

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

ANA CAROLINA MIEKO OMOTO

**Aspectos morfofuncionais, histológicos e moleculares do coração de ratos
após isquemia e reperfusão: estratificação das lesões miocárdicas**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2019

ANA CAROLINA MIEKO OMOTO

**Aspectos morfofuncionais, histológicos e moleculares do coração de ratos
após isquemia e reperfusão: estratificação das lesões miocárdicas**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Jr.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Omoto, Ana Carolina Mieko

Aspectos morfofuncionais, histológicos e moleculares do coração de ratos após isquemia e reperfusão: estratificação das lesões miocárdicas, 2019

P 79.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Rubens Fazan Júnior.

1. isquemia-reperfusão miocárdica 2. função cardíaca 3. espécies reativas de oxigênio, 4. metaloproteinase-2, 5. Fator de necrose tumoral-alfa, 6. troponina I

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes entidades e instituições.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Bolsa de Doutorado – Outubro/2015 - Setembro/2019, processo: 161564/2015-1.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Bolsa de Doutorado Sanduíche (PDSE) – Agosto/2018 – Fevereiro/2019, processo: 88881.187256/2018-0.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2013/20549-7.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

FICHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Mieko Omoto

Aspectos morfofuncionais, histológicos e moleculares do coração de ratos após isquemia e reperfusão: estratificação das lesões miocárdicas

Tese apresentada ao programa de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rubens Fazan Jr.

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto ___/___/___

*Para Mario e Irene
por tantos anos de amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Grande desafio é escrever em poucas páginas todos os agradecimentos que tenho a fazer. Muitas pessoas foram essenciais em meu caminho e algumas parecem que estão em minha vida desde sempre e que mesmo depois dela, permanecerão.

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Mario e Irene, por me aceitarem e me amarem quando o tempo é de sol e quando o tempo é de chuva. Minha eterna gratidão por ressaltarem minhas virtudes, revelarem minhas limitações e, acima de tudo, por apoiarem todos os meus sonhos.

Ao meu companheiro de vida, Talles, com quem experimento a dádiva da troca nesse longo caminho de aprendizado e amor. Gratidão por me fazer enxergar a vida de um jeito tão mágico e bonito. Gratidão por fazer dos meus sonhos os seus e por trazer um sentido maior para a minha caminhada.

À minha irmã e sobrinha amadas, Adriana e Violeta, vocês representam para mim a expressão da coragem. Gratidão por me ensinarem a regar todas as flores que planto em meu jardim da vida e a nunca me acovardar mesmo que com todo medo do mundo.

Às mulheres da minha vida, Yaeko e Lídia, mais do que avós vocês são meus exemplos de humildade, força e determinação. Agradeço a Deus por ter convivido e aprendido com vocês.

Aos meus queridos tios, Helena e Marquinhos, que indiretamente contribuíram para a realização deste sonho. Gratidão por me proporcionarem um lar pra onde eu sempre pude voltar e por todo carinho que sempre me ofereceram.

Aos irmãos que ganhei quando cheguei em Ribeirão Preto, Procópio, Aline, Fábio, Fernanda e Priscilinha, é tão rico compartilhar minha jornada com vocês... Gratidão por essa amizade que transcende a forma, a presença física e me faz sentir segura e tranquila mesmo de tão longe.

Aos meus mestres da fisiologia, parafraseio Arthur Schopenhauer e agradeço por terem me ensinado que a tarefa de um pesquisador não é somente “ver àquilo que ninguém viu, mas sim pensar o que ninguém ainda pensou sobre àquilo que todo mundo vê”. Em especial, agradeço ao meu orientador, professor Rubens Fazan, que com paciência me ajudou na construção do sonho de ser fisiologista.

Ao professor Hélio Salgado, agradeço todos os conselhos e momentos compartilhados. Me inspira acompanhar seu amor pelo que faz.

Ao professor Luiz Carlos Navegantes, coordenador do programa de pós-graduação e avaliador dos meus relatórios anuais, agradeço pelas conversas motivadoras e conselhos no decorrer desses quatro anos de doutorado.

Ao querido Beto que não mediu esforços para me ajudar a desenvolver os experimentos desta tese e me ensinar tudo o que sei sobre técnicas cirúrgicas. Gratidão por ser meu mestre e amigo nesta jornada.

Aos amigos de laboratório e do departamento de fisiologia da FMRP, Renata, Fernandona, Daniel, Luis, Pedro, Amandinha, Hadder, Thaís, Claudinha, Jaci, Mauro, Natália, Natany e Heloísa os meus dias no laboratório não teriam sido tão alegres sem vocês. Gratidão pelo carinho que sempre tiveram comigo.

À Vanessa que com sua ajuda e conselhos fez das minhas infundáveis tardes no laboratório de ecocardiografia mais leves e felizes, gratidão sem fim.

Aos funcionários da secretaria do departamento de fisiologia da FMRP, em especial à querida Cláudia, por todo carinho e ajuda nas questões burocráticas da pós-graduação, minha sincera gratidão.

Ao Leonardo, bioterista do departamento de fisiologia da FMRP, gratidão por seu excelente trabalho cuidando dos nossos animais e por estar sempre bem-humorado e feliz, o que faz toda diferença durante a rotina pesada.

Aos mestres e amigos da University of Mississippi Medical Center, Jussara Do Carmo, Alexandre da Silva, John Hall, Sydney, Xuemei, Zhen, Yiling, Ana Paula, Ana Joanice, Lorena, Edgar, Danny, Elena, Marisa, Norminha e Cláudio, foi um privilégio conhecê-los e trabalhar ao lado de vocês. Agradeço de todo o meu coração pelo carinho com o qual me receberam em Jackson e pelos ensinamentos que carregarei comigo eternamente.

Por fim, agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado, e a FAPESP e CAPES pelo financiamento do projeto e bolsa de estudos sanduiche, respectivamente.

“Ao olhar para mim sinto a presença de muitas pessoas. Não teria chegado até aqui da mesma forma sem elas. Gente da minha família de sangue. Gente da família que meu coração cria vida afora. Gente que encontrei em algum ponto do caminho. Muitas me ajudaram sem se quer perceber. Recebi, em diferentes momentos, a dádiva de gestos de cuidado e amor que fizeram toda a diferença. Mesmo os mais singelos foram providenciais: sorrisos, olhares, escutas, abraços, palavras, silêncios compartilhados quando a presença diz tanto...” Ana Jácomo

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

OMOTO, A. C. M. **Aspectos morfofuncionais, histológicos e moleculares do coração de ratos após isquemia e reperfusão: estratificação das lesões miocárdicas**. Ribeirão Preto, 2019. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2019.

A restauração da perfusão cardíaca é uma das principais intervenções terapêuticas para minimizar os danos causados pelo infarto agudo do miocárdio. Entretanto, o reestabelecimento do fluxo coronariano pode ter consequências deletérias ao coração, fenômeno conhecido como injúria de reperfusão (IR) do miocárdio. Atualmente, o estudo dos mecanismos e a busca por estratégias terapêuticas para prevenir e/ou proteger o coração dos danos causados pela IR, são um importante alvo de investigação. As alterações cardíacas promovidas pela IR em modelos animais ainda são muito conhecidas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a função e remodelamento cardíaco, bem como alterações moleculares envolvidas na IR miocárdica em ratos. Ratos Wistar (280-300g) foram submetidos a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda por 30 min, com subsequente reperfusão. Ratos controle passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos com exceção da oclusão coronariana. Quatro semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos a avaliação da função cardíaca em situação basal (ecocardiografia convencional e *speckle-tracking*), teste de performance física e medida da pressão ventricular com infusão de dobutamina. Fibrose e remodelamento miocárdico, além da quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO), da atividade das metaloproteinases tipo-2 (MMP-2), da expressão gênica do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e da expressão proteica de troponina I no músculo cardíaco, também foram avaliadas. Diferentes graus de lesão miocárdica (SL: sem lesão, LM: lesão moderada e LG: lesão grande), com porcentagens de ocorrência distintas, foram identificados nos animais submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca. A função cardíaca, foi afetada, com diferentes intensidades, independente do grau de lesão miocárdica. A performance física foi menor nos animais submetidos à IR miocárdica (Sham: 85, SL: 48, LM: 57 e LG: 30 kg.m). A deformação circunferencial e radial das fibras miocárdicas estava reduzida em todos os animais submetidos à IR comparados ao controle. No entanto, apenas os animais com lesão

grande apresentaram altos níveis de NT-proBNP plasmático quando comparados aos animais do grupo controle (sham: 44,7 vs LG: 132,9). Fibrose intersticial (Sham: 0,9 ; IR(SL): 2,7; IR(LM): 2,6; IR(LG): 2,9%), altos níveis de atividade da MMP-2 (Sham: 0,22; IR(SL): 0,46; IR(LM): 0,44; IR(LG): 0,48 UA), aumento da expressão gênica de TNF- α (Sham: 0,3; IR(SL): 1,38; IR(LM): 1,36; IR(LG): 1,41 UA) e elevadas concentrações de ERO: O₂⁻ (Sham: 50,5 IR(SL): 175,6; IR(LM): 127,4; IR(LG): 108,1 RLU/mg de proteína) e H₂O₂ (Sham: 86; IR(SL): 1077; IR(LM): 1194; IR(LG): 639,2 nmol/mg de proteína) foram detectadas em todos os animais submetidos a isquemia e reperfusão. Além disso, os animais sem lesão miocárdica apresentaram redução da expressão proteica de troponina I (Sham: 1,31; IR(SL): 0,82; IR(LM): 1,26; IR(LG): 1,33 UA). Esses resultados mostraram que a IR leva a padrões distintos de injúria miocárdica em ratos e que após reperfusão da região isquêmica, alterações histológicas e moleculares continuam presentes e podem contribuir para a disfunção cardíaca ao longo do tempo.

Palavras chave: função cardíaca, isquemia-reperfusão miocárdica, metaloproteinase-2, espécies reativas de oxigênio, fator de necrose tumoral-alfa, troponina I.

ABSTRACT

OMOTO, A.C.M. **Morphofunctional, histological and molecular characterization of Wistar rat's heart after ischemia-reperfusion: stratification of myocardial lesions.** Ribeirão Preto, 2019. PhD thesis. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. 2019.

Even though myocardial reperfusion is the most important tool to preserve cardiac function after infarction, reperfusion of acutely ischemic myocardium can induce injury. We aimed to evaluate chronic morphofunctional/molecular aspects in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion (IR). Male Wistar rats were subjected to myocardial IR by short-term (30 min) ligation and subsequent reperfusion of the left descending coronary artery. Control rats underwent the same surgery without coronary ligation. After four weeks, rats had their cardiac function examined in basal and stress conditions. Myocardial fibrosis, cardiac remodelling and molecular mediators of IR injury (reactive oxygen species, tumor necrosis factor- α and matrix-metalloproteinase-2) were assessed as well. 45% of the IR rats showed no cardiac macroscopic lesion (NL) while 38% and 17% showed mild (ML) or large (LL) lesions, respectively. Cardiac function was affected at different degrees in all IR rats, but only animals with large lesions presented a significant elevation in NT-proBNP plasma levels (sham: 44,7 vs IR(LL): 132,9). Also, IR rats presented a reduction in myocardial circumferential and radial strain measured by speckle-tracking echocardiography. Interstitial fibrosis in the non-infarcted myocardium (Sham: 0,9 ; IR(NL): 2,7; IR(ML): 2,6; IR(LL): 2,9%), matrix-metalloproteinase-2 activity (Sham: 0,22; IR(NL): 0,46; IR(ML): 0,44; IR(LL): 0,48 AU) and the expression of tumor necrosis factor- α (Sham: 0,3; IR(NL): 1,38; IR(ML): 1,36; IR(LL): 1,41 AU) were higher in the myocardium of all IR rats as compared to controls ($p < 0.05$). Myocardium superoxide anion (Sham: 50,5 IR(NL): 175,6; IR(ML): 127,4; IR(LL): 108,1 RLU/mg of protein) and hydrogen peroxide (Sham: 86; IR(NL): 1077; IR(ML): 1194; IR(LL): 639,2 nmol/mg of protein) were increased in rats with no or mild cardiac scars. Interestingly, only rats with no infarct scars presented reduction in troponin I protein expression (Sham: 1,31; IR(NL): 0,82; IR(ML): 1,26; IR(LL): 1,33 AU). These results show that IR leads to distinct degrees of myocardial injury in rats and even the animals without infarct scar

presented cardiac dysfunction and molecular changes that may contribute to the development of heart failure over time.

Key words: cardiac function, myocardial ischemia-reperfusion, matrix-metalloproteinase-2, reactive oxygen species, tumor necrosis factor-alpha, troponin I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica da contribuição individual da isquemia e da reperfusão miocárdica na extensão da área infartada, 24 horas após infarto agudo do miocárdio seguido de reperfusão.....	25
Figura 2: Desenho esquemático representando as alterações intracelulares durante isquemia e reperfusão miocárdica.....	28
Figura 3: Imagens representativas da técnica de ligadura e reperfusão da artéria coronária DAE em camundongos.....	31
Figura 4: Taxa de sobrevivência após IR e grau de lesão miocárdica.....	46
Figura 5: Função sistólica avaliada por ecocardiografia	50
Figura 6: Deformação radial e circunferencial das fibras miocárdicas e sua correlação com a deposição de colágeno intersticial.....	51
Figura 7: Quantificação da taxa máxima de aumento da pressão ventricular esquerda em condições basais e durante administração de doses crescentes de dobutamina..	53
Figura 8: Teste de velocidade máxima e índice de performance física em ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia.	54
Figura 9: Dosagem de NT-proBNP no plasma de ratos submetidos a IR ou cirurgia fictícia.	55
Figura 10: Concentração de espécies reativas de oxigênio e expressão gênica de TNF- α no miocárdio de ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia.	56
Figura 11: Colágeno intersticial e atividade das MMP-2 no miocárdio de ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia.	58
Figura 12: Correlação entre strain radial e strain circunferencial e a quantificação de colágeno intersticial no miocárdio de ratos submetidos à IR miocárdica ou cirurgia fictícia.	59
Figura 13: Quantificação da expressão proteica de troponina I no miocárdio de ratos submetidos a IR ou cirurgia fictícia.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais de ratos 4 semanas após isquemia-reperfusão (IR) miocárdica ou cirurgia fictícia (Sham).	47
Tabela 2. Parâmetros morfométricos obtidos por ecocardiografia 4 semanas após isquemia-reperfusão miocárdica (IR) e cirurgia fictícia (Sham).....	49

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrometro
ATP	trifosfato de adenosina
CaCl_2	cloreto de cálcio
Cq	ciclo quantitativo
DAE	coronária descendente anterior esquerda
DCV	doenças cardiovasculares
dL	decilitro
$\text{dP/dt}_{\text{max}}$	inclinação máxima do ramo ascendente da curva de pressão do VE
ERO	espécies reativas de oxigênio
g	grama
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
IAM	infarto agudo do miocárdio
ICPP	intervenção coronariana percutânea primária
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
IR	isquemia-reperfusão
kDa	quilodalton
kg	quilograma
LG	lesão grande
LM	lesão moderada
m	metro
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro

mM.....milimolar
MMPs.....metaloproteinases
NADPH.....fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NFκB.....fator nuclear kappa B
nM.....nanomolar
O₂⁻.....ânion superóxido
P.E. 50.....polietileno 50
PPTM.....poro de permeabilidade transitória mitocondrial
rpm.....rotação por minuto
s.....segundo
s.c......subcutâneo
SL.....sem lesão
SDS.....dodecilsulfato de sódio
SOD.....superóxido dismutase
STE.....speckle-tracking
TBS-T.....salina tamponada com Tris e Tween
TIMP.....inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF-α.....fator de necrose tumoral alfa
Tnl.....troponina I
VE.....ventrículo esquerdo
V_{máx}.....velocidade máxima
VO_{2max}.....consumo máximo de oxigênio

ÍNDICE

1. Introdução	22
1.1 Infarto agudo do miocárdio	22
1.2 Reperfusão miocárdica	23
1.3 Fisiopatologia da injúria de isquemia e reperfusão	25
1.4 Estudo da isquemia e reperfusão miocárdica em modelos experimentais	28
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
Avaliar em ratos submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca:	33
3. Métodos	35
3.1 Animais	35
3.2 Protocolo experimental	35
3.3 Procedimentos cirúrgicos	36
3.4 Determinação da função sistólica por ecodopplercardiografia	36
3.5 Teste de velocidade máxima para determinação da performance aeróbica	37
3.6 Determinação da função sistólica sob teste de estresse farmacológico .	38
3.7 Dosagem plasmática de BNP	39
3.8 Quantificação de ERO no miocárdio	39
3.8.1 Concentração de ânion superóxido (O ₂ ⁻).....	39
3.8.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	39
3.9 Preparo dos extratos de coração para zimografia em gel e western blot 40	
3.9.1 Dosagem de proteínas pelo método de bradford	40
3.9.2 Avaliação da atividade da MMP-2 por zimografia em gel.....	41
3.9.3 Quantificação da expressão proteica de troponina I por Western Blot.....	41
3.10 PCR em tempo real para quantificação da expressão gênica de TNF-α 42	
3.11 Quantificação de colágeno intersticial	43
3.12 Análise estatística	43
4. Resultados	45
4.1 Sobrevivência e grau de lesão miocárdica após IR	45
4.2 Características gerais	47
4.3 Determinação da função e remodelamento cardíacos por ecocardiografia .	48

4.3.1 Parâmetros morfométricos.....	48
4.3.3 Deformação miocárdica (strain) radial e circunferencial.....	51
4.4 Avaliação da primeira derivada máxima da pressão ventricular (dP/dt máxima) em condições basal e sob estresse farmacológico.....	52
4.5 Teste de tolerância ao exercício físico – Vmax.....	54
4.7 Quantificação de ERO (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) e TNF-α no tecido cardíaco.....	56
4.8 Deposição de colágeno intersticial e atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) no coração de ratos Wistar.....	57
4.9 Correlação entre a deformidade das fibras miocárdicas (strain) e a deposição de colágeno no coração.....	59
4.10 Expressão proteica de troponina I.....	60
5. Discussão.....	62
6. Conclusões.....	70
7. Referências.....	72
8. Anexo A.....	81
9. Anexo B.....	83

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Infarto agudo do miocárdio

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo e estão entre as quatro principais doenças crônicas desencadeadas pela combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais (DCV, câncer, doenças do trato respiratório e diabetes) um dos maiores desafios da saúde pública a serem enfrentados no século XXI (“WHO | Noncommunicable diseases country profiles 2018”). Estima-se que, até 2030, as DCV acometerão mais de 23,6 milhões de pessoas no mundo (“Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association”; “WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014”).

Dentre as DCV, a doença isquêmica do coração, também conhecida como infarto agudo do miocárdio (IAM), é a mais prevalente e segundo a última estimativa, publicada pela Organização Mundial da Saúde, é responsável por mais de 7 milhões de mortes ao ano no mundo, número que tende a aumentar com a maior expectativa de vida da população e prevalência de co-morbidades como a obesidade, síndrome metabólica, hipertensão, diabetes dentre outras (“WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014”; YASUDA; SHIMOKAWA, 2009).

O IAM é caracterizado pela ausência de perfusão miocárdica decorrente da interrupção do fluxo sanguíneo em regiões de estenose aterosclerótica nas artérias coronárias. Na maioria dos casos, o IAM acontece quando placas arterioscleróticas coronarianas se rompem e liberam substâncias que promovem ativação e agregação plaquetária, seguida da formação de trombos que obstruem o fluxo sanguíneo para o miocárdio (BRAUNWALD, 2011).

A ausência do aporte de oxigênio e nutrientes, por períodos prolongados, provoca morte das células cardíacas (WEBB; ADGEY; PANTRIDGE, 1972) que, durante a fase proliferativa do processo de cicatrização da região infartada, são substituídas por tecido fibrótico. A cicatriz fibrótica formada no miocárdio mantém a integridade estrutural do ventrículo impedindo seu rompimento, porém por não possuir propriedades contráteis, compromete o funcionamento do coração (FRANGOIANNIS, 2015). Assim, a redução funcional do ventrículo infartado

promove sobrecarga de trabalho ao miocárdio remanescente levando ao aumento da tensão transmural sistólica e diastólica, com conseqüente estímulo para hipertrofia e remodelamento cardíacos a longo prazo (PFEFFER et al., 1979).

Com o avanço das técnicas de diagnóstico e dos procedimentos de restauração do fluxo sanguíneo na artéria ocluída, conhecido como reperfusão miocárdica, mais pacientes sobrevivem a um IAM, porém em grande parte dos casos os sobreviventes desenvolvem insuficiência cardíaca com o passar do tempo (KLOCKE et al., 2007).

1.2 Reperfusão miocárdica

Desde 1970 é bem estabelecido que o tamanho do infarto (tamanho da cicatriz fibrótica) influencia o prognóstico do paciente (PAGE et al., 1971; SOBEL et al., 1972), em outras palavras, quanto maior o infarto pior sua repercussão clínica. Reimer e colaboradores mostraram que a progressão e, conseqüentemente, o tamanho do infarto estão diretamente relacionados com a duração da isquemia, estabelecendo o conceito de que, dependendo do tempo de isquemia, o miocárdio poderia ser “salvo” pela reperfusão da coronária obstruída (REIMER et al., 1977). Nesta mesma década, Chazov e colaboradores foram os primeiros a utilizar estreptoquinase para lizar o trombo que obstruía o fluxo sanguíneo coronariano de um paciente com IAM (CHAZOV et al., 1976). Iniciava-se a era da reperfusão miocárdica que até hoje é uma das intervenções terapêuticas mais utilizadas nas unidades coronarianas (BRAUNWALD; KLONER, 1985; PIPER; GARCÍA-DORADO; OVIZE, 1998; YELLON; HAUSENLOY, 2007a).

Nos últimos 25 anos, as técnicas utilizadas para reperfusão miocárdica foram aperfeiçoadas e, além do desenvolvimento de fibrinolíticos mais potentes que a estreptoquinase, técnicas mais avançadas como a intervenção coronariana percutânea primária (ICPP) associada a *stents* e, mais recentemente, a aspiração do trombo, foram desenvolvidas. Vale ressaltar que, o advento da reperfusão miocárdica reduziu para a metade a mortalidade de pacientes com IAM (BRAUNWALD, 2012).

Apesar da reperfusão miocárdica representar um grande avanço na terapêutica do IAM, por reduzir os danos causados pela isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo para tecidos isquêmicos pode danificar o miocárdio sobrevivente ao infarto,

fenômeno que ficou conhecido como injúria de reperfusão (IR) (YELLON; HAUSENLOY, 2007b).

A lesão causada pela IR miocárdica foi descrita, pela primeira vez, por Jennings e colaboradores utilizando como modelo experimental a ligadura temporária de artérias coronárias em cães (JENNINGS et al., 1960). Neste trabalho, os autores observaram que a reperfusão parecia acelerar o desenvolvimento de necrose no tecido cardíaco, uma vez que as análises histológicas do coração desses animais mostraram que as alterações encontradas de 30 a 60 minutos de isquemia seguida de reperfusão eram similares àsquelas observadas após 24 horas de isquemia miocárdica por ligadura coronariana permanente. Em seguida, Kloner e colaboradores mostraram que a reperfusão também poderia causar danos na microvasculatura cardíaca comprometendo o reestabelecimento do fluxo sanguíneo (fenômeno de *no-reflow*) e contribuindo para a expansão do infarto (KLONER; GANOTE; JENNINGS, 1974; NDREPEPA et al., 2010). Essas observações levantaram discussões, durante décadas, sobre a possibilidade da reperfusão, por si, causar lesões. Somente com a descoberta do pré-condicionamento isquêmico que os efeitos da isquemia e da reperfusão se mostraram, de certa forma, independentes. Hoje se sabe que a lesão causada pela reperfusão é responsável por, aproximadamente, 50% do tamanho final do infarto (figura 1).

Assim, em 1985, Braunwald e Kloner se referiram à IR como “*a double edge-sword*” (uma faca de dois gumes) pois, apesar de ocasionar efeitos deletérios ao miocárdio, é a única estratégia terapêutica capaz de conter os danos causados pela isquemia (BRAUNWALD; KLONER, 1985). Mesmo com os avanços nos procedimentos de reperfusão, as terapias para a prevenção das lesões causadas pelo reestabelecimento do fluxo sanguíneo em tecidos isquêmicos ainda são alvo de intensos estudos.

