

A avaliação ecocardiográfica e hemodinâmica demonstrou um compromisso significativo da função ventricular dos animais do Grupo IC em comparação com os do Grupo Controlo. No Grupo Controlo com EE intacto, a ET-1 promoveu efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos dependentes da dose. Estes efeitos mantiveram-se na ausência de EE, na presença de L-NNA e de INDO. No que respeita às propriedades diastólicas verificou-se um aumento significativo da distensibilidade miocárdica após a adição de ET-1 na presença de EE intacto. Este efeito foi abolido na ausência do EE, na presença de L-NNA ou de INDO e no Grupo IC. Demonstrou-se que a ET-1 exerce, além dos conhecidos efeitos sobre a função sistólica, um aumento da distensibilidade diastólica do miocárdio, dependente da libertação endotelial de NO e de prostaglandinas e que se encontra atenuado na IC.

Keywords

endothelin, endocardial endothelium, heart failure, diastolic properties, myocardial distensibility, doxorubicin.

Abstract

The main goal of the present dissertation was the study of the intrinsic effects of ET-1 in the regulation of myocardial function in healthy hearts and in experimentally-induced heart failure. This study was carried out in healthy New Zealand white rabbits (Control Group) and diseased rabbits treated with Doxorubicin (1mg/kg, intravenously twice a weekly for 8 weeks, DOX-HF Group).

Cardiac function was evaluated *in vivo* and *in situ* by ecocardiographic and hemodynamic studies, respectively. The myocardial effects of ET-1 (0.1, 1, 10nM) were tested *in vitro* in papillary muscles from the DOX-HF group and from the Control Group in the presence of: (i) intact endocardial endothelium (EE); (ii) damaged EE; (iii) N^G-Nitro-L-Arginine (L-NNA; NO synthase inhibitor); and (iv) Indomethacin (INDO; cyclooxygenase inhibitor).

The ecocardiographic and hemodynamics studies revealed a significant impairment of the ventricular function in DOX-HF Group, in compare with Control Group. In the presence of an intact EE, ET-1 promoted concentration-dependent positive inotropic and lusitropic effects that were maintained after damaging the EE, in the presence of L-NNA or INDO and in the DOX-HF Group. ET-1 reduced resting tension at the end of the isometric twitch (increased diastolic distensibility) in muscles with intact EE, effect that was completely abolished after damaging EE, in the presence of L-NNA or INDO or in the DOX-HF Group. This study demonstrated that the increase in myocardial distensibility induced by ET-1 is absent in HF and is dependent of NO and prostaglandin release.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	Abreviaturas.....	10
CAPÍTULO II	Introdução e Objectivos.....	13
	Síndrome da Insuficiência Cardíaca	
	Insuficiência Cardíaca Sistólica e Diastólica	
	Endotelinas Cardiovasculares	
	Aspectos moleculares do sistema da endotelina-1	
	Síntese e secreção da endotelina-1	
	Receptores da endotelina-1	
	Efeitos miocárdicos da endotelina-1 e mecanismos subjacentes	
	Efeitos da ET-1 na função sistólica	
	Efeitos da ET-1 na função diastólica	
	Endotelina-1 e a Insuficiência Cardíaca	
	Modelos animais de insuficiência cardíaca	
	Modelo de toxicidade cardíaca induzida pela doxorubicina	
	Objectivos	
CAPÍTULO III	Material e Métodos.....	31
	1. Modelo de toxicidade cardíaca induzida pela doxorubicina	
	1.1 Avaliação ecocardiográfica	
	1.2 Análise dos dados ecocardiográficos	
	1.3 Avaliação hemodinâmica	
	1.4 Análise dos dados hemodinâmicos	
	2. Estudos em músculos papilares	
	2.1 Preparação experimental	
	2.2 Protocolos experimentais	
	Avaliação funcional	
	Efeitos miocárdicos da ET-1	
	2.3 Análise de dados do modelo de músculo papilar	

CAPÍTULO IV	Resultados.....	39
	1. Avaliação hemodinâmica e ecocardiográfica	
	2. Estudos em músculos papilares	
	2.1 Relação contractilidade-frequência	
	2.2 Efeitos miocárdicos da ET-1	
CAPÍTULO V	Discussão e Conclusões.....	48
CAPÍTULO VI	Bibliografia.....	56
CAPÍTULO VII	Anexos.....	67
	Modelo do Musculo Papilar Isolado	

CAPÍTULO I

Abreviaturas

AC	Adenilciclase
GC	Guanilciclase
Ang II	Angiotensina II
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DOX	Doxorrubicina
dP/dt_{max}	Velocidade máxima de elevação da pressão ventricular
dP/dt_{min}	Velocidade máxima de queda da pressão ventricular
dT/dt_{max}	Velocidade máxima de elevação da tensão muscular
dT/dt_{min}	Velocidade máxima de queda da tensão muscular
ECA	Enzima de conversão da angiotensina
ECE	Enzima de conversão da endotelina
EE	Endotélio endocárdico
ET-1	Endotelina-1
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
IC	Insuficiência cardíaca
INDO	Indometacina
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
<i>im</i>	via intramuscular
<i>iv</i>	via intravenosa
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginina
NCX	Trocador sódio/cálcio (Na ⁺ /Ca ²⁺)
NHE	Trocador sódio/hidrogénio (Na ⁺ /H ⁺)
NO	Óxido nítrico
PLC	Fosfolipase C
PKA	Proteína cínase A

PKC	Proteína cínase C
PKG	Proteína cínase G
TA	Tensão activa
TP	Tensão passiva
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

CAPÍTULO II

Introdução e Objectivos

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma condição debilitante com elevada mortalidade. Em Portugal tem uma prevalência total de 4,4% que aumenta abruptamente com a idade, sendo superior a 8% acima dos 60 anos e atingindo os 16% acima dos 80 anos (Ceia *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2002).

SÍNDROME DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A síndrome da IC é consequência da incapacidade do coração gerar um adequado débito cardíaco, para atender às necessidades metabólicas do organismo. Os mecanismos fisiopatológicos mais importantes associados à IC incluem: a estimulação cardíaca (inotropismo/contractilidade, cronotropismo/frequência cardíaca e lusitropismo/relaxamento), a vasoconstrição arteriolar periférica e a retenção renal de sódio e água (Cerqueira-Gomes *et al.*, 2004).

Esta síndrome envolve a activação de múltiplas vias celulares, metabólicas e neurohumorais promovida por uma lesão miocárdica inicial (Ganguly *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990; Ferrari *et al.*, 1999; Kjaer & Hesse, 2001). A IC é caracterizada por alteração dos padrões hemodinâmicos (pré-carga e débito cardíaco), e mudanças nos sistemas neurohumorais. As neurohormonas libertadas, actuando de forma endócrina, parácrina ou autócrina, promovem uma panóplia de efeitos que, embora possam ser considerados inicialmente compensadores, rapidamente se tornam deletérios, contribuindo para o ciclo vicioso de auto-agravamento que caracteriza esta síndrome (Katz & Zile, 2006).

O seguinte quadro mostra os principais mecanismos neurohumorais que actuam na IC, divididos em reguladores e contra-reguladores.

Quadro I – Mecanismos neurohumorais na Insuficiência Cardíaca (Cerqueira-Gomes *et al.*, 2004).

Vasoconstritores/Antinatriuréticos Proliferativos/Inotrópicos positivos	Neuroendócrinos	Vasodiladores/Natriuréticos Antiproliferativos/Inotrópicos negativos
Renina-Angiotensina Simpático-adrenal Vasopressina		Peptídeos Natriuréticos - ANP, BNP, CNP
	Autócrinos e/ou Parácrinos	
Angiotensina Troboxano Endotelina		Sistemas dopaminérgicos locais Prostaglandinas NO Cininas Adrenomedulina

A reforçar a importância dos mecanismos neurohumorais está ainda o facto do seu bloqueio ter estado na base dos avanços mais significativos da terapêutica farmacológica da IC, com reflexos directos no prognóstico da doença e, portanto, na sobrevida dos doentes (Jessup & Brozena, 2003).

Outro aspecto fisiopatologicamente importante e, pelo menos em parte, relacionado com a desregulação neurohumoral, diz respeito à disfunção endotelial vascular. A disfunção endotelial é um achado precoce na progressão para a IC e relacionado não apenas com a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), como classicamente apontado na literatura clínica, mas também com alterações de várias outras vias sinalizadoras parácrinas e autócrinas (ECE, COX, ECA) e das suas propriedades (anti)-crescimento, (anti)-inflamatória e (anti)-coagulante. Adicionalmente, factores locais, como o stress inflamatório (citoquinas), o stress oxidativo e a hipóxia são capazes de induzir alterações do fenótipo endotelial para além do tradicionalmente descrito desequilíbrio entre a disponibilidade de factores vasodilatadores e de factores vasoconstritores. Esta disfunção tem sido invocada para explicar a fadiga, intolerância ao exercício, respostas vasoconstritoras inapropriadas com redução da capacidade vasodilatadora e consequente elevação da resistência vascular periférica. Apesar da sua potencial importância na disfunção cardíaca e de toda a evidência acima referida sobre a relevância fisiopatológica da disfunção endotelial vascular na IC, o papel do endotélio endocárdico nesta síndrome permanece ainda por esclarecer (Brutsaert, 2003; Endemann & Schiffrin, 2004).

INSUFICIÊNCIA CARDÍACA SISTÓLICA E DIASTÓLICA

O ciclo cardíaco pode ser dividido em sístole e diástole. Sem levar em consideração o tempo exacto destes períodos, é normalmente aceite que a função sistólica está relacionada com a capacidade do ventrículo contrair e ejectar, enquanto a função diastólica reflecte a sua capacidade de relaxar e encher.

Actualmente, a Insuficiência Cardíaca pode ser subdividida em Insuficiência Cardíaca Sistólica e Insuficiência Cardíaca Diastólica. Estas duas síndromes clínicas diferem na epidemiologia, demografia e origem. Uma vez que a IC Sistólica e a IC Diastólica representam subgrupos de doentes com IC, estes partilham factores clínicos, nomeadamente hemodinâmicos, causados por mecanismos fisiopatológicos diferentes (Zile & Brutsaert, 2002). Os corações com IC Sistólica são caracterizados por apresentarem hipertrofia excêntrica (parede ventricular esquerda fina), dilatação progressiva do VE e disfunção contráctil, enquanto na IC Diastólica, os corações exibem, geralmente hipertrofia concêntrica (espessamento das paredes), volume telediastólico do VE normal ou reduzido, remodelagem concêntrica (ambos causados frequentemente por sobrecarga de pressão crónica - hipertensão) e disfunção diastólica (Katz & Zile, 2006) (Figura 1). A IC Diastólica pode ocorrer isolada ou simultaneamente com a IC Sistólica (Zile & Brutsaert, 2002).

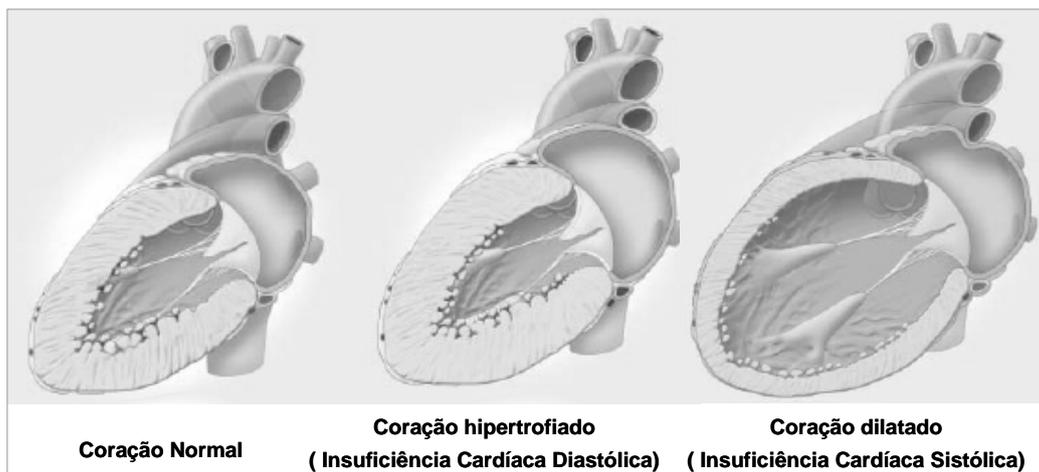


Figura 1 – Esquema representativo do ventrículo do VE humano de: coração normal, coração com IC diastólica e coração com IC sistólica (adaptado de Jessup & Brozena, 2003).

ENDOTELINAS CARDIOVASCULARES

Nos últimos anos tem sido largamente documentada a hiperactivação e participação do sistema da endotelina (ET) em diversas manifestações da IC. As endotelinas são essenciais na função cardiovascular, desempenhando papéis importantes na regulação e na adaptação da função cardíaca a diferentes necessidades, incluindo a manutenção da função diastólica (Brunner *et al.*, 2006).

O sistema da endotelina é constituído por 3 isopeptídeos, diversas isoformas de peptidases activadoras e por dois receptores acoplados a proteínas G, ET_A e ET_B, que se encontram associados a múltiplas vias de sinalização. A família da endotelina é constituída por 4 isoformas de 21 aminoácidos: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2), endotelina-3 (ET-3) e por uma quarta isoforma (ET-4), originalmente identificada como constritor intestinal vasoactivo no rato, que é análoga da ET-2 humana (Figura 2). Para além destas isoformas, várias toxinas de veneno de cobra denominadas sarafotoxinas foram identificados como membros desta família (Masaki, 2002; Brunner *et al.*, 2006).

As endotelinas, ET-1, ET-2 e ET-3 são codificadas por genes distintos localizados nos cromossomas 6, 1 e 20, respectivamente (Motte *et al.*, 2006) (Figura 2). A ET-1 é a principal isoforma presente no sistema cardiovascular, sendo predominantemente produzida pelo endotélio cardíaco (vascular e endocárdico), mas também pelo músculo liso e pelas células miocárdicas (Russel & Molenaar, 2000).

A ET-1 foi originalmente identificada em 1988 por Yanagisawa, como sendo o mais potente vasoconstritor endógeno conhecido. É considerada um regulador local (autócrino e parácrino), uma vez que a sua libertação é predominantemente abluminal. Os níveis plasmáticos, salivares e tecidulares cardíacos de ET-1 encontram-se aumentados na IC, correlacionando-se positivamente com a gravidade da doença e negativamente com o prognóstico (Krum *et al.*, 1998; Attina *et al.*, 2005; Motte *et al.*, 2006).

