

## Artigo Original

**Ecocardiograma de Alta Resolução e o Modelo de Infarto do Miocárdio em Camundongos***High Resolution Echocardiography and the Myocardial Infarction Model in Mice*Bruno Leonardo Barranco Esporcatt<sup>1</sup>, Nazareth Novaes Rocha<sup>1, 2</sup>, Debora Bastos Mello<sup>1</sup>, Karina Dutra Asensi<sup>1</sup>, Stephan Lachtermacher<sup>1</sup>, Regina Coeli dos Santos Goldenberg<sup>1</sup>, Antonio Carlos Campos de Carvalho<sup>1</sup>**RESUMO**

**Objetivo:** Avaliação do infarto do miocárdio (IM), induzido por isquemia e reperfusão em camundongos, por meio de análises ecocardiográficas, em equipamento específico para pequenos roedores. **Metodologia:** Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 (oito semanas), pesando entre 20 e 25g, foram submetidos à indução do IM pelo protocolo isquemia e reperfusão (n=19), com um período de isquemia de 90 minutos e comparados a animais não infartados (n=10). Foram realizadas avaliações ecocardiográficas, antes do infarto e 8, 20 e 60 dias após a cirurgia com transdutor de alta resolução (30 MHz) específico para camundongos. Foram avaliados os diâmetros cavitários, fração de encurtamento pelo modo unidimensional e tempo de relaxamento isovolumétrico pelo Doppler, além da fração de ejeção calculada pelo método de Simpson, pelo modo bidimensional. **Resultados:** Já na primeira análise, após o infarto do miocárdio, é possível evidenciar a dilatação do ventrículo esquerdo, em sístole (controle 2,10±0,43 mm *versus* infartado 2,83±0,46 mm, p< 0,001) e diástole (controle 3,26±0,33 mm *versus* infartado 3,83±0,48 mm, p < 0,01) e redução da fração de ejeção pelo método de Simpson (controle 74,63±8,29 *versus* infartado 62,58±11,62, p<0,05). Além disso, foi observado redução do tempo de relaxamento isovolumétrico (controle 26,61±6,41 vs infartado 20,94±2,65, p<0,05), compatível com disfunção diastólica. **Conclusão:** O uso do equipamento de alta resolução, específico para camundongos, permitiu a observação de alterações, precocemente, ao contrário das medidas feitas em aparelhos desenvolvidos para humanos e adaptados para pequenos roedores. A qualidade da imagem reduz a margem de erro nas aferições, permitindo maior fidedignidade dos resultados.

**Descritores:** Ecocardiografia, Infarto do Miocárdio, Camundongos**SUMMARY**

**Objective:** Valuation of myocardial infarction induced by ischemia and reperfusion in mice using echocardiographic analyses performed in specific equipment for small rodents. **Methods:** C57BL/6 male and female mice (8-12 weeks-old), 20 to 25g of weight, were submitted to myocardial infarction using the ischemia and reperfusion protocol (n=19), with a period of 90 minutes of ischemia and the infarcted animals were compared with non-infarcted animals (n=10). Echocardiography analyses were done before and at 8, 20, and 60 days after surgery using a high resolution transducer (30MHz, Vevo 770, Visual Sonics) specific for mice. We evaluated the following parameters: cavity diameter, shortening fraction by M-Mode and isovolumetric relaxing time by Echo Doppler. Ejection fraction was also measured using Simpson method using the bidimensional mode. **Results:** It was possible to evidence a left ventricular dilatation in systole (control 2.10±0.43 mm vs infarcted 2.83±0.46 mm, p< 0.001), diastole (control 3.26±0.33 mm vs infarcted 3.83±0.48 mm, p < 0.01) and reduction of ejection fraction by Simpson method (control 74.63±8.29 vs infarcted 62.58±11.62, p<0.05) in the first analysis after myocardial infarction. In addition, it was observed reduction of isovolumetric relaxing time (control 26.61±6.41 vs infarcted 20.94±2.65, p<0.05), which is compatible with diastolic dysfunction. **Conclusion:** The use of specific high resolution equipment in mice allowed the observation of early alterations, unlike of the measurements done with equipments developed for humans and adapted to small rodents. The quality of the image reduces possible mistakes of the measurements, giving a more trusted result to the exam.