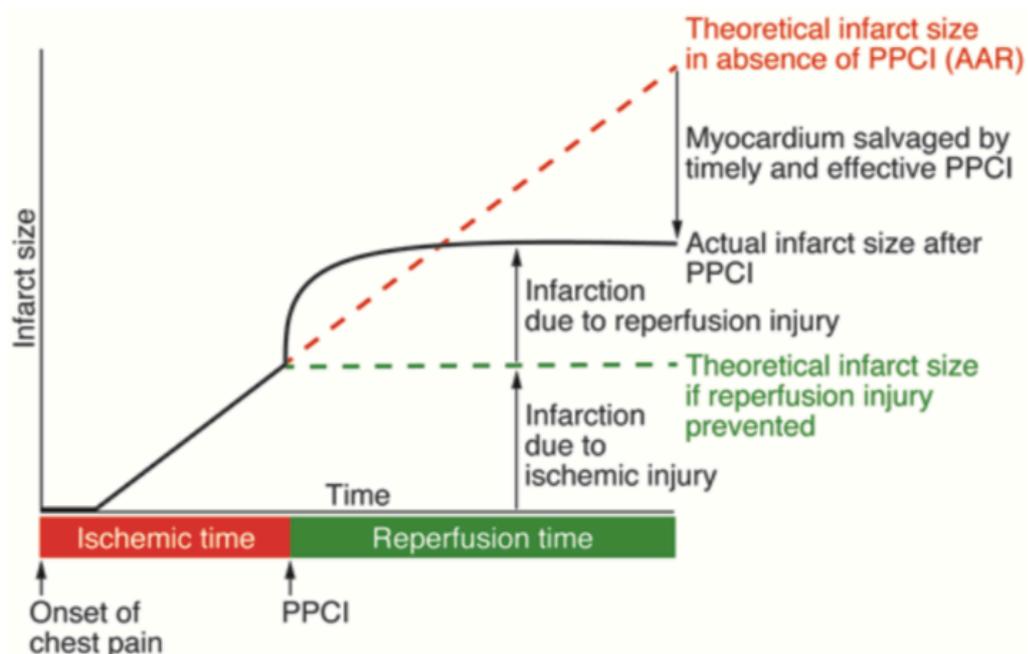


Figura 1: representação gráfica da contribuição individual da isquemia e da reperfusão miocárdica na extensão da área infartada, 24 horas após infarto agudo do miocárdio (com supra desnivelamento de segmento ST) seguido de ICPP (indicado na figura pela sigla PPCI). O traçado contínuo de cor preta representa o tamanho do infarto durante o período de isquemia e após a reperfusão. A linha tracejada verde representa o tamanho estimado do infarto se a lesão de reperfusão fosse prevenida e a linha tracejada vermelha, o tamanho do infarto se o procedimento de reperfusão (PPCI) não fosse realizado. Nota-se que a lesão causada pela reperfusão atenua os benefícios da PPCI e contribui para, aproximadamente, 50% do tamanho final do infarto. Figura retirada do periódico *The journal of clinical investigation* (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

1.3 Fisiopatologia da injúria de isquemia e reperfusão

A IR é caracterizada por qualquer disfunção eletrofisiológica, miocárdica ou vascular induzida pela restauração do fluxo sanguíneo para um tecido isquêmico (PINTO; GIBSON, 2016). O termo IR engloba quatro manifestações diferentes: as arritmias de reperfusão, o atordoamento ou “stunning” miocárdico, os danos endoteliais da microvasculatura cardíaca, responsáveis pelo fenômeno de não

reperusão ou “*no-reflow*”, e a morte dos cardiomiócitos (HAUSENLOY; YELLON, 2013; PINTO; GIBSON, 2016).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da IR têm sido extensivamente investigados, especialmente pela pesquisa básica, a fim de estabelecer possíveis alvos farmacológicos que previnam o agravamento dos danos causados no momento da reperusão. Assim, sabe-se que durante a isquemia miocárdica a fosforilação oxidativa é inibida e a glicólise anaeróbica passa a ser a única fonte de energia para o coração, porém suficiente para manter as funções básicas das células cardíacas por apenas 60 a 90 minutos.

Com o metabolismo cardíaco acontecendo de forma anaeróbica ocorre acúmulo de lactato, que por sua vez, reduz o pH intracelular para valores menores do que 7. O acúmulo de H^+ intracelular sensibiliza o trocador iônico Na^+/H^+ , que envia para o meio extracelular o excesso de íons H^+ em troca de íons Na^+ para o meio intracelular. Em resposta ao acúmulo de Na^+ dentro da célula, o trocador de íons $2Na^+/Ca^{2+}$ passa a trabalhar de forma reversa, retirando íons Na^+ e colocando íons Ca^{2+} no meio intracelular. Além disso, a falta de ATP, devido à isquemia, reduz a atividade da $3Na^+/2K^+$ ATPase resultando em mais Na^+ no meio intracelular (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

Este desequilíbrio iônico, gerado pela isquemia, é agravado durante a reperusão miocárdica, que aumenta ainda mais a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular dando início a uma série de eventos prejudiciais ao funcionamento da célula cardíaca. Além disso, outros mecanismos são propostos para explicar os processos lesivos iniciados durante a reperusão como a restauração abrupta do pH, a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a abertura de poros de permeabilidade transitória da mitocôndria (PPTM) (figura 2) (“Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition”, 2009; BUJA, 2005; HAUSENLOY; YELLON, 2013).

A redução do pH durante a isquemia protege o miocárdio contra a hipercontratibilidade das miofibrilas e previne a abertura dos PPTM (HAUSENLOY; YELLON, 2013; PINTO; GIBSON, 2016). No entanto, a restauração súbita do pH intracelular, durante a reperusão, leva a geração de ERO que, por sua vez, danificam as proteínas e fosfolípidos de membrana das células cardíacas bem como do retículo sarcoplasmático contribuindo para o acúmulo de Ca^{2+} dentro dos cardiomiócitos. Como resultado, a grande quantidade de Ca^{2+} promove o desacoplamento do

mecanismo de excitação-contração do músculo cardíaco levando a hipercontratibilidade e lesão das miofibrilas contráteis (HAUSENLOY; YELLON, 2013; PINTO; GIBSON, 2016).

As ERO também estimulam a abertura dos PPTM (MEISSNER; MORGAN, 1995; TOYOKUNI, 1999; GIBSON et al., 2016), que liberam fatores pró-apoptóticos e “desviam” a mitocôndria de sua função original, que é a manutenção da vida celular, para um papel contrário, facilitando a morte celular. Então, ocorre a liberação de substâncias, como o citocromo *c* e o fator indutor de apoptose, iniciando a ativação das caspases (enzimas de uma família de proteases que participam de uma cascata, iniciada em resposta a sinais pró-apoptóticos, que culmina com a morte da célula) (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; SUSIN et al., 1999). Porém, o papel prejudicial das ERO não se restringe a liberação de fatores pró-apoptóticos, elas também iniciam processos inflamatórios que geram danos nas células endoteliais, da microvasculatura cardíaca, prejudicando a síntese de moléculas bioativas como o óxido nítrico (NO) (MAXWELL; LIP, 1997; CARDEN; GRANGER, 2000; HAUSENLOY; YELLON, 2013). Além disso, o acúmulo de neutrófilos, atraídos pelas ERO, e o prejuízo na vasodilatação tornam o procedimento de reperfusão ineficaz e, ao contrário do desejado, pode contribuir para o aumento da área infartada (ITO HIROSHI et al., 1996). O estresse oxidativo também participa do processo de ativação das metaloproteinases (MMP) que degradam a matrix extracelular e outros componentes da maquinaria contrátil como a troponina (CHEUNG et al., 2000) contribuindo para a deterioração da função contrátil do coração. Nota-se assim, que a injúria provocada pela IR é multifatorial e por isso muito difícil de ser controlada.

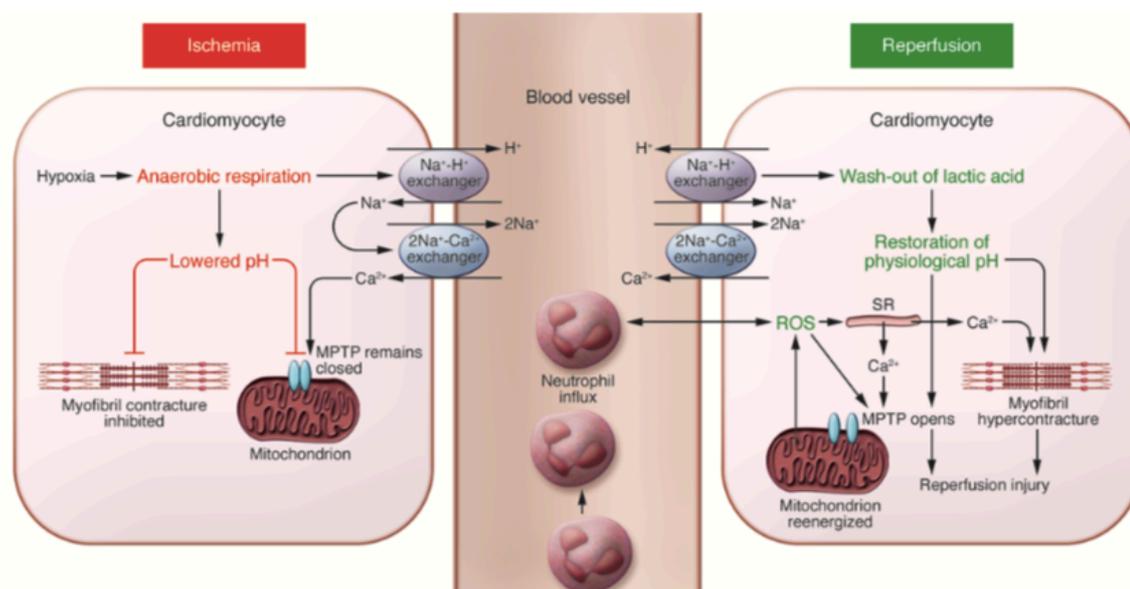


Figura 2: desenho esquemático representando as alterações intracelulares durante isquemia e reperfusão miocárdica. Retirado do periódico *The journal of clinical investigation* (HAUSENLOY; YELLON, 2013).

1.4 Estudo da isquemia e reperfusão miocárdica em modelos experimentais

Para entender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na IR e para desenvolver novas terapias, modelos animais que mimetizam as características e o desenvolvimento de um IAM no homem são indispensáveis. Desta forma, os modelos experimentais devem apresentar desordens estruturais e funcionais semelhantes às aquelas apresentadas em humanos após IAM.

Basear-se na fisiopatologia da doença é sempre a melhor forma de se obter um modelo animal fidedigno, que na maioria dos casos de IAM se deve à oclusão coronariana pelo rompimento de placas arterioscleróticas e trombose. No entanto, o curso de desenvolvimento e estabelecimento da doença coronariana nem sempre é o mesmo em diferentes espécies. Assim, para melhorar a reprodutibilidade dos resultados e diminuir vieses relacionados ao local de obstrução e tempo de desenvolvimento do infarto, a oclusão cirúrgica da coronária descendente anterior esquerda (DAE) tem sido mais utilizada do que os modelos que induzem arteriosclerose por dieta hiperlipídica (KLOCKE et al., 2007).

A técnica que induz infarto por ligadura coronariana em ratos foi implementada por Pfeffer et al. para o estudo da insuficiência cardíaca nesta espécie (PFEFFER et al., 1979, 1984). Somente com o avanço dos procedimentos de reperfusão coronariana na prática clínica e suas repercussões deletérias ao coração que os modelos de isquemia associados a reperfusão começaram a ganhar destaque na pesquisa básica. Desde então, diversos estudos empregando modelos animais de isquemia e reperfusão miocárdica, em diferentes espécies, foram publicados (MICHAEL et al., 1995; BLACK, 2000; GROSS, 2002; CHRISTIA et al., 2013). No entanto, estudos com pequenos animais, como ratos e camundongos, se destacam por serem modelos mais baratos, fáceis de manipular geneticamente e aceitos com maior facilidade pelos comitês de ética em pesquisa animal do que aqueles em animais de médio e grande porte. Apesar das vantagens, é importante mencionar que o coração de roedores apresenta diferenças fisiológicas marcantes quando comparado ao coração de humanos, como, por exemplo, a frequência cardíaca de repouso que é, aproximadamente, 5 vezes maior em roedores do que no homem (KLOCKE et al., 2007). Essas diferenças podem dificultar a transposição dos ensaios pré-clínicos em clínicos, mas estão longe de invalidar o uso de tais modelos animais.

Os procedimentos cirúrgicos para indução de isquemia e reperfusão em roedores são idênticos àqueles utilizados para isquemia permanente por ligadura da DAE com a adição de uma etapa ao final do protocolo: o desatamento ou corte do fio de sutura, usado para fazer a ligadura, após o tempo preestabelecido de duração da isquemia (figura 3). A reperfusão pode ser confirmada pela hiperemia da região miocárdica previamente pálida, devido à isquemia, e por alterações eletrocardiográficas.

Uma grande diversidade de protocolos, que variam desde o tempo de isquemia até o tempo de reperfusão, são encontrados na literatura tornando difícil um consenso sobre as repercussões do modelo de IR miocárdica na função e remodelamento cardíacos de roedores (KLOCKE et al., 2007; CHRISTIA et al., 2013; XU et al., 2014). Porém, é bem estabelecido que a duração da isquemia é fator crucial para os desfechos fisiopatológicos do modelo, assim quanto maior o tempo de isquemia maior a probabilidade de se obter grandes lesões por infartos e, conseqüentemente, redução da função cardíaca (JENNINGS; REIMER, 1981; LINDSEY et al., 2018).

Vanderveld e colaboradores mostraram que, comparado ao modelo de ligadura permanente, camundongos submetidos a 30 minutos de isquemia seguido de reperfusão miocárdica apresentaram diferenças histopatológicas e de remodelamento cardíaco (VANDERVELDE et al., 2006). O remodelamento cardíaco, caracterizado pelo afinamento das paredes ventriculares e dilatação das câmaras cardíacas, foi menos acentuado nos camundongos que tiveram o miocárdio reperfundido do que naqueles com ligadura permanente. No entanto, a reperfusão miocárdica aumentou o infiltrado inflamatório, particularmente de neutrófilos e macrófagos, bem como a deposição de colágeno na região infartada. A mortalidade foi maior no grupo de animais com ligadura permanente (VANDERVELDE et al., 2006).

Já em outro estudo realizado por Panagiota e colaboradores, camundongos submetidos a 1 hora de isquemia seguido de reperfusão miocárdica apresentaram extenso remodelamento cardíaco, representado pela dilatação das câmaras cardíacas e hipertrofia do miocárdio remanescente ao infarto, além de comprometimento funcional verificado pela redução da fração de ejeção e aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo. O aumento do processo inflamatório miocárdico também foi observado neste estudo (CHRISTIA et al., 2013).

Tendo em vista a grande variedade de protocolos encontrados na literatura e as diferenças fisiológicas e anatômicas entre as espécies, a caracterização sistemática dos modelos animais de isquemia e reperfusão é essencial para o estudo da fisiopatologia da IR e o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos para minimizar suas consequências. Apesar da vasta literatura sobre este assunto, a caracterização dos efeitos crônicos da isquemia e reperfusão na função e remodelamento cardíacos de ratos ainda é pouco documentada.

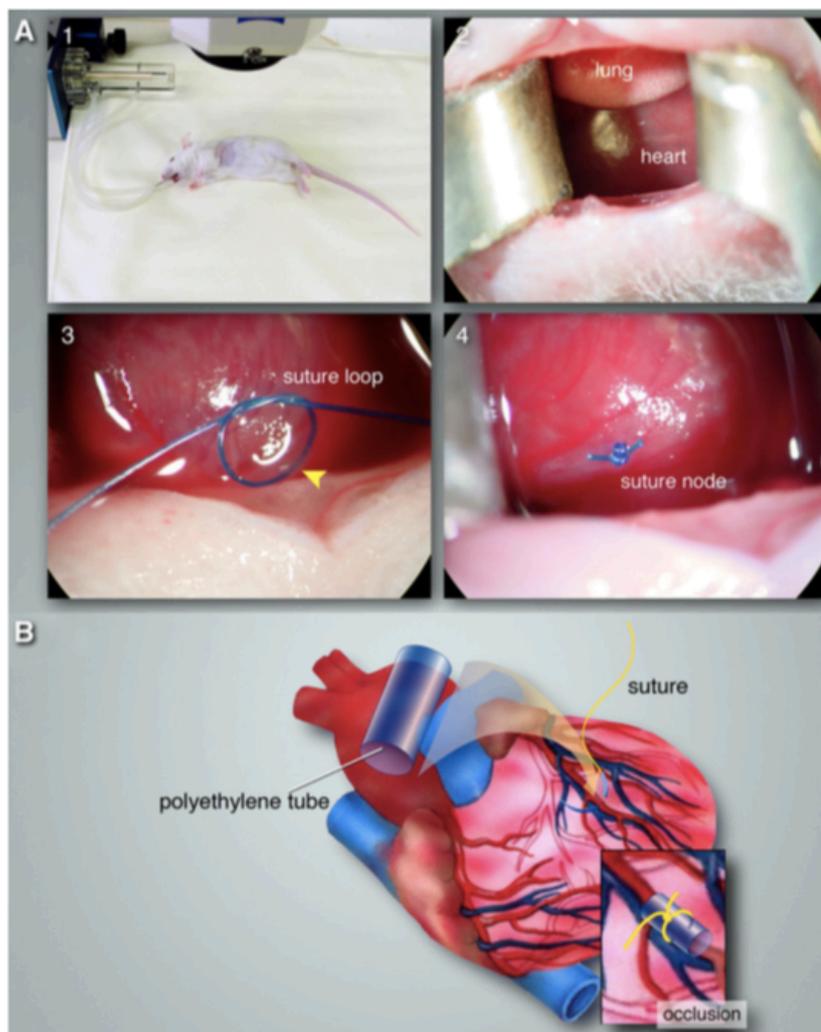


Figura 3: Imagens representativas da técnica de ligadura e reperfusão da artéria coronária DAE em camundongos. A) camundongo anestesiado e acoplado a um ventilador mecânico por intubação orotraqueal (1), toracotomia esquerda para visualização do ventrículo esquerdo (2), identificação e ligadura da coronária DAE com um fio de sutura (3 e 4). B) para modelos de isquemia e reperfusão, um pequeno pedaço de um tubo de polipropileno é amarrado junto com a coronária para facilitar o procedimento de reperfusão sem danificar o miocárdio. Figura de KLOCKE et al., 2007.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da presente tese foi caracterizar as alterações morfofuncionais, histológicas e moleculares do coração de ratos quatro semanas após isquemia e reperfusão miocárdica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em ratos submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca:

- 2.2.1 A taxa de mortalidade,
- 2.2.2 O grau de lesão miocárdica macroscopicamente identificável.
- 2.2.3 A função e remodelamento cardíaco por ecocardiografia.
- 2.2.4 O grau de deformação das fibras miocárdicas (strain), através de análises avançadas de ecocardiografia (speckle-tracking).
- 2.2.5 A congestão cardíaca pela dosagem de BNP plasmático.
- 2.2.6 A função sistólica basal e sob estresse farmacológico.
- 2.2.7 A capacidade aeróbica e performance física.
- 2.2.8 A deposição de colágeno intersticial e a expressão de ROS, TNF- α , MMP-2 e troponina I no tecido cardíaco.

3. MÉTODOS

3. Métodos

3.1 Animais

O estudo foi realizado em ratos da linhagem Wistar, adultos jovens (250 – 300 g), fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Durante todo o protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso a ração padrão e água. Os grupos experimentais foram formados por animais submetidos à cirurgia fictícia (grupo controle) ou submetidos à cirurgia para isquemia e reperfusão miocárdica. Os últimos, foram divididos, para análise dos resultados, em 3 grupos experimentais de acordo com a lesão macroscópica apresentada pelos mesmos:

- I. ratos sem lesão miocárdica (SL);
- II. ratos com lesões médias (LM), ou seja, menores do que 40% da circunferência total do VE;
- III. ratos com lesões grandes (LG), ou seja, maiores do que 40% da circunferência total do VE.

3.2 Protocolo experimental

Para a caracterização das alterações morfofuncionais e moleculares causadas pela isquemia e reperfusão no coração dos ratos, os animais foram submetidos à cirurgia fictícia (grupo controle) ou cirurgia para indução da isquemia e reperfusão miocárdica. Após os procedimentos cirúrgicos e período pós-operatório, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia, em caixas individuais com livre acesso a ração e água durante 4 semanas. Durante a quarta semana, após isquemia miocárdica, iniciou-se o período de adaptação dos animais à uma esteira rolante para o teste de velocidade máxima (V_{max}), que foi realizado após 5 dias de adaptação, ao final da quarta semana. Um dia após o teste de V_{max} , a função e remodelamento cardíacos foram avaliados por ecodopplercardiografia e, no dia seguinte, os animais foram submetidos ao teste de função cardíaca sob estresse farmacológico. Ao final do teste, os animais foram anestesiados (Uretana, 1 g/kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), o tórax foi

aberto e coração, pulmões, e fígado foram, rapidamente, removidos e pesados. O coração foi lavado em solução de salina isotônica tamponada, e fixado "overnight" em solução de formalina 10% para o processamento histológico, com exceção de uma pequena parte, a região apical, do coração que foi acondicionada em tudo criogênico e rapidamente congelada em nitrogênio líquido para posterior análise molecular. Pulmões e fígado foram armazenados em estufa durante 24 horas. Ao final do sexto dia, os órgãos foram, novamente, pesados para o cálculo da relação: peso seco/peso úmido.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

Após anestesia com ketamina e xilazina (50 e 10mg/kg i.p.) os animais foram acoplados a uma bomba de ventilação mecânica (modelo 687, Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA), por meio de intubação orotraqueal e, em seguida, submetidos à toracotomia esquerda entre o 4° e 5° espaços intercostais. Com o auxílio de espaçadores, músculos e costelas foram afastados para a visualização do coração, sem a necessidade de sua exteriorização. Após a retirada do pericárdio, a artéria coronária descendente anterior esquerda foi localizada e, em seguida, ligada com fio de sutura 4-0 a, aproximadamente, 3 mm da sua origem, entre a borda do átrio esquerdo e a artéria pulmonar. Após 30 minutos de isquemia miocárdica, o fio de sutura foi cortado para permitir a reperfusão miocárdica. Em seguida, foi realizada a sutura da musculatura intercostal e o excesso de ar da cavidade torácica foi drenado, a fim de se restabelecer a pressão negativa. Por fim, foi feita a sutura da pele e os animais receberam analgésico (Cloridrato de tramadol, 2 mg/kg, s.c.) e pentabiótico (Benzilpenicilina, 24 UI/g, i.m., 1 vez por semana). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições assépticas.

3.4 Determinação da função sistólica por ecodopplercardiografia

O exame ecodopplercardiográfico foi realizado em todos os animais 4 semanas após a cirurgia de isquemia (ou cirurgia fictícia). Foi utilizado o ecocardiógrafo Vevo 2100 System (Fujifilm, VisualSonics Inc., Toronto, Canada), com a sonda (probe) de 21 MHz. Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (50 e 10mg/kg i.p.)

e posicionados em decúbito lateral direito, para obtenção de vídeos em janela paraesternal de eixo-curto para posterior análise pelo software de *Speckle Tracking*. Na mesma janela ecocardiográfica, o cursor do modo M foi posicionado equidistante dos músculos papilares, em plano cordal, e foram capturadas imagens para mensuração da cavidade do VE em sístole e diástole, espessura do septo interventricular e parede livre do VE em sístole e diástole e cálculo da fração de ejeção, de encurtamento e débito cardíaco.

A técnica de *speckle-tracking* bidimensional (2D-STE) foi realizada para análise da deformação segmentar do VE. Para obtenção dos valores de *Strain* radial e longitudinal por 2D-STE, foram gravados três ciclos cardíacos consecutivos (70 a 110 frames/s). Esses vídeos foram analisados com o software específico para 2D-STE, VEVO LAB 1.6.0 (FujiFilm, VisualSonics Inc, Toronto, Canada).

3.5 Teste de velocidade máxima para determinação da performance aeróbica

Os animais foram inicialmente selecionados/adaptados de acordo com sua capacidade de realizar corrida em um modelo de esteira rolante EPR (Gesam, São Paulo, Brasil) (0% de inclinação). A seleção/adaptação ocorreu em um período de cinco dias, com sessões diárias com duração (5 até 20 min) e velocidades progressivas (5 até 20 m/min), nas quais foram selecionados os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo de corrida por, pelo menos, três vezes. O objetivo da adaptação também foi a redução dos níveis de estresse apresentados pelo animal frente a uma tarefa desconhecida.

No sexto dia, após a pesagem dos animais, foi realizado o teste progressivo para estimativa da V_{max} , que foi iniciado com velocidade de 6 m/min, 0% de inclinação da esteira rolante e incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão dos ratos, que foi assumida como a incapacidade dos mesmos em manterem o padrão de corrida durante a velocidade pré-determinada (FELIX; MICHELINI, 2007; FERREIRA et al., 2007). Para o cálculo da V_{max} foi utilizada a seguinte equação, adaptada para o modelo animal, inicialmente proposta para o ciclismo em seres-humanos (KUIPTERS):

$$V_{max} = \text{velocidade do estágio completo} + \left(\frac{\text{tempo do estágio incompleto}}{\text{tempo total do estágio}} \right) \cdot \text{incremento da velocidade}$$

Para estimativa do desempenho aeróbio realizado durante o teste progressivo para estimativa da V_{max} , foi utilizado o modelo dependente de massa, adaptado de Ferraresco et al. (2012), o qual permite a quantificação da performance de cada rato a partir do trabalho mecânico realizado enquanto o animal corre na esteira rolante, utilizando a fórmula:

$$\text{Performance} = \text{massa corporal} \cdot \text{distância total percorrida (kg.m)}$$

3.6 Determinação da função sistólica sob teste de estresse farmacológico

Para o teste de função ventricular sistólica sob estresse farmacológico foi utilizado como agente estressor cloridrato de dobutamina (Hypofarma, Ribeirão das Neves, Brasil). Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados com uretana (1 g/kg, i.p.), a veia femoral foi cateterizada com um tubo de polietileno (P.E. 50), para administração de dobutamina, e um cateter, específico para determinação da pressão ventricular (SPR 320: Millar Instruments, Texas, EUA), foi inserido no VE através da carótida comum direita. O cateter SPR 320 foi conectado a um amplificador e um sistema de registro (Bridge Amp acoplado ao PowerLab/4SP, ADInstruments, Bella Vista, Australia), através de um acoplador de sinal (TC - 510, Millar Instruments, EUA). Durante o registro contínuo da pressão ventricular, doses crescentes de dobutamina (1, 3, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foram administradas, intravenosamente, em *bolus*, com um intervalo de 10 minutos entre elas. A primeira derivada no tempo da pressão ventricular esquerda (dP/dt) foi calculada por meio de um programa computacional (LabChart 8.0, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e a velocidade máxima de aumento da pressão ventricular foi utilizada como índice de função sistólica.

3.7 Dosagem plasmática de BNP

Ao final do protocolo experimental, após cateterização do ventrículo esquerdo para determinação da função cardíaca sob estresse farmacológico, foi coletado 1 mL de sangue em seringa contendo 0,1 mL do anticoagulante citrato de sódio (3,8 g/dL). As amostras foram centrifugadas (3500 rpm, 20 minutos) e o plasma foi extraído e armazenado para posterior ensaio. Para determinação da fração N-terminal dos peptídeos natriuréticos atriais tipo B (NT-proBNP) no plasma, foi utilizado o método Elisa direto, com o kit de código CSB-E08752r (Cusabio, Wuhan, China) específico para a espécie em questão, com leitura das amostras em filtros de 550 e 450 nm. As curvas de calibração e as dosagens foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 Quantificação de ERO no miocárdio

3.8.1 Concentração de ânion superóxido (O_2^-)

A formação de ERO no tecido cardíaco foi avaliada por um ensaio de luminescência usando a lucigenina como acceptor de elétrons e a NADPH como substrato. Uma porção das amostras de VE, coletadas ao final do protocolo, foram homogeneizadas com um ensaio tampão (50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA e 150 mM sucrose, pH 7.4) em um homogeneizador de vidro. O ensaio foi realizado utilizando 100 μ L da amostra, 5 μ M de lucigenina, 0,1 mM de NADPH e o ensaio tampão. A luminescência foi medida por 30 ciclos de 18 s cada, em um luminômetro (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies, Ortenberg, Alemanha). As leituras basais foram obtidas antes da adição de NADPH e a reação teve início com a adição do substrato. A concentração de ânion superóxido (O_2^-) foi expressa como unidade de luminescência relativa (RLU)/ μ g de proteína.