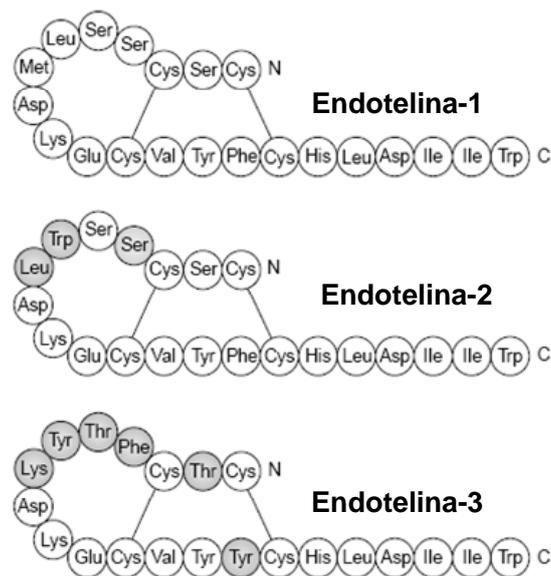


Figura 2 – Estrutura das isoformas da endotelina. Os resíduos assinalados correspondem aos resíduos que diferem da endotelina-1 (adaptado de Sakurai *et al.*, 1992).

ASPECTOS MOLECULARES DO SISTEMA DA ENDOTELINA-1

SÍNTESE E SECREÇÃO DA ENDOTELINA-1

O produto inicial do gene da ET-1 é um peptídeo denominado pré-pró-ET-1, um peptídeo de 212 aminoácidos que é convertido por uma protease semelhante à *furine* em *big* ET-1, de 38 aminoácidos. Numa segunda etapa, as enzimas conversoras da endotelina (ECEs) clivam a *big* ET-1 e libertam a forma madura do peptídeo ET-1. As ECEs pertencem à família das metaloproteases e localizam-se nas células endoteliais, células do músculo liso, cardiomiócitos e macrófagos. Estas enzimas não são, no entanto, as únicas promotoras da síntese de ET-1, outras vias alternativas incluem metaloproteases distintas das ECEs (como a endopeptidase neutra) e a quimase que cliva a *big* ET-1 num peptídeo de 31 aminoácidos, a ET-1₍₁₋₃₁₎. Esta parece ser posteriormente convertida em ET-1 pela endopeptidase neutra (D'Orleans-Juste *et al.*, 2003; Davenport & Maguire, 2006) (Figura 3).

A expressão e libertação da ET-1 são estimuladas por diversos factores químicos e físicos, nomeadamente, stress mecânico baixo, hipóxia, factores de crescimento, Ang II, catecolaminas, citocinas, trombina, radicais livres e pela própria ET-1. Pelo contrário, a expressão do RNAm da ET-1 é inibida pelo NO, peptídeos natriuréticos, prostaciclina, heparina e pelo aumento do fluxo sanguíneo, este último através do aumento da libertação de NO por activação dos receptores de stress mecânico nas células endoteliais (Brunner *et al.*, 2006).

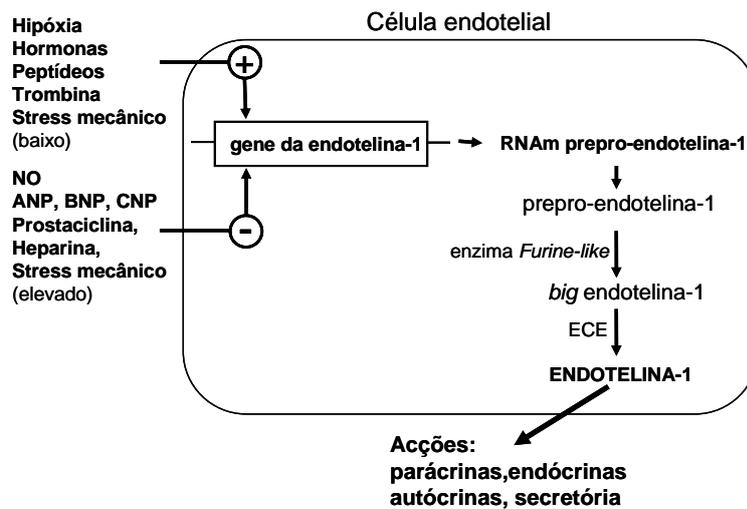


Figura 3 – Regulação da síntese da endotelina-1 (adaptado de Brunner *et al.*, 2006).

A secreção da ET-1 activa é assim controlada por regulação quer ao nível da transcrição genética, quer ao nível da actividade de enzimas conversoras. A maioria dos factores estimuladores actuam através da activação da PLC e conseqüentemente da PKC, ou através de vias dependentes de proteínas cínases activadas por mitogénios (MAPKs), enquanto os factores inibitórios são mediados pela inibição do metabolismo do bifosfato de fosfotidilinositol induzida pela via do GMPc (Neylon *et al.*, 1990; Brunner *et al.*, 2006).

A ET-1 é um componente normal do plasma humano que está constantemente a ser produzida e removida. Em indivíduos saudáveis, as concentrações de ET-1 são muito baixas, variando na maioria dos estudos entre cerca de 0,3 pg/mL a 3 pg/mL (Battistini *et al.*, 1993). É geralmente aceite que os níveis de ET-1 são bastantes superiores junto às

células musculares lisas do que no lúmen vascular, devido à sua libertação predominantemente abluminal (Wagner *et al.*, 1992).

RECEPTORES DA ENDOTELINA-1

Nos mamíferos a actividade biológica da ET-1 é mediada pela ligação a dois tipos de receptores: os receptores ET_A e os receptores ET_B. Tipos de receptores adicionais foram identificados apenas em anfíbios (Karne *et al.*, 1993) e em aves (Lecoin *et al.*, 1998), não existindo, contudo, até à data evidências moleculares da sua existência em mamíferos (Davenport, 2002).

No Homem, os receptores ET_A e ET_B são codificados por genes distintos localizados nos cromossomas 4 e 13, respectivamente, partilham cerca de 60% de identidade em aminoácidos (Sakurai *et al.*, 1992) e cada um dos tipos é altamente preservado nas várias espécies de mamíferos. Ambos os receptores contêm sete domínios transmembranares e pertencem à classe 1 (família A ou *rodopsin-like*) da família de receptores transmembranares acoplados a proteínas G (Davenport, 2002). Os receptores ET_A possuem dez vezes mais afinidade para a ET-1, enquanto que os receptores ET_B possuem igual afinidade para as três endotelinas endógenas (Motte *et al.*, 2006).

Os receptores ET_A e ET_B distinguem-se não só pela sua afinidade de ligação às diferentes isoformas de ET, mas também pela sua distribuição nos tecidos e células e pelos seus efeitos fisiológicos. Assim, no sistema cardiovascular, os receptores ET_A são expressos nas células musculares lisas, nos cardiomiócitos e nos fibroblastos, e os receptores ET_B são expressos predominantemente nas células endoteliais e em menor grau no músculo liso, nos fibroblastos e nos cardiomiócitos (Miyachi & Masaki, 1999). Mais especificamente no coração humano, estes receptores encontram-se distribuídos amplamente e heterogeneamente, incluindo o músculo cardíaco e o sistema de condução atrioventricular (Russel & Molenaar, 2000) (Figura 4).

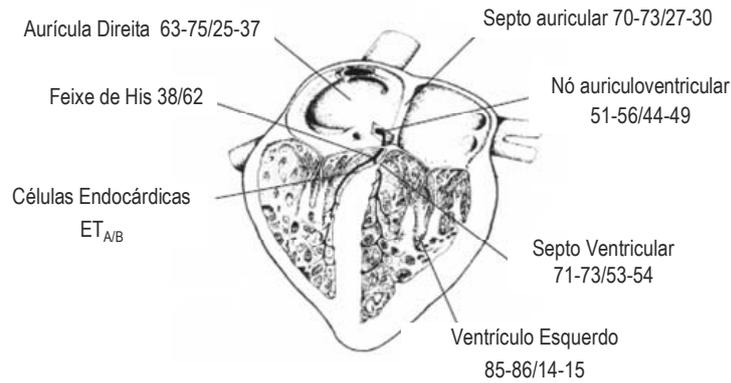


Figura 4 – Distribuição dos receptores ET_A e ET_B no coração humano. Os valores encontram-se expressos em percentagem (adaptado de Russel & Molenaar, 2000).

Em termos gerais, os receptores ET_A, mais abundantes no sistema cardiovascular, promovem vasoconstrição, aumento do inotropismo e mitogénese (Miyachi & Masaki, 1999). Por outro lado, os receptores ET_B têm propriedades vasodilatadoras, mediadas pela libertação do NO (Tsukahara *et al.*, 1994), e prostaciclina (de Nucci *et al.*, 1988), e efeitos inibitórios do crescimento associados à apoptose (Mallat *et al.*, 1995; Okazawa *et al.*, 1998; Russel & Molenaar, 2000). Este tipo de receptores é também responsável pela depuração pulmonar da ET-1 circulante (Fukuroda *et al.*, 1994; Honore *et al.*, 2005) e pela sua re-captção pelas células endoteliais (Ozaki *et al.*, 1995).

Ao nível vascular é possível ainda subdividir os receptores. Os receptores ET_A, de localização muscular, podem ser classificados em ET_{A1} e ET_{A2} consoante são ou não sensíveis ao antagonista BQ-123, respectivamente (Sudjarwo *et al.*, 1994). Por seu turno, os receptores ET_B podem ser classificados em ET_{B1} de localização endotelial e promotores de vasodilatação e em ET_{B2} de localização muscular e promotores de vasoconstrição (Douglas *et al.*, 1994; Endoh *et al.*, 1998).

EFEITOS MIOCÁRDICOS DA ET-1 E MECANISMOS SUBJACENTES

EFEITOS DA ET-1 NA FUNÇÃO SISTÓLICA

Os efeitos inotrópicos da ET-1 são mediados por várias vias de sinalização intracelulares (Sudgen, 2003) (Figura 5). Tal como outras neuro-hormonas, a ET-1 afecta as propriedades contrácteis do cardiomiócito pela regulação do movimento e concentração intracelular de iões. A ET-1 promove um aumento da contractilidade miocárdica, que é mediado sobretudo pelos receptores ET_A. A estimulação dos receptores ET_A activa a PLC, através da via mediada pela proteína G, levando à produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e de diacilglicerol (DAG), e à consequente activação do trocador Na⁺/H⁺ (NHE). Nos cardiomiócitos, o IP₃ aumenta a concentração de Ca²⁺ citosólico, promovendo a sua libertação pelo retículo sarcoplasmático (Poindexter *et al.*, 2001). A DAG activa a PKC, desta forma aumentando o Ca²⁺ sistólico e a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Gwathmey & Hajjar, 1990; Pi & Walker, 1998). As vias de transdução de sinal associadas ao efeito inotrópico positivo dos receptores ET_{B2} permanecem ainda por esclarecer (Figura 5) (Brunner *et al.*, 2006).

Os subtipos de receptores que medeiam os efeitos inotrópicos negativos directos, não-dependentes da libertação de NO e prostaglandinas como descrito acima, são pouco conhecidos. Foram apontados 2 mecanismos de transdução de sinal envolvidos neste processo: i) inibição da AC, mediado pela proteína G de ligação selectiva não conhecida e que resulta na diminuição dos níveis de AMPc; ii) activação de fosfatases mediada pelo GMPc que desfosforilam determinados alvos, como resultado da activação da PKA. Outras enzimas como a PKC e a PKG têm sido implicadas neste mecanismo, promovendo efeitos inotrópicos negativos directos ou inibindo as vias conducentes ao aumento da contractilidade (Wheeler-Jones, 2005; Brunner *et al.*, 2006).

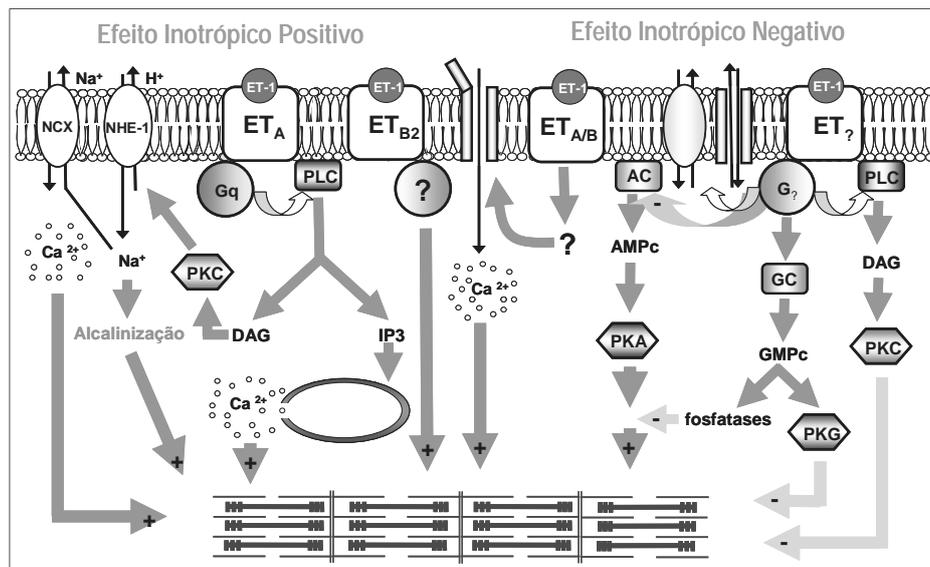


Figura 5 - Mecanismos de transdução de sinal que estão envolvidos nos efeitos inotrópicos da endotelina-1 (Brunner *et al.*, 2006).

EFEITOS DA ET-1 NA FUNÇÃO DIASTÓLICA

Os determinantes da função diastólica incluem o relaxamento miocárdico e as propriedades passivas da parede ventricular, tais como a rigidez miocárdica e a espessura da parede e a geometria da câmara (tamanho e volume). Outros determinantes incluem as estruturas circundantes do ventrículo, a aurícula esquerda, as veias pulmonares e a válvula mitral, bem como a frequência cardíaca. Em relação à rigidez miocárdica, os seus determinantes estão relacionados com factores intrínsecos aos próprios cardiomiócitos (citoesqueleto) e à matriz extracelular (Gillebert *et al.*, 2000; Kass *et al.*, 2004; Leite-Moreira, 2006). Portanto, quando se analisam os efeitos da ET-1 na função diastólica dever-se-á ter em conta os seus efeitos quer sobre o relaxamento miocárdico (efeitos lusitrópicos), quer sobre a rigidez miocárdica.

No que concerne ao relaxamento miocárdico, a administração exógena de ET-1, a preparações de músculo isolado resultou na aceleração da velocidade de queda da tensão e reextensão muscular (relaxamento miocárdico) (Li *et al.*, 1991; Leite-Moreira *et al.*, 2003).

