UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

VANESSA ALMEIDA AMORIN

**Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da
hipertrofia compensada para falência cardíaca**

Ribeirão Preto

2017

VANESSA ALMEIDA AMORIN

**Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da
hipertrofia compensada para falência cardíaca**

*Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no Departamento de
Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Patologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Maria Prado Zinni

Ribeirão Preto

2017

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amorin, Vanessa Almeida.

Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da hipertrofia compensada para falência cardíaca.

60p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP. Departamento de Patologia. Área de concentração: Patologia Experimental.

1. Hipertrofia cardíaca; 2. Falência cardíaca; 3. Transição de hipertrofia compensada para descompensada, 4. Maquinaria contrátil; 5. Proteínas contráteis.

Nome: Amorin, Vanessa Almeida

Título: Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da hipertrofia compensada para falência cardíaca.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho acima de tudo aos meus pais, **Luciana e Indalécio**, pelo exemplo de vida que me deram. Por tudo que me ensinaram sobre o amor, generosidade e honestidade. Por acreditarem em minha capacidade e me darem força pra continuar seguindo em frente. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui!*

*A minha irmã, **Vitória**, por essa força que nos une e fortalece nossas raízes. Pelo suporte e amor depositado em mim.*

AMO VOCÊS!

Agradecimento Especial

Á Profa. Dra. Cibeles Maria Prado Zinni

Minha eterna gratidão pela confiança e ajuda em todos os momentos. Pelo exemplo de pessoa humana, acolhedora e ética, pela sabedoria, competência e parceria, pelas preciosas orientações, contribuindo de forma significativa para a construção deste estudo. Obrigada por ter me acolhido e ensinado o caminho da pesquisa.

Agradecimentos

A Deus, meu bem mais precioso. Por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado. Pela força que me impulsiona e me direciona a cada dia.

À banca examinadora pela presença e disposição para avaliar esse trabalho.

À Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, por ter me recebido no laboratório e pelo apoio.

À Dra. Elen Rizzi Sanchez, pelo apoio científico, pelos conselhos tão valiosos e disponibilidade sempre que precisei.

Às queridas técnicas do laboratório de Patologia celular e molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP: Lígia G.V.B. Santoro e Mônica A. de Abreu, pela dedicação e pelos ensinamentos sobre as técnicas que tanto contribuiu para o enriquecimento de meu conhecimento, por me ajudarem em todos os momentos em que precisei.

À Elaine Medeiros Floriano, técnica do laboratório de Patologia Pulmonar do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

Às minhas companheiras de laboratório, principalmente às minhas amigas: Maria José Figueiredo, Ana Caroline Silva de Freitas e Glauce Trevisan por me ajudarem em toda a minha jornada até aqui, pela convivência, amizade e troca de experiências.

Aos funcionários do biotério da Patologia Carlos Henrique de Carvalho e Ana Carolina Veloni, pelo cuidado com os animais utilizados em nossas pesquisas, por fazerem o melhor que podem sempre pensando no bem-estar dos animais e no sucesso dos experimentos.

Aos secretários do Departamento de Patologia Neide T. Gonçalves, Rosângela N. Paiva, Camila L. Zambonini, Rodrigo B. Miotto, ao técnico de informática Felipe D. Coelho, pela convivência, pelos seus préstimos e por sempre facilitar com o trabalho burocrático.

Ao Felipe de Paiva Ulian e à família Paiva Ulian, que moram em meu coração, por serem parte da minha família e me trazerem lindos ensinamentos. Por sempre me levar adiante e acreditar em mim. Amo vocês, “mesmo se um dia, distantes estivermos, unidos estaremos”.

*A toda minha família, em especial ao meu primo **Samuel Amorin Grisote**, pelo carinho, cumplicidade e conselhos que me animaram durante esta jornada.*

*À **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio a pesquisa.*

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

”Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Amorin, VA. Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da hipertrofia compensada para falência cardíaca. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. 60f.

A sobrecarga crônica de pressão causa hipertrofia, disfunção e insuficiência cardíaca (IC). O mecanismo envolvido na transição da hipertrofia cardíaca compensada para descompensada ainda não é totalmente entendido. Evidências sugerem que modificações nas proteínas contráteis poderiam contribuir para disfunção contrátil e evolução para IC. Neste sentido, estudos mostraram mudanças na expressão das proteínas da maquinaria contrátil durante o desenvolvimento da doença cardíaca como um mecanismo inicialmente benéfico. Porém, na insuficiência cardíaca, ocorrem alterações estruturais que prejudicam a contratilidade. Contudo, não se sabe ao certo quais proteínas estariam contribuindo para a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca. Este estudo teve como objetivo investigar as alterações das proteínas da maquinaria contrátil na transição da hipertrofia cardíaca compensada para descompensada e correlacionar essas alterações com a função cardíaca. Ratos Wistar machos foram submetidos a estenose da aorta abdominal. Após 90d da cirurgia, foram realizados ecocardiograma, análise da pressão sanguínea e os corações foram coletados para realização do Western blot e imunofluorescência para miosina de cadeia pesada, actina sarcomérica, troponina T e troponina I. Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Aos 90d, $70,0 \pm 5,35\%$ dos animais apresentaram hipertrofia cardíaca (HH) e $30,3 \pm 4,79\%$ corações hipertrofiados+dilatados (HD). A pressão arterial média aumentou 58,2% no HH e 55,0% no HD. As expressões de α -actina sarcomérica, miosina de cadeia pesada, troponina T e I aumentaram no grupo HH. No grupo HD, a miosina de cadeia pesada e a troponina T reduziram significativamente. A função sistólica manteve-se preservada nos grupos controle e HH, porém reduzida no HD. A perda estrutural da miosina de cadeia pesada e da troponina T poderia contribuir para a insuficiência cardíaca observada nesse modelo experimental.

Palavras-chaves: hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, transição de hipertrofia compensada para descompensada, proteínas contráteis, maquinaria contrátil.

ABSTRACT

Amorin, VA. Remodeling of cardiac contractile proteins in the transition from compensated hypertrophy to heart failure. Dissertation (Msc). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. 60f.

Hypertension causes hypertrophy, cardiac dysfunction and heart failure (HF). The mechanisms implicated in the transition from compensated to decompensated cardiac hypertrophy are not fully understood. There is considerable evidence that changes in the contractile proteins may contribute to the contractile dysfunction and progression to HF. Studies have shown changes in the expression of contractile proteins during the development of heart disease as a mechanism that is initially beneficial. However, in heart failure there is an intrinsic reduction of cross-bridges that contributes to impaired contractility. It is not known which proteins are contributing to the transition from compensated hypertrophy to heart failure. We investigated α -sarcomeric actin, heavy chain myosin and troponins T and I in the transition from compensated to decompensated cardiac hypertrophy and correlate these alterations with cardiac function. Male Wistar rats were submitted to abdominal aorta constriction and killed at 90 days post-surgery (dps). The hearts were collected; Western blot and immunofluorescence were performed to investigate α -sarcomeric actin, heavy chain myosin and troponins T and I. Blood pressure and cardiac systolic function were evaluated. Data were considered significant when $p < 0.05$. At 90 dps, $70,0 \pm 5,35\%$ presented hypertrophic hearts (HH) and $30,3 \pm 4,79\%$ hypertrophic+dilated hearts (HD). Mean blood pressure increased 58.19% in HH and 54.96% in HD. Heavy chain myosin, troponin T, troponin I and α -sarcomeric actin expression increased in HH. In HD, only heavy chain myosin and troponin T reduced significantly. The systolic function was the same in control and HH animals and reduced in HD. The structural loss of heavy chain myosin and troponin T could contribute to heart failure observed in this experimental model of abdominal aorta constriction.