**Descriptors:** Echocardiography; Myocardial Infarction; Mice**Instituição**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Centro de Ciências da Saúde - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro -RJ

**Correspondência**Antonio Carlos Campos de Carvalho  
Avenida Carlos Chagas Filho nº 373 - Bloco G - 2º andar - Sl. 53  
21941-900 Rio de Janeiro - RJ  
Fax +552122808193  
acarlos@biof.ufrj.br

Recebido em: 22/10/2009 - Aceito em: 22/10/2009

1. Médicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ
2. Médica da Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro-RJ

*Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.*

Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Ecocardiografia de 2008. Rio de Janeiro-RJ

Financiamento: CAPES-MEC, FAPERJ, CNPq e NIH (RO1 HL73732-01).

## Introdução

As doenças do aparelho circulatório são a maior causa de mortalidade no Brasil, segundo o banco de dados do sistema único de saúde (DATASUS), sendo a principal responsável por internações a partir da quinta década de vida. Dentre esses agravos, o infarto agudo do miocárdio (IAM) responde por, aproximadamente, 35 óbitos a cada 100.000 habitantes<sup>1</sup>. Apesar do progresso considerável no entendimento e tratamento das cardiopatias isquêmicas, a incidência, prevalência e impacto socioeconômico continuam aumentando.

O conhecimento dos detalhes fisiopatológicos e o desenvolvimento de novas terapias, que possam reduzir a morbi-mortalidade das principais doenças que afligem a sociedade, são justificativas importantes para o uso de modelos experimentais. Inúmeras são as patologias que já foram reproduzidas em animais, entre elas, a esclerose múltipla<sup>2</sup>, cirrose hepática<sup>3</sup>, glaucoma<sup>4</sup>, doença de Chagas<sup>5</sup>, infarto agudo do miocárdio<sup>6</sup> e insuficiência cardíaca<sup>7</sup>.

A indução cirúrgica do infarto do miocárdio em roedores é um modelo com resultados reprodutíveis e precisos, quanto ao tempo e localização do evento isquêmico, e amplamente utilizado e indispensável na pesquisa cardiovascular. O desenvolvimento de camundongos transgênicos, que expressam proteínas fluorescentes ubiquamente ou sobre controle de promotores específicos<sup>8</sup>, ou ainda que apresentam manipulação seletiva de genes<sup>9,10</sup>, tornam os camundongos, animais de escolha entre os modelos experimentais de IM.

A principal desvantagem do uso de camundongos como modelo experimental de IM é o seu tamanho<sup>11-15</sup>, o que exige uma grande habilidade cirúrgica para a indução do infarto, especialmente, pelo protocolo de isquemia e reperfusão (IR) e equipamentos adequados para a análise da função cardíaca desses animais.

A ecocardiografia sempre foi importante ferramenta para os estudos pré-clínicos das cardiomiopatias e os aparelhos hospitalares eram, inicialmente, adaptados para o uso laboratorial<sup>16,17</sup>, o que nem sempre permitia a melhor análise do desempenho cardíaco de camundongos. Recentemente, novos

ecocardiogramas, com transdutores de alta frequência e melhor resolução de imagem, foram especialmente desenvolvidos para o uso em experimentação animal<sup>18</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a função cardíaca de animais infartados pelo protocolo de IR, por meio da ecocardiografia de alta resolução.

## Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais, do Centro de Ciências da Saúde, conforme Protocolo N° 026/2008, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

### Animais experimentais

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de oito semanas, pesando entre 20 e 25g, fornecidos pelo biotério do Programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal, foram utilizados para experimentos de indução do IM.

### Registro eletrocardiográfico

Foram fixados dois eletrodos no tecido subcutâneo dos animais, na linha axilar posterior, três dias antes da cirurgia. Isso possibilitou a análise eletrocardiográfica da derivação convencional D1, de forma contínua, durante o procedimento cirúrgico. Foram utilizados o aparelho BIO AMP da *ADInstrument*, calibrado para a velocidade de 50 mm/s e voltagem de 20 mm = 1mV e o programa *Chart*, versão 5.0, para as análises subsequentes.