Na presença de sobrecarga cardíaca, a ET-1 pode aumentar a distensibilidade miocárdica e levar a uma dilatação ventricular aguda sem comprometer a função contráctil. Este aumento da distensibilidade diastólica induzido pela ET-1 é mediado pelos receptores ET_A e dependente da activação do NHE (Figura 6) (Leite-Moreira *et al.*, 2003). Isto irá permitir um recrutamento mais eficiente de reserva de pré-carga, com o ventrículo a conseguir alcançar maiores volumes com pequenos aumentos da pressão de enchimento. Embora este mecanismo possa ser considerado compensatório, não se pode excluir que a longo prazo possa contribuir para a dilatação e remodelagem ventriculares (Jessup & Brozena, 2003).

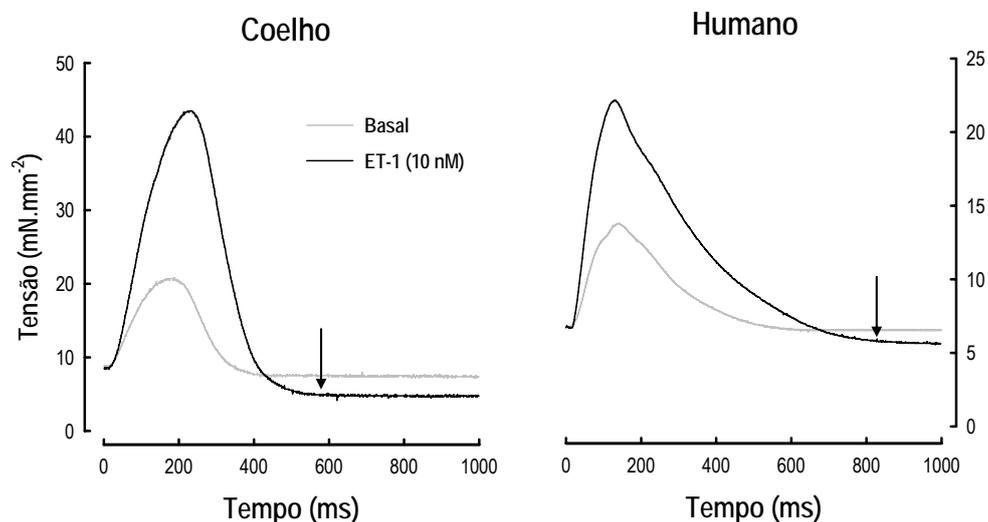


Figura 6 – Efeitos da endotelina-1 (10nM) em músculos papilares isolados do VD de coelho e trabéculas auriculares humanas (exemplo representativo de uma contracção isométrica). A ET-1 aumentou a tensão activa (TA) e diminui a tensão passiva (TP) muscular. Esta diminuição da TP é manifestada pelo facto da porção terminal do traçado da tensão se projectar, na presença de ET-1, claramente abaixo do traçado basal (↓). Este aumento do comprimento muscular para a mesma TP traduz um aumento da distensibilidade miocárdica (Leite-Moreira *et al.*, 2003).

Em relação à rigidez miocárdica, vários estudos sugerem que quando cronicamente elevada em condições patológicas, a ET-1 pode aumentar a rigidez diastólica através da indução de hipertrofia miocárdica e da alteração da matriz extracelular, levando a situações de fibrose (Brown *et al.*, 2005; Clozel & Sallouk, 2005; Brunner *et al.*, 2006). Não obstante, foi demonstrado em diferentes tipos de células *in vitro*, incluindo cardiomiócitos, que a ET-1 pode também aumentar a libertação de metaloproteases, e assim talvez condicionar a fibrose (Tsuruda *et al.*, 2004).

ENDOTELINA-1 E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A progressão para a IC acompanha-se, além da tradicionalmente descrita disfunção hemodinâmica, de intensa e significativa activação neuro-humoral. O modelo neuro-humoral da IC esteve na base dos avanços mais significativos da terapêutica farmacológica desta patologia, com reflexos directos no prognóstico e, portanto, na sobrevida dos doentes (Jessup & Brozena, 2003).

Vimos até aqui que a ET-1 tem um importante papel fisiológico na regulação da homeostasia cardiovascular, porém, a sua produção excessiva e desregulada tem sido associada às principais patologias cardiovasculares. A ET-1 estimula a libertação de outras hormonas (por exemplo, noradrenalina e Ang II) e potencia a sua acção, podendo assim ter efeitos cardíacos a longo prazo e agravar a patologia existente.

Vários estudos, em modelos animais experimentais e em doentes com IC, têm descrito elevadas concentrações plasmáticas de ET-1 na IC e fortes correlações positivas entre os níveis deste peptídeo, as classes funcionais do *New York Heart Association* (NYHA) e a função cardíaca global, o que aponta para um possível valor prognóstico da ET-1 (Attina *et al.*, 2005; Motte *et al.*, 2006). O mecanismo subjacente à sua elevação na IC não está completamente definido, mas poderá estar relacionado com maior produção e secreção, bem como, com menor depuração pulmonar da ET-1 (Brunner *et al.*, 2006). A alteração do sistema tecidual cardíaco da ET-1 foi também documentada na IC experimental e clínica. Assim, vários

estudos verificaram sobre-expressão cardíaca e pulmonar de pré-pró-ET-1 e de ET-1. No que respeita à expressão de ECEs alguns autores relataram aumentos, enquanto que outros não observaram qualquer variação. Quanto aos receptores da ET-1 foram descritos quer aumentos quer diminuições da expressão de ambos os receptores, quer ainda sobre-expressão dos receptores ET_A com concomitante subexpressão de receptores ET_B, dependendo do modelo ou condição clínica avaliados (Brunner *et al.*, 2006; Motte *et al.*, 2006).

Os potenciais efeitos deletérios da ET-1 na IC, fizeram com que o bloqueio da sua actividade se tornasse num importante alvo terapêutico a investigar. Nos últimos anos, diversos estudos clínicos foram conduzidos no Homem e em animais, com abordagens terapêuticas diversificadas, desde o uso de inibidores selectivos dos ECEs, ao uso de antagonistas selectivos e não-selectivos dos receptores ET_A e ET_B, entre outros. No entanto, a utilização destes bloqueadores do sistema da ET no tratamento da IC tem-se mostrado decepcionante.

MODELOS ANIMAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

O tratamento médico da IC está associado a 50% de sobrevivência após 5 anos do diagnóstico, por isso reveste-se de grande importância o estudo e desenvolvimento de modelos experimentais animais que permitam estudar a progressão da doença e elaborar novas terapias (Arnold *et al.*, 1999). Ao longo dos anos, modelos de IC agudos e crónicos têm sido desenvolvidos numa grande diversidade de animais – cães, ovelhas, coelhos, ratos, entre outros; de forma a reproduzir diferentes aspectos da patologia da IC e melhor entender os eventos moleculares subjacentes (Hasenfuss, 1998).

No quadro II estão resumidos alguns dos modelos de IC mais conhecidos. De notar que a maioria dos modelos de IC utilizados requerem uma intervenção cirúrgica, e portanto, um procedimento invasivo. O modelo animal de IC seleccionado para o presente trabalho, modelo de toxicidade cardíaca induzida pela doxorubicina, é um modelo que se encontra bem documentado na literatura (Dodd *et al.*, 1993).

Quadro II – Modelos animais de IC.

Modelos de sobrecarga de volume
– Sobrecarga de volume crónica
– Sobrecarga de volume aguda
Modelos de sobrecarga de pressão
– <i>Banding</i> aórtico
– Monocrotalina
– Hipertensão sistémica
Modelos de IC induzida por <i>rapid-pacing</i>
Modelos de IC induzida por Drogas
– Doxorubicina
– Propanolol
– Isoprenalina
Modelos de Isquemia ou de Enfarte cardíaco
Modelos de animais geneticamente modificados

MODELO DE TOXICIDADE CARDÍACA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DOX) é um agente antineoplásico pertencente ao grupo dos antibióticos antraciclina, isolada a partir de um fungo, *Streptomyces coeruleorubidus* ou *S. peucetius* (Gharib & Brunett, 2002), que desempenha um papel chave na abordagem quimioterapêutica da neoplasia da mama e de linfomas (Hequet *et al.*, 2004). Contudo a sua utilização clínica é, muitas vezes, limitada devido à cardiotoxicidade aguda ou crónica que induz, conduzindo ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e IC (Yoshiro *et al.*, 2002). Adicionalmente, a IC induzida pela DOX é irreversível e progressiva (Monnet & Chachques, 2005).

A cardiotoxicidade induzida pela DOX é dependente da dose, e como tal esta tem sido administrada por via intravenosa ou injeção intracoronária em doses supratrapêuticas para induzir IC em várias espécies animais – cão, ovelha, coelho e roedores (Monnet & Orton, 1999; Christiansen *et al.*, 2002; Monnet & Chachques, 2005).

A administração intravenosa da DOX é seguida de uma rápida distribuição plasmática e rápido abandono do plasma sanguíneo para se fixar nos tecidos, sendo submetida também a uma metabolização rápida no fígado.

Alguns autores sugerem que a DOX exerce os seus efeitos cardiotoxicos por acção do seu maior metabolito, o doxorubicinol, formado pela acção da reductase carbonil presente no citosol das células cardíacas (Figura 7) (Boucek *et al.*, 1987; Minotti *et al.*, 1998).

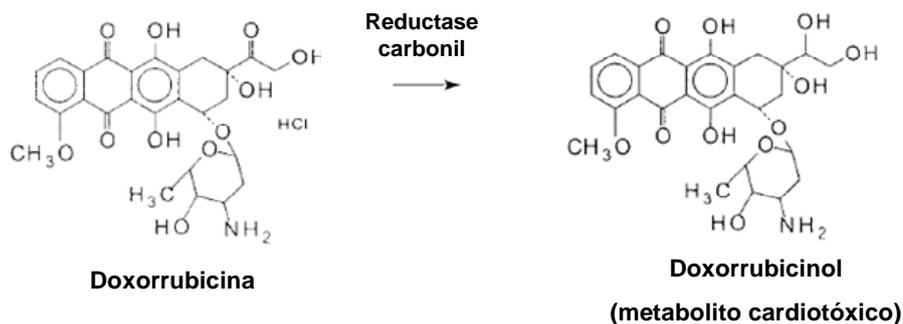


Figura 7 – Formação do metabolito da doxorubicina. A DOX é reduzida no carbono 13 por reductases presentes no citosol das células cardíacas dando origem ao metabolito cardiotoxico, o Doxorubicinol (Gambliel *et al.*, 2002).

O mecanismo exacto da cardiotoxicidade induzida pela DOX é pouco claro, e parece ser de origem multifactorial (Minotti *et al.*, 2004). Os principais mecanismos descritos estão relacionados com: i) a formação de radicais livres; ii) inibição da síntese e transcrição do ADN, pois tem a capacidade de se ligar especificamente ao ADN intercalando-se entre os pares de bases adjacentes e tem um efeito estabilizante do aminoácúcar, unindo-se fortemente ao ADN; iii) peroxidação lipídica, que resulta em alterações nos lisossomas, mitocôndrias, sarcolema e retículo sarcoplasmático e; iv) apoptose (Hasenfuss, 1998; Wu *et al.*, 2002; Minnot *et al.*, 2004). Em geral, estas alterações induzem uma sobrecarga de cálcio, activação de enzimas hidrolíticas e redução na produção de energia, e consequentemente uma diminuição da função cardíaca, como resultado da perda de integridade estrutural (Monnet & Chachques, 2005).

A ecocardiografia é a forma de avaliação não invasiva da função cardíaca mais frequentemente utilizada na avaliação da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclina, em humanos (Hequet *et al.*, 2004). Na avaliação ecocardiográfica, a IC induzida pela DOX é caracterizada por dilatação bilateral, espessamento da parede ventricular e redução da fracção de ejeção (Monnet & Orton, 1999; Christiansen *et al.*, 2002).

A IC induzida pela doxorubicina tem sido utilizada para avaliar diferentes modalidades de tratamento para a IC. Este modelo tem a vantagem de ser simples de aplicar, não-invasivo e económico (Balakumar *et al.*, 2007). Contudo, apresenta algumas limitações, nomeadamente: o grau de disfunção ventricular esquerda é variável; encontra-se associado a uma elevada incidência de arritmias, que contribuem para a taxa de mortalidade; e para além disso, a DOX tem efeitos tóxicos indesejáveis ao nível gastrointestinal e da medula óssea (Monnet & Chachques, 2005).

OBJECTIVOS

Na sequência do estudo dos efeitos agudos deste peptídeo na função diastólica, este trabalho foi conduzido de forma a averiguar se o efeito da ET-1 sobre as propriedades diastólicas se encontra preservado num modelo animal de IC e, uma vez que a IC pode cursar com disfunção endotelial, pretendeu-se investigar se esses efeitos são dependentes de dois dos mais importantes mediadores endoteliais, óxido nítrico e prostaglandinas. Neste contexto, os objectivos específicos desta dissertação consistiram em:

- caracterizar a disfunção cardíaca no modelo de toxicidade cardíaca induzida pela doxorrubicina, avaliando a função sistólica e diastólica *in vivo* e *in situ*, através de estudos ecocardiográficos e hemodinâmicos, respectivamente, em coelhos tratados com doxorrubicina e veículo;
- estudar os efeitos miocárdicos do sistema da Endotelina-1 na regulação da função sistólica e diastólica de corações saudáveis e insuficientes *in vitro*;
- avaliar a modulação dos efeitos da ET-1 na distensibilidade miocárdica, por dois dos mais importantes mediadores endoteliais, o óxido nítrico e as prostaglandinas, em corações saudáveis *in vitro*.

O cumprimento destes objectivos poderá contribuir para clarificar o papel da ET-1 endógena na modulação da função miocárdica, em particular no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, o que se reveste de grande relevância para a compreensão da sua fisiopatologia e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes.

CAPÍTULO III

Material e Métodos

1. MODELO DE CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA

O presente trabalho seguiu as recomendações do “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*” publicado pelos “*US National Institutes of Health*” (NIH Publication Nº 85-23, revisto em 1996).

A Doxorubicina foi administrada por via intravenosa (*iv*) a coelhos brancos Neozelandeses adultos (*Oryctolagus cuniculus*), pela veia marginal da orelha, na dose de 1 mg.Kg⁻¹, duas vezes por semana durante 8 semanas (Arnolda *et al.*, 1985). Num Grupo Controlo, os coelhos foram submetidos ao mesmo protocolo, recebendo volumes equivalentes de soro fisiológico (NaCl 0,9%) durante o mesmo período de tempo (veículo). Todos os animais foram submetidos a avaliação ecocardiográfica de forma a monitorizar as alterações morfológicas e funcionais durante o desenvolvimento da IC. Adicionalmente, num subgrupo de animais Controlo e com IC, foram realizadas avaliações hemodinâmicas da função cardíaca, uma semana após a última administração de soro fisiológico ou Doxorubicina, respectivamente. Os protocolos experimentais foram realizados utilizando o modelo de músculo papilar isolado.