Keywords: cardiac hypertrophy, heart failure, transition from compensated to decompensated cardiac hypertrophy, contractile proteins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema das proteínas do miofilamento cardíaco. (A) Organização estrutural do sarcômero (Adaptado de Morimoto, 2008); (B) Disposição das proteínas que compõem o filamento fino e grosso (Adaptado de Seidman; Seidman, 2001)..... 20
- Figura 2- Sequência do procedimento cirúrgico utilizado no experimento.(A) Grupo *sham*: apenas mobilização da aorta foi realizada; (A-F) grupo estenose: após a dissecação, uma agulha romba que produz 80% de estenose é colocada sobre a aorta (C). Uma ligadura de fio de algodão é feita em torno da agulha (D), que é imediatamente removida (E), reduzindo o lúmen do vaso para o diâmetro da agulha (F)..... 26
- Figura 3- Imagens representativas do modo M de corações dos grupos sham-operados e após 30, 60 e 90d da cirurgia. As ondas representam o ciclo cardíaco na sístole (diâmetro menor) e diástole (diâmetro maior). Os gráficos representam dados da função sistólica (n=15 grupo)..... 33
- Figura 4- Imagens representativas de corte transversal dos corações, evidenciando as paredes do ventrículo direito (VD), septo e ventrículo esquerdo (VE) dos animais sham-operados e grupos HH e HD (painel superior). No painel central, observam-se cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e utilizados para a quantificação do diâmetro dos miócitos. Observar a presença de pequena barra preta na região nuclear do cardiomiócito, simulando uma medida de diâmetro da célula. Barra=50 micrômetros. O gráfico representa o valor médio do diâmetro dos cardiomiócitos nos diferentes grupos avaliados..... 35
- Figura 5- Imunofluorescência e Western blotting para actina sarcomérica. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e esse aumento manteve-se nos do grupo HD. Actina (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x..... 36

Figura 6-	Imunofluorescência e Western blotting para miosina de cadeia pesada. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e significativa redução nos animais do grupo HD. Miosina (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.....	37
Figura 7-	Imunofluorescência e Western blotting para troponina I. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e esse aumento manteve-se nos animais do grupo HD .Troponina I (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.....	38
Figura 8-	Imunofluorescência e Western blotting para troponina T. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e significativa redução nos animais do grupo HD. Troponina T (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Parâmetros ecocardiográficos.....	32
Tabela 2-	Pressão arterial sistólica, diastólica e média aos 90d após a cirurgia.....	34
Tabela 3-	Peso corporal e peso do coração.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
BSA	Albumina do soro bovino
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloryde
g	gramas
HCl	Ácido clorídrico
HD	Hipertrofiado+dilatado
HH	Hipertrofiado
HRP	Horseradish peroxidase
IVS	Septo interventricular
KCl	Cloreto de potássio
LVID	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
LVPW	Parede posterior do ventrículo esquerdo
M	Molar
MCP	Miosina de cadeia pesada
MCL	Miosina de cadeia leve
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MYL2	Miosina de cadeia leve reguladora-2

n	Número
Nm	Nanômetro
°C	Graus Célsius
PBS	Tampão salina fosfato
Pi	Fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilenosulfonila
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVO.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Animais de experimentação.....	25
3.2	Delineamento experimental.....	25
3.3	Análise da função cardíaca – Ecocardiografia.....	26
3.4	Análise da pressão arterial.....	27
3.5	Coleta dos tecidos.....	27
3.6	Microscopia óptica convencional.....	28
3.7	Imunofluorescência.....	28
3.8	Western blotting.....	29
3.9	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Função cardíaca.....	31
4.2	Análise da pressão arterial.....	33
4.3	Peso corporal e peso dos corações.....	34
4.4	Western blot e Imunofluorescência.....	34
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO.....	58
	APÊNDICES.....	59

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e uma das principais causas de morbidade e mortalidade (Vasan et al., 2002; OMS, 2012). A sobrecarga crônica de pressão produz remodelamento do miocárdio, que inclui mudanças significativas nos cardiomiócitos, fibroblastos e na matriz extracelular (MEC), contribuindo para a hipertrofia do ventrículo esquerdo (Levy et al., 1996; de Simone et al., 2008; Zile et al., 2011). A hipertrofia é caracterizada pelo aumento do volume celular do cardiomiócito e ocorre em resposta a diversos estímulos, incluindo fisiológicos, mecânicos, hormonais e genéticos (Kent et al., 1991; Sadoshima et al., 1992; Thum et al., 2007). Inicialmente, a hipertrofia é uma resposta adaptativa classificada como hipertrofia compensada, com função cardíaca preservada. Durante a fase de adaptação do tecido cardíaco à sobrecarga de trabalho ocorrem mudanças na estrutura do ventrículo esquerdo, originando a hipertrofia excêntrica ou concêntrica (Ganau et al., 1992). A hipertrofia concêntrica refere-se ao aumento da espessura da parede e da massa cardíaca, devido principalmente a adição de novas miofibrilas em paralelo no miocárdio, e uma leve ou nenhuma redução no volume da câmara. Na hipertrofia excêntrica ocorre aumento da massa cardíaca com aumento no volume da câmara, resultado do alongamento dos cardiomiócitos e dilatação da câmara cardíaca esquerda (Grossman et al., 1975; Bernardo et al., 2010).

Na hipertrofia ocorre a produção de novas unidades contráteis e sua regulação intrínseca é altamente complexa e ainda não completamente esclarecida. Para que ocorra a hipertrofia cardíaca é preciso que haja a transdução de várias classes de estímulos para sinais intracelulares que causariam uma resposta. Esta poderia ser traduzida como o aumento na síntese de proteínas e RNA (Rabinowitz; Zak, 1972). De fato, uma das primeiras alterações bioquímicas observadas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca é o aumento da atividade da RNA polimerase, enzima responsável pela síntese protéica (Nair et al., 1968). A consequência destes fenômenos é a produção de maior número de organelas para atender ao aumento do número de unidades contráteis. Espera-se que este aumento na atividade biossintética seja regido por mecanismos finos de adaptação para permitir a imprescindível proporcionalidade da célula e adequação às novas necessidades. Essa adequação é, provavelmente, decorrente do tipo de estímulo e dos sinais intracelulares deflagradores do processo.