### Indução do infarto do miocárdio

O animal, após pesagem, foi anestesiado, utilizando-se Cloridrato de Xilazina (Anasedan®), na dose de 20mg/kg, e Cloridrato de Quetamina (Dopalen®), na dose de 80 mg/kg, por via intraperitoneal. Um pequeno acesso foi realizado 5mm acima da fúrcula esternal. Divulsionamos as estruturas, anatômicas, de forma a visualizar-se a traqueia e a cartilagem cricótireóide, o que permitiu a sua punção com um dispositivo de cateter sobre agulha ca-

libre 24, mimetizando uma cricotireoideostomia e possibilitando o acoplamento do animal a um ventilador (*Harvard Apparatus; Holliston, MA*), previamente ajustado (ar comprimido / fluxo de 0,2ml / FR: 90 até 14irpm).

Após a instalação do suporte ventilatório, o acesso à cavidade torácica foi realizado na região paraesternal, na altura do 4º espaço intercostal esquerdo, com o auxílio de um bisturi (nº15). Divulsionamos a musculatura torácica (peitoral maior e menor), de forma a visualizar o 4º e 5º espaço intercostal à esquerda. Com auxílio de uma tesoura de ponta fina, acessamos o espaço acima daquele em que melhor observa-se o *ictus cordis*.

A ligadura foi feita a dois milímetros da aurícula esquerda, com fio 7-0 *mononylon* (prolene). O protocolo de IR é realizado mediante a instalação do ponto cirúrgico sobre um aparato de polietileno (PE10), o que permite a remoção da sutura após 90 minutos de isquemia. O animal foi desmamado do suporte ventilatório, gradualmente, mediante o retorno dos reflexos de retirada. Durante o período de isquemia, o animal permaneceu em plano anestésico, com o acesso respiratório e uma sutura provisória, feita para evitar exposição do coração. Terminado o período de isquemia, a sutura da pele foi desfeita e a cavidade torácica exposta novamente, tornando-a visual. Abaixo da ligadura, sobre o

aparato de polietileno, o miocárdio apresentou-se esbranquiçado.

Com o auxílio de uma pinça e uma lâmina de bisturi, o ponto simples foi desfeito, permitindo a reperfusão do tecido. A sutura definitiva da pele foi concluída e o animal retornou à gaiola, após o retorno dos reflexos posturais.