1.1. AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Todos os animais foram avaliados ecocardiograficamente no início do estudo e posteriormente quinzenalmente durante as 8 semanas em que se procedeu à administração de DOX (Grupo IC; n=16) ou de veículo (Grupo Controlo; n=21). A avaliação ecocardiográfica foi executada como descrito previamente (Fontes-Sousa *et al.*, 2006). Sumariamente, os coelhos foram ligeiramente anestesiados com uma injeção intramuscular da combinação de Ketamina (2 mg.Kg⁻¹, *im*) e de Medetomidina (0,15 mg.Kg⁻¹, *im*), que permite aos coelhos respirar espontaneamente. Depois de anestesiados, os animais foram colocados numa maca especial com uma pequena área removida, onde a sonda ultrasónica pode ser colocada sob a parede anterior direita do tórax do coelho. As ecocardiografias foram obtidas usando um Transdutor de 7.5-MHz (Ecocardiógrafo *General Electrics Vivid 3*) e o exame foi executado numa posição paraesternal direita e subcostal.

1.2. ANÁLISE DOS DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS

Os parâmetros analisados foram: frequência cardíaca, espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole e em sístole, diâmetro diastólico e sistólico da cavidade ventricular esquerda (DVE_d e DVE_s , respectivamente), fracção de encurtamento (FE) [$FE = (DVE_d - DVE_s) / DVE_d$] e fracção de ejeção, relação aurícula esquerda/aorta e distância do ponto E ao septo interventricular. Foram contabilizados 3 ciclos representativos de cada parâmetro e, no final, foi calculada a média.

Os valores são expressos em média \pm erro padrão. As diferenças nos dados ecocardiográficos de animais tratados com DOX e com solução salina de NaCl foram avaliados pelo Teste t de Student não-emparelhado.

1.3. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A instrumentação dos animais para estudos hemodinâmicos foi realizada uma semana após a última administração de DOX (Grupo IC, n=9) ou de NaCl (Grupo Controlo, n=6), como descrito previamente (Leite-Moreira *et al.*, 1999; Leite-Moreira & Correia-Pinto, 2001). A anestesia foi induzida com uma combinação de Ketamina (50 mg.Kg^{-1} , *im*) e de Xilazina (5 mg.Kg^{-1} , *im*). Os animais foram colocados sobre uma placa aquecida para manter a temperatura corporal entre $36\text{-}38 \text{ }^\circ\text{C}$ e monitorizados com ECG contínuo (DII) para controlo da frequência cardíaca (Datascopie 2000A).

Para compensar as perdas de líquidos que ocorrem peri-operatoriamente, procedeu-se à cateterização de uma veia jugular e iniciou-se uma perfusão contínua de soro fisiológico (0,9% de NaCl), com 40 mEq/L de KCl e 80 mEq/L de NaHCO_3 . Os animais foram, depois, traqueostomizados e ventilados mecanicamente (Harvard Small Animal Ventilator, Model 683) com ar enriquecido em oxigénio. A frequência respiratória e o volume corrente foram ajustados de forma a manter os parâmetros da gasometria arterial dentro de valores fisiológicos. De seguida, efectuou-se uma esternotomia mediana, abriu-se completamente o pericárdio, laçou-se a aorta ascendente com seda de modo a permitir a oclusão transitória da aorta durante o protocolo experimental.

Finalmente, procedeu-se à instrumentação cardíaca para o registo das pressões em ambos os ventrículos conforme previamente descrito.

O registo das pressões foi efectuado com transdutores de alta-fidelidade (SPR-407, Millar Instruments, Houston, Texas) na extremidade de cateteres 3F (ventrículo esquerdo) ou 2F (ventrículo direito). O transdutor ventricular esquerdo foi posicionado, através do ápice, no centro da câmara ventricular esquerda e fixado em posição com uma sutura em bolsa com fio 7/0. O transdutor ventricular direito foi posicionado na câmara de saída ventricular direita. Ambos os cateteres foram conectados a um amplificador de pressões, enquanto o cateter VE foi também conectado a um diferenciador de modo a registar a primeira derivada da pressão em função do tempo (dP/dt).

Depois da instrumentação estar completa, deixou-se estabilizar a preparação experimental durante 30 minutos antes do início do protocolo experimental. Procedeu-se à obtenção e análise de registos em condições basais e em condições isovolumétricas, sendo que nesta última o pico de pressão sistólica obtido corresponde à pressão máxima que o ventrículo é capaz de desenvolver naquelas condições experimentais. O pico de pressão isovolumétrica constitui assim um excelente índice de função ventricular sistólica (Blaustein & Gaasch, 1983; Kass *et al.*, 1986; Gillebert *et al.*, 1997).

1.4. ANÁLISE DOS DADOS HEMODINÂMICOS

Todos os parâmetros foram digitalizados automaticamente e registados em computador com uma frequência de 500 Hz, tendo os registos sido efectuados com a respiração suspensa no final da expiração. O início e o fim do ciclo cardíaco foram definidos pela onda R do ECG, que corresponde à telediástole. Para cada ciclo foram determinados, a partir dos sinais registados em computador, os seguintes parâmetros: i) pressões sistólicas e telediastólicas ventriculares esquerdas; ii) velocidades máximas de elevação (dP/dt_{max}) e de queda (dP/dt_{min}) da pressão ventricular esquerda; iii) constante de tempo de relaxamento isovolumétrico tau (τ), que se correlaciona inversamente com a velocidade de relaxamento.

Os resultados são apresentados em média \pm erro padrão e foram analisados utilizando o teste *two-way* ANOVA. Quando os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de *Student-Newman-Keuls* para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

2. ESTUDOS EM MÚSCULOS PAPILARES

2.1. PREPARAÇÃO EXPERIMENTAL

Inicialmente foram preparadas duas soluções de Krebs-Ringer modificada, uma de 2L ao qual se adicionou 5% de soro de bovino e outra de 500mL sem soro. Os reagentes foram pesados para obter as concentrações descritas na tabela 1 e diluídos em água destilada, em balões volumétricos. A solução de 2L foi subdividida em duas soluções de forma a obter uma solução de 1L de Krebs-Ringer com 5% de soro de bovino e outra solução de 1L de Krebs-Ringer com soro à qual se adicionou 3% BDM (*2,3-butanedione monoxime*; substância cardioplégica).

As soluções foram borbulhadas com uma mistura gasosa Carboxi 5 contendo 95%O₂/ 5%CO₂, de forma obter um pH entre 7,38 e 7,42. O atenolol foi usado para prevenir os efeitos mediados pela estimulação β -adrenérgica. Antes de se iniciarem as experiências, as soluções foram previamente aquecidas num banho a 35°C.

Tabela 1 – Solução de Krebs-Ringer modificada utilizada no modelo de músculo papilar isolado de coelho a 35°C. Quantidade de reagentes necessários para preparar 0,5L e 2L de solução.

	500mL (g)	2L (g)
NaCl (98 mM)	2,86	11,45
KCl (4,7 mM)	0,17	0,7
MgSO ₄ .7H ₂ O (2,4 mM)	0,29	1,18
KH ₂ PO ₄ (1,2 mM)	0,08	0,33
C ₆ H ₁₂ O ₆ (4,5 mM)	0,41	1,62
NaHCO ₃ (20 mM) – Sem Soro	0,84	3,36
NaHCO ₃ (17 mM) – Com Soro	0,68	2,72
CH ₃ COONa (5 mM)	0,21	0,82
C ₃ H ₃ NaO ₃ (15 mM)	0,83	3,30
Atenolol (0,02 mM)	2,7x10 ⁻³	10,6x10 ⁻³
CaCl ₂ (1,8 mM)	0,13	0,53
BDM	1,51	6,06

Os coelhos foram anestesiados com Pentobarbital de sódio (25 mg.Kg^{-1} , *iv*). Antes de se proceder à cardiectomia, os indicadores sensitivos da profundidade da anestesia foram avaliados. Estes indicadores incluem: comprimir as orelhas e as extremidades podais, tocar na córnea e nas pálpebras (por ordem decrescente de confiança; Harkness & Wagner, 1995). Após a confirmação de anestesia profunda, executou-se uma toracotomia esquerda para extrair rapidamente o coração a bater. Este foi, de seguida, imerso num gobelé contendo solução de Krebs-Ringer a 35°C com 5% de soro de bovino e heparina. O coração foi depois colocado num banho de dissecação contendo solução Krebs-Ringer com 5% soro de bovino e 3% de BDM, e dissecaram-se os músculos papilares do ventrículo direito (comprimento: $4,2 \pm 0,3 \text{ mm}$; peso: $2,9 \pm 0,3 \text{ mg}$; pré-carga: $4,3 \pm 0,3 \text{ mN}$). Os músculos papilares foram montados verticalmente em banhos próprios de 10ml, contendo a solução Krebs-Ringer acima descrita, e conectados a um Transdutor Electromagnético de comprimento-tensão (isotónico/isométrico).

Os banhos encontram-se, também, ligados a um sistema de tubagens com ar que permite borbulhar a solução dentro do banho com $95\% \text{O}_2 / 5\% \text{CO}_2$, de modo a oxigenar a solução, e a um controlador de temperatura, de modo a manter a temperatura dos banhos a 35°C (ver Anexo).

Decorridos 10 minutos iniciou-se a estimulação eléctrica com uma frequência de 0,6 Hz. Ao fim de dez minutos, procedeu-se à substituição da solução de Krebs-Ringer com soro e BDM por outra de composição semelhante, mas sem BDM. Os músculos começam então a contrair com uma pré-carga estimada de acordo com as suas dimensões, e com uma pós-carga correspondente a cerca de 10% da pré-carga. Durante a meia-hora seguinte, os músculos são deixados a estabilizar. De seguida, a solução do banho é novamente substituída por uma solução de Krebs-Ringer sem soro. Após estabilização determinou-se o L_{max} , ou seja, o comprimento muscular em repouso que determina uma tensão activa máxima. A partir do momento em que duas contracções isotónicas e isométricas adquiridas (usando um programa apropriado; ver Anexo) a cada 10 minutos sejam similares, o protocolo experimental é iniciado.

2.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Avaliação Funcional

Com o objectivo de avaliar a disfunção contráctil nos músculos papilares, nem sempre evidente pela *performance* basal de músculos a contrair a frequências de estimulação baixas, mas detectável por resposta perturbada a frequências elevadas (Endoh, 2004), foram efectuadas relações contractilidade-frequência (Grupo Controlo, n=8; Grupo IC, n=7). Resumidamente, após um período de contracção a uma frequência de 0,6Hz, a frequência foi elevada sucessivamente para 1Hz, 2Hz, 3Hz e 4Hz a intervalos de 3 minutos, tendo sido registadas e analisadas contracções isométricas em cada patamar de frequência.

Efeitos miocárdicos da ET-1

Os efeitos miocárdicos de concentrações crescentes de ET-1 (0,1; 1 e 10 nM) foram estudados em músculos papilares isolados do ventrículo direito, em diversas condições experimentais: (i) Grupo Controlo com endotélio endocárdico (EE) intacto (n=9); (ii) Grupo Controlo com EE danificado (n=9); (iii) Grupo Controlo na presença de N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inibidor da síntese do NO, 1μM; n=8); iv) Grupo Controlo na presença de Indometacina (INDO, inibidor da COX, 1μM; n=7); e (v) Grupo IC (n=8).

As doses de ET-1 foram seleccionadas com base em estudos anteriores que descreveram os seus efeitos fisiológicos na contracção e distensibilidade em preparações de tecidos miocárdicos, ou em preparações de coração intacto (Shah *et al.*, 1989; Firth *et al.*, 1990; Leite-Moreira *et al.*, 2003; Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006). Os peptídeos foram adicionados directamente nos banhos, com pipetas graduadas.

O Endotélio endocárdico (EE) foi danificado através de uma breve imersão (1s) do músculo isolado numa solução de detergente, Triton X-100 (0,5%), como descrito previamente (Brutsaert *et al.*, 1988; Leite-Moreira & Brás-Silva, 2004).

2.3. ANÁLISE DOS DADOS DO MODELO DE MÚSCULO PAPILAR

Foram registadas e analisadas contrações isotónicas e isométricas antes e depois da adição de ET-1. A partir dos sinais registados em computador obtiveram-se os seguintes parâmetros: tensão muscular activa máxima (TA, mN/mm²); L_{max} (mm); fracção de encurtamento (FE, % de L_{max}); velocidades máximas de elevação (dT/dt_{max}, mN.mm⁻².s) e de queda (dT/dt_{min}, mN/mm⁻².s) da tensão muscular; velocidades máximas de encurtamento (dL/dt_{max}, L_{max}.s⁻¹) e de reextensão muscular (dL/dt_{min}, L_{max}.s⁻¹); e tensão muscular passiva (TP, mN.mm⁻²).

Nos vários protocolos, os resultados foram apresentados como percentagem de variação em relação ao valor basal. Para os parâmetros que se expressam em valores negativos (por exemplo, dT/dt_{min}), esta percentagem de variação refere-se a valores absolutos.

Os resultados foram apresentados como médias ± erro padrão e avaliados por análise de variância, tendo-se seleccionado o teste ANOVA mais adequado para cada protocolo experimental. Utilizou-se o teste de *Student-Newman-Keuls* para efectuar comparações múltiplas emparelhadas, sempre que o teste ANOVA revelava diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

CAPÍTULO IV

Resultados

1. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E ECOCARDIOGRÁFICA

Os parâmetros hemodinâmicos dos grupos experimentais avaliados encontram-se sumariados na tabela 2. Quando comparado com o Grupo Controlo, o Grupo IC apresentava índices de função sistólica (pressão sistólica, pico de pressão isovolumétrica e dP/dt_{max}) significativamente diminuídos.

No que respeita à função diastólica, o Grupo IC apresentava uma velocidade máxima de relaxamento (dP/dt_{min}) significativamente menor e uma constante de tempo de relaxamento isovolumétrico τ significativamente prolongada. Os animais do Grupo IC apresentavam ainda um aumento significativo da pressão telediastólica.

Tabela 2 – Dados hemodinâmicos de coelhos do Grupo Controlo e do Grupo com Insuficiência cardíaca (Grupo IC).

Parâmetro Contráctil	Grupo Controlo (n=6)	Grupo IC (n=9)
LVSP (mmHg)	64,8±4,7	47,7±9,7*
LVEDP (mmHg)	1,2±0,3	2,28±0,34*
dP/dt_{max} (mmHg/s)	3026,0±244,0	1274±266,0*
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-2004,0±378,0	-992,0±171,0*
LVP_{ISO} (mmHg)	148,9±9,2	84,6±13,5*
τ (ms)	36,6±7,7	68,9±7,1*

Valores apresentados como média \pm erro padrão. LVEDP e LVSP, pressão telediastólica e sistólica do VE, respectivamente; dP/dt_{max} e dP/dt_{min} , velocidade máxima de elevação da pressão e de queda da pressão, respectivamente; LVP_{ISO} , pico de pressão isovolumétrica; τ , constante de tempo de relaxamento isovolumétrico. * $p < 0,05$ vs. Grupo Controlo.