Embora a hipertrofia e o remodelamento cardíaco em resposta à sobrecarga de pressão sejam inicialmente uma resposta benéfica, gradualmente conduzem a riscos aumentados de eventos cardiovasculares (Frohlich et al., 1992; Varagic; Frohlich, 2002; Stilli et al., 2006). As alterações morfológicas e moleculares na hipertrofia compensada podem induzir a evolução para a descompensação e insuficiência cardíaca. Sabidamente, a apoptose e a degradação excessiva da matriz extracelular e de proteínas contráteis podem contribuir para a evolução da hipertrofia compensada para insuficiência cardíaca. Foi demonstrado que uma das principais características da progressão para a insuficiência cardíaca é a diminuição da força de contração cardíaca (de Tombe, 1998). Além disso, estudos mostraram sinais iniciais de inadequação principalmente no compartimento celular do tecido miocárdico, anterior à transição para disfunção cardíaca, como um processo multifatorial envolvendo mudanças na expressão de diferentes proteínas. Há evidências consideráveis de que modificações nas proteínas contráteis podem contribuir para disfunção contrátil e evolução para insuficiência cardíaca (Lowes et al., 1997; Houser; Margulies, 2003; Li et al., 2013).

As miofibrilas dos cardiomiócitos são estruturas citoesqueléticas altamente diferenciadas, em que os componentes da maquinaria contrátil estão organizados em unidades sarcoméricas repetitivas e individuais (Squire, 1997). O sarcômero é composto por proteínas contráteis, regulatórias e estruturais. A área que um sarcômero se liga ao seguinte é designada de disco Z ou disco intercalar. Cada lado do disco Z encontra-se a banda I que é composta apenas por filamentos finos. Entre as bandas I existe a banda A, onde há a sobreposição de filamentos grossos e filamentos finos. A banda A contém uma linha M central composta por filamentos grossos (**Figura 1A**) (Seidman; Seidman, 2011; Marques; Oliveira, 2016). O filamento grosso contém miosina, um hexâmero composto por duas cadeias pesadas, duas cadeias leves essenciais e duas cadeias leves regulatórias (Chang; Potter, 2005). O filamento de miosina forma a banda A dentro do sarcômero e se liga parcialmente ao filamento fino. O filamento fino é composto por uma dupla hélice de moléculas de actina e está associada com duas proteínas regulatórias: tropomiosina e troponina (Boron; Boulpaep, 2008; Lu et al., 2013). As proteínas do filamento fino são vinculadas e se projetam a partir do disco Z, transmitindo força entre os cardiomiócitos (Olson, 1998). A troponina é um heterodímero composto pela troponina T que se liga a tropomiosina, a troponina C com função de se ligar ao Ca^{2+} e a troponina I que inibe a contração muscular impedindo a atividade ATPase do complexo miosina-actina (Boron; Boulpaep, 2008). A tropomiosina está presente no domínio externo do filamento de actina e bloqueia a interação da miosina com a actina durante a diástole (**Figura 1B**).

Figura 1: Esquema das proteínas do miofilamento cardíaco. **(A)** Organização estrutural do sarcômero (Adaptado de Morimoto, 2008); **(B)** Disposição das proteínas que compõem o filamento fino e grosso (Adaptado de Seidman; Seidman, 2001).

A contração do músculo cardíaco acontece através da interação entre o filamento fino e o grosso seguida da ativação da actomiosina Mg^{2+} -ATPase, sendo iniciada com o potencial de ação que ativa os canais de cálcio do tipo L dependente de voltagem e gera um pequeno afluxo desse íon através da membrana sarcolemal (Bers, 2002; Moore, 2012; Lu et al., 2013). Com isso, o cálcio se liga na troponina C, mudando sua conformação e liberando a atividade inibitória da troponina I e a tropomiosina se move para o domínio interno de actina (Craig; Lehman, 2001; Willott, 2009). A seguir, a cabeça da miosina de cadeia pesada (MCP) liga-se ao ATP e ao sofrer hidrólise ($ADP+P_i$), a miosina adquire grande afinidade pela actina, deslizando pelo filamento fino, o que causa a contração do miocárdio. Após a liberação do P_i , um novo ciclo de pontes cruzadas é formado (Boron; Boulpaep, 2008; Wilson; Lucchesi, 2014).

Na hipertrofia miocárdica, além do aumento da expressão de proteínas contráteis estruturais, ocorre uma modificação no padrão de expressão dessas proteínas. Entretanto, na insuficiência cardíaca ocorre uma redução intrínseca de pontes cruzadas que contribui para uma contratilidade prejudicada (Braunwald; Bristow, 2000; VanBuren; Okada, 2005). Mudanças foram observadas na expressão da MCP durante o desenvolvimento da doença cardíaca como um mecanismo que inicialmente pode ser considerado benéfico (Narolska et al., 2005). A miosina é um transdutor de movimento químico-mecânico. Gera movimentos transferindo a energia da hidrólise do ATP para o deslizamento dos miofilamentos. Cada miosina é basicamente uma proteína hexamérica, consistindo de duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves (MCLs) (Gupta, 2007). O tecido cardíaco possui duas isoformas de MCP: a rápida (α) e a lenta (β) (McNally et al., 1989). Foi demonstrado que a isoforma β -MCP é cerca de 5 vezes mais econômica, consideravelmente mais lenta do que a isoforma α -MCP (Narolska et al., 2005). Devido relação entre a MCP e a função miocárdica, energética e bioquímica, assume-se que a MCP é o principal determinante das características contráteis no miocárdio. Na sobrecarga crônica de pressão, átrios humanos sofrem uma substituição parcial da α -MCP pela isoforma β -MCP (Schaub et al., 1998). Níveis altos na expressão de β -MCP e peptídeo natriurético atrial foram mantidos durante um longo período em um modelo in vitro de hipertrofia cardíaca utilizando cultura de cardiomiócitos (Sadoshima et al., 1992). Outro estudo relatou que na sobrecarga crônica de pressão houve um aumento na expressão do RNAm para a β -MCP e diminuição para a isoforma α -MCP. A retirada do estímulo hipertrófico resultou na regressão da hipertrofia e retorno rápido da α -MCP aos valores normais (Gupta; Zak, 1992). Além disso, níveis elevados de mRNA para α -MCP são expressos em corações humanos sem insuficiência, entretanto, ocorre uma significativa redução em pacientes com insuficiência cardíaca (Nakao et al., 1997, Miyata et al., 2000). Em contrapartida, Lowes e colaboradores (1997) observaram um aumento na expressão de β -MCP em pacientes com insuficiência cardíaca. Alterações na expressão de genes de proteínas da miosina de cadeias leves também têm sido descritas na insuficiência cardíaca. A miosina de cadeia leve reguladora-2 (MYL2) pertence à parte fosforilável de reguladores de cadeias leves da miosina. A MYL2 liga-se especificamente a miosina de cadeia pesada, sendo um dos principais componentes dos filamentos sarcoméricos desempenhando um papel modulador na contração muscular. Níveis da expressão MYL2 foram reduzidos em amostras de tecido do miocárdio de vários pacientes com insuficiência crônica (Li et al., 2011). Os achados até agora são controversos, daí a necessidade da contínua avaliação da expressão dessa proteína no desenvolvimento de disfunção e insuficiência cardíaca.