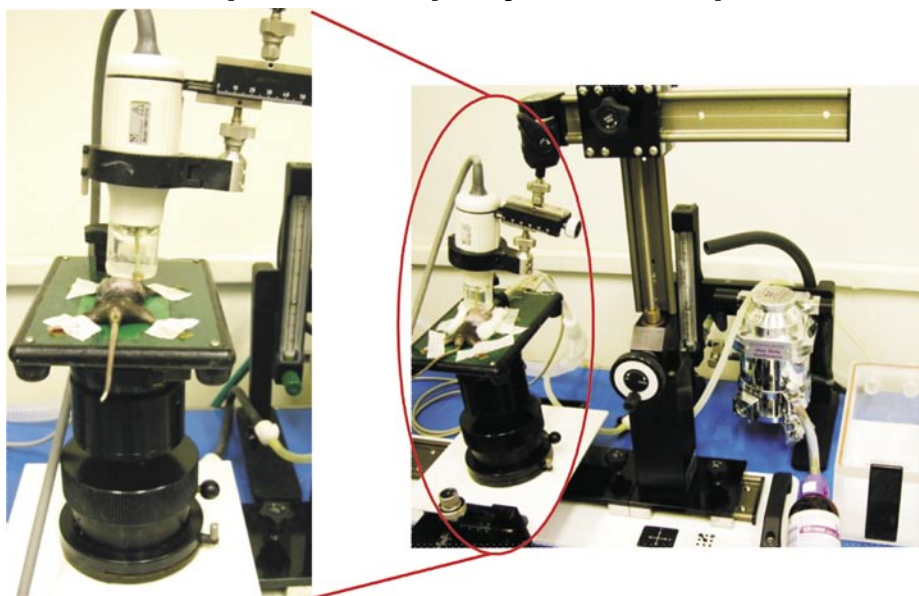
## Estudo ecocardiográfico

Para a realização do ecocardiograma (ECO), os animais foram anestesiados por inalação, com isoflurano 1,5% (Cristália), tricotomizados na região torácica anterior e fixados a uma plataforma aquecida. Durante todo o protocolo, foram monitoradas a frequência cardíaca, respiratória e temperatura corporal dos camundongos. Foi utilizado o aparelho Vevo 770 (*Visual Sonics, Toronto - Canadá*), específico para roedores. Para o presente estudo, foi empregado um transdutor eletromecânico setorial de 30,0 MHz, para a obtenção de imagens fundamentais. Após a tricotomia da parede torácica anterior, uma camada de gel (Carbogel) foi colocada sobre o tórax dos animais, servindo de interface entre o transdutor e o tórax do animal (Figura 1). Todas as imagens foram adquiridas a uma profundidade de 6mm. O frame médio de aquisição foi de 70 a 100 por segundo.

A geometria cardíaca foi analisada utilizando o modo unidimensional (Modo-M), para avaliar os seguintes parâmetros: diâmetro ventricular em sístole e diástole (em mm), fração de encurtamento, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) pelo Doppler. A fração de ejeção foi avaliada pelo método de Simpson, por meio do modo bidimensional.

O TRIV foi empregado por meio da imagem, em cinco câmaras, pegando o Doppler da mitral, juntamente com o Doppler da via de saída

**Figura 1** - Equipamento específico para pequenos roedores. O aparelho possui transdutor de 30 MHz acoplado a alavanca regulável, câmara de indução de anestesia, mesa com controle de temperatura e sensores para registro de ECG e frequência cardíaca.



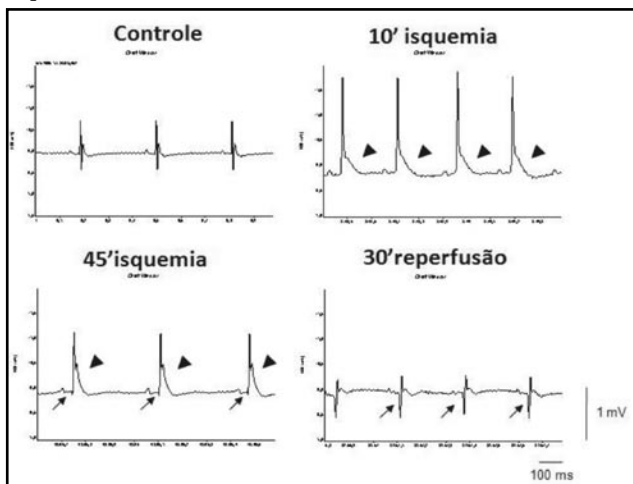
da aorta. O cálculo foi feito analisando-se o tempo em milissegundos, do final do Doppler aórtico até o início do Doppler do fluxo mitral.

O mesmo operador realizou os exames de todos os grupos nos mesmos dias, desconhecendo a procedência dos animais, quanto aos grupos experimentais a que pertenciam.

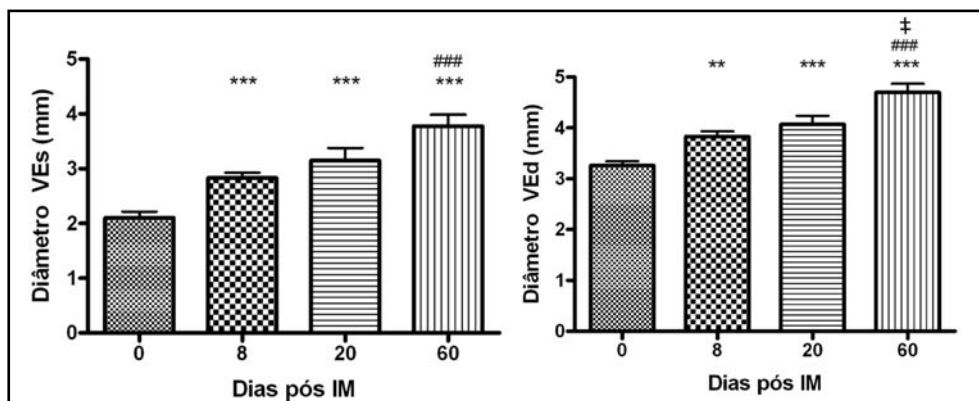
### Análise estatística

Os resultados são mostrados sobre a forma de média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni e os resultados foram considerados significativos, quando  $p < 0,05$ .