Na avaliação ecocardiográfica basal realizada no início do estudo não foram observadas diferenças significativas entre o Grupo Controlo e o Grupo IC. No entanto, foi possível constatar que no final das 8 semanas os animais do Grupo IC apresentavam um aumento significativo dos diâmetros telediastólico (final *vs.* inicial; $16\pm 0,4$ *vs.* $14\pm 0,8$ mm) e telessistólico ($12\pm 0,4$ *vs.* $10\pm 0,3$ mm) do ventrículo esquerdo e uma redução também significativa da fracção de encurtamento ($24\pm 1,0$ *vs.* $30\pm 1,0\%$) e da fracção de ejeção ($52\pm 2,0$ *vs.* $61\pm 1,0\%$) do ventrículo esquerdo, consistente com a presença de cardiomiopatia dilatada e IC (Figura 8). Nenhum dos restantes parâmetros avaliados apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

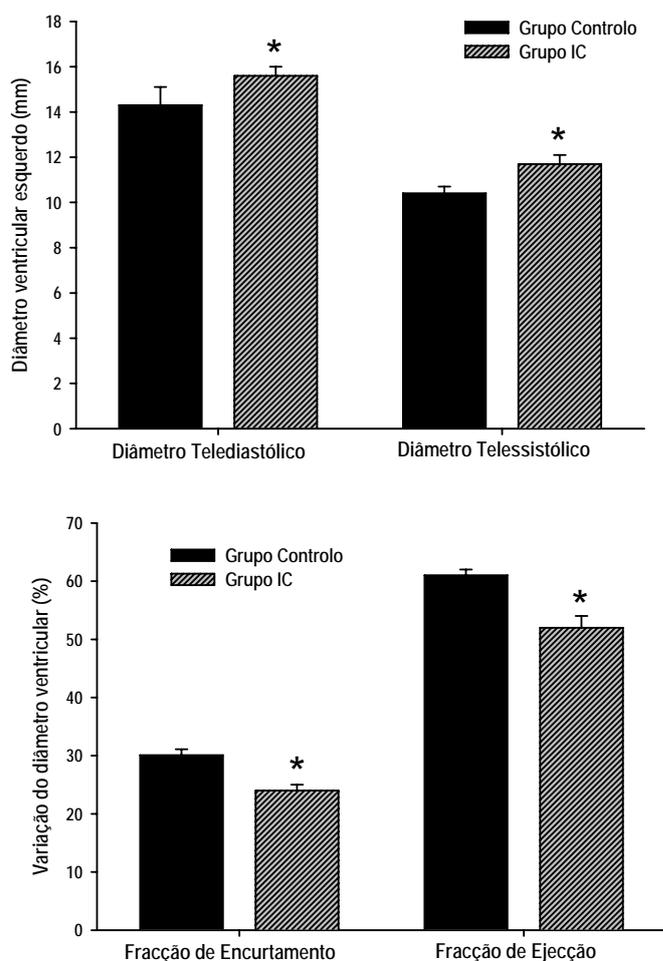


Figura 8 – Avaliação ecocardiográfica da função sistólica e diastólica nos Grupos Controlo e Insuficiência Cardíaca (IC). No Grupo IC verificou-se um aumento progressivo dos diâmetros telediastólico e telessistólico do ventrículo esquerdo (em cima) e uma redução da fracção de encurtamento e da fracção de ejeção (em baixo) do ventrículo esquerdo. * $p < 0,05$ *vs.* Grupo Controlo.

2. ESTUDOS EM MÚSCULOS PAPILARES

Na Tabela 3 encontram-se discriminados os valores médios basais absolutos dos parâmetros contrácteis de músculos papilares isolados de coelhos, dos seguintes grupos experimentais: (i) Grupo Controlo com endotélio endocárdico (EE) intacto (Grupo Controlo com EE); (ii) Grupo Controlo com EE danificado (Grupo Controlo sem EE); (iii) Grupo com Insuficiência Cardíaca (Grupo IC).

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros contrácteis nos músculos papilares dos três grupos experimentais.

Parâmetro Contráctil	Grupo Controlo		Grupo IC (n=15)
	Com EE (n=32)	Sem EE (n=9)	
TA (mN.mm ⁻²)	25,7 ±2,4	17,5 ±2,1*	24,6±2,4
dT/dt _{max} (mN.mm ⁻² .s ⁻¹)	171,3±14,6	130,5±12,8*	164,3±13,1
dT/dt _{min} (mN.mm ⁻² .s ⁻¹)	-127,0±9,79	-88,1±9,5*	-130,3±12,5
FE (% L _{max})	12,0±0,1	8,0±0,1*	12,0±0,2
dL/dt _{max} (L _{max} .s ⁻¹)	0,85±0,05	0,56±0,06*	0,75±0,05
dL/dt _{min} (L _{max} .s ⁻¹)	-2,92±0,26	-1,85±0,2*	-2,62±0,3

Valores apresentados como média ± erro padrão. EE, Endotélio Endocárdico; TA, Tensão Activa; dT/dt_{max}, Velocidade Máxima de Elevação da Tensão Muscular; dT/dt_{min}, Velocidade Máxima de Queda da Tensão Muscular; FE, Fração de Encurtamento Muscular; dL/dt_{max}, Velocidade Máxima de Encurtamento Muscular; dL/dt_{min}, Velocidade Máxima de Reextensão Muscular.

* p<0,05 vs. Controlo com EE.

Verifica-se que, no Grupo Controlo sem EE existem diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros avaliados em relação ao Grupo Controlo com EE, ou seja, a remoção do EE resultou na redução do inotropismo e do lusitropismo.

Apresentam-se apenas os resultados da análise das contracções isométricas, uma vez que a análise das contracções isotónicas não forneceu informações adicionais.

2.1. RELAÇÃO CONTRACTILIDADE-FREQUÊNCIA

Apesar da *performance* basal dos músculos papilares do Grupo Controlo e do Grupo IC serem similares, a contractilidade dos músculos papilares do Grupo Controlo não diminui de forma significativa com o aumento da frequência de estimulação, entre 1 Hz e 4 Hz, enquanto os músculos papilares do Grupo IC apresentaram uma diminuição significativa da contractilidade na mesma gama de frequências de estimulação. Estes resultados são indicadores de disfunção intrínseca do miocárdio e de redução da reserva contráctil (Figura 9).

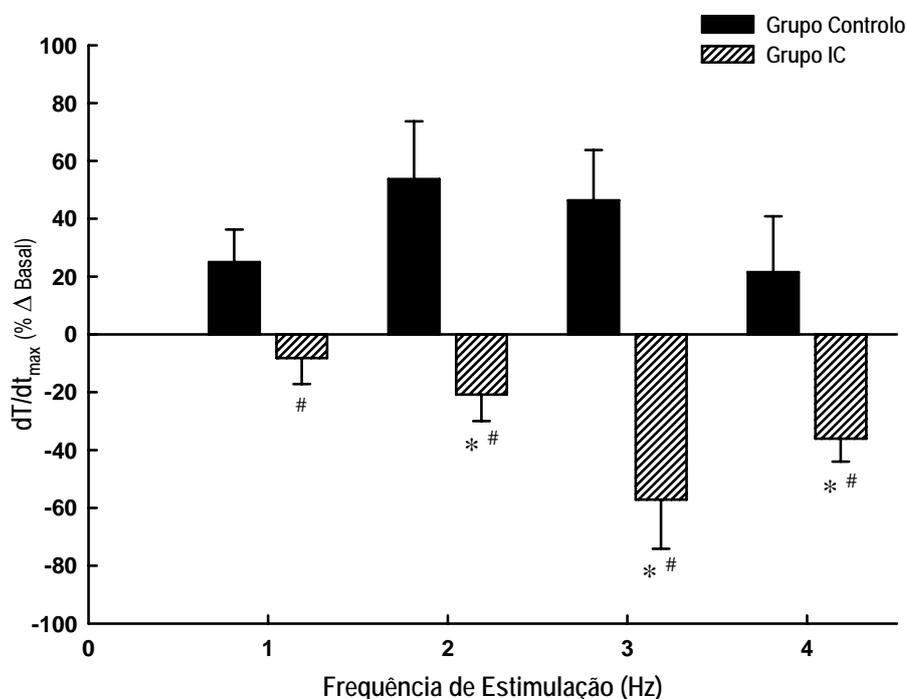


Figure 9 – Relações Contractilidade–Frequência. Resposta contráctil dos músculos papilares de coelho do Grupo Controlo (n=8) e do Grupo Insuficiência Cardíaca (IC, n=7) a aumentos da frequência de estimulação. A relação contractilidade-frequência foi obtida graficamente apresentando-se dT/dt_{max} em função da frequência de estimulação. Os músculos papilares do Grupo IC apresentaram uma redução da contractilidade com a elevação das frequências de estimulação, enquanto que nos músculos papilares do Grupo Controlo verificou-se uma tendência para aumento da contractilidade. dT/dt_{max} (velocidade máxima de elevação da tensão muscular); * $p < 0,05$ vs. Basal; # $p < 0,05$ vs. Controlo.

2.2. EFEITOS MIOCÁRDICOS DA ET-1

Na presença de EE intacto, a ET-1 induziu efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos dependentes da concentração: a TA aumentou $11,9\pm 6\%$, $38,6\pm 9,4\%$ e $78,0\pm 17,0\%$; a dT/dt_{\max} $10,7\pm 4,7\%$, $33,1\pm 9,0\%$ e $81,7\pm 10,1\%$; e a dT/dt_{\min} $10,2\pm 5,0\%$, $35,4\pm 7,6\%$ e $77,1\pm 17,1\%$ (a 0,1; 1 e 10 nM, respectivamente).

Estes efeitos mantiveram-se nos músculos com EE danificado (a TA aumentou $14,6\pm 4,4\%$, $43,1\pm 10,5\%$ e $70,4\pm 12,4\%$; a dT/dt_{\max} $11,3\pm 3,4\%$, $44,7\pm 9,0\%$ e $92,7\pm 13,9\%$; e a dT/dt_{\min} $7,3\pm 2,6\%$, $34,7\pm 13,7\%$ e $56,1\pm 14,2\%$), na presença de LNA (TA aumentou $8,4\pm 2,4\%$, $31,2\pm 7,7\%$ e $84,3\pm 19,3\%$; a dT/dt_{\max} aumentou $14,2\pm 4,1\%$, $45,4\pm 7,5\%$ e $126,7\pm 16,6\%$; e a dT/dt_{\min} aumentou $4,9\pm 2,4\%$, $32,2\pm 9,4\%$ e $69,8\pm 24,8\%$); na presença de INDO (TA aumentou $7,6\pm 1,9\%$, $32,5\pm 12,2\%$ e $95,6\pm 29,6\%$; a dT/dt_{\max} aumentou $5,7\pm 2,4\%$, $32,7\pm 14,4\%$ e $109,6\pm 40,0\%$; e a dT/dt_{\min} aumentou $6,2\pm 2,4\%$, $32,2\pm 17,0\%$ e $108,0\pm 30,3\%$).

Finalmente, no Grupo IC a ET-1 induziu, também, efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos dependentes da concentração: TA aumentou $10,5\pm 2,9\%$, $21,6\pm 6,9\%$ e $63,9\pm 23,6\%$, a dT/dt_{\max} $12,4\pm 3,1\%$, $26,8\pm 7,1\%$ e $82,1\pm 20,0\%$, e a dT/dt_{\min} $10,5\pm 2,6\%$, $23,2\pm 7,1\%$ e $62,9\pm 25,5\%$ (a 0,1; 1 e 10 nM, respectivamente).

Os efeitos miocárdicos da ET-1 a 10nM nas várias condições experimentais estão resumidos na Figura 10.

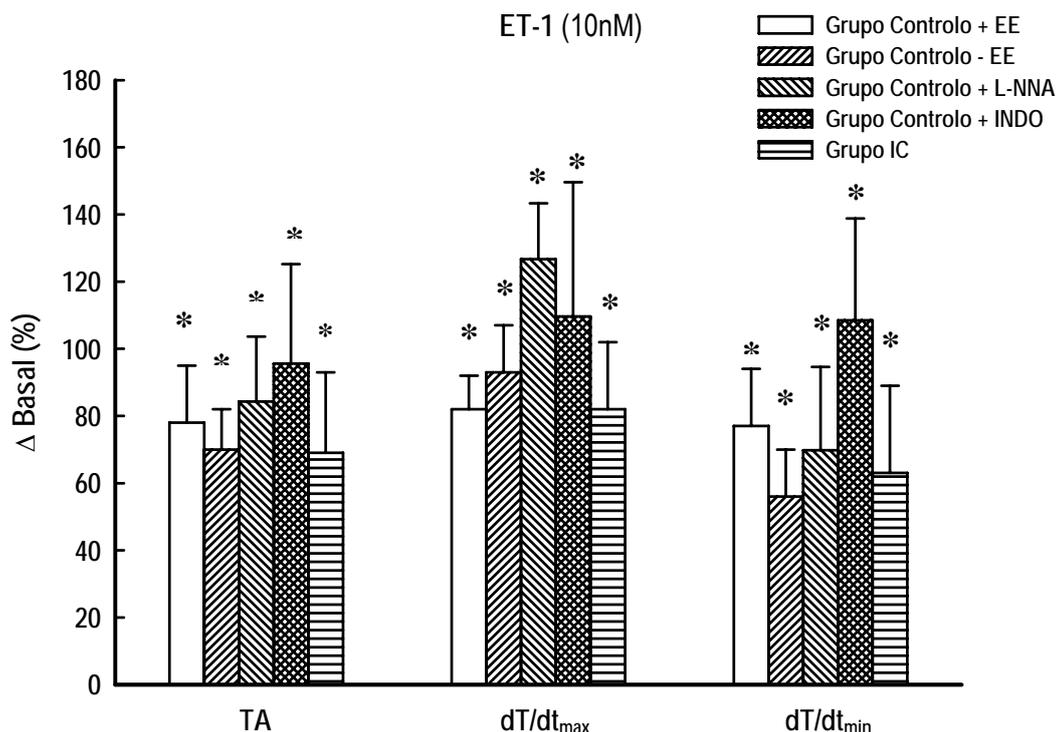


Figura 10 – Efeitos da Endotelina-1 (ET-1, 10nM) sobre os parâmetros contrácteis de músculos papilares de coelho nas várias condições experimentais: (i) Grupo Controllo com EE intacto (Controllo + EE; n=11); (ii) Grupo Controllo com EE danificado (Grupo Controllo – EE; n=10); (iii) Grupo Controllo na presença de N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inibidor da síntese do NO; n=9); (iv) Grupo Controllo na presença de Indometacina (INDO, inibidor da COX; n=7) e (v) Grupo Insuficiência Cardíaca (Grupo IC; n=9). TA (tensão activa), dT/dt_{max} (velocidade máxima de elevação da tensão muscular), dT/dt_{min} (velocidade máxima de queda da tensão muscular), TP (tensão passiva). Média ± erro padrão; Δ Basal (%) (percentagem de variação em relação ao Basal). * p < 0,05 vs. Basal.