Alterações no filamento fino e proteínas associadas também podem estar envolvidas no processo de remodelamento miofibrilar (Lowes et al., 1997; Lewinter; Vanburen, 2002). A actina sarcomérica é composta por duas isoformas: a α -cardíaca e a α -esquelética, sendo que mudanças sutis nas isoformas podem causar alterações importantes na contratilidade do músculo cardíaco. A deficiência de α -actina cardíaca em camundongos levou a letalidade em estágio embrionário ou perinatal com desordem profunda nas miofibrilas cardíacas (Schwartz et al., 1986; Kumar et al., 1997). Foi inicialmente demonstrado que o gene da α -actina cardíaca mostrou-se inalterado na sobrecarga de pressão (Chassagne et al., 1993). Entretanto, outros estudos demonstraram que estímulos hipertróficos induzem a expressão de genes fetais como a α -actina esquelética e α -actina de músculo liso (Machackova et al., 2006). O aumento na expressão de α -actina esquelética nos estágios iniciais da hipertrofia compensada causada por sobrecarga de pressão aumentou a contratilidade do miocárdio e preservou o desempenho mecânico do coração (Stilli et al., 2006; Canton et al., 2011). Porém, também foi demonstrado que o aumento na expressão da actina contribui para o aparecimento de sinais iniciais de enfraquecimento da função mecânica ventricular, antes da ocorrência de lesão miocárdica severa e a transição para a descompensação (Berni et al., 2009). Neste sentido, ainda é incerto a contribuição da expressão da actina para a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca.

Alterações nas proteínas regulatórias do filamento fino têm sido demonstradas na hipertrofia cardíaca, como o aumento da expressão das isoformas de troponina T durante a hipertrofia ventricular em coelhos (Chen et al., 1997). Há evidências que a disfunção miofibrilar na insuficiência cardíaca também pode ser causada por alterações nas propriedades e quantidade de troponinas, o que prejudica a regulação da interação entre a miosina-actina (Wu et al., 1998; van der Laarse, 2002). Foi observado que a expressão das isoformas de troponina T (TnT-1 e -2) diminui nos corações com insuficiência causados pela sobrecarga de pressão quando comparados com o grupo controle. Muitos pacientes com insuficiência cardíaca possuem uma elevação da TnT e TnI no plasma sugerindo uma degradação proteolítica e danos similares ao infarto do miocárdio (Gulati et al., 1994; Missov et al., 1997). Entretanto, Hunkeler e seu grupo (1991) observou que não há alterações na expressão de TnI nos estágios finais de insuficiência cardíaca. O aumento do RNAm para as isoformas fetais de TnI não foram detectadas em amostras de ventrículo direito e esquerdo nos corações com insuficiência causada por hipertensão pulmonar, isquemia cardíaca e cardiomiopatia dilatada, sugerindo que a TnI não está relacionada com os mecanismos que levam a alterações na contratilidade durante a transição para a insuficiência cardíaca. Evidências sugerem que o

mesmo acontece com a TnC, que permanece estável nas doenças do miocárdio (Adamcová; Pelouch, 1999).

Como mostrado acima, o comprometimento das proteínas da maquinaria contrátil resulta em disfunção da contração muscular e pode estar associada com a insuficiência cardíaca (Yin et al., 2015). Porém, há controvérsias sobre quais proteínas sofrem alterações durante a transição da hipertrofia compensada para a descompensada. Esse esclarecimento poderá fornecer subsídios para o maior entendimento da patogênese dessa doença e auxiliar no desenvolvimento de mecanismos inibitórios para evitar a evolução para a insuficiência cardíaca.

2. OBJETIVO

O presente estudo propõe investigar as alterações morfológicas que ocorrem nas proteínas contráteis cardíacas (actina sarcomérica, miosina de cadeia pesada, troponina T e troponina I) durante a transição da hipertrofia compensada para a descompensada em corações de ratos submetidos à estenose crônica da aorta abdominal e correlacionar essas alterações com a função cardíaca.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos (n=80), pesando em média 150g obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram mantidos 5 animais por caixa (41x34x16 cm) em ambiente com temperatura controlada e ciclo de 12h claro/escuro. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Foram feitos todos os esforços para se minimizar o sofrimento e a utilização do menor número de animais. O presente projeto de pesquisa foi apresentado à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aprovado sob número 050/2016.

3.2 Delineamento experimental

A cirurgia de estenose da aorta abdominal foi baseada na técnica descrita por Béznak (1955) e modificada por Rossi e Peres (1992). Nosso grupo tem vasta experiência nessa área (Rossi; Peres, 1992; Prado et al., 2006; Prado; Rossi, 2006; Prado et al., 2008; dos Santos et al., 2016). Os animais foram anestesiados com a mistura de 2% de isoflurano e 1% oxigênio medicinal. A retirada dos pêlos no local da incisão foi feita com creme depilatório. Os animais foram colocados em mesa cirúrgica e a antisepsia da pele feita com álcool iodado. Através de incisão cirúrgica de cerca de 1,5 cm de extensão, oblíqua, paralela e 0,5 cm abaixo do rebordo costal esquerdo, os planos foram dissecados até a cavidade peritoneal. Após a exposição da aorta, esta foi dissecada logo acima da adrenal por onde se passou um fio de algodão 4,0. A seguir, uma agulha romba de 0,85 mm foi colocada paralela à aorta, atando-se com nó duplo o fio de algodão. Com a retirada da agulha, a artéria passou a apresentar estenose local com diâmetro correspondente da agulha. Após o término desses procedimentos, a parede abdominal foi suturada e realizada limpeza local com álcool iodado. Os animais *sham-operados* foram submetidos a procedimento cirúrgico semelhante, diferindo apenas no trato com a aorta, apenas manipulada (**Figura 2**). Os animais receberam analgésico (dipirona) de 6/6h até 24 horas após a cirurgia.

Figura 2: Sequência do procedimento cirúrgico utilizado no experimento. (A) grupo *sham*: apenas mobilização da aorta foi realizada; (A-F) grupo estenose: após a dissecção, uma agulha romba que produz 80% de estenose é colocada sobre a aorta (C). Uma ligadura de fio de algodão é feita em torno da agulha (D), que é imediatamente removida (E), reduzindo o lúmen do vaso para o diâmetro da agulha (F).

3.3 Análise da função cardíaca – Ecocardiografia

O estudo histopatológico dos corações provê somente informação pontual referente à estrutura cardíaca em um animal. Por outro lado, o uso de técnicas diagnósticas não invasivas baseadas em imagem permite o estudo em série das alterações cardíacas tornando-se uma ferramenta importante para o estudo da progressão natural das doenças.