3.8.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Outra porção das amostras de VE, coletada ao final do experimento, foi incubada em solução Krebs Henseleit. Em seguida, as amostras de VE foram congeladas com Krebs, maceradas e centrifugadas. Alíquotas de 15 μ L do

sobrenadante foram removidas e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada fluorimetricamente medindo a conversão do Amplex Red (Probes moleculares, Invitrogen, Carlsbad, EUA) (8×10^{-6} M) em um composto com maior intensidade fluorescente, resorufin (ZHOU et al., 1997), na presença de horseradish peroxidase (4 U/mL). A fluorescência do resorufin foi detectada por uma placa fluorimétrica (Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments) utilizando comprimentos de onda de 530 e 590 nm para excitação e emissão, respectivamente. As medidas de fluorescência foram corrigidas pela quantidade total de tecido.

3.9 Preparo dos extratos de coração para zimografia em gel e western blot

O ventrículo esquerdo de cada coração foi cuidadosamente coletado dos animais e armazenado em freezer -70°C . Os corações foram triturados em nitrogênio líquido e misturados ao tampão de extração [10 mM Fluoreto de Sódio (#201154, Sigma-Aldrich, EUA) ; 1 mM Ortovanadato de Sódio (#S6508, Sigma-Aldrich, EUA); 1x Coquetel Inibidor de Proteases (#S8820, Sigma-Aldrich, EUA)] diluído em tampão RIPA gelado (#R0278, Sgma-Aldrich, EUA) numa proporção de 300 μL de tampão de extração para cada 80 mg de tecido. As amostras trituradas foram então deixadas em contato com o tampão *overnight*, sob agitação lenta e constante, a 4°C . Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a 4°C , por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado no freezer -70°C .

3.9.1 Dosagem de proteínas pelo método de bradford

Os extratos de foram diluídos em água destilada nas proporções de 1:50. As amostras diluídas foram então aplicadas em placa de 96 poços juntamente com uma curva padrão de calibração de soro fetal bovino nas concentrações crescentes de 0,0875, 0,175, 0,35, 0,70, e 1,4 mg/mL. Água destilada foi usada como “branco” da reação. A placa com as amostras foi deixada em contato com o corante de Bradford por 20 minutos sob agitação lenta e abrigada da luz. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrofotometria para determinação da concentração protéica.

3.9.2 Avaliação da atividade da MMP-2 por zimografia em gel

Extratos de coração (60 µg de proteínas) foram misturadas a um tampão não redutor. Em seguida, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 8% e submetidas a eletroforese. Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2 % para remoção do SDS e foram colocados em solução 50 mM Tris-HCl e 10 mM CaCl₂ pH 7,6, por no mínimo 16 horas, a 37 °C. Posteriormente, os géis foram corados em solução Coomassie Blue 0,05% por, no mínimo, uma hora.

Para visualização das bandas referentes à MMP-2, os géis foram descorados com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Para cada gel foi utilizado um controle interno positivo (soro fetal bovino a 2%). A quantificação das bandas de MMP-2 foi feita por meio do *software Image J* (National Institute of Health, EUA). A atividade de MMP-2 foi normalizada pelo padrão de soro fetal bovino em cada gel. A MMP-2 foi identificada por meio dos seus pesos moleculares: 75, 72 e 64 KDa.

3.9.3 Quantificação da expressão proteica de troponina I por Western Blot

Os extratos de coração (60 µg) foram misturados ao tampão redutor e aquecidos a 95°C por 5 minutos, seguido de aplicação em gel de poliacrilamida a 12%. Um padrão de peso molecular (#ab116028, Abcam, EUA) foi aplicado junto às amostras para facilitar a identificação das proteínas de interesse. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose com auxílio de um aparato de transferência úmida (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, EUA) em tampão de transferência (20% metanol, 48 mM Tris-base, 39 mM glicina e 0,04 % m/v SDS) para determinação dos níveis de troponina I. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau e registradas no fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE Healthcare, EUA) para posterior normalização. As membranas foram então bloqueadas com leite a 5% diluído em tampão TBS-T (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1% Tween) por 1 hora sob agitação lenta e em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário da troponina I (diluição 1:10000 em BSA 5%, #MA-1040, IPOCDx, Canada) em agitação lenta a 4 °C.

No dia seguinte, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-*mouse* (diluição 1:10000 em TBS-T, Millipore #12-349) por 1 hora em temperatura

ambiente e visualizadas usando um *kit* de reação de quimioluminescência (Thermo Scientific, EUA) pelo fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE Healthcare, EUA). A intensidade colorimétrica (Ponceau) e quimioluminescente das bandas foi quantificada utilizando *software Image J* (National Institute of Health, EUA). A razão entre a intensidade das bandas de troponina I e do Ponceau foi utilizada como resultado de cada amostra.

3.10 PCR em tempo real para quantificação da expressão gênica de TNF- α

Para a determinação da expressão gênica de TNF- α no miocárdio, amostras do VE, coletadas em condições RNase *free* e previamente estocadas sob congelamento a -80°C, foram submetidas ao protocolo de extração do RNA total utilizando-se TRIzol reagente (ThermoFisher scientific®, Waltham, EUA). O RNA total foi quantificado por meio de espectrofotômetro (Epoch Biotek®, Winooski, EUA) e sua integridade foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 5 μ L de RNA em gel de agarose a 1%, não denaturante, corado com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (ThermoFisher scientific®, Waltham, EUA). O gel foi fotografado sob luz ultravioleta para visualização das bandas. Em seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, a partir de 2 μ g de RNA total, utilizando-se o kit comercial *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (ThermoFisher scientific®, Waltham, EUA). O cDNA obtido foi utilizado para as reações de PCR em tempo real.

A PCR em Tempo Real foi realizada com ensaios Taqman para o gene alvo, TNF- α (Rn01525859_g1) e o gene constitutivo, GAPDH (Rn01775763_g1). Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas, no Sistema StepOnePlus PCR (ThermoFisher scientific®, Waltham, EUA), utilizando o TaqMan Universal MasterMix (ThermoFisher scientific®, Waltham, EUA). As condições de termociclagem da reação de PCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento (10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C). A quantificação relativa foi realizada através do método do ciclo de quantificação (Cq) comparativo e os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para o gene constitutivo GAPDH.

3.11 Quantificação de colágeno intersticial

Secções transversais do coração, com 5 µm de espessura, foram cortadas e coradas com picrossirius vermelho. As imagens do tecido miocárdico foram adquiridas em microscopia de luz (Leica DM5500B; Leica Microsystem, Alemanha) no aumento de 40x. A quantidade relativa de colágeno foi avaliada por meio do programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Para a determinação da área infartada, os cortes transversais do coração foram digitalizados (em aumento de 100x) e analisados com o software Image J.

3.12 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm EPM. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA one-way) com pós-teste de Tukey para comparar os parâmetros de ecocardiografia, o teste de tolerância ao exercício físico, os valores máximos de pressão ventricular em condições basais e os dados moleculares e histológicos. Para a comparação dos valores de pressão ventricular durante teste de estresse farmacológico e da deformação regional do miocárdio (strain) foi utilizada análise de variância de duas vias (ANOVA two-way) seguido do pós-teste de Holm-Siday. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SigmaStat V3.5 (Systat Software Inc., San Jose, EUA) e os gráficos foram gerados por meio do programa Graphpad Prism 8.0 (Graphpad, San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Sobrevivência e grau de lesão miocárdica após IR.

Onze animais morreram no início do procedimento de reperfusão miocárdica, durante episódios de fibrilação ventricular, quatro animais morreram 24 horas após a reperfusão e três animais morreram 14 dias após isquemia (figura 4A). Considerando todas as mortes ocorridas durante o protocolo experimental, a taxa de mortalidade após a isquemia e reperfusão miocárdica foi de 28%. Os animais que sobreviveram à isquemia e reperfusão apresentavam cicatrizes miocárdicas de tamanhos distintos ou não apresentavam nenhum tipo de lesão macroscópica. Por este motivo, os animais foram divididos em 3 grupos: animais sem lesões macroscópicas, IR(SL); animais com lesões transmurais menores do que 40% da circunferência total do VE, IR(LM); e animais com lesões transmurais maiores do que 40% da circunferência total do VE, IR(LG). Como apresentado na figura 4B, os animais sobreviventes à IR apresentaram a seguinte distribuição: 45% dos animais não apresentaram lesões aparentes no miocárdio, 38% apresentaram lesões médias e 17% apresentava lesões grandes (figura 4B).

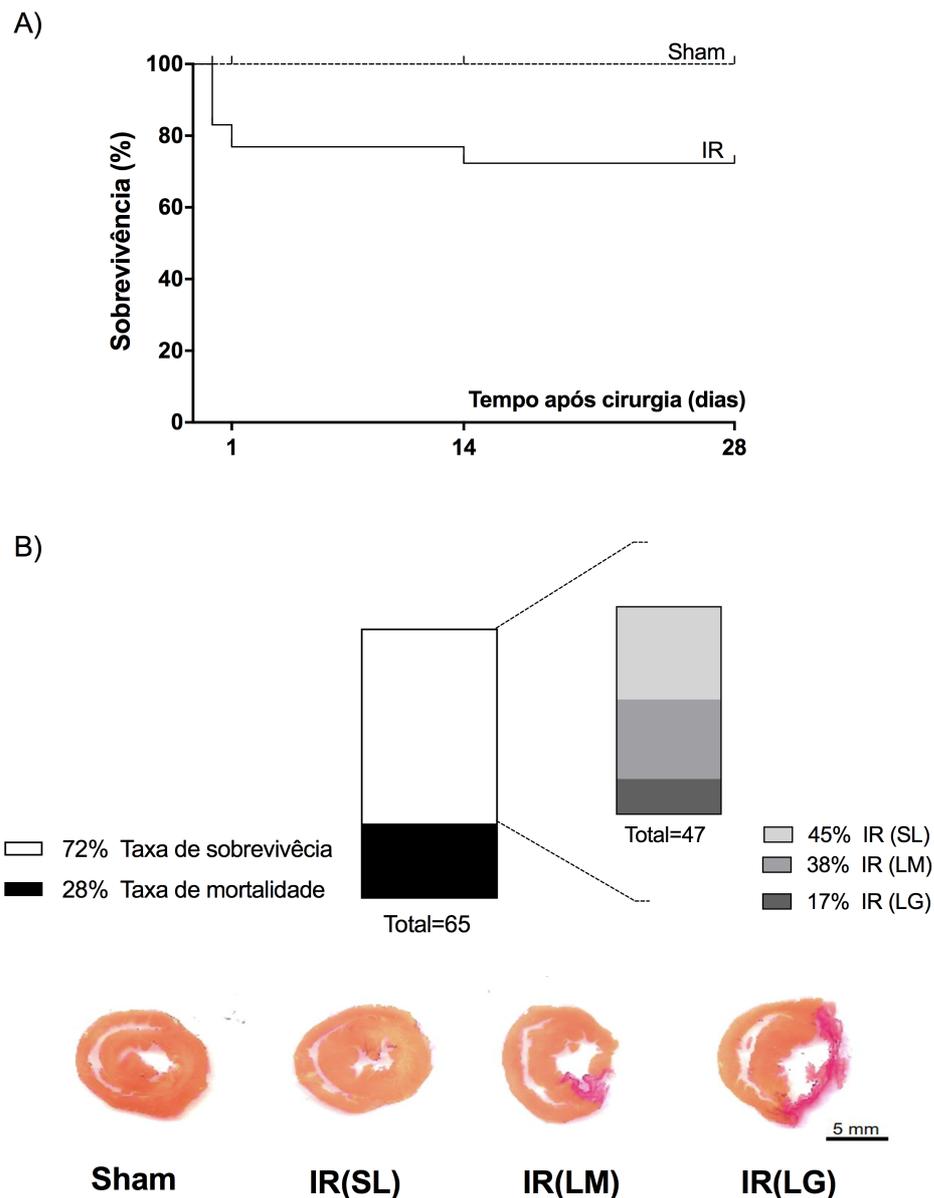


Figura 4: Taxa de sobrevivência e grau de lesão miocárdica macroscópica após isquemia e reperfusão. A) Porcentagem de sobrevivência (Kaplan-Meier) dos animais submetidos à cirurgia de isquemia e reperfusão miocárdica durante 4 semanas. B) Distribuição dos animais em 3 grupos de acordo com o tamanho da lesão miocárdica: IR(SL), sem lesão macroscópica; IR(LM), com lesão transmural e menor do 40% do VE; e IR(LG), com lesões maiores do que 40% do VE. Note a cicatriz fibrótica corada em rosa escuro nas imagens representativas das secções transversais do miocárdio dos grupos IR(LM) e IR(LG).

4.2 Características gerais

As características gerais observadas nos animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham) ou de isquemia e reperfusão miocárdica estão sumarizadas na tabela 1. O peso corporal foi similar entre os grupos, já o peso do coração normalizado pelo peso corporal se apresentou aumentado nos animais com lesão grande, sugerindo uma hipertrofia do miocárdio sobrevivente à lesão de IR. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais para o peso do pulmão e fígado normalizados pelo peso corporal, indicando que não houve congestão destes órgãos e, portanto, nenhum sinal de insuficiência cardíaca congestiva.

Tabela 1. Características gerais de ratos 4 semanas após isquemia-reperfusão (IR) miocárdica ou cirurgia fictícia (Sham).

	Sham n=7	IR(SL) n=6	IR(LM) n=6	IR(LG) n=6
Peso corporal (g)	419 ± 0,01	485 ± 0,03	567 ± 0,01	547 ± 0,02
Peso do coração/peso corporal (mg/g)	3,7 ± 0,07	3,8 ± 0,15	3,7 ± 0,09	4,7 ± 0,3**#
Peso do pulmão/peso corporal (mg/g)	2,8 ± 0,13	3 ± 0,3	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,2
Peso do fígado/peso corporal (mg/g)	36 ± 1,7	35 ± 1,5	34 ± 0,7	35 ± 1,2
Tamanho do infarto	0	0	21 ± 3	46 ± 1,2

* P<0,05 vs. Sham, + P<0,05 vs. IR (SL), # P<0,05 vs. IR (LM). Valores expressos como média ± EPM.

4.3 Determinação da função e remodelamento cardíacos por ecocardiografia

4.3.1 Parâmetros morfométricos

A morfometria das estruturas cardíacas, obtidas por ecocardiografia bidimensional em eixo curto (modo M) esta apresentada na tabela 2. O aumento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo (tanto em sístole quanto em diástole) e a redução da espessura da parede ventricular (sístole) em ratos com lesão média e grande quando comparados com ratos sham, confirmam o inicio do remodelamento cardíaco nesses animais. Não foi observada diferença a espessura do septo interventricular entre os grupos e na relação entre átrio esquerdo e aorta.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos obtidos por ecocardiografia 4 semanas após isquemia-reperfusão miocárdica (IR) e cirurgia fictícia (Sham).

	Sham (n=7)	IR(SL) (n=8)	IR(ML) (n=9)	IR(LG) (n=7)
DdVE (mm)	8,4 ± 0,1	8,6 ± 0,2	10,5 ± 0,4**	12,3 ± 0,3***#
DsVE (mm)	5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	8,2 ± 0,5**	10,3 ± 0,4***#
SIV,d (mm)	1,4 ± 0,03	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1
SIV,s (mm)	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
PPVE,d (mm)	2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1**
PPVE,s (mm)	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3**	1,2 ± 0,1**
AE/Ao (au)	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,04	2,1 ± 0,04	2,2 ± 0,2

DdVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DsVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, SIV,d: septo interventricular na diástole; SIV,s: septo interventricular na sístole; PPVE,d: parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; PPVE,s: parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole; AE/Ao: átrio esquerdo/aorta. Valores estão expressos como média ± EPM, *p<0,05 vs. Sham, + p<0,05 vs. IR (SL), # p<0,05 vs. IR (LM).

4.3.2 Parâmetros funcionais: fração de ejeção e fração de encurtamento

A avaliação da função cardíaca por ecocardiografia esta representada na figura 5. A fração de ejeção e fração de encurtamento, parâmetros que estimam a função sistólica, se apresentaram reduzidas apenas nos animais com lesão média e grande quando comparados com os animais Sham. Nenhuma diferença foi observada para este parâmetro nos animais sem lesão miocárdica.

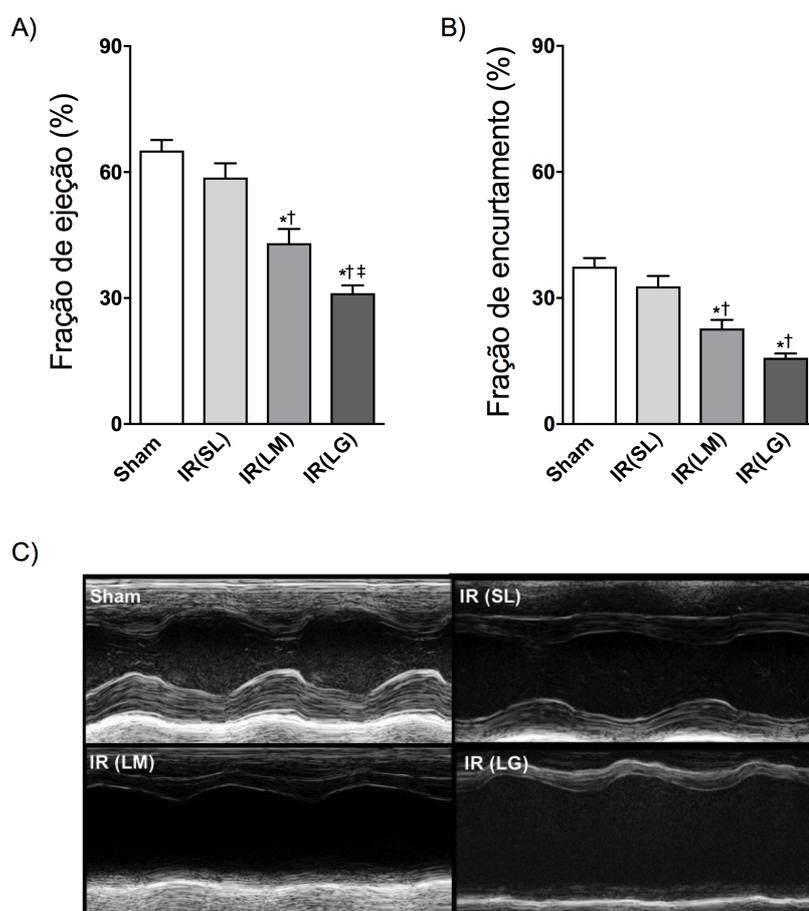


Figura 5: Função sistólica avaliada por ecocardiografia. A) fração de ejeção e B) fração de encurtamento avaliadas 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. C) imagens ecocardiográficas do coração em modo-M, eixo curto. Note acinesia da parede livre do VE nos animais com lesão média e grande. * $p < 0,05$ vs. Sham; + $p < 0,05$ vs. IR(SL); † $p < 0,05$ vs. IR(LM).

4.3.3 Deformação miocárdica (strain) radial e circunferencial

A figura 6 mostra a taxa de deformação global das fibras miocárdicas (Strain) no sentido radial e circunferencial bem como a correlação entre strain (radial e circunferencial) e a densidade de colágeno no miocárdio. Todos os animais submetidos à IR miocárdica apresentam redução do strain circunferencial, independente do grau de lesão. Já o strain radial se apresentou significativamente reduzido nos animais com lesão média e grande; e os animais sem lesão apresentaram uma forte tendência ($p=0,06$) a redução do strain radial.

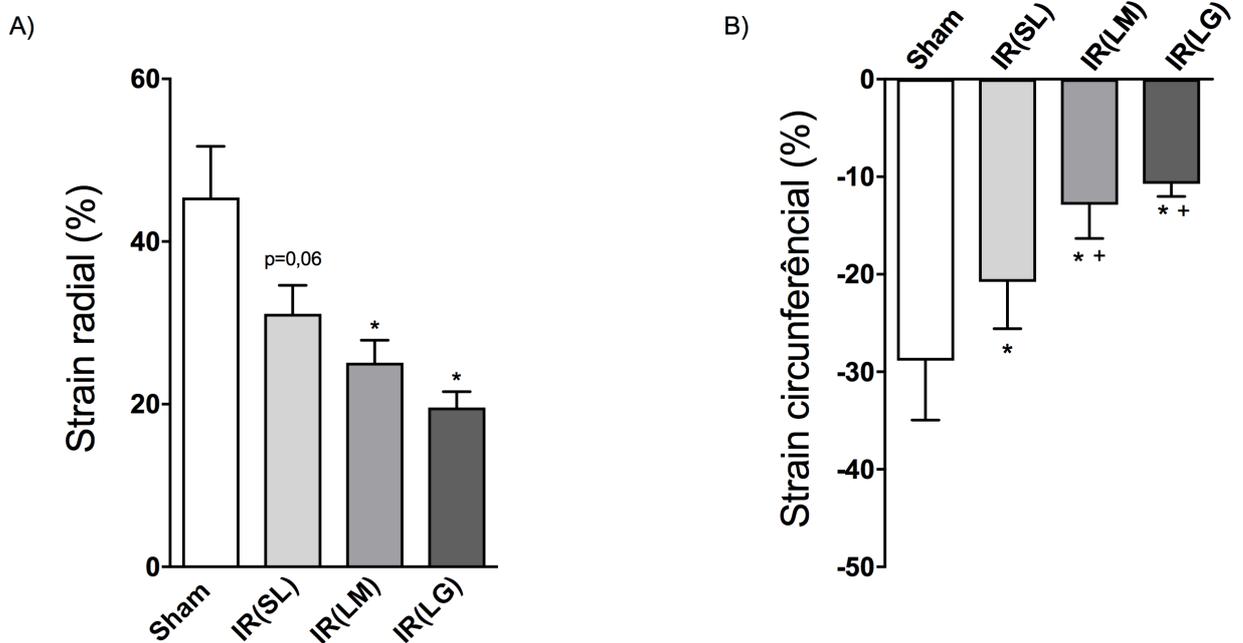


Figura 6: Deformação radial e circunferencial das fibras miocárdicas e sua correlação com a deposição de colágeno intersticial. A) strain radial e B) strain circunferencial 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. * $p<0,05$ vs. Sham; + $p<0,05$ vs. IR(SL).

4.4 Avaliação da primeira derivada máxima da pressão ventricular (dP/dt máxima) em condições basal e sob estresse farmacológico

A taxa máxima de aumento da pressão ventricular esquerda medida pelo valor máximo da dP/dt positiva ($+dP/dt$ max), bem como a resposta da dP/dt máxima à administração de doses crescentes de dobutamina estão representadas na figura 7. Note que a $+dP/dt$ máx se apresentou reduzida em todos os animais submetidos à IR, independente da presença ou do grau de lesão miocárdica, quando comparado ao grupo Sham. Como esperado, a administração de dobutamina produziu um efeito dose-dependente na $+dP/dt$ máx em todos os animais. No entanto, os ratos com lesões miocárdicas grande apresentaram um comprometimento na resposta contrátil do coração nas doses de 3, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de dobutamina quando comprado ao grupo controle. Já os animais sem lesão cardíaca ou com lesões médias foi observado déficit de resposta contrátil apenas na dose de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de dobutamina.

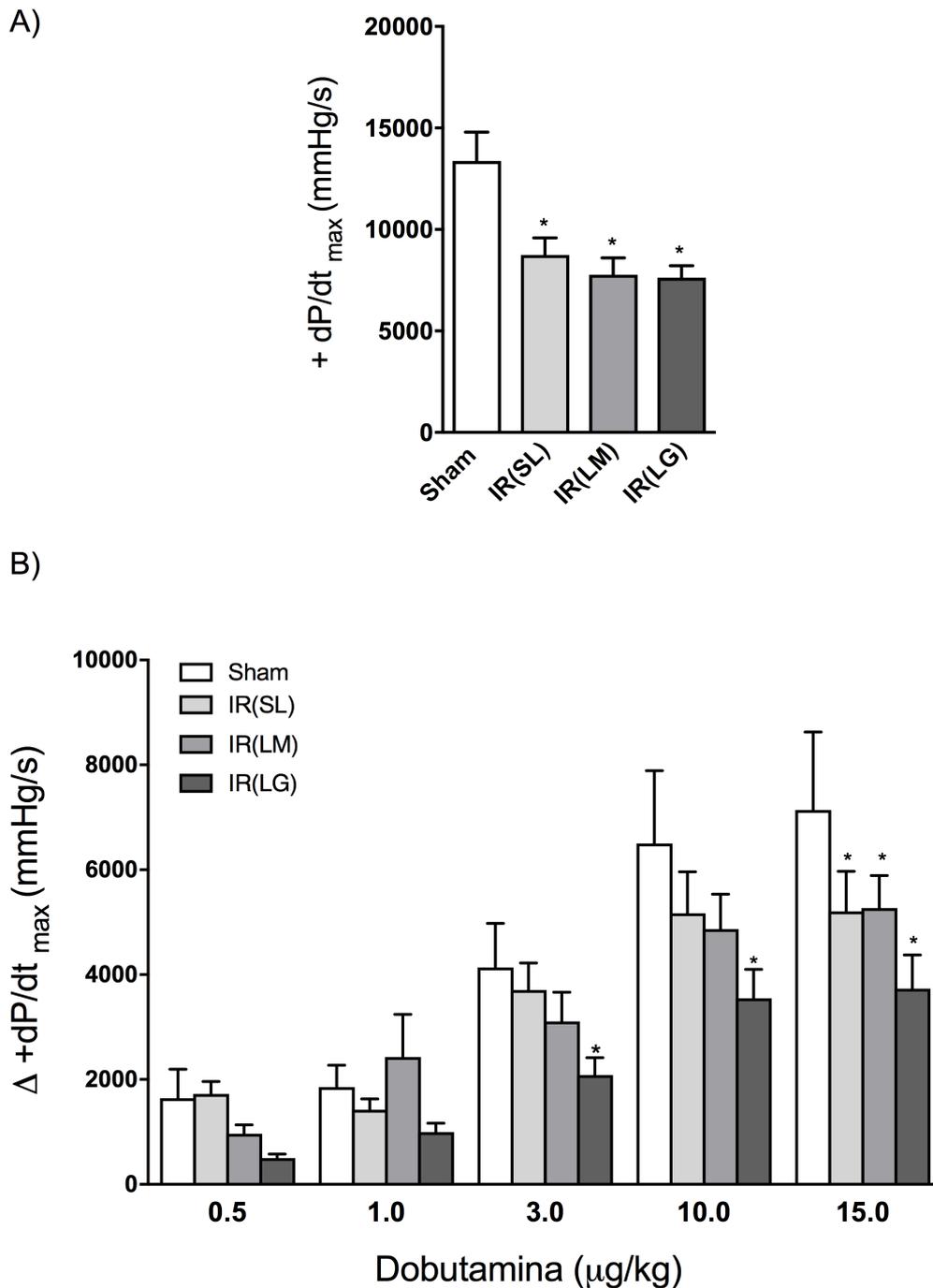


Figura 7: Quantificação da taxa máxima de aumento da pressão ventricular esquerda (+dP/dt max) em condições basais e durante administração de doses crescentes de dobutamina. A) +dP/dt max basal e B) após administração de dobutamina nas doses de 0,5, 1, 3, 10 e 15 μg/kg, 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. * p<0,05 vs. Sham.