**Figura 2 - ECG durante a cirurgia:** A primeira alteração observada é o aparecimento da elevação do segmento ST (triângulo) aos 10 minutos, que denota a presença de isquemia. Aos 45 minutos, surge a onda Q (seta), patognomônica de lesão irreversível. 30 minutos após o início da reperfusão observamos apenas a onda Q patológica sem a presença de supra desnivelamento do segmento ST, já que o estímulo isquêmico foi abolido.



**Figura 3 - Diâmetro ventricular em sístole e diástole.** Detecção da dilatação da cavidade ventricular foi possível já aos oito dias após o procedimento cirúrgico. \* vs 0  $p < 0,05$ , \*\*\* vs 0  $p < 0,001$ , \*\* vs 0  $p < 0,01$ , \* vs 0  $p < 0,05$ , ### vs 8 dias  $p < 0,001$ , ## vs 8 dias  $p < 0,01$ , ‡ vs 20 dias  $p < 0,05$ .



### Resultados

Durante a cirurgia os camundongos foram monitorados por eletrocardiograma (Figura 2). A interrupção abrupta do fluxo sanguíneo gerou o supradesnivelamento do segmento ST, já aos 10 minutos de isquemia e, aos 45 minutos, surgiu uma onda Q denotando o início da lesão tecidual irreversível. Após a reperfusão miocárdica, cessa o estímulo isquêmico, determinando, assim, o retorno do segmento ST à linha de base e, ao ECG, observa-se apenas a presença de uma onda negativa profunda (Q patológica). Animais, que foram submetidos à oclusão permanente da artéria descendente anterior ou não reperfundidos adequadamente, apresentaram, além da onda Q, a manutenção do supradesnivelamento do segmento ST.

### Análise ecocardiográfica seriada

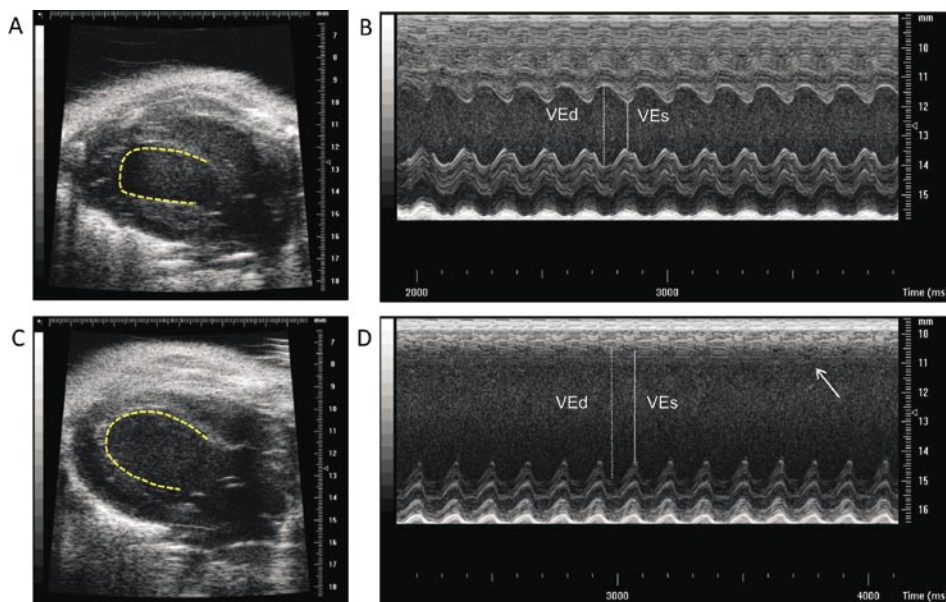
Os animais normais e falso-operados foram acompanhados ao longo do estudo e não foram observadas, em nenhum momento, alterações significativas em relação às medidas de cavidade nos dois grupos. A frequência cardíaca foi monitorada ao longo de todo o exame, permanecendo em torno de 350 a 400 batimentos por minuto.