Para essa análise, os animais (n=15/grupo) foram anestesiados com a mistura de 2% de isoflurano vaporizado em 1% de oxigênio medicinal, permitindo ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. O animal foi colocado em placa aquecida (37-40°C) e as quatro patas conectadas a eletrodos de eletrocardiograma. Os pêlos da região anterior do tórax foram retirados com o auxílio de creme depilatório. Foi utilizado gel aquecido durante o exame para formar uma interface entre o tórax e o transdutor. O equipamento de ecocardiografia utilizado foi o Vevo 2100® High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá), com transdutor de frequência de 15 MHz. As imagens ecocardiográficas em modo B e modo M foram obtidas através do eixo longo paraesternal. As medidas diastólicas foram realizadas na região de maior dimensão da cavidade ventricular, e

as medidas sistólicas na região de menor dimensão da cavidade ventricular, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia. A fração de ejeção e fração de encurtamento foram calculadas e utilizadas como um determinante da função sistólica do ventrículo esquerdo (VE). As medidas convencionais do ventrículo esquerdo incluindo: a espessura do septo interventricular (IVS) na sístole e na diástole, o diâmetro interno do ventrículo esquerdo (LVID) na sístole e na diástole e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (LVPW) na sístole e na diástole foram avaliadas.

3.4 Avaliação da pressão arterial

Vinte e quatro horas após a realização do estudo funcional através da ecocardiografia aos 90d após a cirurgia, a pressão arterial foi avaliada. Os animais (n=6-8/grupo) foram anestesiados com pentobarbital de sódio (40mg/kg, ip). A artéria carótida foi isolada, clampeada e realizada uma incisão puntiforme na superfície anterior onde foi introduzido o cateter (cânula PE-10 + PE-50). A cânula (PE-50) preenchida com salina heparinizada foi conectada a um transdutor de pressão arterial e venosa TRA 021 - PowerLab (AD Instruments, Castle Hill, Australia). As pressões sistólica, diastólica e média foram avaliadas por 5 minutos, sendo registrado o valor médio no período.

3.5 Coleta dos corações

Imediatamente após a avaliação da pressão arterial, os animais foram mortos e os corações coletados. Os animais (n=10-12/grupo) foram colocados sobre mesa cirúrgica (ainda anestesiados com pentobarbital de sódio, o mesmo anestésico usado na avaliação da pressão arterial) e por meio de incisão mediana o tórax foi aberto e os animais mortos por exsanguinação pós-seção da aorta abdominal. O coração foi retirado ainda pulsando, lavado rapidamente em salina para retirada do excesso de sangue, imerso em uma solução de KCl 0.05M, objetivando a parada cardíaca em diástole, seco em papel de filtro, pesado em balança de precisão e recortado em duas metades por um corte transversal. A metade superior, onde se encontram os vasos da base, foi fixada em formol tamponado 10%, e a metade inferior, que contém o ápice, foi novamente recortada e uma fatia colocada em OCT (Tissue Tek®-Triangle Biomedical Sciences, Durbam, NC, EUA), congelada em isopentano resfriado com nitrogênio líquido e utilizada para as reações de imunofluorescência. O restante do VE foi colocado em eppendorf, congelado em nitrogênio líquido e utilizado para a realização do Western blotting. Os fragmentos congelados foram mantidos a -80°C até o momento de uso.

3.6 Microscopia Óptica Convencional

Os corações fixados em formol foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Após 24 horas, período de fixação do material, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95%, 30 minutos cada e 100%, 4 trocas de 1 hora cada). Depois do último álcool, as amostras foram clarificadas em xilol (três banhos de 30 minutos cada), dois banhos de parafina (2 horas cada) e inclusão em parafina. A partir dos blocos de parafina, foram realizados cortes de 5 µm de espessura e posteriormente corados com hematoxilina-eosina. Para a análise do diâmetro médio dos miócitos, foram obtidas 30 medidas em fibras dispostas longitudinalmente, no aumento de 400x. O menor diâmetro foi obtido na região do núcleo das referidas células, onde o envelope nuclear é nitidamente definido e também ambas as extremidades da célula. Para essas análises morfométricas (n=6-8/grupo), foi utilizado o programa de análise de imagens Leica QWin V 3.2.0 (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), vídeo-câmera Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador online onde foram avaliados o menor diâmetro das células.

3.7 Imunofluorescência

Os corações (n=5-6/grupo) foram coletados e armazenados como descrito previamente. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em criostato Leica CM 1850 (Leica Instruments, Nusslich, Alemanha), transferidos para lâminas silanizadas e fixados em acetona gelada por 10 minutos. Depois de fixadas e secas em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) e colocadas em Triton 0,5% em PBS durante 15 minutos e posteriormente incubadas com soro de cavalo 1:50 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluído em BSA 1% e deixadas incubando *overnight* a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários contra: miosina de cadeia pesada (anticorpo monoclonal de camundongo, Abcam, 1:200), actina sarcomérica (anticorpo monoclonal de camundongo, Sigma, 1:400), troponina T (anticorpo monoclonal de camundongo, Abcam, 1:100) e troponina I (anticorpo policlonal de coelho, Abcam, 1:100). Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário. Foram utilizados como anticorpos secundários: α-coelho-IgG/FITC e α-camundongo-IgG/FITC (Vector Laboratories), na concentração de 1:200 e diluídos em HEPES 0,01 M, durante 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em PBS (3 vezes de 10 minutos). Para a

marcação de actina foi usada faloidina (Molecular Probes, Eugene, EUA) 1:1000 diluída em BSA 0,1% por uma hora. A marcação nuclear foi feita com 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihidrochloryde (DAPI, Molecular Probes) por 3 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) e montadas com Prolong® (Invitrogen, Molecular Probes). As lâminas foram analisadas em microscópio de deconvolução Leica DM 6000M (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), com o software Leica LAS AF (versão 1.8.0 build 1346) e videocâmera (Leica DC350F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e computador on-line.

3.8 Western blotting

As amostras de tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais (n=8/grupo) foram coletadas da maneira descrita no item 3.5 e mantidas a -80°C até o momento da extração de proteínas. Foi adicionado ao material o tampão de extração com inibidores da fosfatase (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1% SDS e 1 mM PMSF; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA) e inibidores de protease (Protease inhibitor cocktail, Amresco LLC, Solon, Ohio, EUA). Em seguida, o tecido foi triturado em polytron (DREMEL®300, Marconi, Ribeirão Preto, Brasil). O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de proteínas. A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de *Bradford*. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories) utilizando-se o filtro específico para o comprimento de onda correspondente à 595 nm.