4.5 Teste de tolerância ao exercício físico – Vmax

Os resultados do teste de velocidade máxima (Vmax) e performance física estão apresentados na figura 8. Uma tendência a redução da Vmax, mas não estatisticamente significativa, foi observada nos animais com lesão cardíaca grande. No entanto, uma redução significativa da performance física foi observada em todos os animais submetidos à IR miocárdica, inclusive naqueles animais que não apresentavam lesão cardíaca.

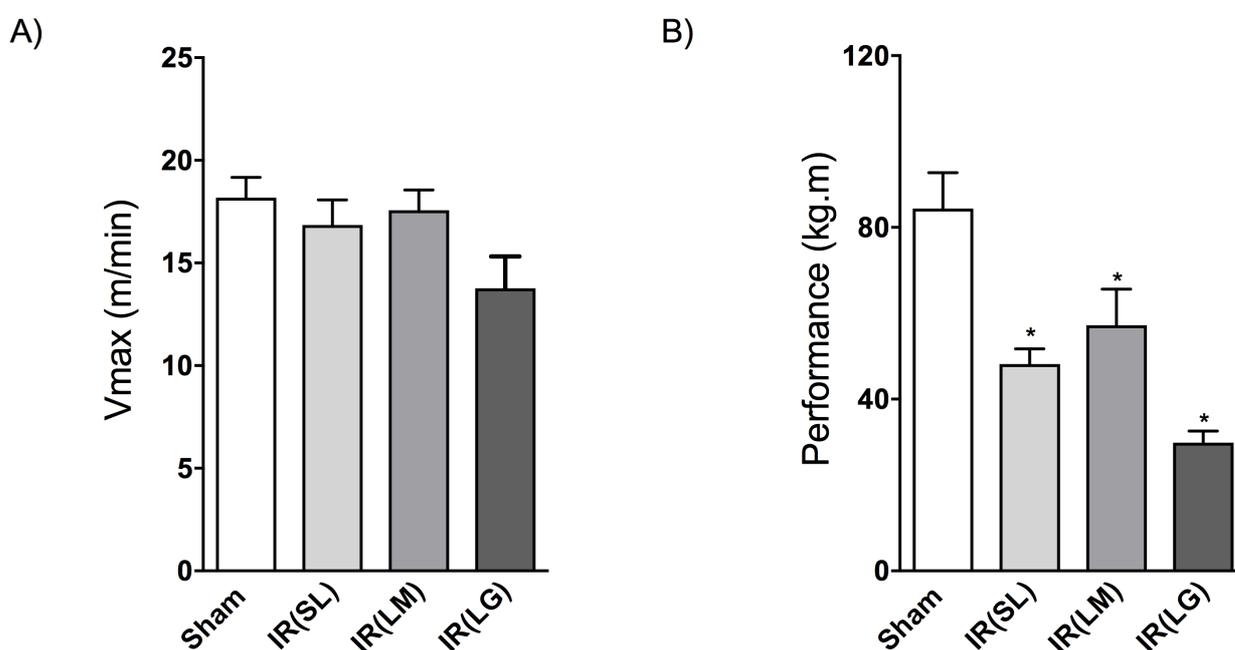


Figura 8: A) teste de velocidade máxima e B) índice de performance física em ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. * $p < 0,05$ vs. Sham.

4.6 Dosagem plasmática de NT-proBNP

A dosagem plasmática de NT-proBNP esta representada na figura 12. Foi observado aumento significativo do NT-proBNP plasmático apenas nos animais com lesões médias e grandes, quando comparado com os animais do grupo sham, indicando sobrecarga de volume no coração desses animais.

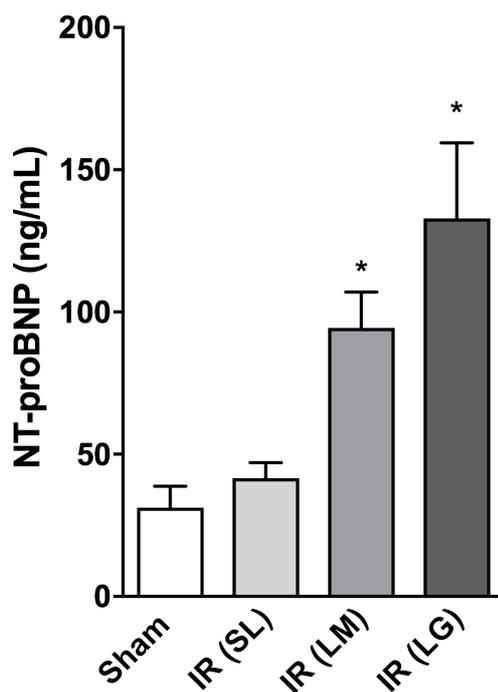


Figura 9: Dosagem de NT-proBNP no plasma de ratos submetidos a IR ou cirurgia fictícia 4. * $p < 0,05$ vs. Sham.

4.7 Quantificação de ERO (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) e TNF- α no tecido cardíaco

A quantificação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (O_2^- e H_2O_2), bem como a expressão gênica de TNF- α estão representados na figura 9. Altas concentrações de O_2^- e H_2O_2 foram observadas nos animais com lesão média ou sem lesão miocárdica comparado ao grupo Sham, ao passo que o aumento de O_2^- e H_2O_2 nos animais com grandes lesões miocárdicas não foi estatisticamente significativo. Já a expressão gênica de TNF- α estava aumentada em todos os animais submetidos à IR, independente da presença ou grau de lesão miocárdica, quando comparados com o grupo Sham.

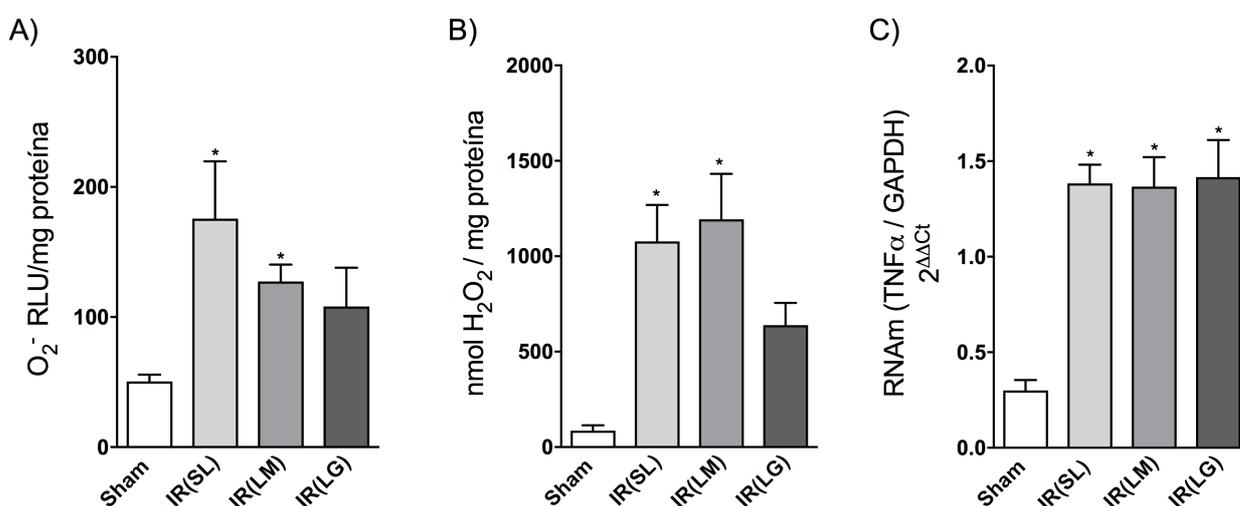


Figura 10: Concentração de espécies reativas de oxigênio e expressão gênica de TNF- α no miocárdio de ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. A) concentração de ânion superóxido, B) concentração de peróxido de hidrogênio e C) expressão gênica de TNF- α no miocárdio. * $p < 0,05$ vs. Sham.

4.8 Deposição de colágeno intersticial e atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) no coração de ratos Wistar

A densidade de colágeno intersticial no septo interventricular (figuras 10A e B) estava aumentada em todos os animais submetidos à IR, independente da presença ou grau de lesão miocárdica, quando comparado ao grupo Sham. Em adição, todos os ratos submetidos à IR também apresentaram aumento na atividade da MMP-2 (figuras X C e D) comparados ao grupo Sham, indicando que o processo de reparação tecidual também está aumentado em áreas não infartadas.

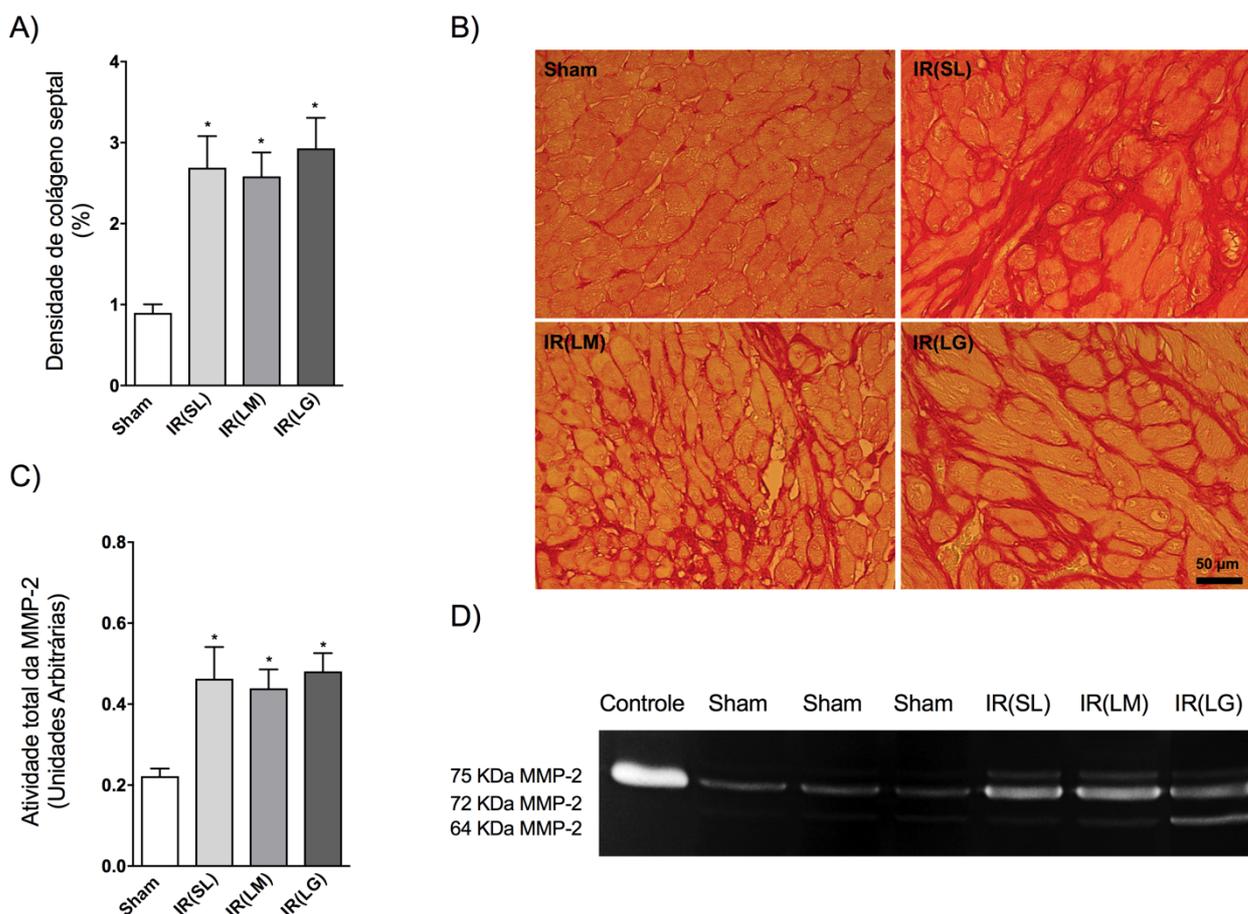


Figura 11: Colágeno intersticial e atividade das MMP-2 no miocárdio de ratos 4 semanas após IR miocárdica ou cirurgia fictícia. A) quantificação da deposição de colágeno intersticial na região do septo interventricular, B) imagens representativas das lâminas histológica, de cada um dos grupos experimentais, coradas com picrossirius vermelho e utilizadas na quantificação de colágeno, C) quantificação da atividade total da MMP-2 no tecido miocárdico e D) gel representativo da técnica de zimografia utilizada na quantificação da atividade das 3 isoformas de MMP-2 nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ vs. Sham.

4.9 Correlação entre a deformidade das fibras miocárdicas (strain) e a deposição de colágeno no coração

A figura 11 mostra a correlação entre strain circunferencial e radial com a deposição de colágeno no miocárdio. Tanto o strain radial quanto o strain circunferencial apresentaram correlação negativa com a deposição de colágeno intersticial, ou seja, quanto maior a deposição de colágeno, menor a deformação das fibras miocárdicas.

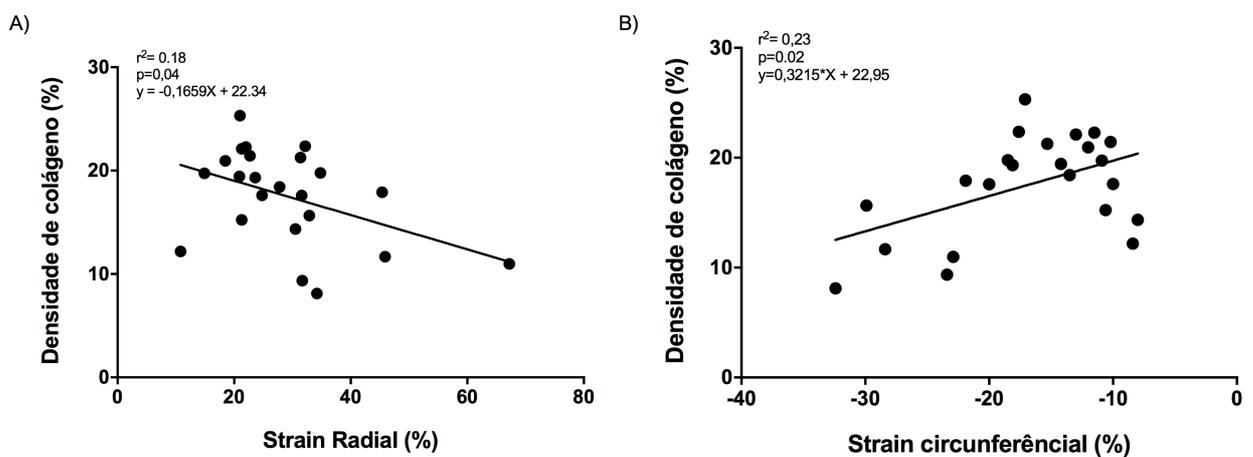


Figura 12: A) correlação entre strain radial e B) strain circunferencial e a quantificação de colágeno intersticial no miocárdio de ratos submetidos à IR miocárdica ou cirurgia fictícia.

4.10 Expressão proteica de troponina I

A figura 13 representa a expressão proteica de troponina I. Comparado com o grupo sham, apenas os animais sem lesão apresentaram redução significativa da expressão de troponina I no miocárdio.

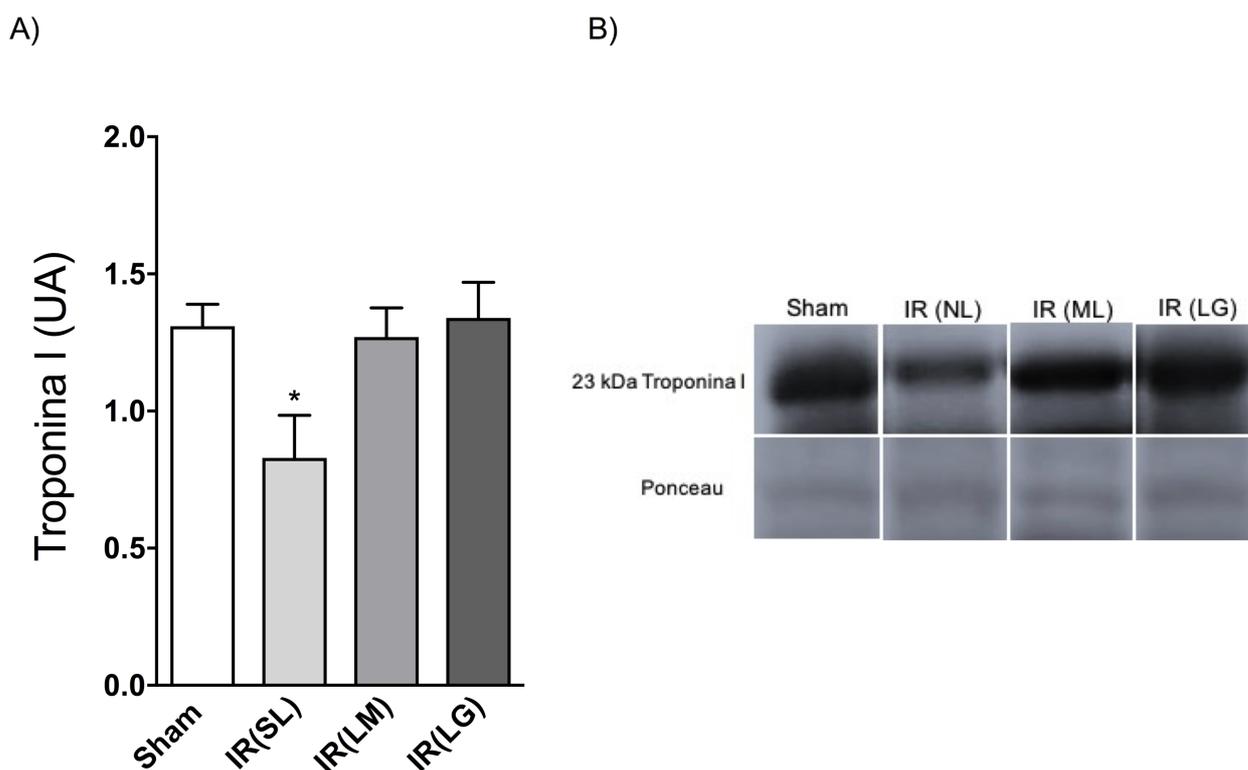


Figura 13: A) quantificação da expressão proteica de troponina I no miocárdio de ratos submetidos a IR ou cirurgia fictícia e B) figura representativa das bandas de troponina I, em gel de eletroforese, de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs. Sham.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

Este estudo teve como objetivo caracterizar as alterações morfofuncionais, histológicas e moleculares causadas pela IR no coração de ratos Wistar após 4 semanas dos procedimentos cirúrgicos. Os resultados mostraram que apesar da cirurgia para indução de IR ter sido realizada pela mesma pessoa, seguindo estritamente os mesmos procedimentos, uma grande heterogeneidade de lesões miocárdicas foi observada entre os animais. Este achado pode ser interpretado pela variação anatômica das artérias coronárias dentro de uma mesma espécie (MICHAEL et al., 1995; KLOCKE et al., 2007) e destaca a importância da caracterização do modelo.

Além disso, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que mesmo os animais que não apresentavam lesões miocárdicas macroscópicas, ou seja, sem cicatriz de infarto no coração, desenvolveram disfunção sistólica em condições basais e mediante estresse fisiológico e farmacológico, bem como importantes alterações histológicas (fibrose) e moleculares.

Após 4 semanas do procedimento de 30 minutos de isquemia, seguida do restabelecimento da perfusão miocárdica, apenas uma pequena parcela de animais (17%) apresentou lesões miocárdicas transmuralis que comprometiam mais do que 40% da circunferência total do VE. Esses animais também apresentavam severa disfunção sistólica com aumento dos níveis de NT-proBNP plasmático, um importante biomarcador de insuficiência cardíaca (PANAGOPOULOU et al., 2013). Outra parcela de animais (38%) apresentou infartos moderados, ou seja, cicatrizes menores do que 40% da circunferência total do VE, com disfunção sistólica em condições basais e sob estresse, porém não tão severa quanto aquela dos animais com lesões grandes.

Interessantemente, apesar da grande maioria (45%) dos animais não apresentar lesões miocárdicas macroscópicas e nem remodelamento cardíaco (figura 4B), foi observado comprometimento da função sistólica, especialmente, sob condições de estresse e também por técnicas mais sensíveis de ecocardiografia utilizadas neste estudo.

Independente do grau da lesão miocárdica, todos os animais submetidos à isquemia por 30 min mostraram marcantes alterações histológicas e moleculares no coração, quando comparados aos animais controle (sham), dentre elas, aumento de ERO, e da expressão gênica de TNF- α . Aumento da deposição de colágeno septal e

da atividade das MMP-2 também foram observados. Curiosamente, apenas os animais sem lesão cardíaca apresentaram redução da expressão proteica de troponina I.

As injúrias causadas pela reperfusão do miocárdio isquêmico podem ser subdivididas em 4 tipos diferentes, sendo as duas primeiras reversíveis e as outras duas irreversíveis, são elas: 1) as arritmias ventriculares, que podem ser fatais ou passíveis de tratamento; 2) o *stunning* miocárdico, também conhecido como miocárdio hibernante, que é caracterizado por uma disfunção contrátil temporária e reversível que pode ser ocasionada pelo estresse oxidativo e/ou sobrecarga de cálcio; 3) a obstrução microvascular, ou fenômeno de *no-reflow*, causada por danos nos capilares do miocárdio e por micro-embolização de fragmentos da placa aterosclerótica, liberados no momento da reperfusão, que impedem o reestabelecimento do fluxo coronarianos em algumas regiões do miocárdio, além de pequenos trombos formados pela agregação plaquetária e neutrofílica que também podem comprometer a eficácia do procedimento de reperfusão (ITO, 2006; LUO; WU, 2006; HEUSCH et al., 2009; KLEINBONGARD PETRA et al., 2011); e 4) a injúria letal causada pela morte dos cardiomiócitos que ainda eram viáveis ao final da isquemia miocárdica (PIPER; GARCÍA-DORADO; OVIZE, 1998), os principais fatores que contribuem para este tipo de lesão incluem o estresse oxidativo, a inflamação, a sobrecarga de cálcio com consequente hipercontratilidade das miofibrilas e a abertura dos PPTM (YELLON; HAUSENLOY, 2007b).

Neste estudo foi possível observar a ocorrência de fibrilação ventricular no momento da reperfusão, que em alguns animais foram fatais, e a morte das células cardíacas (injúria letal) representada pela cicatriz fibrótica presente nos animais com lesões médias e grandes. Acreditamos que nos animais sem lesão, o fenômeno de *no-reflow* possa ter contribuído para o aumento de colágeno intersticial quantificado na região septal e, conseqüentemente, para a disfunção sistólica observada nesses animais. No entanto, para confirmar a ocorrência deste fenômeno novos estudos devem ser realizados para avaliar o grau de comprometimento dos capilares miocárdicos nesta região.

Outro dado importante deste estudo é que apesar de ser crônico, ou seja, as avaliações foram feitas apenas na quarta semana após a isquemia seguida de restabelecimento da perfusão coronariana, todos os animais, independente do grau de lesão macroscópica do coração, apresentaram comprometimento da função

cardíaca, confirmado por exames ecocardiográficos e por avaliação da pressão no VE, associadas às marcantes alterações histológicas e moleculares observadas no coração desses animais.

Sabe-se que um dos principais vilões na reperfusão de regiões isquêmicas é aumento do estresse oxidativo no músculo cardíaco, marcado pela intensa formação de ERO em detrimento dos sistemas antioxidantes (VENDITTI; MASULLO; DI MEO, 2001; NAVARRO-YEPES et al., 2014).

A produção e liberação de ERO durante a reperfusão do miocárdio isquêmico foi confirmada, pela primeira vez, por Zeweier e colaboradores utilizando espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons para medir a formação de radicais livres de oxigênio em corações de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão (ZWEIER; FLAHERTY; WEISFELDT, 1987), depois disso diversos estudos pré-clínicos (KURIAN; PADDIKKALA, 2009; KURIAN et al., 2010) e clínicos (KURIAN; PADDIKKALA, 2010) mostraram que o tratamento com antioxidantes poderia conferir proteção às injúrias causadas pela isquemia e reperfusão miocárdica.