A utilização de um equipamento específico para o uso laboratorial, em pequenos roedores, permitiu a detecção precoce das alterações estruturais induzidas pela injúria isquêmica. Ao final da primeira semana (Figura 3), já é possível notar o aumento da cavidade ventricular em sístole (controle

2,10  $\pm$  0,43mm versus 8 dias 2,83  $\pm$  0,46mm,  $p < 0,001$ ) e, em diástole, (controle 3,26  $\pm$  0,33mm vs 8 dias 3,83  $\pm$  0,48mm,  $p < 0,01$ ), o que não era evidenciado com o uso de aparelhos de humanos, adaptados para animais (dados não apresentados).

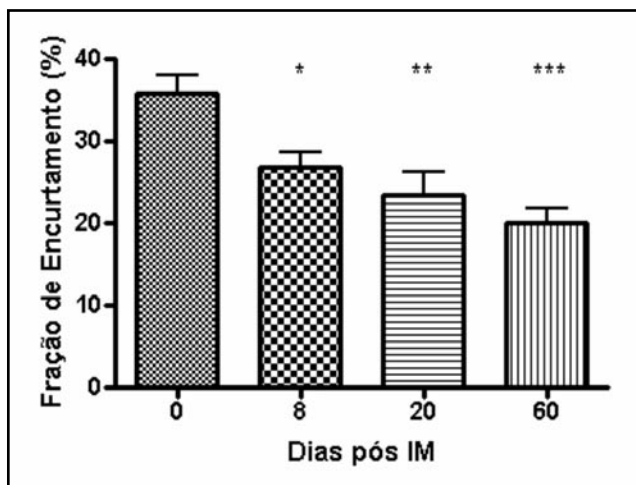
Com o aumento da cavidade ventricular, seu

**Figura 4:** Representativos animais normais (A e B) vs infartados (C e D). observamos a alteração da conformação ventricular, na qual os corações infartados apresentam dilatação da cavidade e conformação globosa. Além disso, nota-se acinesia da parede anterior indicada pela seta em D.



processo de remodelamento e acinesia da parede anterior (Figura 4), observou-se, ainda, a redução da fração de encurtamento (controle  $35,86 \pm 8,64$  vs 8 dias  $26,92 \pm 7,78$ ,  $p < 0,05$ ; vs 20 dias  $23,39 \pm 8,75$ ,  $p < 0,01$ ; vs 60 dias  $19,96 \pm 5,56$ ,  $p < 0,001$ ), avaliada pelo modo bidimensional, mantendo-se assim ao longo do estudo. (Figura 5) Para avaliação da função diastólica, foi realizada a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico. A deficiência diastólica foi constatada pela redução do TRIV (Figura 6), presente logo na primeira avaliação (controle  $26,8 \text{ ms} \pm 6,25$  vs. 8 dias  $21,7 \text{ ms} \pm 3,86$   $p < 0,001$ ). Pela

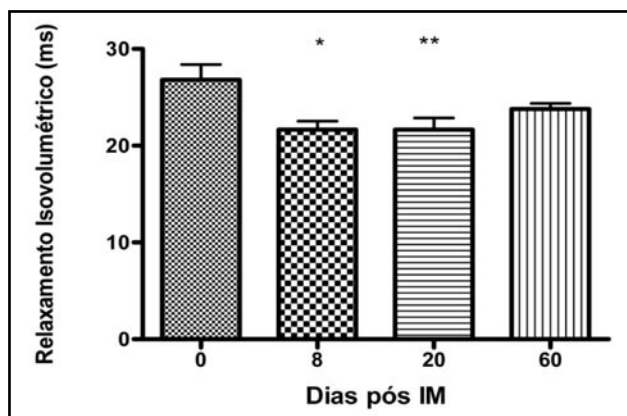
**Figura 5:** Fração de encurtamento. Medida feita pelo modo m na altura dos músculos papilares. \*\*\* *versus day 0*  $p < 0,001$ , \*\* *versus day 0*  $p < 0,01$ , \* *versus day 0*  $p < 0,05$ .