As amostras contendo 50µg de proteínas foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE a 7% ou 10% de acordo com o peso molecular da proteína analisada. Terminada a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (BioRad Laboratories). A transferência completa das proteínas foi confirmada pela coloração da membrana com o corante Ponceau S (Sigma-Aldrich). As membranas carregando as proteínas foram colocadas em solução de bloqueio com BSA (Sigma-Aldrich) 5% *overnight* a 4°C. Após, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: miosina de cadeia pesada (anticorpo monoclonal de camundongo, Abcam, 1:2000), actina sarcomérica (anticorpo monoclonal de camundongo, Sigma, 1:1000), troponina T (anticorpo monoclonal de camundongo, Abcam, 1:1000), troponina I (anticorpo policlonal de coelho, Abcam, 1:1000) diluídos em solução de PBS-T 1X com BSA à 1%. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados com HRP (horseradish peroxidase,

Santa Cruz Biotechnology) diluídos em solução com PBS-T 1X com BSA à 2% por 40 minutos a temperatura ambiente. Por último, as membranas foram incubadas com solução de revelação (Luminata Forte, EMD Millipore Luminata™ Western HRP Chemiluminescence Substrates, Millipore, Merk, Alemanha) de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, as membranas foram expostas e documentadas através do equipamento de fotodocumentação ChemiDoc XRS (BioRad Laboratories). A quantificação das bandas foi realizada com o software Image J através da função Gel Analyzes. Os valores de cada banda foram proporcionais ao valor de intensidade integrada e expressos em unidades arbitrárias (UA). O anticorpo anti-GAPDH (1:10.000, Cell Signaling, Danvers, EUA) foi usado como controle da quantidade de proteína aplicada nos géis.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA). Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. Comparações múltiplas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Função cardíaca

O estudo ecocardiográfico foi realizado nos animais sham-operados (controles) e após 30, 60 e 90d da cirurgia. Como alguns parâmetros são dependentes do peso, os animais selecionados para a realização desses exames apresentaram o mesmo peso corporal. Aos 30 e 60d após a cirurgia, somente 2 grupos eram evidenciados no exame: os animais operados e os animais controles. Porém, aos 90d após a cirurgia, o grupo operado dividiu-se em animais que mantiveram seus corações hipertrofiados (grupo HH) e animais que além de corações hipertrofiados, também apresentaram-se dilatados (grupo HD). Uma vez que a hipertrofia cardíaca é um processo comum em ambos os grupos HH e HD após a constrição da aorta abdominal, e somente os animais do grupo HD tiveram os corações hipertrofiados+dilatados 90d após a cirurgia, a análise dos resultados foi realizada principalmente comparando-se estes dois grupos (HH x HD).

A tabela 1 mostra as alterações nos parâmetros ecocardiográficos. O aumento na espessura da parede do VE foi evidenciada pelo aumento na espessura do septo interventricular (IVS) e também pelo aumento na espessura da parede posterior do VE (LVPW) desde os 30d após a cirurgia tanto na sístole quanto na diástole. Alterações no diâmetro interno do VE (LVID) foram observadas somente no grupo HD. A função sistólica aos 30 e 60d após a cirurgia não foi diferente do grupo controle. Os achados do grupo HH foram semelhantes aos observados ao 30 e 60d após a cirurgia (**Figura 3**). Importantes reduções foram observadas no grupo HD: 45% na fração de ejeção e 41,5% na fração de encurtamento.

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos observados após 30, 60 e 90d da cirurgia nos grupos controles e operados

	30d		60d		90d		
	Sham	Operado	Sham	Operado	Sham	HH	HD
IVS sístole (mm)	1,8±0,2	2,3±0,4*	2,0±0,3	2,8±0,3***	2,1±0,4	2,7±0,4**	2,8±0,4***
IVS diástole (mm)	1,4±0,1	1,6±0,2*	1,5±0,2	1,9±0,2***	1,5±0,1	1,9±0,3***	2,0±0,3***
LVID sístole (mm)	4,9±0,6	5,4±0,6	5,2±0,6	5,6±0,8	5,4±0,5	6,0±0,3###	8,2±1,1***
LVID diástole (mm)	7,7±0,7	8,1±0,7	7,8±0,6	8,8±0,9	8,3±0,3	9,1±0,9###	10,6±0,9***
LVPW sístole (mm)	2,3±0,2	2,7±0,4*	2,4±0,3	3,1±0,4***	2,5±0,1	3,1±0,4***	2,7±0,2
LVPW diástole (mm)	1,7±0,2	1,9±0,2*	1,8±0,2	2,1±0,2**	1,7±0,1	2,1±0,2**	2,0±0,3
Fração de ejeção (%)	65,3±5,8	62,2±5,8	62,6±5,8	63,3±5,4	67,7±7,3	61,5±4,9###	35,5±3,3***
Fração de encurtamento (%)	36,7±3,9	33,9±5,0	35,3±2,5	37,4±3,8	37,0±3,4	34,6±2,8###	21,6±5,3***

Valores são média ± desvio padrão da média *p<0,05 - versus sham **p<0,01 - versus sham ***p<0,001 - versus sham ###p<0,001 - HH versus HD.

Figura 3: Imagens representativas do modo M de corações dos grupos sham-operados e após 30, 60 e 90d após a cirurgia. As ondas representam o ciclo cardíaco na sístole (diâmetro menor) e diástole (diâmetro maior). Os gráficos representam dados da função sistólica (n=15 grupo). IVS = Septo interventricular; LVID = diâmetro interno do ventrículo esquerdo; LVPW = parede posterior do ventrículo esquerdo.

4.2 Análise da pressão arterial

Houve um aumento na pressão sistólica de 73,8% no grupo HH e 71,3% no grupo HD, quando comparada as pressões sistólicas dos animais sham. A pressão diastólica aumentou 50,5% no grupo HH e 49,4% no grupo HD. A pressão arterial média aumentou 58,2% no grupo HH e 55% no grupo HD quando comparada aos controles (**Tabela 2**).

Tabela 2. Pressão arterial sistólica, diastólica e média aos 90d após a cirurgia.

	Pressão sistólica		Pressão diastólica		Pressão média	
	Sham	Operado	Sham	Operado	Sham	Operado
HH	111,3±10,0	193,4±20,2**	85,1±14,8	128,2±11,0**	92,8±11,9	146,8±11,2**
HD	111,3±10,0	190,7±18,2**	85,1±14,8	127,2±11,1**	92,8±11,9	143,8±10,1**

Valores são média ± desvio padrão da média. *p<0,05; **p<0,01.

4.3 Peso corporal e peso dos corações

Antes de realizar a cirurgia, os animais foram separados aleatoriamente em sham-operados e operados, sendo que apresentaram pesos iniciais semelhantes. Não houve diferença no peso corporal final entre os grupos sham (590,2±52,3g), HH (585,3±12,2g) e HD (595,0±13,1g). No entanto, o peso médio dos corações dos animais operados aumentou significativamente em comparação com os animais do grupo sham-operado. O peso dos corações foi 54,7% maior nos animais do grupo HH (2,6±0,1g, p<0,001) e 82,9% maior nos animais do grupo HD (3,1±0,1g; p<0,001) quando comparados ao grupo sham-operado (1,7±0,1g) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Peso corporal e peso do coração aos 90d após a cirurgia.

	Peso corporal (g)		Peso coração (g)	
	Sham	Operado	Sham	Operado
HH	590,2±52,3	585,3±12,2	1,70±0,07	2,63±0,1***
HD	590,2±52,3	595,0±13,1	1,70±0,07	3,10±0,1**

Valores são média ± desvio padrão da média. ***p<0,001

Observamos um aumento de 22,4% no diâmetro do miócito nos animais do grupo HH e 20,7% no grupo HD quando comparado com animais controles (**Figura 4**).