Apesar da diversidade de fontes que podem gerar ERO durante a reperfusão, a mitocôndria tem ocupado papel de destaque devido a sua capacidade de detectar os níveis de oxigênio (KURIAN et al., 2016). Assim, o vazamento de elétrons dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, durante a reperfusão, é responsável pela formação de um subtipo específico de ERO: o aniôn superóxido (O_2^-), resultado da interação do oxigênio molecular com os elétrons provenientes da cadeia respiratória (TANAKA-ESPOSITO; CHEN; LESNEFSKY, 2012).

O O_2^- danifica os fosfolípides da membrana interna da mitocôndria resultando na desestabilização dos supercomplexos da cadeia respiratória mitocondrial, o que resulta na redução da produção de ATP (PARADIES et al., 2002; GADICHERLA et al., 2012). O O_2^- formado também pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outro subtipo de ERO, pelo sistema catalítico da superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea (CAMARA; LESNEFSKY; STOWE, 2010). Por sua vez, o H_2O_2 é usado como substrato, pelas mieloperoxidases presentes nos leucócitos, para a formação de hipoclorito (HOCl), um potente oxidante de macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas, glicoproteínas e DNA (HO et al., 2013).

Além dos danos moleculares, as ERO também iniciam processos inflamatórios (FRANK et al., 2012) através da estimulação de fatores de transcrição, como o $NF\kappa B$,

que promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α (CHANDRASEKAR; SMITH; FREEMAN, 2001; GERCZUK; KLONER, 2012). Sabe-se que o excesso de TNF- α e a consequente estimulação do seu receptor, TNFR-1, induz disfunção contrátil, hipertrofia, fibrose e morte celular (KLEINBONGARD; SCHULZ; HEUSCH, 2011).

Mecanismos propostos para explicar o efeito deletério do TNF- α sobre a função cardíaca foram elucidados por estudos que mostraram redução na recaptção e liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, bem como a diminuição da responsividade dos miofilamentos contráteis ao cálcio (KLEINBONGARD; SCHULZ; HEUSCH, 2011), na presença de grandes quantidades de TNF- α . Além disso, o TNF- α aumenta a metilação da região promotora do gene da bomba SERCA2a, proteína responsável pela receptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático, o que culmina com a redução de sua expressão gênica e proteica (KAO et al., 2010).

Além das ações do TNF- α na homeostase do cálcio, elevadas concentrações desta citocina também pode prejudicar a função contrátil do coração por aumentar a formação de ERO através da estimulação da atividade enzimática da NADPH oxidase e xantina oxidase. (FERDINANDY et al., 2000). Assim, um ciclo vicioso é estabelecido: ERO estimulando a formação de TNF- α , que por sua vez, aumenta ainda mais a produção de ERO, ambos contribuindo para a deterioração da função cardíaca.

Outra ação do aumento do estresse oxidativo no coração é a ativação das metaloproteinases-2 (MMP-2), também conhecidas como gelatinase A ou colagenase tipo IV, por serem capazes de degradar um dos principais componentes da matrix extracelular, o colágeno tipo IV. Tanto as ERO como as espécies reativas de nitrogênio são capazes de ativar a MMP através de uma via que, não necessariamente, envolve a remoção proteolítica do seu domínio auto inibitório e sim através de uma mudança conformacional da sua estrutura molecular (SCHULZ, 2007; VIAPPIANI et al., 2009).

As MMP exercem importante papel em funções fisiológicas, como a embriogênese e a angiogênese, e fisiopatológicas. Assim, no coração sadio as MMP são expressas de forma ubíqua junto com seus inibidores endógenos, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). No entanto, o desbalanço entre MMP e TIMP, devido ao aumento da atividade das MMP, tem participação importante na

fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares, como, por exemplo, a IR (SCHULZ, 2007).

Schulz e colaboradores mostraram que as MMP, mais especificamente as MMP-2, são as principais proteases envolvidas na redução da função cardíaca após reperfusão (MCDONOUGH; ARRELL; VAN EYK, 1999; KURIAN et al., 2016). Além disso, as MMP-2 foram encontradas, significativamente, aumentadas no efluente coronariano de uma preparação de coração isolado de ratos após isquemia e reperfusão miocárdica, sendo a concentração das MMP-2 inversamente proporcional à recuperação da função mecânica cardíaca (CHEUNG et al., 2000). Assim, ficou estabelecido que a participação das MMP-2 na fisiopatologia da IR vai além da degradação de componentes da matriz extracelular para a modulação de processos celulares, como por exemplo, a agregação plaquetária, o tono vascular e a degradação de componentes da maquinaria contrátil do coração (WANG et al., 2002; SCHULZ, 2007).

Assim, foi observado que as MMP-2 também são encontradas dentro das células cardíacas, mais especificamente nos sarcômeros, e estão co-localizadas com os filamentos finos, sendo responsáveis pela degradação da troponina I, após isquemia e reperfusão miocárdica, levando a disfunção contrátil do músculo cardíaco (WANG et al., 2002).

A contração do músculo estriado esquelético e cardíaco é regida pela concentração intracelular de cálcio através de proteínas regulatórias como a troponina e a tropomiosina. A troponina possui três subunidades sendo uma delas a subunidade inibitória (TnI), responsável pelo desacoplamento da interação entre os filamentos de miosina e actina na ausência de cálcio (GOMES; POTTER; SZCZESNA-CORDARY, 2002; PARK et al., 2017). Diferente da TnI do musculo esquelético, a TnI cardíaca possui um domínio específico na porção N-terminal com *sítes* para fosforilação pela proteína kinase A, e este domínio faz da TnI uma importante proteína regulatória durante a contração miocárdica (KRUDY et al., 1994). A habilidade da TnI em regular a contração cardíaca foi destacada quando a deleção da sua porção N-terminal apresentou um importante efeito na capacidade de interagir com a subunidade C da troponina e estimular a atividade da ATPase miofibrilar (GUO; MARTIN; SOLARO, 1996; GAO WEI DONG et al., 1997). Isso destaca os efeitos deletérios da degradação da TnI pelas MMP-2 após a isquemia e reperfusão miocárdica.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que todos os animais submetidos a IR miocárdica apresentaram níveis aumentados de O_2^- e H_2O_2 , bem como aumento da expressão de TNF- α , MMP-2 e da deposição de colágeno, no músculo cardíaco, após 4 semanas. Este perfil molecular, somado à redução da expressão proteica de TnI no miocárdio, pode explicar a disfunção sistólica observada mesmo nos animais sem lesões cardíacas macroscópicas.

Entretanto, um fato intrigante foi que apenas os animais sem lesão miocárdica apresentaram diminuição da expressão proteica de TnI e uma possível explicação seria que devido à intensa degradação de TnI nos animais com lesões moderadas e grandes um mecanismo compensatório de ressíntese da TnI esteja presente após 4 semanas. Sabe-se que o tempo médio de *turnover* da TnI é de aproximadamente 3,2 dias e que apenas esta subunidade da troponina possui um *pool* citoplasmático de reserva (MARTIN, 1981).

Além das alterações funcionais, histológicas e moleculares, os animais submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca também apresentaram redução da performance física, ressaltando a incapacidade do coração em manter o débito cardíaco em situações de estresse, como durante atividades físicas extenuantes. Apesar de não termos medido o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) nestes animais, padrão ouro para determinação da capacidade funcional, Rodrigues e colaboradores mostraram que o teste de velocidade máxima, no qual os animais correm em uma esteira apropriada até a exaustão (KUIPERS et al., 1985), possui correlação com a VO_{2max} e pode ser usada como indicador da capacidade cardio-respiratória em ratos, além de ser uma técnica segura e bem tolerada pelos animais (RODRIGUES et al., 2007). Somado a isso, os resultados do teste físico foram confirmados pelos resultados do índice de contratilidade cardíaca ($+dP/dt_{max}$) durante o estresse farmacológico com dobutamina, agonista β_1 adrenérgico que possui meia-vida curta e é muito utilizado no cenário clínico em pacientes com capacidade física limitada (GELEIJNSE et al., 2000).

Por fim, este estudo também utilizou técnicas avançadas de ecocardiografia para a análise da deformação regional das fibras miocárdicas (*strain*), também conhecido como *Speckle-tracking* (STE). A técnica de STE se baseia no rastreamento de pontos hiperecogênicos em imagens de ultrassom que representam a movimentação das fibras miocárdicas, durante um ou mais ciclos cardíacos, em três diferentes orientações: radial, circunferencial e longitudinal (POPOVIĆ et al., 2007). O

STE foi validado por diversos estudos clínicos (FERNANDEZ-PATRON; RADOMSKI; DAVIDGE, 1999; YELLON; HAUSENLOY, 2007a; KANDASAMY et al., 2010; O'GARA et al., 2013) bem como em um modelo animal de infarto do miocárdio em ratos o qual mostrou que o STE é capaz de identificar, corretamente, as regiões do miocárdio com aumento da deposição de colágeno e redução da deformação das fibras cardíacas, 4 a 10 semanas após indução do infarto (POPOVIĆ et al., 2007).

Os resultados da presente tese, mostraram que o STE é mais sensível do que os métodos convencionais, como a fração de ejeção e de encurtamento, para identificar alterações da função cardíaca nos animais que não apresentaram lesões miocárdicas. Foi observado redução significativa do *strain* circunferencial e uma forte tendência a redução ($p=0,06$) do *strain* radial nesses animais. Além disso, a redução da deformação das fibras radiais e circunferenciais encontradas nos animais submetidos à isquemia e referusão cardíaca apresentou correlação negativa com o aumento da deposição de colágeno no coração, ou seja, quanto maior a deposição de colágeno intersticial, menor a deformação das fibras endocárdicas. Popović e colaboradores também observaram correlação semelhante em ratos submetidos à ligadura permanente da coronária DAE (POPOVIĆ et al., 2007).

Tomando como base todos os resultados apresentados neste trabalho de tese, é possível concluir que a IR pode causar danos miocárdicos que perduram por várias semanas e podem ter como consequência o desenvolvimento de IC a longo prazo. Assim, este estudo enfatiza não apenas a importância da caracterização de um modelo animal como também o seguimento clínico, por longos períodos, de pacientes submetidos às terapias de reperfusão após IAM.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

Em suma, o presente trabalho mostrou que:

1. O mesmo procedimento (30 minutos de isquemia e 4 semanas de reperfusão miocárdica) gerou alterações macroscópicas marcadamente diferentes entre os animais.
2. Mesmo os animais que não apresentaram lesões macroscopicamente visíveis (cicatrizes de infarto) mostraram alterações funcionais, histológicas e moleculares que podem contribuir para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca no futuro.
3. A caracterização de modelos experimentais é extremamente importante para garantir reprodutibilidade dos resultados em diferentes laboratórios e translação para futuros ensaios clínicos.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

BLACK, S. C. In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury: Application to drug discovery and evaluation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, Methods and Consideration for Cardiovascular Drug Discovery Research. v. 43, n. 2, p. 153–167, 2000.

BRAUNWALD, E. **Braunwald's Heart Disease**. 9th. ed.

BRAUNWALD, E. The treatment of acute myocardial infarction: the Past, the Present, and the Future. **European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care**, v. 1, n. 1, p. 9–12, 2012.

BRAUNWALD, E.; KLONER, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 5, p. 1713–1719, 1985.

BUJA, L. M. Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. **Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 14, n. 4, p. 170–175, 2005.

CAMARA, A. K. S.; LESNEFSKY, E. J.; STOWE, D. F. Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 3, p. 279–347, 2010.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of Ischaemia-Reperfusion Injury. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 255–266, 2000.

CHANDRASEKAR, B.; SMITH, J. B.; FREEMAN, G. L. Ischemia-Reperfusion of Rat Myocardium Activates Nuclear Factor-KappaB and Induces Neutrophil Infiltration via Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine. **Circulation**, v. 103, n. 18, p. 2296–2302, 2001.

CHAZOV, E. I. et al. [Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarct]. **Terapevticheskii Arkhiv**, v. 48, n. 4, p. 8–19, 1976.

CHEUNG, P.-Y. et al. Matrix Metalloproteinase-2 Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. **Circulation**, v. 101, n. 15, p. 1833–1839, 2000.

CHRISTIA, P. et al. Systematic Characterization of Myocardial Inflammation, Repair,

and Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 555–570, 2013.

DUANE PINTO; MICHAEL GIBSON. Reperfusion injury of the heart. 2016. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/reperfusion-injury-of-the-heart#H2>>.

FERDINANDY, P. et al. Peroxynitrite Is a Major Contributor to Cytokine-Induced Myocardial Contractile Failure. **Circulation Research**, v. 87, n. 3, p. 241–247, 2000.

FERNANDEZ-PATRON, C.; RADOMSKI, M. W.; DAVIDGE, S. T. Vascular Matrix Metalloproteinase-2 Cleaves Big Endothelin-1 Yielding a Novel Vasoconstrictor. **Circulation Research**, v. 85, n. 10, p. 906–911, 1999.

FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 2015.

FRANK, A. et al. Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. **Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 16, n. 3, p. 123–132, 2012.

GADICHERLA, A. K. et al. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1817, n. 3, p. 419–429, 2012.

GAO WEI DONG et al. Role of Troponin I Proteolysis in the Pathogenesis of Stunned Myocardium. **Circulation Research**, v. 80, n. 3, p. 393–399, 1997.

GELEIJNSE, M. L. et al. Dobutamine Stress Myocardial Perfusion Imaging. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 7, p. 2017–2027, 2000.

GERCZUK, P. Z.; KLONER, R. A. An Update on Cardioprotection: A Review of the Latest Adjunctive Therapies to Limit Myocardial Infarction Size in Clinical Trials. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 11, p. 969–978, 2012.

GIBSON, C. M. et al. EMBRACE STEMI Study: A Phase 2a Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of Intravenous MTP-131 on Reperfusion Injury in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. **European Heart Journal**, v. 37, n. 16, p. 1296–1303, 2016.

GOMES, A. V.; POTTER, J. D.; SZCZESNA-CORDARY, D. The Role of Troponins in Muscle Contraction. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 54, n. 6, p. 323–333, 2002.

GROSS, G. J. Models of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury in Dogs and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v. Chapter 5, p. Unit 5.27, 2002.

GUO, X.; MARTIN, A. F.; SOLARO, R. J. Modulatory role of the N-terminal TnC binding site of cardiac troponin I on activation of cardiac myofilament. **Biophys J**, v. 70, n. A170, 1996.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: A Neglected Therapeutic Target. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 92–100, 2013.

Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. p. 426, [s.d.]

HEUSCH, G. et al. Coronary Microembolization: From Bedside to Bench and Back to Bedside. **Circulation**, v. 120, n. 18, p. 1822–1836, 2009.

HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 483–491, 2013.

ITO, H. No-Reflow Phenomenon and Prognosis in Patients with Acute Myocardial Infarction. **Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine**, v. 3, n. 9, p. 499–506, 2006.

ITO HIROSHI et al. Clinical Implications of the ‘No Reflow’ Phenomenon. **Circulation**, v. 93, n. 2, p. 223–228, 1996.

JENNINGS, R. B. et al. Myocardial Necrosis Induced by Temporary Occlusion of a Coronary Artery in the Dog. **Archives of Pathology**, v. 70, p. 68–78, 1960.

JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Lethal Myocardial Ischemic Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 102, n. 2, p. 241–255, 1981.

KANDASAMY, A. D. et al. Matrix Metalloproteinase-2 and Myocardial Oxidative Stress Injury: Beyond the Matrix. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 3, p. 413–423, 2010.

- KAO, Y.-H. et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha Decreases Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Expressions via the Promoter Methylation in Cardiomyocytes. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 1, p. 217–222, 2010.
- KLEINBONGARD, P.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G. TNF α in Myocardial Ischemia/Reperfusion, Remodeling and Heart Failure. **Heart Failure Reviews**, v. 16, n. 1, p. 49–69, 2011.
- KLEINBONGARD PETRA et al. Vasoconstrictor Potential of Coronary Aspirate From Patients Undergoing Stenting of Saphenous Vein Aortocoronary Bypass Grafts and Its Pharmacological Attenuation. **Circulation Research**, v. 108, n. 3, p. 344–352, 2011.
- KLOCKE, R. et al. Surgical Animal Models of Heart Failure Related to Coronary Heart Disease. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 1, p. 29–38, 2007.
- KLONER, R. A.; GANOTE, C. E.; JENNINGS, R. B. The “No-Reflow” Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 6, p. 1496–1508, 1974.
- KRUDY, G. A. et al. NMR Studies Delineating Spatial Relationships within the Cardiac Troponin I-Troponin C Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23731–23735, 1994.
- KUIPERS, H. et al. Variability of Aerobic Performance in the Laboratory and Its Physiologic Correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, n. 4, p. 197–201, 1985.
- KURIAN, G. A. et al. Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts. **Chinese Medicine**, v. 5, p. 3, 2010.
- KURIAN, G. A. et al. **The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited.** Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/1656450/>>.
- KURIAN, G. A.; PADDIKKALA, J. Administration of Aqueous Extract of *Desmodium Gangeticum* (L) Root Protects Rat Heart against Ischemic Reperfusion Injury Induced Oxidative Stress. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 2, p. 129–135,

2009.

KURIAN, G. A.; PADDIKKALA, J. N-Acetylcysteine and Magnesium Improve Biochemical Abnormalities Associated with Myocardial Ischaemic Reperfusion in South Indian Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: A Comparative Analysis. **Singapore Medical Journal**, v. 51, n. 5, p. 381–388, 2010.

LINDSEY, M. L. et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 314, n. 4, p. H812–H838, 2018.

LUO, A. K.; WU, K. C. Imaging Microvascular Obstruction and Its Clinical Significance Following Acute Myocardial Infarction. **Heart Failure Reviews**, v. 11, n. 4, p. 305–312, 2006.

MARTIN, A. F. Turnover of Cardiac Troponin Subunits. Kinetic Evidence for a Precursor Pool of Troponin-I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 2, p. 964–968, 1981.

MAXWELL, S. R.; LIP, G. Y. Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 307–317, 1997.

MCDONOUGH, J. L.; ARRELL, D. K.; VAN EYK, J. E. Troponin I Degradation and Covalent Complex Formation Accompanies Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. **Circulation Research**, v. 84, n. 1, p. 9–20, 1999.

MEISSNER, A.; MORGAN, J. P. Contractile Dysfunction and Abnormal Ca²⁺ Modulation during Postischemic Reperfusion in Rat Heart. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. H100-111, 1995.

MICHAEL, L. H. et al. Myocardial Ischemia and Reperfusion: A Murine Model. **The American Journal of Physiology**, v. 269, n. 6 Pt 2, p. H2147-2154, 1995.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death versus Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 66–85, 2014.

NDREPEPA, G. et al. 5-Year Prognostic Value of No-Reflow Phenomenon After Percutaneous Coronary Intervention in Patients With Acute Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 21, p. 2383–2389, 2010.

O'GARA, P. T. et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 4, p. e78–e140, 2013.

PAGE, D. L. et al. Myocardial Changes Associated with Cardiogenic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 3, p. 133–137, 1971.

PANAGOPOULOU, V. et al. NTproBNP: An Important Biomarker in Cardiac Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 82–94, 2013.

PARADIES, G. et al. Reactive Oxygen Species Affect Mitochondrial Electron Transport Complex I Activity through Oxidative Cardiolipin Damage. **Gene**, v. 286, n. 1, p. 135–141, 2002.

PARK, K. C. et al. Cardiac Troponins: From Myocardial Infarction to Chronic Disease. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 14, p. 1708–1718, 2017.

PFEFFER, J. M. et al. Ventricular Performance in Rats with Myocardial Infarction and Failure. **The American Journal of Medicine**, v. 76, n. 5, p. 99–103, 1984.

PFEFFER, M. A. et al. Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. **Circulation Research**, v. 44, n. 4, p. 503–512, 1979.

PIPER, H. M.; GARCÍA-DORADO, D.; OVIZE, M. A Fresh Look at Reperfusion Injury. **Cardiovascular Research**, v. 38, n. 2, p. 291–300, 1998.

POPOVIĆ, Z. B. et al. Speckle-Tracking Echocardiography Correctly Identifies Segmental Left Ventricular Dysfunction Induced by Scarring in a Rat Model of Myocardial Infarction. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 6, p. H2809-2816, 2007.

REIMER, K. A. et al. The Wavefront Phenomenon of Ischemic Cell Death. 1. Myocardial Infarct Size vs Duration of Coronary Occlusion in Dogs. **Circulation**, v. 56, n. 5, p. 786–794, 1977.

Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition - 8th Edition. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/robbins-and-cotran-pathologic-basis-of-disease-professional-edition/kumar/978-1-4377-0792-2>>.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, p. 38, 2007.

SCHULZ, R. Intracellular Targets of Matrix Metalloproteinase-2 in Cardiac Disease: Rationale and Therapeutic Approaches. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 211–242, 2007.

SOBEL, B. E. et al. Estimation of Infarct Size in Man and Its Relation to Prognosis. **Circulation**, v. 46, n. 4, p. 640–648, 1972.

SUSIN, S. A. et al. Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 2, p. 381–394, 1999.

TANAKA-ESPOSITO, C.; CHEN, Q.; LESNEFSKY, E. J. Blockade of electron transport before ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury during reperfusion in aged rat hearts. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 160, n. 3, p. 207–216, 2012.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 1998.

TOYOKUNI, S. Reactive Oxygen Species-Induced Molecular Damage and Its Application in Pathology. **Pathology International**, v. 49, n. 2, p. 91–102, 1999.

VANDERVELDE, S. et al. Increased Inflammatory Response and Neovascularization in Reperfused vs. Non-Reperfused Murine Myocardial Infarction. **Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 15, n. 2, p. 83–90, 2006.

VENDITTI, P.; MASULLO, P.; DI MEO, S. Effects of Myocardial Ischemia and Reperfusion on Mitochondrial Function and Susceptibility to Oxidative Stress. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 58, n. 10, p. 1528–1537, 2001.

VIAPPIANI, S. et al. Activation and Modulation of 72kDa Matrix Metalloproteinase-2 by Peroxynitrite and Glutathione. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 5, p. 826–834, 2009.

WANG, W. et al. Intracellular Action of Matrix Metalloproteinase-2 Accounts for Acute

Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1543–1549, 2002.

WEBB, S. W.; ADGEY, A. A. J.; PANTRIDGE, J. F. Autonomic Disturbance at Onset of Acute Myocardial Infarction. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5818, p. 89–92, 1972.

WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>>.

WHO | Noncommunicable diseases country profiles 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>>.

XU, Z. et al. A Murine Model of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury through Ligation of the Left Anterior Descending Artery. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 86, Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4080806/>>.

YASUDA, S.; SHIMOKAWA, H. Acute Myocardial Infarction: The Enduring Challenge for Cardiac Protection and Survival. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 73, n. 11, p. 2000–2008, 2009.

YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial Reperfusion Injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 11, p. 1121–1135, 2007a.

YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial Reperfusion Injury. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 11, p. 1121–1135, 2007b.

ZHOU, M. et al. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162–168, 1997.

ZWEIER, J. L.; FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 5, p. 1404–1407, 1987.

8. ANEXO A – Aprovação no comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos da estimulação colinérgica sobre a modulação autonômica e mediadores moleculares envolvidos na injúria de isquemia/reperfusão*”, registrado com o número **165/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 31 de outubro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 84 ratos Wistar machos pesando 280g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 31/10/2016 a 10/12/2019.

We certify that the Protocol n° 165/2016, entitled “*Cholinergic stimulation in ischaemia/reperfusion injury: effects in autonomic modulation and molecular mediators*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/31/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 84 male Wistar rats weighing 280g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/10/2019.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

9. ANEXO B – Artigos relacionados à tese

RESEARCH ARTICLE

Lack of scarring is not always a sign of cardiac health: Functional and molecular characterization of the rat heart's following chronic reperfusion

Ana Carolina Mieko Omoto¹, Fábio Nelson Gava¹, Carlos Alberto Aguiar Silva¹, Hadder Batista Silva¹, Juliana Montenegro Parente², Rafael Menezes Costa², Michele Mazzaron Castro², Rita de Cássia Tostes², Helio Cesar Salgado¹, Rubens Fazan Jr^{1*}

1 Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **2** Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

* rfazan@usp.br



OPEN ACCESS

Citation: Omoto ACM, Gava FN, Silva CAA, Silva HB, Parente JM, Costa RM, et al. (2018) Lack of scarring is not always a sign of cardiac health: Functional and molecular characterization of the rat heart's following chronic reperfusion. PLoS ONE 13(12): e0209190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190>

Editor: Michael Bader, Max Delbruck Centrum fur Molekulare Medizin Berlin Buch, GERMANY

Received: July 13, 2018

Accepted: December 2, 2018

Published: December 20, 2018

Copyright: © 2018 Omoto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: Funding was provided by São Paulo Research Foundation, grant number: 2013/20549-7, to HCS and RF. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Even though the coronary reperfusion process is the most important tool to preserve cardiac function, after myocardial infarction, reperfusion of acutely ischemic myocardium can induce injury. We aimed to evaluate the functional and molecular aspects 4 weeks after myocardial ischemia-reperfusion (IR) in rats. Male Wistar rats (N = 47) were subjected to myocardial IR by short-term (30 min) ligation and subsequent reperfusion of the left descending coronary artery. Control rats (N = 7) underwent the same surgical maneuver without coronary ligation. After 4 weeks, rats had their cardiac function examined by ventricular pressure recording under basal condition or pharmacological stress. Myocardial fibrosis and molecular mediators of IR injury (reactive oxygen species, tumor necrosis factor-alpha and matrix-metalloproteinase-2) were assessed as well. Most of the rats subjected to IR did not show macroscopic signs of infarct, while only 17% of these animals showed large myocardial infarction scars. Of note, all animals submitted to IR presented the functional and molecular parameters altered when compared with the control subjects. Cardiac function was attenuated in all animals submitted to IR, regardless the presence or size of macroscopic cardiac scars. Interstitial fibrosis, matrix-metalloproteinase-2 activity and the expression of tumor necrosis factor-alpha were higher in the myocardium of all IR rats as compared to the control subjects (p<0.05). Myocardium superoxide anion and hydrogen peroxide were increased in rats without or with mild cardiac scars. These results show that IR leads to myocardial injury in rats. Besides, even the animals with an apparent healthy myocardium (without infarct scar) presented cardiac dysfunction and molecular changes that may contribute to the development of heart failure over time.