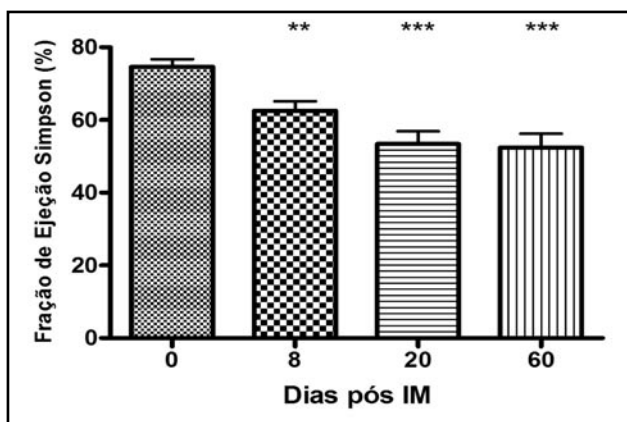
frequência cardíaca, elevada nos camundongos, não foi possível avaliar a relação E/A do fluxo transmitral.

Devido à maior sensibilidade do aparelho, foi possível aferir a fração de ejeção pelo método de Simpson (Figura 7), pela obtenção de cortes transversais em diferentes alturas associados a um corte longitudinal. Por essa medida, é possível inferir, de forma global, a disfunção cardíaca progressiva desses animais, desde o seu valor basal de  $74,63 \pm 8,29\%$  para  $62,58$

**Figura 6:** Tempo de relaxamento isovolumétrico. Avaliação da função diastólica já alterada aos oito dias após IM. \*\* *versus 0*  $p < 0,01$ , \* *versus 0*  $p < 0,05$ .



**Figura 7:** Fração de ejeção pelo método de Simpson. Avaliação mais fidedigna da disfunção cardíaca progressiva e permanentemente provocada pela injúria isquêmica. \*\*\* *versus 0*  $p < 0,001$ , \*\* *versus 0*  $p < 0,01$ .





$\pm 11,62\%$  aos oito dias, ( $p < 0,01$ ),  $53,41 \pm 10,41\%$  aos 20 dias ( $p < 0,001$  vs controle) e para  $52,42 \pm 10,41\%$  aos 60 dias, após o procedimento ( $p < 0,001$  vs controle).

## Discussão

A avaliação da função cardíaca de camundongos é limitada pelo pequeno tamanho do coração e sua frequência de batimentos elevada. Transdutores de frequência baixa, quando utilizados para adquirir imagens em campo próximo, realizam essa avaliação de maneira deficiente<sup>19</sup>, impedindo a apresentação de sensibilidade suficiente para detectar pequenas disfunções.

O uso de camundongo para a indução do infarto do miocárdio apresenta grandes vantagens, como a possibilidade de utilização de diferentes animais transgênicos, o que permite a melhor investigação dos mecanismos moleculares de lesão e remodelamento cardíaco subsequente. Porém, sua utilização demanda grande habilidade cirúrgica e a necessidade de equipamentos específicos para a avaliação cardiovascular.

Ecocardiogramas convencionais equipados com transdutores de até 15 MHz, utilizados em hospitais, foram adaptados para a avaliação da função cardíaca em camundongos<sup>20</sup>. Apesar de extensamente utilizados e provendo informações importantes, em outros modelos de doenças cardíacas, tais equipamentos não apresentam sensibilidade suficiente para inferir a função cardíaca no modelo de injúria por IR.

O modelo de infarto do miocárdio, induzido por IR, provoca disfunção ventricular dependente do tempo ao qual o animal é submetido à restrição de aporte sanguíneo<sup>21,22</sup>. Michael et al<sup>23</sup> compararam a disfunção miocárdica de diferentes períodos de isquemia à oclusão permanente da artéria descendente anterior, por meio da análise perimetria da área infartada do ventrículo esquerdo. A oclusão temporária de 30 e 60 minutos geraram lesões muito pequenas, possivelmente não detectáveis ao ecocardiograma. Entretanto, o insulto isquêmico de 120 minutos levou a uma lesão sem diferença estatística, quando comparada a animais infartados

pela oclusão permanente da artéria em questão.