4.4 Western blot e Imunofluorescência

A avaliação de algumas importantes proteínas da maquinaria contrátil foi realizada através da técnica de Western blotting e imunofluorescência: actina sarcomérica, miosina de cadeia pesada, troponina T e troponina I.

Figura 4: Imagens representativas de corte transversal dos corações, evidenciando as paredes do ventrículo direito (VD), septo e ventrículo esquerdo (VE) dos animais sham-operados e grupos HH e HD (painel superior). No painel central, observa-se cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e utilizados para a quantificação do diâmetro dos miócitos. Observar a presença de pequena barra preta na região nuclear do cardiomiócito, simulando uma medida de diâmetro da célula. Barra=50 micrômetros. O gráfico representa o valor médio do diâmetro dos cardiomiócitos nos diferentes grupos avaliados.

Actina sarcomérica

A quantidade de actina sarcométrica presente nos corações dos animais do grupo HH aumentou 49,1% ($0,8 \pm 0,3$ UA; $p < 0,05$) em relação ao observado nos corações dos animais controles ($0,6 \pm 0,1$). Já nos corações dos animais do grupo HD, o aumento foi de 63,1% ($0,9 \pm 0,2$ UA). Não houve diferença entre os grupos HH e HD. Houve uma leve marcação em

verde no interior dos cardiomiócitos do grupo sham (**Figura 5**). A intensidade de fluorescência aumentou significativamente nos grupos HH e HD.

Figura 5: Imunofluorescência e Western blotting para actina sarcomérica. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e esse aumento manteve-se nos do grupo HD. Actina (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.

Miosina de cadeia pesada (MCP)

A quantidade de miosina de cadeia pesada presente nos corações dos animais do grupo HH aumentou 42,3% ($1,2 \pm 0,3$ UA; $p < 0,05$) em relação ao observado nos corações dos animais controles ($0,8 \pm 0,2$ UA). Já nos corações dos animais do grupo HD houve uma importante redução de 32% na expressão de miosina ($0,6 \pm 0,2$ UA; $p < 0,05$) quando comparado ao controle. Se comparado ao grupo hipertrofiado, essa redução foi ainda maior, 52%. Houve uma leve marcação em verde no interior dos cardiomiócitos do grupo sham (**Figura 6**). A intensidade de fluorescência aumentou significativamente no grupo HH e reduziu no HD.

Figura 6: Imunofluorescência e Western blotting para miosina de cadeia pesada. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e significativa redução nos animais do grupo HD. Miosina (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.

Troponina I

A expressão de troponina I aumentou 49,3% nos corações dos animais do grupo HH ($1,0 \pm 0,2$ UA) e 46,4% no grupo HD ($1,0 \pm 0,2$ UA) quando comparados ao grupo controle ($0,7 \pm 0,1$ UA). Não houve diferença entre os grupos HH e HD. Houve uma leve marcação em verde no interior dos cardiomiócitos do grupo sham e a intensidade de fluorescência aumentou nos grupos HH e HD (**Figura 7**).

Troponina T

A quantidade de troponina T presente no grupo HH foi 46,7% ($1,1 \pm 0,3$ UA; $p < 0,05$) maior quando comparada a expressão no grupo controle ($0,7 \pm 0,2$ UA). Já o grupo HD ($0,7 \pm 0,3$ UA) não apresentou diferença quando comparado ao controle. Porém, quando comparado ao grupo

hipertrofiado, a redução foi de 33,6%. Na imunofluorescência, observamos uma maior expressão de troponina T no interior das células do grupo HH (verde). A expressão do grupo HD foi semelhante ao grupo controle (**Figura 8**).

Figura 7: Imunofluorescência e Western blotting para troponina I. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e esse aumento manteve-se nos animais do grupo HD. Troponina I (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.

Figura 8: Imunofluorescência e Western blotting para troponina T. Houve um aumento na expressão nos animais do grupo HH e significativa redução nos animais do grupo HD. Troponina T (verde), faloidina (vermelho) e núcleos (azul). Aumento 400x.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a expressão das proteínas da maquinaria contrátil nos corações de animais submetidos à estenose da aorta abdominal 90d após a cirurgia, em que 70% dos animais apresentaram corações hipertrofiados (HH) e 30% apresentaram os corações hipertrofiados+dilatados (HD), e relacionou estes achados com a função cardíaca. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão de miosina de cadeia pesada, actina sarcomérica, troponina T e troponina I nos animais do grupo HH, sendo que neste grupo os corações permaneceram com a função sistólica preservada. No grupo HD, a expressão de miosina de cadeia pesada e troponina T foram significativamente reduzidas acompanhadas de diminuição da função sistólica; a actina sarcomérica e a troponina I não se diferenciaram do grupo HH. O grupo HH apresentou 54,7% de hipertrofia cardíaca enquanto o grupo HD 82,9%.

A constrição da aorta abdominal é uma técnica cirúrgica bem estabelecida para a indução de sobrecarga crônica de pressão e produção de hipertrofia do ventrículo esquerdo em roedores. A constrição inicialmente impõe pouca restrição ao fluxo sanguíneo aórtico, mas gradualmente, à medida que o animal cresce, a gravidade relativa da constrição aumenta, resultando em hipertrofia cardíaca. Além disso, o estímulo para a insuficiência cardíaca é gradual no início como é a progressão da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca em seres humanos, tornando-se clinicamente mais relevante do que outros modelos de hipertrofia e insuficiência (Swyngedauw; Delcayre, 1982; Cantor et al., 2005; Monnet; Chachques, 2005; Gomes et al., 2013). Entre as principais vantagens que este modelo de coarctação da aorta abdominal apresenta em relação aos outros modelos de hipertrofia e insuficiência cardíaca está a capacidade de manipular o grau de estenose e consequentemente a sobrecarga de pressão, controlando a gravidade da constrição. Estudos anteriores mostraram que uma redução da luz do vaso de 80% é suficiente para produzir significativa hipertrofia cardíaca após 30 dias da constrição (Béznak, 1955; Protonotarios; Tsatsopoulou, 2004; Prado et al., 2006; Prado; Rossi, 2006).