Introduction

Reperfusion of the ischemic tissue is the most valuable therapeutic tool to limit the infarct area and preserve cardiac function after acute myocardial infarction (MI) [1,2]. However, despite the reperfusion therapy, a significant number of infarcted patients develop heart failure, approximately one year after MI [3,4]. Paradoxically, in some cases, reperfusion can worsen the ischemic scenario increasing the probability of life-threatening ventricular arrhythmias; besides, it also leads to myocardial damage through the death of the cardiomyocytes that were still viable during the ischemic period. This phenomenon is known as cardiac reperfusion injury; in essence, it may contribute to the final infarct size and, accordingly, to the long-term prognostic of the patient [5]. Therefore, the myocardial damage in a reperfused MI might be the result of two subsequent processes: ischemia and reperfusion.

Lack of oxygen and nutrient supply during ischemia result in biochemical and metabolic myocardial outcomes that may be aggravated by restoration of the aerobic metabolism provided by reperfusion [6,7]. Altered membrane potential, calcium overload, cell swelling, oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening, activation of pro-inflammatory mediators and extracellular matrix proteases are the major outcomes that contribute for the reperfusion injury at the cellular level [7–9]. In this context, notwithstanding myocardial reperfusion has been demonstrated to be the best therapeutic option for acute MI, it is a “*double-edge sword*” [6]. Therefore, prevention of myocardial reperfusion injuries combined with the decrease of the incidence of heart failure, in patients surviving a reperfused MI, has been a remarkable challenge for physicians and scientists [6,8].

In this scenario, the study of experimental models of ischemia followed by reperfusion (IR) is crucial for improving the knowledge of the mechanisms involved in this situation. In most preclinical studies of experimental models of IR, short periods of myocardial reperfusion have been used [10]. Therefore, there is a lack of characterization of the long-term effects of IR in the literature. This drawback is fundamental for delineating future cardioprotective strategies to be translated into the clinical setting. Considering these facts, the present study was designed to characterize the long-term (4 weeks) repercussions of transitory (30 min) cardiac ischemia followed by reperfusion in contractile function as well as in morphological and molecular aspects of myocardium in rats.

Materials and methods

Ethics statement

Experiments were carried out in 65 male Wistar rats (supplied by the Animal Facility of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil) submitted to myocardial IR or sham surgery (control group). The experimental protocol was reviewed and approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil (Protocol #163/2016). The personnel responsible for handling the animals in this study were adequately trained for this task.

Experimental myocardial ischemia/reperfusion

Male Wistar rats (250–300 g) were anesthetized with ketamine and xylazine (50 and 10 mg/kg i.p., respectively), and received endotracheal intubation for mechanical ventilation with room air. A left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space, to assess the heart, and the left anterior coronary artery (LAD) was temporarily (30 min) occluded with a polyester suture (4–0, Ethicon, Somerville, USA) placed between the pulmonary artery outflow tract and the left atrium. After 30 min of ischemia, the occlusion of the vessel was released by cutting the

suture line. The thorax was immediately closed, and the excess air was removed from the chest cavity to prevent the development of pneumothorax. Sham rats ($n = 7$) were submitted to the same surgical procedures except for left coronary artery occlusion. The animals were led to recover from anesthesia on a heating pad (37°C) and received analgesic (tramadol hydrochloride: 2 mg/kg , during 3 consecutive days) and antibiotic (benzylpenicillin + streptomycin). After complete recovery from surgery, the rats were housed with free access to food and water on a temperature controlled ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) 12h light-dark environment. They were carefully checked every day after surgery to detect signs of suffering or distress.

Experimental protocol

One month after IR, or sham surgery, the animals were anesthetized (urethane, 1 g/kg , i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and had their cardiac contractility evaluated by measuring the left ventricle (LV) pressure under baseline conditions and also during the infusion of increasing doses of dobutamine. Following, an additional dose of urethane (1 g/kg , i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was administered for the animal euthanasia and subsequently tissue and blood sampling for histological and molecular analysis were collected immediately.

Measurement of left ventricle systolic function during basal and stress conditions

Under the anesthesia of urethane (1 g/kg , i.p.), a catheter specially designed to measure ventricular pressure (SPR 320: Millar Instruments, Houston, TX, USA) was inserted into the LV via the right carotid. The catheter was connected, through a dedicated signal coupler (TC-510, Millar Instruments, USA), to a recording system (Bridge Amp attached to PowerLab/4SP, AD Instruments, Sydney, Australia) and, under continuous recording of LV pressure, they received increasing doses of dobutamine ($1, 3, 10$ and $15\text{ }\mu\text{g/kg}$) intravenously. Dobutamine was used as a pharmacological stressor, and each dose was injected, in bolus, with an interval of at least 10 min between each other. The 1st derivative in time of the LV pressure (dP/dt) was calculated online, and the maximum rate of increasing pressure was used as an index of systolic function of the rats.

Tissue sampling

At the end of LV pressure recording, with the animals deeply anesthetized, they were euthanized, and the hearts were collected and cut transversely into two sections from the midventricular surface until the apex. The first midventricular section of each heart was fixed in phosphate-buffered 10% formalin and embedded in paraffin for histological analysis. The second section was rapidly frozen in liquid nitrogen and used for measuring matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity, reactive oxygen species (ROS) and TNF- α gene expression.

Assessment of MMP-2 activity by gelatin zymography

Samples were crushed in liquid nitrogen and homogenized overnight at 4°C in 10 mM Sodium Fluoride (#201154, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 1 mM Sodium Orthovanadate (#S6508, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 1X Protease Inhibitor Cocktail (#S8820, Sigma-Aldrich, USA) and cold RIPA buffer (#R0278, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) according to the following proportion: $300\text{ }\mu\text{L}$ of buffer for 80 mg of sample. Homogenates were centrifuged with $12,000\text{ rpm}$ at 4°C for 20 min , and the supernatant was used. Extracts were then submitted to Bradford analysis (#B6916, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) for protein quantification; $60\text{ }\mu\text{g}$ of the sample were loaded onto 8% polyacrylamide gels with 10% gelatin under non-reducing

conditions. Fetal bovine serum was used as positive control. After electrophoresis, gels were incubated twice with 2.5% v/v Triton X-100 buffer for 30 min each at room temperature and then incubated with 50 mM Tris, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 150 mM NaCl, pH 7.6 overnight at 37°C. Gels were coloured with 0.05% Coomassie Blue. The 75, 72 and 64 kDa matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were visualized using ChemiDoc Imaging Systems (Biorad, Hercules, USA) and quantified by the computer software ImageJ.

Measurements of ROS generation in myocardial tissue: Lucigenin and amplex red assays

Lucigenin. Myocardial superoxide anion (O_2^-) generation was measured by a luminescence assay using lucigenin as the electron acceptor and NADPH as the substrate. Myocardial tissue from IR and sham rats were homogenized in an assay buffer (50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA and 150 mM sucrose, pH 7.4) with a glass-to-glass homogenizer. The assay was performed with 100 μL of sample, lucigenin (5 μM), NADPH (0.1 mM) and assay buffer. Luminescence was measured for 30 cycles of 18 s each by a luminometer (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies, Ortenberg, Germany). Basal readings were obtained prior to the addition of NADPH, and the reaction was started by the addition of the substrate. Basal and buffer blank values were subtracted from the NADPH-derived luminescence. O_2^- was expressed as relative luminescence unit (RLU)/ μg of protein.

Amplex red. Samples were frozen in Krebs, macerated and centrifuged. Fifty μL aliquots of the supernatant were removed and the amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) produced by the myocardial tissue was determined fluorometrically by measuring the Amplex Red conversion (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, USA) (8×10^{-6} M) to a highly fluorescent compound resorufin, in the presence of horseradish peroxidase (4 U/mL). The resorufin fluorescence was detected by plate fluorimeter (Synergy 2 Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. The fluorescence values were corrected by the total amount of tissue proteins.

TNF- α expression in myocardial tissue

For the analysis of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) mRNA expression levels in the myocardium, total RNA was isolated from LV samples using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA). RNA concentration and integrity were assessed. cDNA was synthesized using reverse transcriptase at 70°C for 10 min, followed by incubation at 42°C for 60 min and 75°C for 15 min. Taqman Gene Expression Assay for TNF- α (Rn01525859_g1) and the housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase—GAPDH (Rn01775763_g1) were used. All samples were amplified in triplicates on StepOnePlus PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) by using TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR cycling conditions included 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 60 s. Dissociation curve analysis confirmed that signals corresponded to unique amplicons. TNF- α mRNA expression levels were normalized relatively to GAPDH mRNA levels using the comparative $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Histological analysis and infarct size measurement

Midventricular cross-sections of the LV with 7 μm thick were cut and stained with picosirius red for the quantification of interstitial collagen fibers. Stained cross-sections were captured using light microscopy (Leica DM5500B; Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) at x40 magnification. To estimate the fraction area (%) of collagen in picosirius red-stained sections, 15 images of the septum, for each rat, were randomly acquired for posterior analysis with the

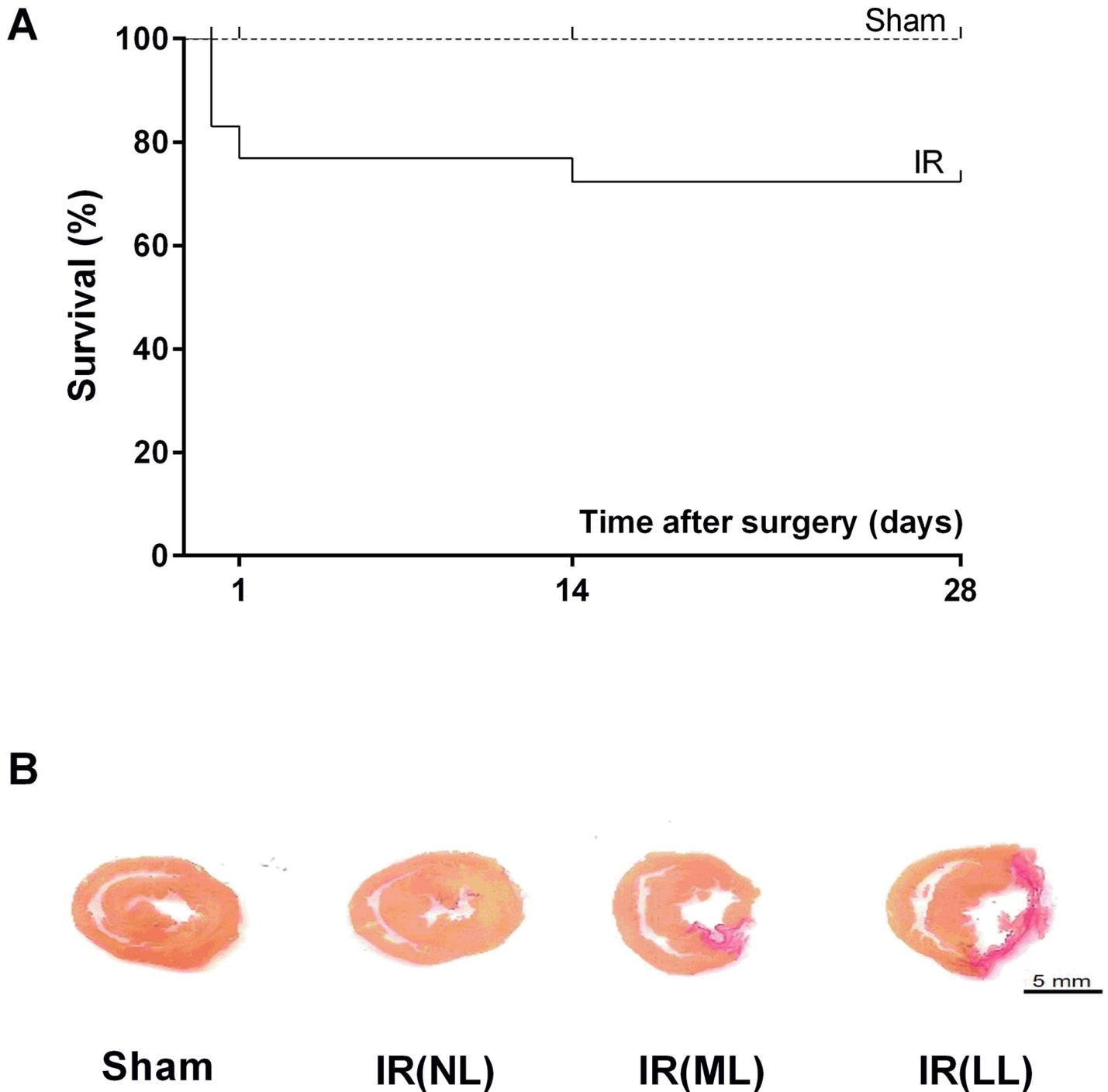


Fig 1. Survival rate and infarct scars in myocardial cross-sections. (A) Survival rate (Kaplan-Meier) from rats, following 4 weeks after sham-operation (Sham) or acute myocardial ischemia-reperfusion (IR). (B) Midventricular cross sections of the heart stained with *picosirius red*. The animals were classified according to the presence and size of infarct scars. IR(NL): without a scar; IR(ML): mild infarct scars, i.e. less than 40% of the total circumference of the left ventricle; IR(LL): large infarct scars, i.e. more than 40% of the total circumference of the left ventricle.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190.g001>

public-domain software NIH Image J. Infarct size was measured in picosirius red-stained sections using Image J and calculated dividing the length of the infarcted area by the total circumference of the LV (expressed as percentage).

Table 1. General characteristics of rats 4 weeks after acute myocardial ischemia-reperfusion (IR) or sham surgery (Sham).

	Sham (n = 7)	IR(NL) (n = 6)	IR(ML) (n = 6)	IR(LL) (n = 6)
Body weight (g)	419 ± 0.01	485 ± 0.03	567 ± 0.01	547 ± 0.02
Heart weight (mg)	1536 ± 66	1853 ± 113	2092 ± 82	2600 ± 231
Lung weight (mg)	1184 ± 58	1492 ± 175	2013 ± 370	1778 ± 113
Liver weight (mg)	14896 ± 350	16740 ± 638	19302 ± 305	19398 ± 1110
Heart/body weight (mg/g)	3.7 ± 0.07	3.8 ± 0.15	3.7 ± 0.09	4.7 ± 0.3* ^{##}
Lung/body weight (mg/g)	2.8 ± 0.13	3 ± 0.3	3.5 ± 0.6	3.2 ± 0.2
Liver/body weight (mg/g)	36 ± 1.7	35 ± 1.5	34 ± 0.7	35 ± 1.2
Infarct size	0	0	21 ± 3	46 ± 1.2

NL: no lesion, ML: mild lesion and LL: large lesion.

* P<0.05 vs. Sham

+ P<0.05 vs. IR (NL)

P<0.05 vs. IR (ML). Values are means ± SEM

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190.t001>

Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM. One-way ANOVA followed by the post hoc of Tukey was used to compare conventional echocardiographic parameters, tolerance to exercise, the maximum value of the positive dP/dt (+dP/dt_max) during basal conditions, molecular data and interstitial fibrosis. Two-way ANOVA followed by Holm-Sidak test was used to compare LV systolic function (+dP/dt_max), during dobutamine stress test, and segmental myocardial dysfunction by strain. The level of significance adopted was p<0.05.

Results

Mortality rates and classification of IR injuries

At the onset of the reperfusion procedure, 11, out of 47, animals died. Also, 4 rats died within 24 hours after IR (post-operative period), while only 3 animals died after 14 days after IR (Fig 1A). Considering all deaths, the mortality rate was 28% of all animals subjected to IR. All the deaths occurred suddenly, probably due to cardiac arrest caused by myocardial infarction/reperfusion (i.e., the animals were found dead in their cages). Euthanasia before the end of the experiments was not necessary since the rats did not exhibit signs of suffering or distress during the study. The survivors exhibited marked distinct sizes of macroscopic cardiac lesions (infarct scar), from no visible lesion up to large transmural scars spreading over the LV free wall. As indicated in Fig 1B, the animals were divided into 3 groups according to the size of cardiac scars: rats without macroscopic lesions (no lesion, NL), rats with infarct scars not larger than 40% of the LV circumference (mild lesion, ML), and rats with transmural lesions that affected more than 40% of the circumference of the LV (large lesion, LL). The animals subjected to IR showed the following distribution: 45% of the animals did not show a cardiac lesion, 38% presented mild lesion while 17% exhibited a large infarct scar.

General characteristics of rats with IR or sham surgery

The general characteristics observed in rats subjected to sham surgery or IR, with different degrees of cardiac lesions, are summarized in Table 1. Body weight was similar in all groups. Increased heart weight and heart/body weight ratio were observed in rats subjected to IR, denoting compensatory hypertrophy of the surviving myocardium. No differences were found

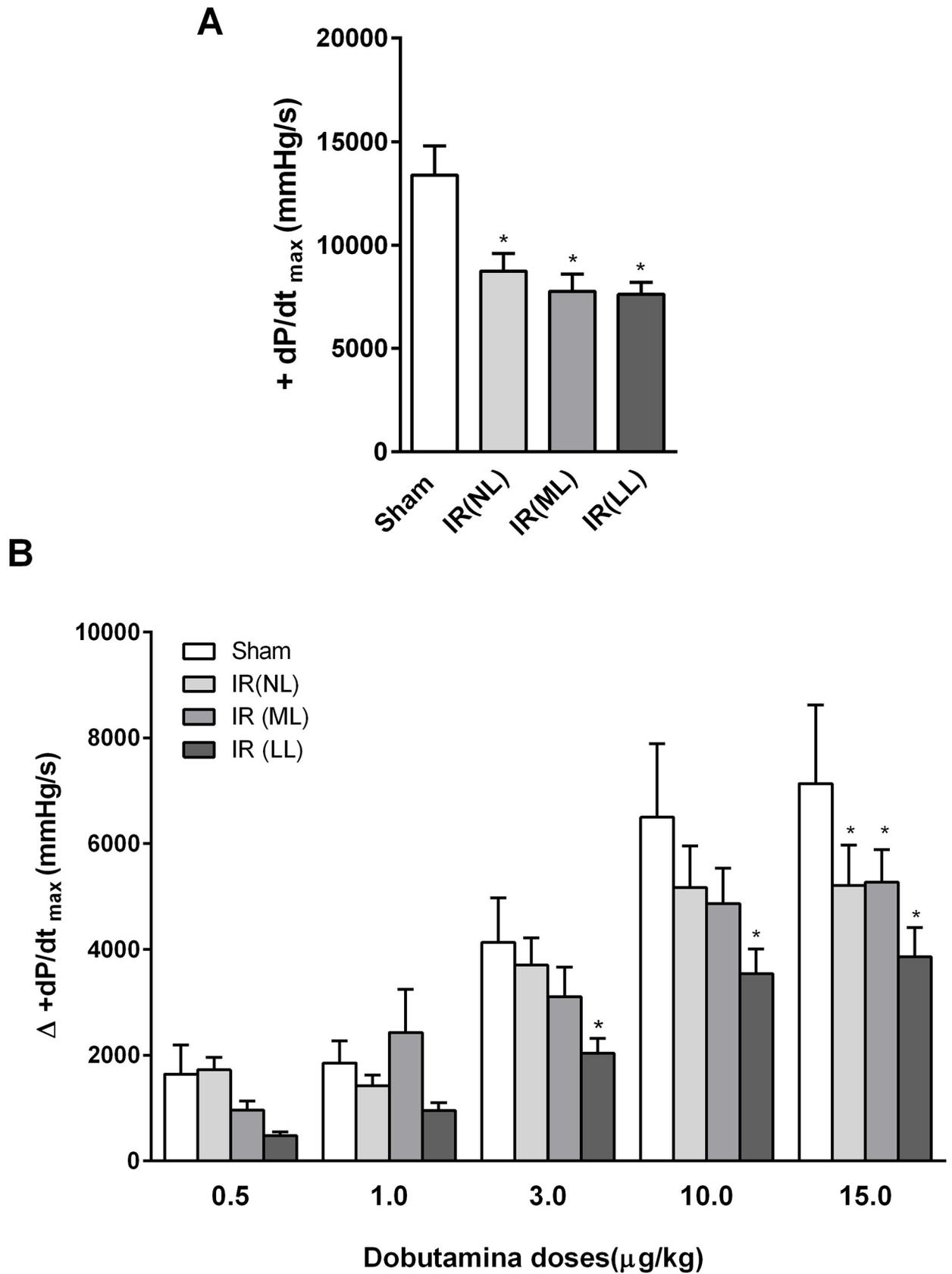


Fig 2. Cardiac function in basal and stress conditions. (A) Basal recordings of maximal increasing rate of left ventricular pressure (+dP/dt_max) and (B) Changes in +dP/dt_max elicited by 1, 3, 10 and 15 $\mu\text{m}/\text{kg}$ of dobutamine infusion from rats following 4 weeks after sham-operation (Sham) or acute myocardial ischemia-reperfusion (IR), with no (NL), mild (ML) or large (LL) cardiac lesions. Values are means \pm SEM, * vs. Sham, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190.g002>

in lung/body weight, and liver/body weight ratios among groups. These findings indicate no fluid accumulation in these organs. Accordingly, no sign of development of congestive heart failure was seen.

Cardiac function analysis and the pharmacological stress test

The maximum increasing rate of LV pressure measured by the maximum value of the positive dP/dt (+dP/dt_max), as well as dP/dt response to increasing doses of dobutamine, is shown in Fig 2. Note that basal +dP/dt_max was found smaller in rats subjected to IR, independently of the presence of the myocardial scar, as compared to sham-operated counterparts. Dobutamine elicited, as expected, a dose-dependent increase in +dP/dt_max in all rats. IR rats with large cardiac lesions presented impaired response of +dP/dt_max to 3, 10 and 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of dobutamine as compared to their sham-operated counterparts. Nevertheless, at the dose of 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dobutamine elicited an impaired response of +dP/dt_max in all rats subjected to IR, i.e. independent of the presence of macroscopic cardiac lesions.

Myocardial ROS generation and TNF- α expression

Data on O_2^- and H_2O_2 generation, and TNF- α gene expression are shown in Fig 3. High concentrations of O_2^- and H_2O_2 were found in the IR rats with no or mild cardiac lesions as compared to sham-operated rats, whereas in IR rats with large myocardial scars the slight increase of O_2^- and H_2O_2 was not statistically significant. TNF- α mRNA expression was high in all animals submitted to IR despite the presence, or absence, of infarction scar.

Interstitial collagen deposition and myocardial MMP-2 activity

The density of septal collagen (Fig 4A) was greater in all rats subjected to IR, independently of the degree of cardiac lesion. Also, all rats subjected to IR showed increased total MMP-2 activity (Fig 4C) when compared to sham-operated rats, thus indicating that the repairing process may be present in noninfarcted areas as well.

Discussion

Despite the surgery to induce IR in all animals has been performed by the same researcher, following strictly the same procedures, a marked heterogeneity was observed in macroscopic injury among the animals. This finding was actually expected and interpreted mainly as a consequence of anatomical variations of coronary vessels. Moreover, the present study demonstrates, as expected, that myocardial IR elicited different degrees of cardiac injury in rats. However, this study shows, for the first time, that even the animals with an apparently healthy myocardium (without infarct scar) presented LV systolic dysfunction, under a basal and challenged condition, as well as marked changes in cardiac histology (fibrosis) and molecular mediators involved in cardiac dysfunction and myocardial remodeling.