No que respeita aos efeitos da ET-1 sobre a distensibilidade miocárdica, verificou-se uma redução significativa da tensão passiva (TP) após contracção isométrica na presença de ET-1. Esta diminuição da TP não foi significativa no estado basal, mas tornou-se progressivamente maior com doses crescentes de ET-1 em músculos com EE intacto. De facto, quando comparado com o valor inicial da contracção (TP_{inicial}), a TP no final da contracção isométrica (TP_{final}) diminuiu 3,1±1,0%, de 5,4±1,4% e de 9,0±2,4% com administração de 0,1; 1, e 10 nM de ET-1, respectivamente (Figura 11).

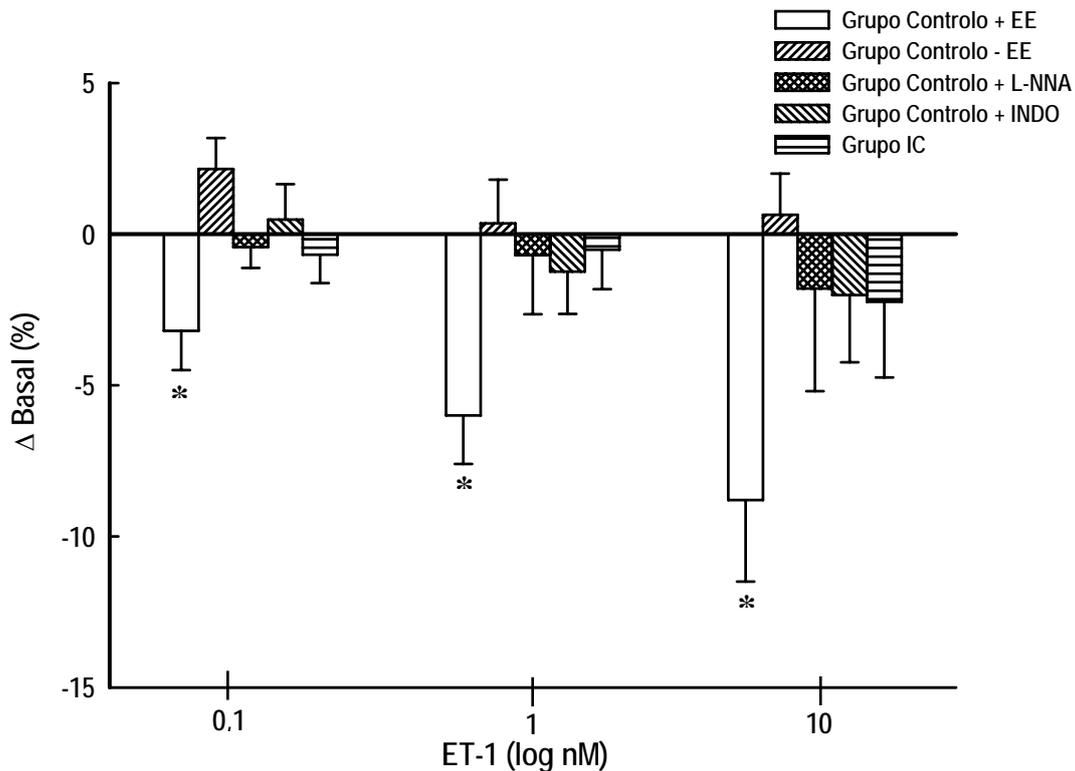


Figura 11 – Efeitos da Endotelina-1 (ET-1; 0,1; 1 e 10nM) sobre os parâmetros contrácteis de músculos papilares de coelho nas diferentes condições experimentais: (i) Grupo Controllo com EE intacto (Controllo + EE; n=11); (ii) Grupo Controllo com EE danificado (Grupo Controllo – EE; n=10); (iii) Grupo Controllo na presença de N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inibidor da síntese do NO; n=9); (iv) Grupo Controllo na presença de Indometacina (INDO, inibidor da COX; n=7) e (v) Grupo Insuficiência Cardíaca (Grupo IC; n=9). TA (tensão activa), dT/dt_{max} (velocidade máxima de elevação da tensão muscular), dT/dt_{min} (velocidade máxima de queda da tensão muscular), TP (tensão passiva). Média ± erro padrão; Δ Basal (%) (percentagem de variação em relação ao Basal). * p < 0,05 vs. Basal.

Esta diminuição na TP representa um aumento na distensibilidade miocárdica, uma vez que a reposição do valor de TP para o seu valor inicial, resulta num aumento do comprimento passivo do músculo. Não foram observadas diferenças significativas entre a TP_{inicial} e TP_{final} depois da adição de ET-1 em músculos papilares do Grupo Controllo sem EE. Para além disso, a ET-1 não alterou de forma significativa a distensibilidade miocárdica após o bloqueio da libertação de NO e de prostaglandinas pelo L-NNA ou INDO, respectivamente (Figura 12).

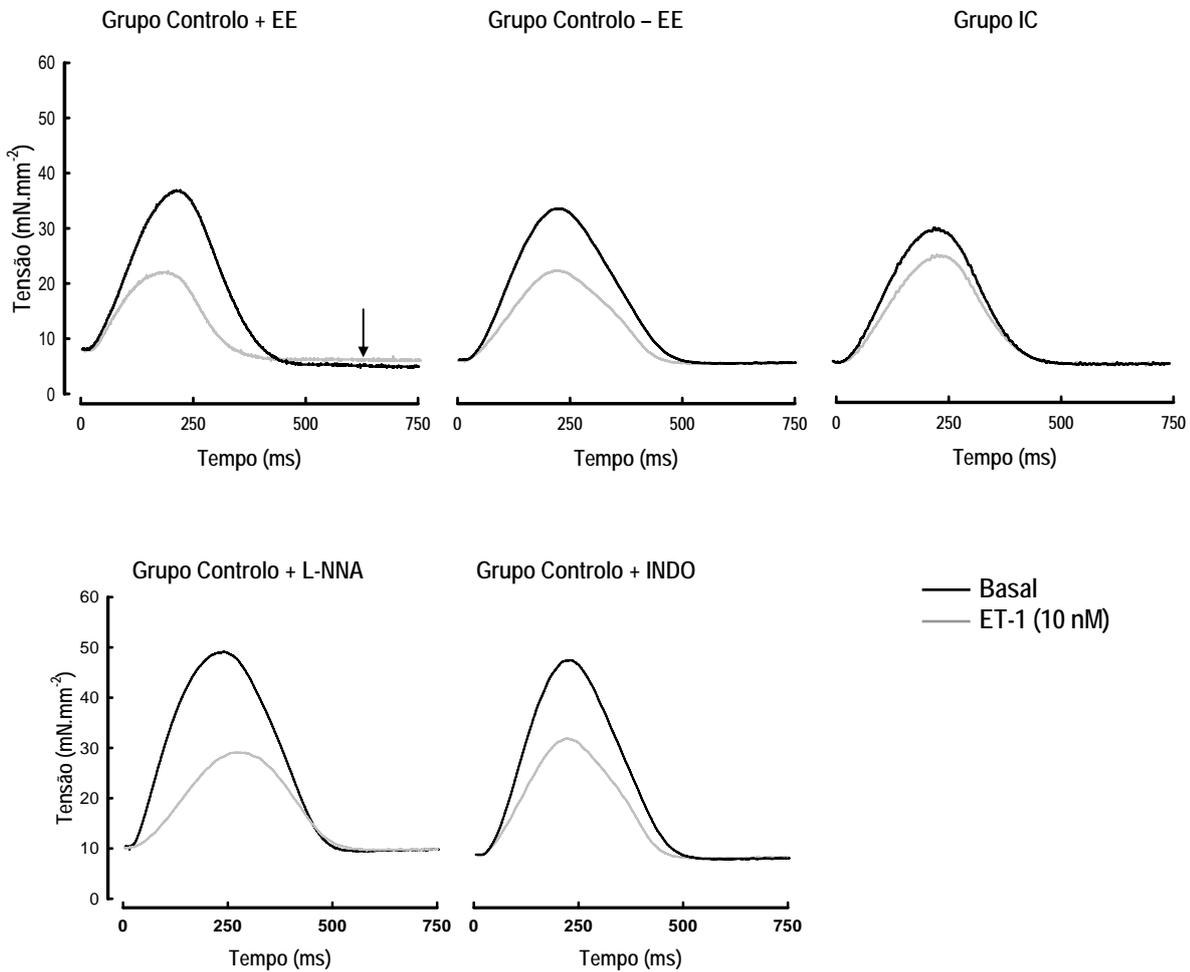


Figura 12 – Exemplo de contrações isométricas obtidas em músculos papilares de coelho, representativos das várias condições experimentais antes e após a administração da Endotelina-1 (10nM): (i) Grupo Controlo com EE intacto; (ii) Grupo Controlo com EE danificado e (iii) Grupo IC (em cima); (iv) Grupo Controlo na presença de N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inibidor das síntases do NO) e (v) Grupo Controlo na presença de Indometacina (INDO, inibidor da COX) (em baixo). Na presença de EE, a ET-1 aumentou a TA (tensão passiva) e diminuiu a TP (tensão passiva) (↓). Pelo contrário, no Grupo IC, na presença de EE danificado, L-NNA e INDO, a ET-1 aumentou a TA mas não produziu efeitos sobre a TP.

CAPÍTULO V

Discussão e Conclusões

A presente dissertação permitiu investigar os efeitos miocárdicos do sistema da ET-1 em corações saudáveis e insuficientes, e a sua modulação pelo óxido nítrico e prostaglandinas. Os estudos experimentais que foram realizados visaram assim contribuir para o esclarecimento do papel do sistema da endotelina na fisiopatologia da síndrome da insuficiência cardíaca.

Apesar de todo o conhecimento que já existe sobre a acção da ET-1 na regulação da função cardíaca e desta continuar a ser alvo de investigação intensa, os seus efeitos sobre as propriedades diastólicas do miocárdio continuam por esclarecer. Os poucos estudos referentes a este aspecto foram levados a cabo em modelos de coração intacto *in situ* (Clozel & Clozel, 1989; Ezra *et al.*, 1989; Karwatowska-Prokopczuk & Wennmalm, 1990; Hom *et al.*, 1992) ou *in vitro* (Khandoudi *et al.*, 1994; Offstad *et al.*, 1995) e, como tal, não permitem distinguir os efeitos directos da ET-1 sobre o miocárdio, dos seus efeitos sobre a função diastólica dependentes da carga e da vasoconstrição sistémica e coronária (Winegrad, 1997; Leite-Moreira *et al.*, 2000). De forma a ultrapassar esta limitação, seleccionou-se o modelo de músculos papilares isolados do ventrículo direito de coelhos brancos neozelandeses para a realização dos diversos protocolos, tendo em conta que este modelo não sofre a influência nem da circulação coronária, nem da circulação periférica e permite o controlo rigoroso dos vários determinantes da função sistólica e diastólica.

Além disso, o coelho é uma das espécies animais mais sensíveis à ET-1 (Li *et al.*, 1991), razão pela qual se realizaram estas experiências nesta espécie (*Oryctolagus cuniculus*). Adicionalmente, o miocárdio normal (sem insuficiência) de coelho exhibe similaridades interessantes com o coração humano: i) a isoforma da cadeia pesada β -miosina predomina nos animais adultos; ii) o retículo sarcoplasmático contribui com cerca de 70% e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ contribui com 30% para a eliminação do cálcio; e iii) a relação força-frequência é positiva (Hasenfuss, 1998).

O modelo de IC seleccionado para este estudo, cardiomiopatia dilatada induzida pela Doxorubicina, tem sido usado em diversas espécies animais com o objectivo de estudar os mecanismos fisiopatológicos e avaliar diferentes modalidades terapêuticas na IC (Monnet & Chachques, 2005).

A progressão para disfunção cardíaca foi monitorizada ecocardiograficamente de forma a estimar alterações morfológicas e funcionais durante o desenvolvimento da IC. Verificou-se um aumento progressivo dos diâmetros telessistólico e telediastólico e reduções das fracções de encurtamento e ejeção do ventrículo esquerdo, alterações consistentes com o que tem sido descrito neste modelo de IC (Monnet & Chachques, 2005). Estudos hemodinâmicos realizados uma semana após o final do tratamento com Doxorubicina permitiram comprovar a presença de disfunção sistólica e diastólica neste modelo.

Adicionalmente, efectuamos relações contractilidade-frequência, uma vez que a disfunção contráctil em músculos papilares, é dificilmente identificável por alterações da *performance* basal de músculos a contrair a frequências de estimulação baixas, sendo mais facilmente detectável através de uma resposta comprometida a aumentos da frequência de contracção (Endoh, 2004). Verificou-se assim que, apesar da *performance* basal dos músculos dos corações saudáveis e insuficientes ser semelhante, os primeiros apresentaram um aumento da contractilidade face a elevações da frequência, enquanto os últimos apresentaram uma diminuição da contractilidade face a elevações semelhantes da frequência cardíaca, indicando disfunção miocárdica e redução da reserva contráctil.

Os efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos da ET-1 têm sido descritos por vários autores em diversas preparações experimentais, sendo a magnitude desses efeitos, obtidos neste trabalho, consonante com os resultados obtidos noutros estudos publicados previamente em músculos papilares de coelho (Li *et al.*, 1991, Endoh *et al.*, 1998; Leite-Moreira *et al.*, 2003 Leite-Moreira & Brás-Silva, 2004; Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006). Estes efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos induzidos pela ET-1 mantiveram-se quer na presença de EE danificado, quer após o bloqueio da libertação

endotelial de NO e de prostaglandinas, quer no Grupo IC. Estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os efeitos contrácteis da ET-1 se encontravam aumentados (Li & Rouleau, 1996), atenuados (Möllmann *et al.*, 2006), preservados (Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006) ou até, mesmo, invertidos (Kelso *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1996, MacCarthy *et al.*, 2000) na presença de IC. Estas diferenças podem ser explicados pela utilização de diferentes espécies animais, pelo uso de modelos de IC e de abordagens metodológicas distintas.