Em vista disso, adotamos 90 minutos, como protocolo de isquemia, com o intuito de gerar lesões evidenciáveis ao ecocardiograma, sem provocar a mesma disfunção cardíaca que a oclusão permanente da artéria descendente anterior.

O ecocardiograma específico para camundongos foi, extremamente, útil para a caracterização do modelo de infarto do miocárdio induzido por IR. Esse modelo mimetiza mais precisamente a situação clínica, na qual o paciente diagnosticado com infarto é submetido a alguma terapia de revascularização. Apesar de extensamente utilizada, a oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior não é um modelo indicado para teste de administração de células, moléculas ou drogas que atuem diretamente na região isquêmica.

No modelo de isquemia, durante 90 minutos seguidos de reperfusão, foi possível detectar alterações precoces provocadas pela injúria, logo na primeira semana após o procedimento. Devido à alta sensibilidade do sistema, foi também possível avaliar a fração de ejeção pelo método de Simpson. Tal avaliação permite inferir com mais segurança a função cardíaca global. Além disso, a evolução do remodelamento cardíaco pode ser acompanhada, ao longo dos dois meses de estudo.

## Conclusão

O infarto do miocárdio induzido por IR gerou disfunção cardíaca progressiva, precocemente evidenciada pelo ecocardiograma de alta resolução, específico para pequenos roedores. A dilatação da cavidade ventricular, redução da FE, FS e TRIV representam critérios para a disfunção sistólica e diastólica. Tais parâmetros mostraram-se alterados já na primeira avaliação, oito dias após a indução do infarto.

## Referências

1. Ministério da Saúde. Datasus. Morbidade.[Acesso em 2008 dez 10]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>
2. Thessen HM, Gillett A, Olsson T, Jagodic M, Harris RA. Characterization of Multiple Sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2009;210:30-9.
3. Dias JV, Paredes BD, Mesquita LF, Carvalho AB, Kozłowski EO, Lessa AS, et al. An ultrasound and histomorphological analysis of experimental liver cirrhosis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:992-9.
4. McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW. Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp Eye Res.* 2009;88(4):816-24.
5. Rocha NN, Garcia S, Gimenez LE, Hernandez CC, Senra JF, Lima RS, et al. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology.* 2006;133:729-37.
6. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 1995;269:H2147-H2154.
7. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:29-38.
8. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997;407:313-9.
9. Jacob S, Laury-Kleintop L, Lanza-Jacoby S. The Select cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduced the extent of atherosclerosis in Apo E-/- mice. *J Surg Res.* 2008;146(1):135-42.
10. Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Talab YD, Shagdarsuren E, et al. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodelling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):496-506.
11. Gehrman J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:237-50.
12. Gonder JC. Introduction: recent studies, new approaches, and ethical challenges in animal research. *ILAR J.* 2007;48:1-2.
13. Gonder JC, Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR J.* 2007;48:29-36.
14. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954;140:675-82.
15. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:H660-H668.
16. Youn HJ, Rokosh G, Lester SJ, Simpson P, Schiller NB, Foster E. Two-dimensional echocardiography with a 15-MHz transducer is a promising alternative for in vivo measurement of left ventricular mass in mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999;12:70-5.
17. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA. Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res.* 1995;76:907-14.
18. Okajima K, Abe Y, Fujimoto K, Fujikura K, Girard EE, Asai T, et al. Comparative study of high-resolution microimaging with 30-MHz scanner for evaluating cardiac function in mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007;20:1203-10.
19. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics.* 2003;13:227-39.
20. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1998;274:H1812-H1820.
21. Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation.* 1993;88:2872-83.
22. Hirayama A, Adachi T, Asada S, Mishima M, Nanto S, Kusuoka H, et al. Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size. *Circulation.* 1993;88:2565-74.
23. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:H660-H668.