After 30 min of ischemia followed by 4 weeks of reperfusion, only a small fraction (17%) of the surviving rats presented large transmural MI scar combined with severe systolic dysfunction. Another fraction (38%) of survivors from IR displayed moderate infarct leading to scars that measured less than 40% of the total area of the LV. These animals showed a significant

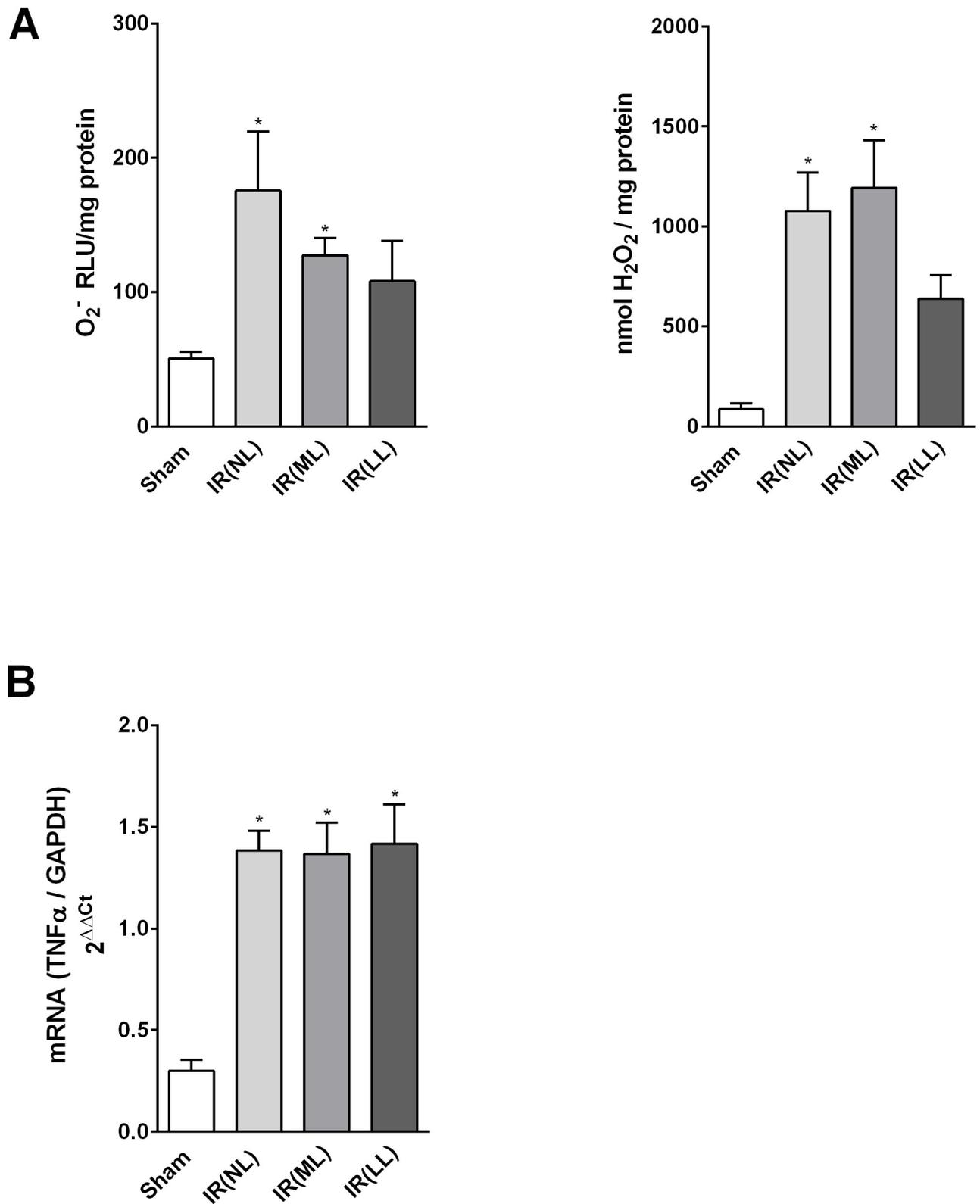


Fig 3. Myocardial ROS and TNF- α expression. (A) Myocardial tissue concentrations of O_2^- and H_2O_2 and (B) TNF- α mRNA expression in rats 4 weeks after sham-operation (Sham) or acute myocardial ischemia-reperfusion (IR), with no (NL), mild (ML) or large (LL) cardiac lesions. Values are means \pm SEM, *vs. Sham, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190.g003>

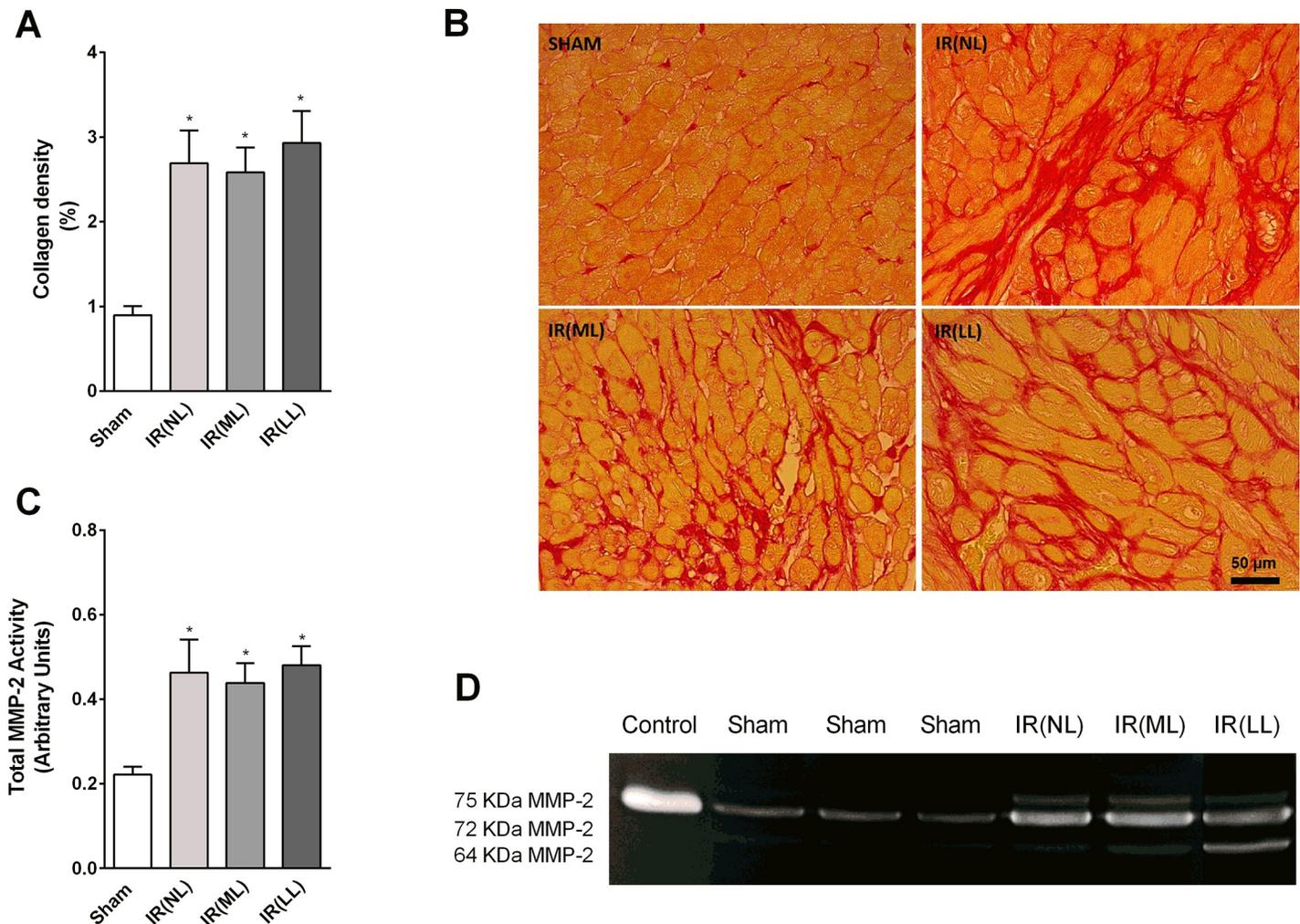


Fig 4. Myocardial fibrosis and MMP-2 activity. (A) Quantification of septal collagen density and (B) photomicrographs of myocardial tissue stained with picosirius red in rats, 4 weeks after sham-operation (Sham) or acute myocardial ischemia-reperfusion (IR), with no (NL), mild (ML) or large (LL) cardiac lesions. (C) Quantified values of MMP-2 activity and (D) its respective gelatin zymogram. Values are means ± SEM, * vs. Sham, P<0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209190.g004>

reduction in systolic function during basal and stress conditions, but not as severe as their counterparts with large cardiac scars.

Although the majority of the surviving animals (45%) did not show any macroscopic sign of myocardial infarct (Fig 1), surprisingly, these animals showed impairment of LV systolic function and higher septal accumulation of interstitial collagen combined with high total MMP-2 activity. Furthermore, elevated concentrations of ROS (O_2^- and H_2O_2) and higher levels of TNF- α were detected in the myocardial tissue from rats subjected to IR without cardiac scars.

During reperfusion, a burst of ROS is produced by a variety of sources, especially by the disruption of mitochondrial membrane potential [8,11,12]. ROS accumulation stimulates pro-inflammatory pathways and causes direct damage to the cellular DNA, proteins and lipids [11]. Therefore, redox-sensitive transcription factors such as nuclear factor- κ B were activated by ROS eliciting the expression of TNF- α and other pro-inflammatory cytokines [13,14]; this mechanism plays an important role in the impairment of calcium homeostasis and consequently in myocardial contractile dysfunction [15]. In addition, it has been postulated that

ROS contributes to the activation of MMP-2 performing a covalent modification of its Cys residue between the pro-peptide and the catalytic domain [16].

MMP-2, also known as gelatinase A or type IV collagenase, plays a critical role in cardiovascular diseases [17] and has emerged as a key enzyme involved in cardiac conditions associated with increased oxidative stress [16–20]. Moreover, MMP-2 was found increased in the coronary effluent, immediately after IR of isolated rat hearts [21]. MMP-2 has been considered the major protease involved in myocardial stunning [19,22]. Beyond its action in the extracellular matrix, MMP-2 modulates different cellular functions during the IR process, for instance, platelet aggregation [23], vascular tone [24,25] and digestion of troponin I [19,22,26] and myosin light chain 1 [27], leading to cardiac contractile dysfunction.

These outcomes might be involved with the impairment of myocardial function observed after IR. Therefore, even in the animals without macroscopic cardiac lesions, the IR triggers molecular mechanisms that culminate with adverse changes in the ventricular architecture and contractile dysfunction under stress; accordingly, determining increased ventricular stiffness over time.

Taking into account these data, the present study provides novel information regarding long-term outcomes after myocardial IR in rats. The important and novel information brought by this study is that, despite the degree of a macroscopic myocardial lesion, all animals presented cardiac dysfunction with a certain degree of severity. Moreover, our findings revealed that, all survivors from myocardial IR, even those without any visible infarction scar, displayed interstitial fibrosis and derangements at the molecular level; outcomes, probably involved in the development of heart failure over time. Studies with dogs and humans suggested that myocardium at risk, collateral flow and metabolic demand are determinant factors for infarct size after reperfusion [28,29]; however, future studies are required to elucidate the mechanism(s) involved in molecular alterations observed in IR animals without patent infarct scar.

Also, it is important to emphasize that a consistent characterization of animal models with different methodological protocols are crucial; because these models may remarkably contribute to improving therapeutic strategies in the field of IR.

Supporting information

S1 File. Experimental dataset. Fig A. Cardiac stress test; Fig B. Superoxide anion; Fig C. Hydrogen peroxide; Fig D. TNF alpha; Fig E. Collagen density; Fig F. MMP2. (XLSX)

S2 File. Septal collagen deposition. Midventricular cross-sections of the left ventricle stained with picrosirius red for the quantification of interstitial collagen fibers. (XLSX)

Acknowledgments

The author thanks Mauro de Oliveira, Vanessa de Souza Nakagi and Eliane Maciel for the excellent assistance and technical support.

Author Contributions

Conceptualization: Ana Carolina Mieko Omoto, Fábio Nelson Gava, Rubens Fazan, Jr.

Data curation: Ana Carolina Mieko Omoto, Carlos Alberto Aguiar Silva, Hadder Batista Silva, Juliana Montenegro Parente, Rafael Menezes Costa.

Formal analysis: Ana Carolina Mieko Omoto, Rubens Fazan, Jr.

Funding acquisition: Helio Cesar Salgado, Rubens Fazan, Jr.

Investigation: Ana Carolina Mieko Omoto, Fábio Nelson Gava, Rubens Fazan, Jr.

Methodology: Ana Carolina Mieko Omoto, Fábio Nelson Gava.

Project administration: Ana Carolina Mieko Omoto.

Resources: Helio Cesar Salgado, Rubens Fazan, Jr.

Supervision: Fábio Nelson Gava, Helio Cesar Salgado, Rubens Fazan, Jr.

Validation: Ana Carolina Mieko Omoto.

Visualization: Ana Carolina Mieko Omoto, Rubens Fazan, Jr.

Writing – original draft: Ana Carolina Mieko Omoto.

Writing – review & editing: Ana Carolina Mieko Omoto, Fábio Nelson Gava, Michele Mazaron Castro, Rita de Cássia Tostes, Helio Cesar Salgado, Rubens Fazan, Jr.

References

1. Gerczuk PZ, Kloner RA. An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 969–978. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.07.054> PMID: 22402067
2. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, de Lemos JA, et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61: e78–e140. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.019> PMID: 23256914
3. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015; 373: 1021–1031. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505489> PMID: 26321103
4. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016; 13: 193–209. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.5> PMID: 26843289
5. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1121–1135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071667> PMID: 17855673
6. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*. 1985; 76: 1713–1719. <https://doi.org/10.1172/JCI112160> PMID: 4056048
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013; 123: 92–100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874> PMID: 23281415
8. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 7018393. <https://doi.org/10.1155/2017/7018393> PMID: 28286377
9. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001; 94: 1133–1138. PMID: 11465607
10. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Dis Model Mech*. 2010; 3: 35–38. <https://doi.org/10.1242/dmm.003855> PMID: 20075380
11. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koepfen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012; 16: 123–132. <https://doi.org/10.1177/1089253211436350> PMID: 22368166
12. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 1656450. <https://doi.org/10.1155/2016/1656450> PMID: 27313825
13. Bowie A, O’Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59: 13–23. PMID: 10605930
14. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation*. 2001; 103: 2296–2302. PMID: 11342480
15. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodelling and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2011; 16: 49–69. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9180-8> PMID: 20571888

16. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, León H, et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.004> PMID: 19046943
17. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: 413–423. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp268> PMID: 19656780
18. Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, Ferrari-Vivaldi M, Ferrari-Vivaldi G, Bachetti T, et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J.* 2005; 26: 27–35. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi007> PMID: 15615796
19. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 211–242. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105230> PMID: 17129183
20. Spinale FG. Myocardial matrix remodelling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007; 87: 1285–1342. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2007> PMID: 17928585
21. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation.* 2000; 101: 1833–1839. PMID: 10769285
22. McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 1999; 84: 9–20. PMID: 9915770
23. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature.* 1997; 386: 616–619. <https://doi.org/10.1038/386616a0> PMID: 9121586
24. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res.* 2000; 87: 670–676. PMID: 11029402
25. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res.* 1999; 85: 906–911. PMID: 10559137
26. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JRB, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation.* 2002; 106: 1543–1549. PMID: 12234962
27. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation.* 2005; 112: 544–552. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.531616> PMID: 16027249
28. Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation.* 1992; 86: 81–90. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.86.1.81> PMID: 1617793
29. Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR, Murdock RH, Greenfield JC, Becker LC, et al. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circ Res.* 1985; 56: 651–665. <https://doi.org/10.1161/01.RES.56.5.651> PMID: 3838923

Subclinical myocardial dysfunction in reperfused rat hearts is detected by speckle-tracking echocardiography.

Authors

Omoto, A.C.M. ¹; Gava, F.N. ²; Nakagi, V. S. ¹; Salgado, H.C. ¹; Fazan Jr., R. ¹.

Affiliations

Department of Physiology¹, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Department of Veterinary Clinics², State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Running head

Speckle-tracking echocardiography in reperfused rat hearts.

Disclosure

No conflicts to disclosure.

Corresponding author

Rubens Fazan Jr., M.D., Ph.D.

Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Phone: +55 16 3615-3331

E-mail: rfazan@usp.br

ABSTRACT

Recent studies in basic and clinical settings are applying advanced echocardiographic techniques, such as Speckle-tracking echocardiography (STE), to better evaluate the cardiac function after myocardial infarction. However, few data are available on the sensitivity of STE to detect changes in left ventricle (LV) deformation (strain) after myocardial ischemia-reperfusion (IR). In this study, we tested the hypothesis that STE is more prone to detect alterations in LV function, four weeks after IR than conventional echocardiographic parameters. To test this hypothesis, male Wistar rats (250-280g) were studied by echocardiography (LV short axis) 4 weeks after myocardial IR or sham surgery. Echocardiographic data were post-processed for M-mode systolic function and STE analysis of myocardial circumferential and radial strain. Our results showed that STE detected reductions in global circumferential ($p < 0.05$) and radial ($p = 0.06$) strain in rats subjected to IR as compared to their sham-operated counterparts, while no changes were observed between groups for the conventional M-mode parameters (ejection fraction, fractional shortening and cardiac output). In addition, strain reductions were correlated with collagen deposition for both circumferential ($r^2 = 0.74$; $p = 0.003$) and radial ($r^2 = 0.54$; $p = 0.015$) strains. We also distinguished which regions of the heart were affected by IR injury by performing a segmental strain analysis. In conclusion, STE, but not conventional echocardiography, was able to detect LV dysfunction, in apparently healthy hearts, four weeks after IR.

Key Words: myocardial dysfunction, myocardial ischemia-reperfusion, speckle-tracking echocardiography.

INTRODUCTION

Evaluation of cardiac function is an important goal in echocardiography; therefore, a variety of parameters that estimates systolic function has been proposed. In this context, one of the most used and clinically relevant parameters is the left ventricular ejection fraction (LVEF) (1). However, LVEF has several limitations since it does only provide an indirect estimative of myocardial contraction and is influenced by several factors; for instance, heart rate and loading conditions. Also, LVEF is not able to quantify and delineate regional myocardial contraction impairment and is not sensitive enough to detect subclinical myocardial dysfunctions as well.

Two-dimensional strain imaging, derived from Speckle-tracking Echocardiography (STE), is a recently developed tool that tracks natural acoustic markers from ultrasound images; it does characterize segmental muscle movement along specific axes of a specified coordinate system (2). In other words, STE measures the myocardium deformation during the cardiac cycle under three principal strains: longitudinal, circumferential, and radial. STE was validated under a variety of clinical settings(3–6), as well as in a rat model of myocardial infarction (left anterior descending coronary artery -LAD - permanent ligation) (2); and has been shown to be more sensitive to detect cardiac dysfunction than standard echocardiographic parameters, such as LVEF. Evaluation of early myocardial dysfunction in subclinical cardiomyopathies stages is a challenging task and has been proposed as one of the most promising applications of STE (1).

Timely and efficient myocardial reperfusion, using thrombolytic agents or primary percutaneous coronary intervention, is the most promising strategy in acute

myocardial infarction, for reducing cardiac injuries and limiting the infarct size (7). However, reperfusion itself can induce cardiomyocytes death, aggravating the injuries elicited by ischemia; this phenomenon is known as reperfusion injury, for which there is no effective treatment. Once reperfusion therapy has been established, the mortality rate after myocardial infarction falls; but, on the other hand, the incidence of heart failure increases (8). For this reason, echocardiographic follow-up after myocardial ischemia-reperfusion (IR), especially using STE, may be an important preventive strategy. Take this information into account, the present study was designed to evaluate the efficacy of STE for detecting myocardial circumferential and radial strain abnormalities, in rats submitted to left ventricle IR exhibiting healthy hearts (e.g., without myocardial scars and preserved LVEF).

METHODS

The experiments were carried out in male Wistar rats (250-300g, 7-8 weeks old), supplied by the Animal Facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, submitted to myocardial Ischemia-reperfusion (IR) or sham surgery (Sham). Experimental protocol was reviewed and approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil (Protocol #163/2016).

Experimental Myocardial Ischemia-reperfusion

Rats were anesthetized with ketamine (50mg/kg i.p.; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brazil) and xylazine (10mg/kg i.p.; Hertape Calier Saúde animal S/A, Brazil), intubated and mechanically ventilated with room air. A left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space, the pericardium

was opened, and the coronary artery (LAD) was occluded between the pulmonary artery outflow tract and the left atrium with a polyester suture (4-0, Ethicon, Brazil). After 30 min of ischemia, the occlusion was released by cutting the suture line, and the coronary flow was reestablished. The thorax was immediately closed after reperfusion and care was taken to remove excess air from the cavity to prevent the development of a pneumothorax. Sham-operated rats were submitted to the same surgical procedures except for the coronary artery occlusion. After IR or sham surgeries, the animals were housed with free access to food and water on a 12h light-dark cycle for four weeks.

Experimental protocol

Four weeks after IR or sham surgeries, animals were submitted to an echocardiographic exam under ketamine and xylazine anesthesia. At the end of the exam, the rats were killed with anesthetic overdose (urethane, 1g/kg, i.p.) and their heart was rapidly removed and fixed in formalin 10% for macroscopic and histological analysis.

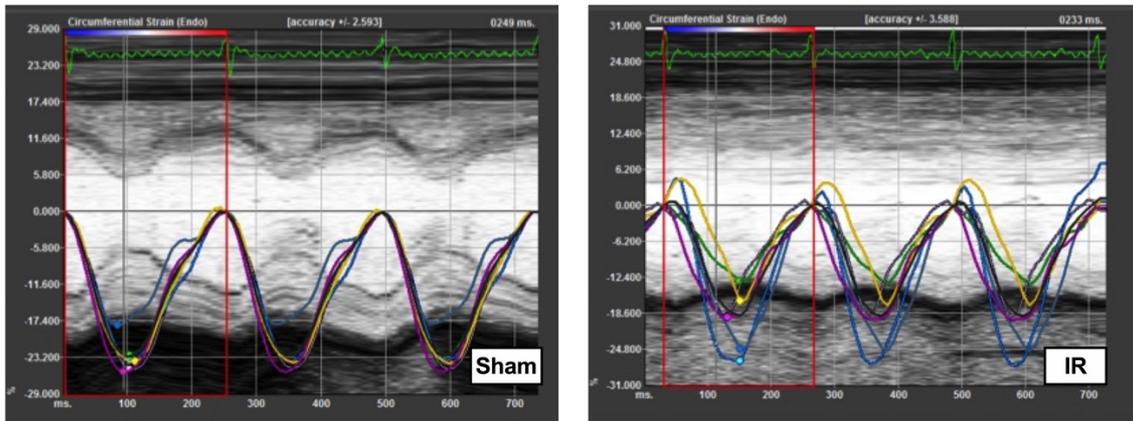
Conventional M-mode echocardiographic measurements

Images were acquired under ketamine and xylazine anesthesia using an echocardiograph (Vevo 2100, Visual Sonics, Canada) with a 21 MHz transducer. Parasternal short-axis images of the LV at the level of papillary muscles were recorded for conventional M-mode tracing measurements (i.e., LV end-diastolic diameter, LV end-systolic diameter, interventricular septum thickness, and LV posterior wall thickness). LV fractional shortening and ejection fraction were measured using M-mode from two-dimensional parasternal short-axis images as well.

Speckle- tracking echocardiography

To determine LV global and regional function, the circumferential and radial endocardial strain was evaluated using a speckle-tracking algorithm built into Vevo 2100 workstation (version 1.6.0). Two-dimensional high-frame (300 frames/second) cine loops data of the short-axis at the midventricular level (papillary level) was digitally stored for subsequent off-line strain analysis. The semiautomated border tracking software requires several points placed by the user on the endocardial and epicardial borders as a guide for border delineation and subsequent frame-by-frame tracking throughout the cardiac cycle (Figure 1). All parameters were evaluated from three consecutive cardiac cycles and expressed as the mean value.

Circumferential Strain



Radial Strain

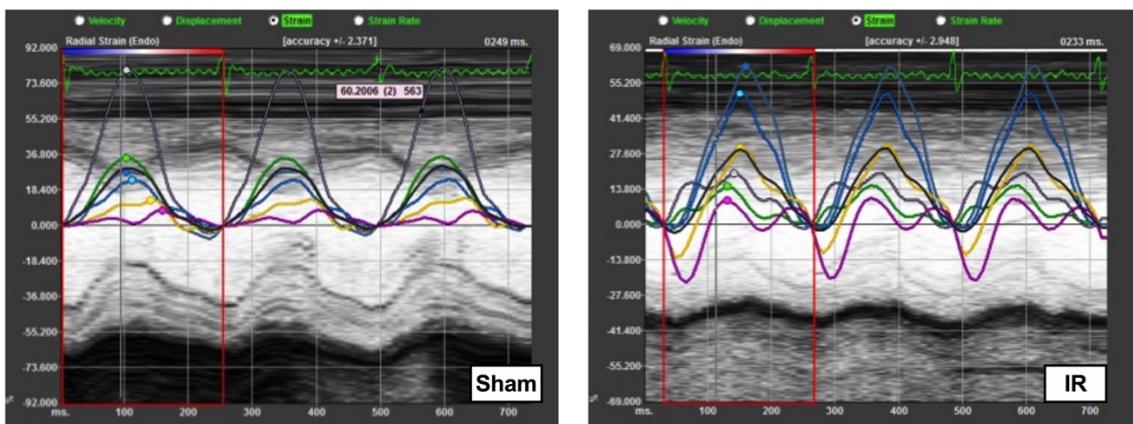


Figure 1. Representative images of Speckle-tracking echocardiography (STE) analysis of ventricular function on Vevo 2100. Segmental circumferential (upper panels) and radial (bottom panels) strain curves from a parasternal short-axis view in sham and IR rats.

Morphological analysis of the hearts

The ventricles of the hearts were carefully inspected looking for any macroscopic sign of myocardial scar elicited by the ischemia and/or ischemia-reperfusion process. Following, midventricular cross-sections of the left ventricle with 7 μm thick were cut and stained with Masson's trichrome for the quantification of interstitial collagen fibers. Stained cross-sections were captured using light microscopy (Leica DM5500B; Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) at x40 magnification. To estimate the area fraction (%) of collagen in Masson's trichrome-stained sections, 15 images of the septum, per rat, were randomly acquired for posterior analysis with the public-domain software NIH Image J (available on the internet site: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error. Unpaired t-test was used to compare conventional echocardiographic parameters, global and segmental myocardial strain and histological data. Correlations were assessed using linear regression and correlation coefficients. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

Visual inspection of the hearts from animals subjected to ischemia-reperfusion was not able to identify any macroscopic myocardial scar. As expected, no sign of macroscopic lesion was found in sham-operated rat.

Conventional M-mode echocardiographic parameters (cardiac morphology and function).

The morphometry of LV structures obtained from two-dimensional short axis (M-mode) echocardiography is shown in Table 1, while the data of systolic and diastolic functions are presented in Figure 2. No differences were observed for the conventional echocardiography parameters compared between groups; including end-diastolic and end-systolic diameters, the thickness of interventricular septum, LV posterior wall and left atrium and aorta ratio (LA/Ao). Also, LV fractional shortening, ejection fraction, and cardiac output were not altered after IR. Diastolic function was not different between groups, as shown by the ratio of the velocity of E and A waves (Doppler).

Table 1. Morphometric parameters obtained by echocardiography four weeks after myocardial ischemia-reperfusion (IR) or sham surgery (Sham).

	Sham (n=5)	IR (n=6)
LVIDd (mm)	8.6 ± 0.2	8.6 ± 0.1
LVIDs (mm)	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.3
IVSd (mm)	1.4 ± 0.04	1.6 ± 0.2
IVSs (mm)	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1
LVPWd (mm)	2 ± 0.1	1.9 ± 0.2
LVPWs (mm)	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.3
LA/Ao (au)	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.04

LVIDd: left ventricle internal diameter in diastole, **LVIDs:** left ventricle internal diameter in systole, **IVSd:** interventricular septum in diastole **IVSs:** interventricular septum in systole, **LVPWd:** left ventricle posterior wall in diastole, **LVPWs:** left ventricle posterior wall in systole, **LA/Ao:** left atrium/aorta. Values are means ± SEM. au: arbitrary unit.