Neste estudo observou-se a ocorrência de disfunção contráctil nos corações insuficientes, contudo como já foi referido, a *performance* basal dos músculos papilares foi similar entre os animais do Grupo Controlo e do Grupo IC foi semelhante. Além disso, os músculos dos dois grupos experimentais exibiram o mesmo tipo de resposta inotrópica e lusitropica à ET-1, no entanto, demonstraram uma resposta inotrópica distinta face a elevações da frequência de estimulação. A obtenção de relações força-frequência negativas é uma característica bem conhecida do miocárdio insuficiente, que pode ser devido parcialmente a uma desregulação da homeostasia do cálcio e a um desequilíbrio energético (Redel *et al.*, 2002; Endoh, 2004). Por outro lado, a resposta contráctil à ET-1 envolve mecanismos celulares distintos, que podem explicar o facto da ET-1 induzir efeitos análogos sobre o miocárdio normal e insuficiente. Adicionalmente, sabe-se que a ET-1 tem a capacidade de aumentar a eficiência contráctil cardíaca através da diminuição da actividade da ATPase (McClellan *et al.*, 1996) e do consumo de oxigénio (Takeuchi *et al.*, 2001), sendo considerada essencial para a eficiência contráctil do miocárdio insuficiente (Sakai *et al.*, 1996).

As propriedades diastólicas do miocárdio podem ser inferidas a partir da tensão passiva (TP), ou seja, da tensão do músculo quando este não está a contrair, mantendo o seu comprimento constante. No sentido de avaliar o efeito do abalo muscular sobre este parâmetro, procedeu-se à sua medição no início (TP_{inicial}) e no final (TP_{final}) do abalo muscular. Verificou-se que na presença de ET-1 em músculos com EE intacto ocorre uma diminuição da TP_{final} (aumento da distensibilidade miocárdica), que se acentua com o aumento da concentração deste peptídeo. Este efeito não foi observado após a

administração ET-1 no miocárdio insuficiente. Para além disso, verificou-se que a remoção do EE também bloqueava este efeito, confirmando-se desta forma estudos recentes (Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006).

Em estudos anteriores verificou-se que estes efeitos da ET-1 sobre a distensibilidade miocárdica são mediados pela estimulação dos receptores ET_A e pelo trocador Na⁺/H⁺ (Leite-Moreira *et al.*, 2003) e é dependente da actividade dos receptores ET_{B1} (endoteliais), apesar da estimulação directa dos receptores endoteliais ET_{B1} e receptores miocárdicos ET_{B2} não demonstrarem nenhum destes efeitos (Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006). Se tomarmos em consideração que o EE se encontra disfuncional no modelo de IC induzida pela DOX (Brás-Silva *et al.*, 2006) e que os efeitos agudos da ET-1 sobre a distensibilidade miocárdica são bloqueados pela remoção do EE, parece plausível que o facto de não terem sido observados efeitos da ET-1 sobre a distensibilidade miocárdica no miocárdio insuficiente, poderá ser explicado pela ocorrência de disfunção do EE.

Neste contexto, e uma vez que o NO e as prostaglandinas são dois dos mais importantes mediadores endoteliais conhecidos, libertados após a estimulação selectiva dos receptores ET_{B1} endoteliais (de Nucci *et al.*, 1988; Thiemermann *et al.*, 1989; Filep *et al.*, 1991; Hirata *et al.*, 1993; Leite-Moreira & Brás-Silva, 2004), que também influenciam o efeito da ET-1 na distensibilidade miocárdica (Brás-Silva & Leite-Moreira, 2006), investigou-se de que forma estes dois agentes participam na modulação dos efeitos miocárdicos da ET-1. Verificou-se que, após a remoção do EE e bloqueando as vias de libertação endoteliais do NO e das prostaglandinas, a ET-1 não alterou a distensibilidade miocárdica, apontando para um importante papel destes dois mediadores endoteliais na modulação dos efeitos da ET-1 sobre a função diastólica.

Em estudos anteriores ficou demonstrado que NO induz um aumento da distensibilidade miocárdica (Paulus *et al.*, 1994; Vila-Pitroff *et al.*, 1994; Paulus & Shah, 1999). Este efeito tem sido largamente atribuído a uma redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca²⁺ devida à fosforilação da troponina I pela PKC (Vila-Pitroff *et al.*, 1994; Shah & MacCarthy, 2000; Layland *et al.*, 2002). No que diz respeito às

prostaglandinas, alguns estudos descrevem efeitos inotrópicos negativos (Schorr & Hohfield, 1992), enquanto outros reportam efeitos inotrópicos positivos (Mohan *et al.*, 1995) em músculos papilares isolados. Quanto aos efeitos sobre as propriedades diastólicas são pouco claros, tendo-lhe sido atribuídas algumas acções sobre o relaxamento miocárdico (Kisch-Wedel *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006). Adicionalmente, estes dois agentes, NO e prostaglandinas, têm sido implicados nos efeitos inotrópicos negativos resultantes da estimulação dos receptores ET_{B1} (Leite-Moreira & Brás-Silva, 2004). Portanto, independentemente das acções individuais directas de cada um dos agentes endoteliais, estes são capazes de regular os efeitos sistólicos e diastólicos da ET-1.

Estes efeitos da ET-1 sobre a distensibilidade miocárdica fornecem uma visão completamente inovadora sobre as propriedades diastólicas da parede ventricular. De facto, a perspectiva corrente é a de que essas propriedades só podem ser alteradas cronicamente, por exemplo, pela fibrose ou hipertrofia. Embora, curiosamente, se saiba que a ET-1 quando activada cronicamente é um dos mais importantes promotores de fibrose e hipertrofia, e portanto de uma diminuição da distensibilidade ventricular (Zhu *et al.*, 2003; Brunner *et al.*, 2006), por aumento da rigidez, o presente trabalho confirma que pelo contrário, quando activada agudamente, a ET-1 aumenta significativamente essa distensibilidade.

No que diz respeito à relevância deste estudo na fisiopatologia da IC, estes resultados sugerem que uma tensão passiva mais baixa do musculo cardíaco é indicativa de que o ventrículo consegue alcançar maiores volumes de enchimento a pressões de enchimento mais baixas, o que é sem dúvida um poderoso mecanismo adaptativo. Estes efeitos benéficos da ET-1 na função diastólica parecem ser mitigados pelo seu papel na progressão para a fibrose cardíaca e remodelagem ventricular, quando os seus níveis se encontram elevados cronicamente (Brunner *et al.*, 2006). Adicionalmente, estes resultados revelam que a influência humoral na função cardíaca diastólica é modulada pela interacção com mediadores endoteliais endocárdicos, como o NO e as Prostaglandinas, que estando alteradas nos corações insuficientes poderão fornecer

novos elementos para a compreensão da fisiopatologia da IC.

Visto que a doxorrubicina (fármaco usado para induzir IC no modelo animal estudado) é um antineoplásico usado em grande escala no tratamento de vários tipos de cancro, cujo uso clínico é limitado pela elevada cardiotoxicidade que possui (Monnet & Chachques 2005), estes resultados poderão ser relevantes para melhor compreensão da fisiopatologia da cardiomiopatia induzida por este agente, no sentido de desenvolver estratégias terapêuticas protectoras eficientes a aplicar em doentes tratados com este fármaco quimioterapêutico.

CONCLUSÕES

A discussão desenvolvida permitiu apresentar as seguintes conclusões:

- As avaliações hemodinâmicas, ecocardiográficas e funcionais demonstraram a presença de um compromisso significativo das funções sistólica e diastólica, a ocorrência de disfunção intrínseca do miocárdico e uma redução de reserva contráctil, na IC desenvolvida no modelo de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina;
- A ET-1 exerce, além dos conhecidos efeitos sobre a função sistólica, uma importante acção sobre a função diastólica, através da promoção do aumento agudo da distensibilidade miocárdica, a qual apesar de ser mediada pelos receptores ET_A, é dependente da integridade funcional do EE e da libertação endotelial de óxido nítrico e de prostaglandinas, e está atenuado na Insuficiência Cardíaca.

Estes resultados assumem particular relevância no esclarecimento do papel da ET-1 na fisiopatologia da IC e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes e protectoras.

CAPÍTULO VI

Bibliografía

- Arnolda LF, Mcgrath B, Cocks M, Sumithran E, Johnston C (1985). Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovasc Res* 19: 378-382.
- Arnolda LF, Llewellyn-Smith IJ, Minson JB (1999). Animal models of heart failure. *Aust N Z J Med* 29:403-409
- Attina T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ (2005). Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34: 833-846.
- Baker KM, Singer HA, Aceto JF (1990). Angiotensin II receptor-mediated stimulation of cytosolic-free calcium and inositol phosphates in chick myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 578-585.
- Balakumar P, Singh AP, Singh M (2007). Rodent models of heart failure. *J Pharmacol Toxicol Methods* 56:1-10
- Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P (1993). Endothelins – circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 68: 600-628.
- Blaustein AS, Gaasch WH (1983). Myocardial relaxation. VI. Effects of beta-adrenergic tone and asynchrony on LV relaxation rate. *Am J Physiol* 244: H417-H422.
- Boucek RJ Jr, Olson RD, Brenner DE, Ogunbunni EM, Inui M, Fleischer S (1987). The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps: A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem* 262: 15851-15856.
- Brás-Silva C, Fontes-Sousa A, Moura C, Areias JC, Leite-Moreira AF (2006). Impaired response to ETB receptor stimulation in heart failure. Functional evidence of endocardial endothelial dysfunction? *Exp Biol Med* 231: 893-898.
- Brás-Silva C, Leite-Moreira AF (2006). Obligatory Role of the Endocardial Endothelium in the Increase of Myocardial Distensibility Induced by Endothelin-1. *Exp Biol Med* 231: 876-881.
- Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodelling and failure. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 45: 657-687.
- Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF (2006). Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111: 508-531.

- Brutsaert DL, Meulemans AL, Spido KR, Sys SU (1988). Effects of damaging endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ Res* 62: 358-366.
- Brutsaert DL (2003). Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiol Rev* 83: 59-115.
- Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, de Sousa A, Oliveira A (2002). Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur J Heart Fail* 4: 531-539.
- Cerqueira-Gomes M, Ferreira A, Bettencourt P (2004). Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca. *Rev Port Cardiol* 23(Supl. II): 7-23.
- Clozel JP, Clozel M (1989). Effects of endothelin on the coronary beds in open chest dogs. *Circ Res* 65:1193-1200.
- Clozel M, Salloukh H (2005). Role of endothelin in fibrosis and antifibrotic potential of bosentan. *Ann Med* 37: 2-12.
- Christiansen S, Redmann K, Scheld HH (2002). Adriamycin-induced cardiomyopathy in the dog – an appropriate model for research on partial left ventriculectomy?. *J Heart Lung Transplant* 21: 783-790.
- Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusak BJ, Fleischer S (1993). Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest* 91: 1697-1705.
- D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 503-510.
- De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Warner TD, Vane JR (1988). Pressor Effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9797-9800.
- Davenport AP, Maguire JJ (2006). Endothelin. *Handb Exp Pharmacol* 176: 295-329.
- Davenport AP (2002). International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 219-226.
- Douglas SA, Meek TD, Ohlstein EH (1994). Novel receptor antagonists welcome new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci* 15: 313-316.
- Endemann DH, Schiffrin EL (2004). Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1983-1992.

- Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I (1998). Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci* 62: 1485-1489.
- Endoh M (2004). Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol* 500: 73-86.
- Ezra HG, Lewis MJ, Shah AM (1989). Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol* 257: H339-H343.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Ferrari F, Confortini R, Pepi P, Visioli O (1999). Activation of the neuroendocrine response in heart failure: adaptive or maladaptive process? *Cardiovasc Drugs Ther* 10(S): 623-29.
- Filep JG, Battistini B, Cote YP, Beaudoin AR, Sirois P (1991). Endothelin1 induces prostacyclin release from bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 171-176.
- Firth JD, Roberts FC, Raine AEG (1990). Effect of endothelin on the function of isolated perfused working rat heart. *Clin Sci (Colch)* 79: 221-226.
- Fonseca C, Ceia C, Brito D, Madeira H (2002). How patients with Heart Failure are managed in Portugal. *Eur J Heart Fail* 4: 563-566.
- Fontes-Sousa AP, Brás-Silva C, Moura C, Areias JC, Leite-Moreira AF (2006). M-mode and Doppler echocardiographic reference values for New Zealand white male rabbits. *Am J Vet Res* 67: 1725-1729.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1461-1465.
- Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD (2002). Doxorubicin and C-13 Deoxydoxorubicin Effects on Ryanodine Receptor Gene Expression. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 433-438.
- Ganguly PK, Lee SL, Beamish RE, Dhalla NS (1989). Altered sympathetic system and adrenoceptors during the development of cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 118: 520-525.
- Gharib MI, Burnett AK (2002). Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Failure* 4: 235-242.

- Gillebert TC, Leite-Moreira AF, De Hert SG (1997). Relaxation-systolic pressure relation. A load-independent assessment of left ventricular contractility. *Circ* 95: 745-52.
- Gillebert TC, Leite-Moreira AF, De Hert SG (2000). Load dependent diastolic dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev* 5: 345-355.
- Gwathmey JK, Hajjar RJ (1990). Effect of protein kinase C activation on sarcoplasmic reticulum function and apparent myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in intact and skinned muscles from normal and diseased human myocardium. *Circ Res* 67: 744-752.
- Harkness JE, Wagner JE (1995). The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. Fourth Edition. Williams & Wilkins. Capítulos 1-2.
- Hasenfuss G (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovas Res* 39: 60-76.
- Hequet O, Le QH, Moullet I, Pauli E, Salles G, Espinouse D, Dumontet C, Thieblemont C, Arnaud P, Antal D, Bouafia F, Coiffier B (2004). Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults. *J Clin Oncol* 22: 1864-1871.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91: 1367-1373.
- Hom GJ, Touchey B, Rubanyi GM (1992). Effects of intracoronary administration of endothelin in anesthetized dogs: comparison with Bay K 8644 and U 48619. *J Cardiovas Pharmacol* 19: 194-200.
- Honore JC, Fecteau M-H, Brochu I, Labone J, Bkaily G, D'Orleans-Juste P (2005). Concomitant antagonism of endothelial and vascular smooth muscle cell-ETB receptors for endothelin induces hypertension in the hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1258-H1264.
- Jessup M, Brozena S (2003). Heart failure. *N Engl J Med* 348: 2007-2018.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor type (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268: 19126-19133.
- Karwatowska-Prokopczuk E, Wennmalm A (1990). Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. *Circ Res* 66: 46-54.