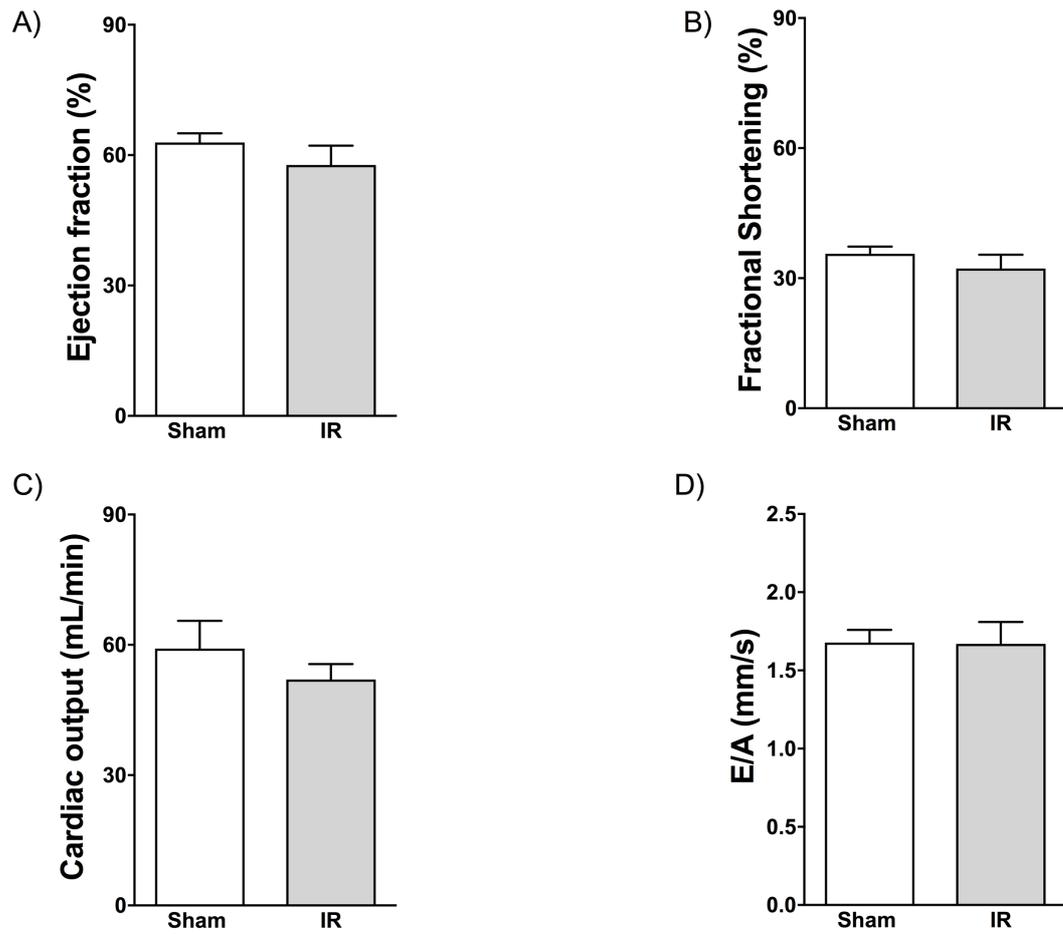


Figure 2. Conventional M-mode echocardiography analysis from systolic and diastolic functions four weeks after sham-operation (Sham) or myocardial ischemia-reperfusion (IR) surgeries. A) ejection fraction, B) fractional shortening, C) cardiac output and D) E/A ratio. Values are means \pm SEM.

Global circumferential (Scirc) and global radial (Srad) strain are reduced four weeks after myocardial IR.

Figure 3 shows global (mean of all six segments) Scirc and Srad. Interestingly, despite no differences were observed in the conventional echocardiographic parameters combined with no infarct scars, the rats subjected to IR showed lower values of Scirc and Srad.

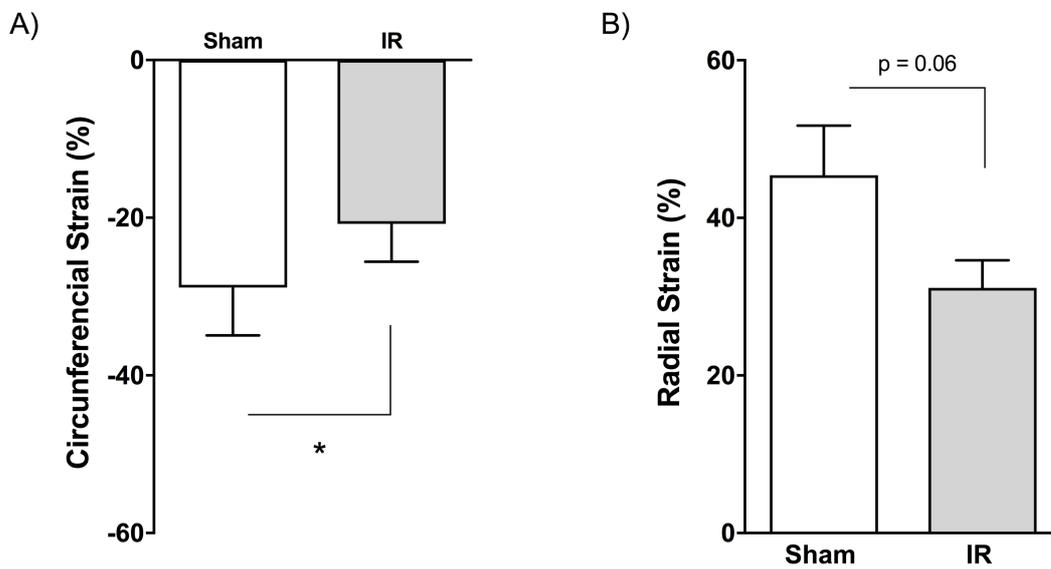


Figure 3. Global (mean of the six segments) left ventricular strain four weeks after sham-operation (Sham) or myocardial ischemia-reperfusion (IR) surgeries.

A) circumferential and B) radial strain. Values are means \pm SEM, * P < 0.05.

Segmental circumferential strain (SScirc) and segmental radial strain (SSrad) detected specific LV regions with reduced strain.

The midventricular short axis was divided into six segments, and the regional deformation was analyzed in all of them (Figure 4). The mean SScirc for the posterior septal wall, anterior free wall, and lateral wall segments were significantly lower in the IR animals than in the sham subjects. However, the SSrad was reduced only in the posterior septal wall and the inferior free wall segment, as compared to sham animals (Figure 5).

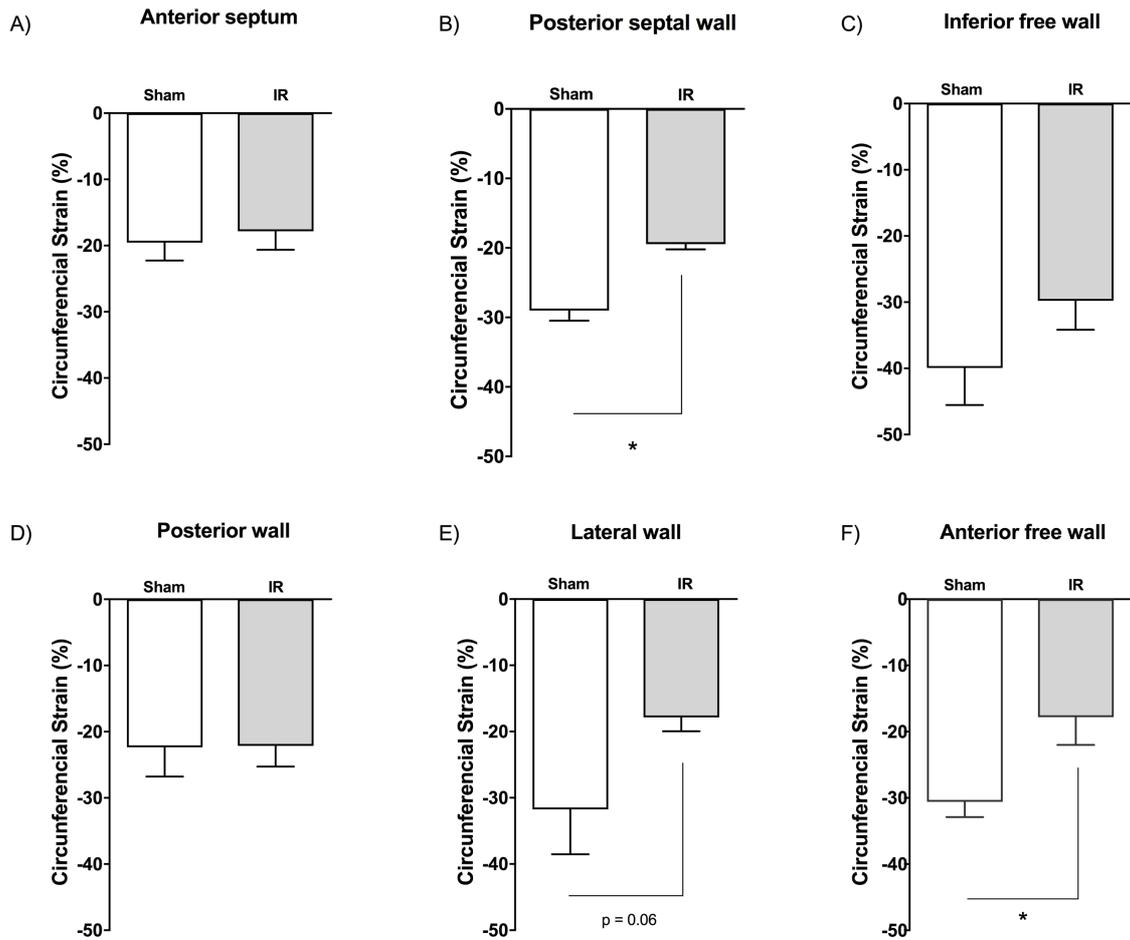


Figure 4. Segmental (six segments) left ventricle circumferential strain analysis four weeks after sham-operation (Sham) or myocardial ischemia-reperfusion (IR) surgeries. A) anterior septum, B) posterior septal wall, C) inferior free wall, D) posterior wall, E) lateral wall and F) anterior free wall. Values are means \pm SEM, * $P < 0.05$.

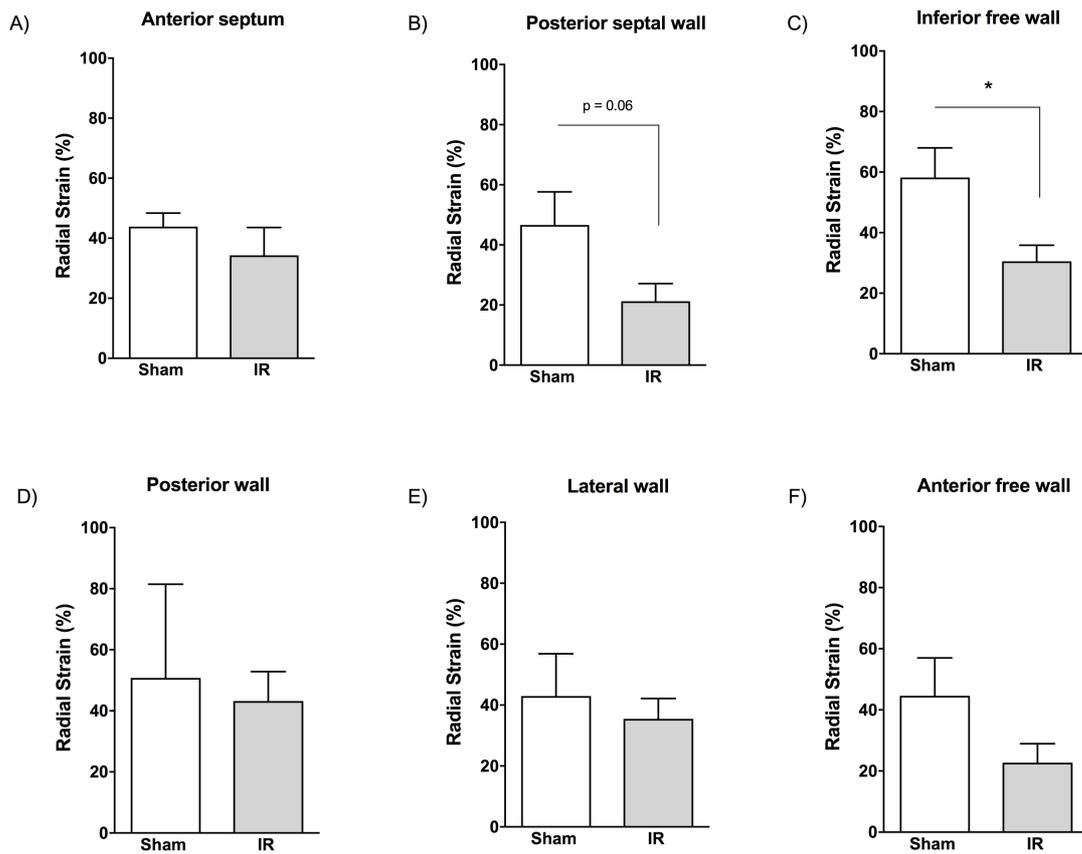


Figure 5. Segmental (six segments) left ventricle radial strain analysis four weeks after sham-operation (Sham) or myocardial ischemia-reperfusion (IR) surgeries. A) anterior septum, B) posterior septal wall, C) inferior free wall, D) posterior wall, E) lateral wall and F) anterior free wall. Values are means \pm SEM, * $P < 0.05$.

Collagen deposition and global myocardial strain.

A strong correlation was found between strain and myocardial collagen deposition. Both Scirc and Srad presented good correlation with collagen density, despite no changes in LV geometry (Figure 6).

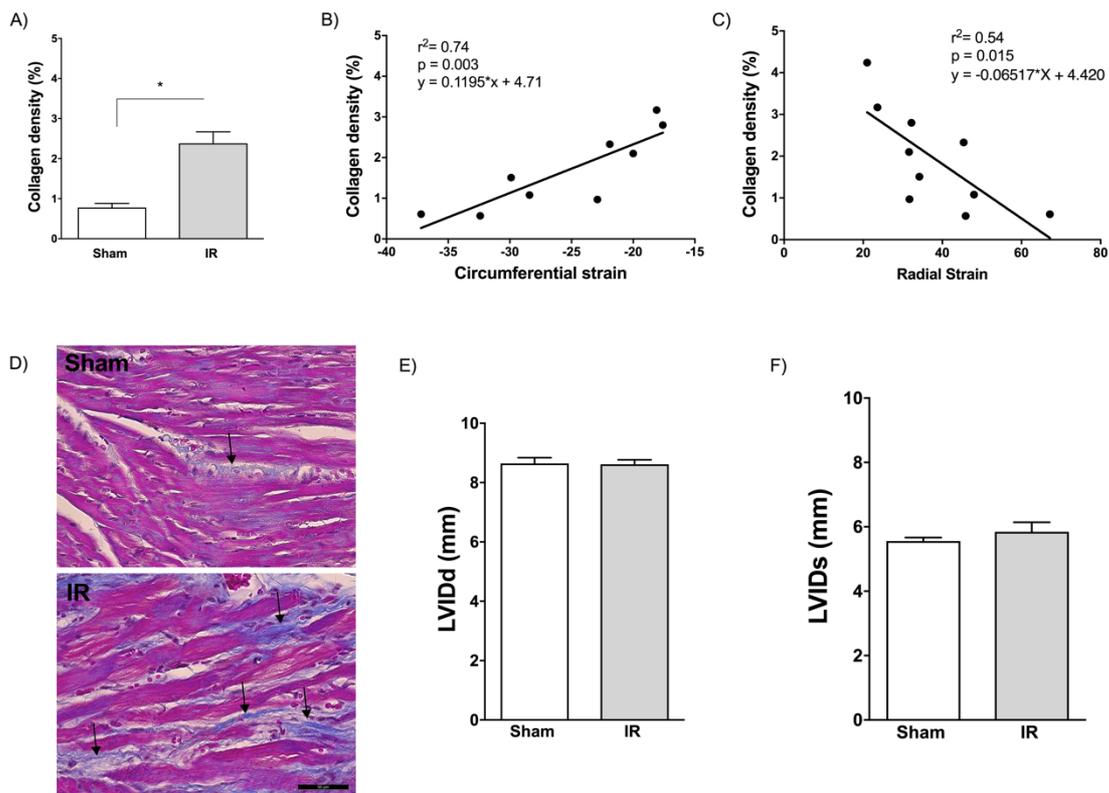


Figure 6. Collagen quantification (panel A) and collagen density correlation with global circumferential strain (panel B, $r=0.74$, $p=0.003$) and global radial strain (panel C, $r=0.54$, $p=0.015$) in rats four weeks after sham-operation (Sham) or myocardial ischemia-reperfusion (IR). D) representative images of histological midventricular sections of the heart stained with Masson's trichrome for collagen quantification (arrows indicate collagen fibers stained in blue). E) left ventricle internal diameter during diastole (LVIDd) and E) left ventricle internal diameter during systole (LVIDs). Values are means \pm SEM, * $P<0.05$.

DISCUSSION

The aim of this study was the use of advanced echocardiographic techniques (Speckle Tracking Echocardiography – STE) to assess the cardiac function in rats, four weeks after myocardial ischemia-reperfusion. We found that STE was able to identify alterations in both global and segmental circumferential/radial strain despite no evident macroscopic infarct scars and no changes in conventional M-mode echocardiographic parameters.

Rodent models of myocardial IR have been used as an important approach to investigate the mechanisms involved in IR injury, as well as to explore the effects of new cardioprotective therapies for the reperfusion injury. However, myocardial IR in rodents is a very challenging procedure, mainly due to the high mortality of the animals during the surgical procedures, and also due to the different levels of myocardial infarction obtained (9), leading to a lack of reproducibility of the results. In this context, sensitive tools are crucial to better evaluate the cardiac function, especially in ischemic heart disease models, that affect the heart regionally.

Popović and coworkers (2) showed that STE correctly identifies segmental LV dysfunction induced by scarring, 4 to 10 weeks after LAD permanent ligation; but, to our knowledge, ours is the first study to investigate the sensitivity of STE to identify changes in myocardial deformation (strain) indices in apparently healthy hearts (e.g., with no infarct scars and preserved LVEF). We also found interesting correlations between strain and collagen deposition in this model of IR.

Our results showed that global LV circumferential strain (Scirc) is reduced four weeks after myocardial IR and that global LV radial strain (Srad) presented a

strong tendency to reduce ($p=0,06$). Interestingly, none of the conventional echocardiographic parameters from systolic or diastolic function in these animals were reduced after myocardial IR (Figure 2). These data indicate that STE is more sensitive to detect changes in cardiac function than the conventional echocardiographic approach. Also, it is important to highlight that an echocardiographic follow-up of the heart function, using accurate tools, is considerably important, since the recovery of blood flow after myocardial infarction triggers necrosis and apoptosis in the myocytes, culminating with heart failure (10).

Segmental (regional) evaluation is an important application of STE, especially in ischemic diseases, and has been validated in humans and experimental animals (11–14). The segmental function was evaluated in our study by comparing from the experimental groups, each of the six different segments of the LV short-axis. Rats subjected to IR showed a reduced segmental circumferential strain (SScirc) in the anterior free wall, lateral wall, and posterior septal wall, compared to their sham-operated counterparts; as well as a reduction in the segmental radial strain (SSrad) of the posterior septal wall and inferior free wall. The first two segments, anterior free wall, and lateral wall are supplied by the occluded coronary artery, i.e., the LAD, which can explain the SScirc reduction in these regions. However, the reduction observed in the segments from the posterior septal wall and inferior free wall - regions remote from the site of the injury - could be related to LV fibrosis and the interactions among all six segments during heart contraction. Li et al., also observed a reduction in the regional function in remote segments, after ischemia-reperfusion (15).

An interesting study conducted by Chan and co-workers (16) showed that longitudinal strain is more sensitive than the radial strain, to detect myocardial alterations in acute and chronic ischemia in humans. On the other hand, Popovic and co-workers (17) reported that the contribution of the long-axis function seems to be lower in small mammals than in humans. Unfortunately, in our study longitudinal strain was not evaluated, and it was not possible to distinguish which of the three components of myocardial deformation (longitudinal, circumferential and radial) are more sensitive to detect myocardial impairments in our animals.

LV fibrosis is a hallmark of ventricular remodeling and a predictive risk factor for heart failure (HF) (18,19). Decreased compliance and diminished oxygen diffusion capacity caused by fibrotic tissue, deflagrate ventricular remodeling and can lead to the development of HF over-time.

An interesting correlation between decreased LV strain and adverse cardiac remodeling has been reported (2,14,20). In our study, LV Scirc and Srad analysis presented a good correlation with myocardial collagen deposition, despite the lack of difference in LV geometry between groups (figure 6). Thus, these results indicate that the strain analysis is sensitive to detect the presence of early fibrosis deposition, independent of considerable alterations in LV chamber diameters (e.g., at the beginning of the remodeling process).

In summary, the data obtained in the present study suggest that STE detects early alterations in systolic function caused by myocardial IR, being more sensitive than conventional echocardiographic parameters (e.g., LVEF). Also, these results highlighted the importance of using advanced and accurate echocardiographic approaches, such as STE, to detect initial signals of

myocardial remodeling, postponing the HF development with the current therapies available.

Limitations

Some limitations need to be taken into account in our study. First, echocardiography is prone to misinterpretation, since because it is a technique which depends, remarkably, of the expertise of who acquires the images, and who analyze the data. In the present study, a skilled professional recorded all echocardiographic images using a standardized protocol. The data analysis was post-processed by another experienced professional. Second, strain analysis was performed only in one section of the heart (mid-ventricular short-axis at the level of papillary muscles). However, both conventional echocardiographic parameters and STE data were analyzed in the same image. This outcome seems to be important because the techniques applied (conventional echocardiography and STE) presented different results. Third, we did not evaluate the longitudinal strain deformation.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks to Carlos Alberto Aguiar Silva and Eliane Maciel for the excellent assistance and technical support.

DISCLOSURE

No conflicts to disclosure.

SOURCES OF FUNDING

This study was supported by grants from CNPq and FAPESP.

REFERENCES

1. Bansal M, Kasliwal RR. How do I do it? *Speckle-tracking echocardiography*. Indian Heart J. 2013 Jan;65(1):117–23.
2. Popović ZB, Benejam C, Bian J, Mal N, Drinko J, Lee K, et al. *Speckle-tracking echocardiography correctly identifies segmental left ventricular dysfunction induced by scarring in a rat model of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jun;292(6):H2809-2816.
3. Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, et al. *Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging*. J Am Coll Cardiol. 2006 Feb 21;47(4):789–93.
4. Cho G-Y, Chan J, Leano R, Strudwick M, Marwick TH. *Comparison of two-dimensional speckle and tissue velocity based strain and validation with harmonic phase magnetic resonance imaging*. Am J Cardiol. 2006 Jun 1;97(11):1661–6.
5. Helle-Valle T, Crosby J, Edvardsen T, Lyseggen E, Amundsen BH, Smith H-J, et al. *New noninvasive method for assessment of left ventricular rotation: speckle tracking echocardiography*. Circulation. 2005 Nov 15;112(20):3149–56.
6. Notomi Y, Lysyansky P, Setser RM, Shiota T, Popović ZB, Martin-Miklovic MG, et al. *Measurement of ventricular torsion by two-dimensional ultrasound speckle tracking imaging*. J Am Coll Cardiol. 2005 Jun 21;45(12):2034–41.
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest. 2013 Jan 2;123(1):92–100.
8. Hausenloy DJ, Yellon DM. *Targeting Myocardial Reperfusion Injury--The Search Continues*. N Engl J Med. 2015 Sep 10;373(11):1073–5.
9. Omoto ACM, Gava FN, Silva CAA, Silva HB, Parente JM, Costa RM, et al. *Lack of scarring is not always a sign of cardiac health: Functional and molecular characterization of the rat heart's following chronic reperfusion*. PLOS ONE. 2018 Dec 20;13(12):e0209190.
10. Parlakpınar H, Orum MH, Sagır M. *Pathophysiology of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: A Review* -. Med Sci Int Med J. 2013;2(4):935–54.
11. Becker M, Bilke E, Kühl H, Katoh M, Kramann R, Franke A, et al. *Analysis of myocardial deformation based on pixel tracking in two dimensional echocardiographic images enables quantitative assessment of regional left ventricular function*. Heart Br Card Soc. 2006 Aug;92(8):1102–8.
12. Donal E, Tournoux F, Leclercq C, De Place C, Solnon A, Derumeaux G, et al. *Assessment of longitudinal and radial ventricular dyssynchrony in ischemic*

- and nonischemic chronic systolic heart failure: a two-dimensional echocardiographic speckle-tracking strain study.* J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr. 2008 Jan;21(1):58–65.
13. Korinek J, Wang J, Sengupta PP, Miyazaki C, Kjaergaard J, McMahon E, et al. *Two-dimensional strain a Doppler-independent ultrasound method for quantitation of regional deformation: validation in vitro and in vivo.* J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr. 2005 Dec;18(12):1247–53.
 14. Bhan A, Sirker A, Zhang J, Protti A, Catibog N, Driver W, et al. *High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014 May;306(9):H1371-1383.
 15. Li Y, Garson CD, Xu Y, Helm PA, Hossack JA, French BA. *Serial ultrasound evaluation of intramyocardial strain after reperfused myocardial infarction reveals that remote zone dyssynchrony develops in concert with left ventricular remodeling.* Ultrasound Med Biol. 2011 Jul;37(7):1073–86.
 16. Chan J, Hanekom L, Wong C, Leano R, Cho G-Y, Marwick TH. *Differentiation of subendocardial and transmural infarction using two-dimensional strain rate imaging to assess short-axis and long-axis myocardial function.* J Am Coll Cardiol. 2006 Nov 21;48(10):2026–33.
 17. Popović ZB, Sun JP, Yamada H, Drinko J, Mauer K, Greenberg NL, et al. *Differences in left ventricular long-axis function from mice to humans follow allometric scaling to ventricular size.* J Physiol. 2005 Oct 1;568(Pt 1):255–65.
 18. Xie M, Burchfield JS, Hill JA. *Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2.* Circulation. 2013 Jul 23;128(4):388–400.
 19. Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, et al. *Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis.* Circulation. 2009 Aug 18;120(7):577–84.
 20. Kuznetsova T, Nijs E, Cauwenberghs N, Knez J, Thijs L, Haddad F, et al. *Temporal changes in left ventricular longitudinal strain in general population: Clinical correlates and impact on cardiac remodeling.* Echocardiogr Mt Kisco N. 2019;36(3):458–68.