- Kass DA, Yamazaki T, Burkhoff D, Maughan WL, Sagawa K (1986). Determination of left ventricular end-systolic pressure-volume relationships by the conductance (volume) catheter technique. *Circ* 73: 586-595.
- Kass DA, Bronzwaer JG, Paulus WJ (2004). What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res* 94: 1533-1542.
- Katz AM, Zile MR (2006). New Molecular Mechanism in Diastolic Heart Failure. *Circ* 113: 1922-1925.
- Kelso EJ, Geraghty RF, Mcdermott BJ, Trimble ER, Nicholls DP, Silke B (1996). Mechanical effects of ET-1 in cardiomyocytes isolated from normal and heart-failed rabbits. *Mol Cell Biochem* 157: 149-155.
- Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M (1994). Role of Na⁺-H⁺ exchange in mediating effects of endothelin-1 on normal and ischemic/reperfused hearts. *Circ Res* 75: 369-378.
- Kisch-Wedel H, Kemming G, Meisner F, Flondor M, Bruhn S, Koehler C, Messmer K, Zwissler B (2005). Effect of prostaglandin IA analogues on left ventricular diastolic function in vivo. *Eur J Pharmacol* 517: 298-216.
- Kjaer A, Hesse B (2001). Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clin Physiol* 21: 661-672.
- Krum H, Denver R, Tzanidis A, Martin P (2001). Diagnostic and therapeutic potencial of the endothelin system in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev* 341-352.
- Layland J, Li JM, Shah AM (2002). Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxid in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 540:457-467.
- Lecoin L, Sakurai T, Ngo Mt, Abe Y, Yanagisawa M, Le Douarin NM (1998). Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3024-3029.
- Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J, Gillebert TC (1999). Afterload induced changes in myocardial relaxation: a mechanism for diastolic dysfunction. *Cardiovasc Res* 43: 344-353.
- Leite-Moreia AF, Rocha-Sousa A, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque R Jr, Castro-Chaves P (2000). Efeitos da Endotelina-1 sobre a Função Miocárdica. *Rev Port Cardiol* 19(1): 79-83.

- Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J (2001). Load as an acute determinant of end-diastolic pressure-volume relation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H51-H59.
- Leite-Moreira AF, Brás-Silva C, Pedrosa CA, Rocha-Sousa A (2003). ET-1 increases distensibility of acutely loaded myocardium: a novel ET_A and Na⁺/H⁺ exchanger-mediated effect. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1332-H1339.
- Leite-Moreira AF, Brás-Silva C (2004). Inotropic effects of ET_B receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1194-H1199.
- Leite-Moreira AF (2006). Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart* 92: 712-718.
- Li K, Stewart DJ, Rouleau JL (1991). Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. *Circ Res* 69: 301-312.
- Li K, Rouleau JL (1996). Altered responsiveness to endothelin-1 of myocardium from pacing-induced heart failure model in the dog. *Cardiovasc Drugs Ther* 10: 107-112.
- Maccarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM (2000). Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET(A) receptor antagonist. *Circ* 101: 142-147.
- Mallat A, Fouassier L, Preaux AM, Gal Cs, Raufaste D, Rosenbaun J, Dhumeaux D, Jouneaux C, Mavier P, Lotersztjain S (1995). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J Clin Invest* 96: 42-49.
- Masaki T (1995). Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 235-255.
- Masaki T (2002). Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 25(4): 221-224.
- Mcclellan G, Weisberg A, Winegrad S (1996). Effect of endothelin-1 on actomyosin ATPase activity. Implications for the efficiency of contraction. *Circ Res* 78:1044-1050.
- Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi C, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G (1998). The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J* 12: 541-552.

- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56(2): 185-229.
- Miyauchi T, Masaki T (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61: 391-415.
- Mohan P, Brutsaert DL, Sys SU (1995). Myocardial performances is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxid and prostaglandins. *Cardiovasc Res* 29: 637-640.
- Möllmann H, Schmidt-Schweda S, Nef H, Mollmann S, Burstin JV, Klose S, Elsasser A, Holubarsch CJ (2006). Contractile effects of angiotensin and endothelin in failing and non-failing human hearts. *Int J Cardiol* 114:34-40.
- Monnet E, Orton EC (1999). A canine model of heart failure by intracoronary adriamycin injection: hemodynaminx and energetic results. *J Card Fail* 5: 255-264.
- Monnet E, Chachques JC (2005). Animal Models of Heart Failure: What is new?. *Ann Thorac Surg* 79: 1445-1453.
- Motte S, Kathleen Mc, Naeije R (2006). Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 110: 386-414.
- Neylon CB, Hoyland J, Mason WT, Irvine RF (1990). Spatial dynamics of intracellular calcium in agonist-simulated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 259: C675-C686.
- Offstad J, Tonnessen T, Kirkeboen KA, Ilebekk A, Downing SE (1995). Modulation of systolic and diastolic function by endothelin-1: relation to coronary flow. *Acta Physiol Scand* 154: 103-111.
- Okazawa M, Shiraki T, Ninomiya H, Kobayashi S, Masaki T (1998). Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 273: 12584-12592.
- Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Kukuroda T, Ishikawa K, Yano M (1995). ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 483-489.
- Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM (1994). Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. *Circ* 89: 2070-2078.
- Paulus WJ, Shah AM (1999). NO and cardiac diastolic function. *Cardiovasc Res* 43: 595-606.

- Pi Y, Walker JW (1998). Role of intracellular Ca^{2+} and pH in positive inotropic response in cardiomyocytes to dialcylglycerol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H1473-H148.
- Poindexter BJ, Smith JR, Buja LM, Bick RJ (2001). Calcium signalling mechanisms in dedifferentiated cardiac myocytes: comparison with neonatal and adult cardiomyocytes. *Cell Calcium* 30: 373-382.
- Redel A, Baumgartner W, Golenhofen K, Drenckhahn D, Golenhofen N (2002). Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Eur J Physiol* 445: 297-304.
- Russel FD, Molenaar P (2000). The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol Sci* 21: 353-359.
- Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH (1989). Inotropic effects of endothelin in ferret ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 163: 365-367.
- Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996). Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circ* 93:1214-1222.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T (1992). Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 103-108.
- Schorr K, Hohlfeld TH (1992). Inotropic actions of eicosanoids. *Basic Res Cardiol* 48: 430-439.
- Shah AM, MacCarthy PA (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 86: 49-86.
- Soares JB, Rocha-Sousa A, Castro-Chaves P, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF (2006). Inotropic and lusitropic effects of ghrelin and their modulation by the endocardial endothelium, NO, prostaglandins, GHS-R1a and K_{Ca} channels. *Pept* 27: 1616-1623.
- Sorhus V, Sys SU, Natas A, Demolder MJ, Angelsen AJ (2000). Controlled Auxotonic Twitch in Papillary Muscle: A New Computer-Based Control Approach. *Comp Biomed Res* 33: 398-415.
- Strobeck JE, Krueger J, Sonnenblick EH (1980). Load and time considerations in the force-length relation of cardiac muscle. *Fed Proc* 39(2): 175-182.

- Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T, Karaki H (1994). Subtypes of endothelin ETA and ETB receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 627-633.
- Sudgen PH (2003). An overview of endothelin signaling in the cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35: 871-886.
- Takeuchi Y, Kihara Y, Inagaki K, Yoneda T, Sasayama S (2001). Endothelin-1 has a unique oxygen-saving effect by increasing contractile efficiency in the isolated rat heart. *Circ* 103:1557-1563.
- Thiemermann C, Lidbury PS, Thomas GR, Vane JR (1989). Endothelin 1 releases prostacyclin and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anesthetized rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: S138-S141.
- Thomas PB, Liu EC, Webb ML, Mukherjee R, Hebbar L, Spinale FG (1996). Exogenous effects and endogenous production of endothelin in cardiac myocytes: potential significance in heart failure. *Am J Physiol* 271:H2629-H1637.
- Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS (1994). Molecular and functional characterization of the non-isopeptide ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 21778-21785.
- Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr (2004). Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 9: 53-61.
- Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollot SJ (1999). Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxid in cardiac myocytes. *Circ Res* 84:1020-1031.
- Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Scheider B, Waldhaust W, Binder BR (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 16066-16068.
- Wheeler-Jones C (2005). Cell Signalling in the cardiovascular system: an overview. *Heart* 91: 1366-1374.
- Winegrad S (1997). Endothelial cell regulation of contractility of the heart. *Annu Rev Physiol* 59: 505-525.

- Worthley MI, Horowitz JD, Zeitz CJ (2005). Lack of inotropic effect of nitric oxide on the heart myocardium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 526–530.
- Wu S, Ho YS, Teng MS, Ko YL, Hsu LA, Hsueh C, Chou YY, Liew CC, Lee YS (2002). Adriamycin-induced Cardiomyocyte and Endothelial Cell Apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1595-1607.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.
- Yoshiro K, Hiroshi K, Hideyuki H, Yoshiko S, Kunio S (2002). Left ventricular transmural systolic function by high-sensitivity velocity measurement “phased-tracking method” across the septum in doxorubicin cardiomyopathy. *Ultrasound Med Biol* 28(11-12): 1395-403.
- Zhu Y, Yang HT, Endoh M (1997). Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscle. *Am J Physiol* 42: H119-H127.
- Zile MR, Brutsaert DL (2002). New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure. Part I: Diagnosis, Prognosis and Measurements of Diastolic Function. *Circ* 105: 1387-1393.
- Zile MR, Brutsaert DL (2002). New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure. Part II: Causal Mechanisms and Treatment. *Circ* 105: 1503-1508.

CAPÍTULO VII

Anexos

Modelo do Músculo Papilar Isolado

O modelo de músculo papilar isolado é ideal para estudos funcionais e farmacológicos, visto que permite controlar rigorosamente a carga e assim avaliar a acção *in vitro* de determinado agente, neste caso a ET-1, nas propriedades intrínsecas do miocárdio, excluindo factores extrínsecos, como é o caso da activação neurohumoral sistémica, da perfusão coronária, do acoplamento ventrículo-arterial e da interacção ventricular (Strobeck *et al.* 1980; Sorhus *et al.* 2000; Worthley *et al.* 2005).

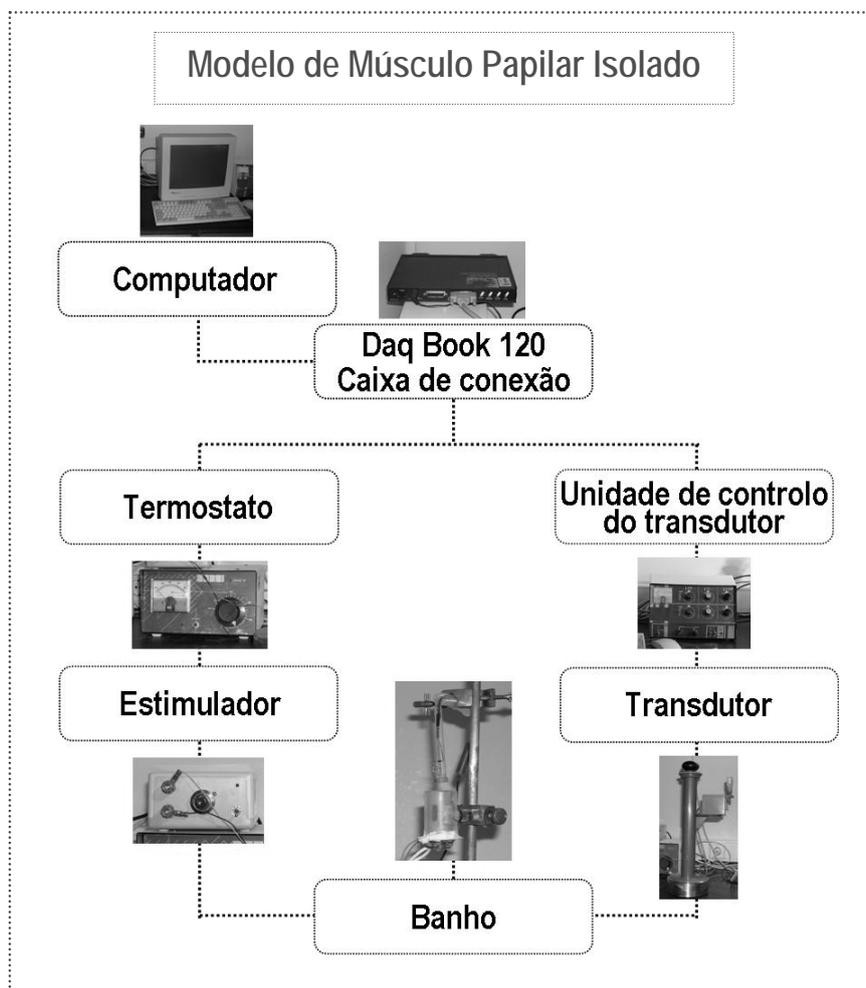


Figura 13 – Equipamento experimental necessário para a avaliação da função miocárdica no modelo de músculo papilar isolado.

Para além disso, este modelo permite a obtenção de contracções isométricas e isotónicas (Figura 14) e desta forma avaliar a função contráctil miocárdica usando-se os parâmetros descritos no quadro III.

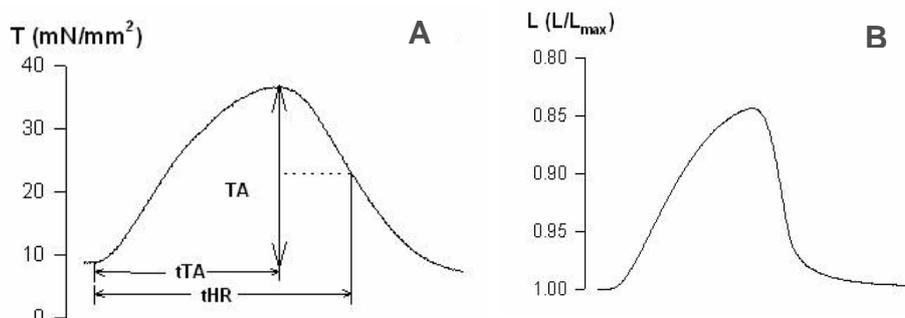


Figura 14 – Exemplo representativo de registos efectuados no decurso de um trabalho experimental. A. Contracção isométrica: tensão muscular (T , mN/mm^2); B. Contracção isotónica: comprimento muscular (L , L/L_{max}) (Leite-Moreira *et al.*, 2000).

Quadro III – Parâmetros contrácteis avaliados no modelo de músculo papilar isolado.

	Parâmetro	Descrição
Contracções Isotónicas	FE	Fracção de Encurtamento Máximo
	tFE	Tempo para Fracção de Encurtamento Máximo
	VC (dL/dt_{max})	Velocidade de Contracção
	tVC	Tempo para Velocidade de Contracção
	VR (dL/dt_{min})	Velocidade de Relaxamento
	tVR	Tempo para Velocidade de Relaxamento
Contracções Isométricas	TA	Tensão Activa
	tTA	Tempo para Tensão Activa
	tHR	Duração do Abalo Muscular
	PdF (dT/dt_{max})	Velocidade Máxima de Elevação da Tensão
	tPdF	Tempo para Velocidade Máxima de Elevação da Tensão
	NdF (dT/dt_{min})	Velocidade Máxima de Queda da Tensão
	tNdF	Tempo para Velocidade Máxima de Queda da Tensão