A expressão de actina, avaliada por Western blot e imunofluorescência, apresentou um aumento de 49% no grupo HH e de 63% no grupo HD. Não houve diferença entre os grupos. As duas actinas sarcoméricas, α -cardíaca e α -esquelética, são co-expressas no miocárdio adulto normal e representam as isoformas predominantes de actina no filamento fino de unidades contráteis dos cardiomiócitos (Suurmeijer et al., 2003). O conhecimento da expressão das isoformas de actina no coração tem sido baseado principalmente em estudos de

expressão de genes devido à falta de anticorpos específicos. Com isso, foi demonstrado que a expressão da actina sarcomérica está alterada no início da hipertrofia causada por sobrecarga de pressão e está relacionada com o aumento do mRNA que codifica α -actina esquelética (Schwartz et al., 1986; Machackova et al., 2006; Berni et al., 2009). Outro estudo mostrou que em amostras de miocárdio com hipertrofia devido à sobrecarga de pressão da parede ventricular direita ou esquerda, a α -actina esquelética aumentou sua expressão e foi distribuída em um padrão homogêneo. Este resultado mostrou que esta isoforma é necessária para atingir um elevado grau de contratilidade miocárdica durante a fase de adaptação a estímulos hipertróficos (Hewett et al., 1994; Suurmeijer et al., 2003). Na cardiomiopatia dilatada, o aumento da actina foi essencial como um processo compensatório para manter o ciclo de pontes cruzadas durante a contração muscular (Copeland et al., 2010). Em modelos experimentais utilizando ratos, os estímulos hipertróficos induzem uma expressão precoce dos genes da α -actina (Long et al., 1989; Swynghedauw, 1990). O aumento da expressão de α -actina esquelética também foi observado em corações com hipertrofia compensada após infarto do miocárdio e na hipertrofia cardíaca associada à cardiomiopatia dilatada (Adachi et al., 1998; Nahrendorf et al., 2003). De acordo com estudos anteriores, a expressão aumentada de α -actina esquelética foi mais evidente nas fibras miocárdicas que rodeiam grandes pontos de fibrose, isto é, nas regiões ventriculares mais expostas ao estresse mecânico (Clement et al., 1999; Stilli et al., 2006). Boheler e seu grupo (1991) demonstrou que a quantidade de mRNA de α -actina não muda nos corações com insuficiência quando comparados com o grupo controle, sugerindo que a desregulação do filamento fino não está relacionada com a actina. Em um estudo com ratos espontaneamente hipertensos, os animais hipertrofiados apresentaram um aumento de mRNA de α -actina esquelética, porém nenhum aumento foi observado nos animais que desenvolveram insuficiência cardíaca (Boluyt et al., 1994). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, no qual se observa aumento da expressão de actina sarcomérica em animais hipertrofiados e este aumento na expressão é mantido na insuficiência cardíaca.

A quantificação de miosina de cadeia pesada, outro componente importante da maquinaria contrátil, apresentou aumento de 42% nos animais do grupo HH quando comparados com o grupo sham. Este perfil mudou nos animais do grupo HD, a miosina reduziu significativamente, 52% quando comparada ao grupo HH, e a função sistólica ficou comprometida. A miosina gera movimentos utilizando a energia da hidrólise do ATP para realizar movimento e força muscular através da interação cíclica com a actina. A MCP possui duas isoformas, α e β , codificadas por dois genes distintos (Swynghedauw, 1986; Bugaisky et

al., 1990; Freire et al., 2007). Os nossos achados estão de acordo com outros estudos mostrando o aumento da expressão de MCP na hipertrofia cardíaca, que parece estar relacionada com o aumento da isoforma β com ou sem diminuição recíproca da isoforma α -MCP (Mercadier et al., 1981; Boluyt et al., 1994). Na hipertrofia do ventrículo direito causada por hipertensão pulmonar observaram um aumento na expressão de MCP, sendo que esta alteração foi relacionada com o aumento de massa e a eficiência na contratilidade cardíaca (Guihaire et al., 2014). No entanto, outro estudo mostrou que a quantidade de MCP no ventrículo esquerdo diminui precocemente na fase compensada antes da etapa de insuficiência cardíaca em modelos de sobrecarga de volume e diminui progressivamente à medida que evolui para o estágio final de insuficiência do miocárdio em ratos (Hutchinson et al., 2011; Guggilam et al., 2013). Alterações patológicas dentro dos cardiomiócitos, como apoptose, degradação da matriz extracelular e de proteínas contráteis, podem ser suficientes para causar uma disfunção na contratilidade cardíaca, o que acelera a progressão da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca (Flesch et al., 1997; de Tombe, 1998). Com isso, na insuficiência cardíaca, independente de sua etiologia, a quantidade de MCP apresenta-se invariavelmente reduzida (Mercadier et al., 1981; Boluyt et al., 1994; Nakao et al., 1997; Miyata et al., 2000). Foi demonstrado que na cardiomiopatia contendo hipertrofia e aumento da fibrose intersticial, houve uma diminuição de 44% na quantidade de mRNA para a α -MCP, perda de 25% na expressão desta proteína e 33% de diminuição na função sistólica. Estes dados mostram que a perda de MCP contribui para o desenvolvimento da disfunção do miocárdio e cardiomiopatia (Jones et al., 1996; Lowes et al., 1997). Também foi demonstrado que a expressão de mRNA de α -MCP diminuiu aproximadamente 15x em corações humanos com insuficiência quando comparada com corações normais (Gupta, 2007). Com o exposto, nossos dados estão de acordo com a literatura, onde corações hipertrofiados têm expressão aumentada de MCP e corações insuficientes apresentam expressão reduzida de MCP. A diminuição da expressão de MCP poderia contribuir para a insuficiência cardíaca. Infelizmente, nesse estudo, as diferentes isoformas α e β , não foram quantificadas individualmente. Nosso anticorpo quantifica a somatória das duas isoformas.

A análise da expressão de troponina I mostrou aumento de 49% nos animais do grupo HH e 46% nos animais do grupo HD, não havendo diferença entre os grupos. A troponina I é uma proteína chave do sarcômero que regula a contração e relaxamento do miocárdio, pois na ausência de íons Ca^{2+} a TnI interage com a actina e inibe a atividade ATPase do complexo actomiosina (Adamcová; Pelouch, 1999; Metzger, 2004). Estudos anteriores mostraram que a troponina I e troponina T estão envolvidas na alteração do comprimento do sarcômero,

possivelmente através do papel que a troponina T tem na ligação da troponina I e C ao complexo filamento de actina+tropomiosina (Chandra et al., 2001; Konhilas et al., 2003). Foi demonstrado que mutações no gene da troponina I podem resultar em cardiomiopatia hipertrófica, dilatada ou restritiva (Kimura et al., 1997; Frazier et al., 2011; Watkins et al., 2011). Outro estudo utilizando o modelo de fístula aorta-cava mostrou uma diminuição na expressão da TnI, causando uma falha no miofilamento que foi associada com a falha progressiva no ventrículo esquerdo e diminuição da contratilidade dos miócitos (Guggilam et al., 2013). McConnell e seu grupo (1998) observou que a expressão da TnI permaneceu inalterada durante a progressão da hipertrofia cardíaca compensada para a descompensada e não houve diferença entre as linhagens de ratos espontaneamente hipertensos e ratos Wistar Kyoto. Entretanto, outro estudo experimental de coartação da aorta ascendente de guinea pigs mostrou expressão aumentada de TnI naqueles corações que entraram em insuficiência cardíaca (Gulati et al., 1994). O oposto foi mostrado por Noguchi e colaboradores (2003) em estudo utilizando animais Dahl-sensíveis ao sal, submetidos à dieta com níveis aumentados de sal para produção de hipertrofia compensada e transição para a descompensação. Os níveis de TnI não mostrou alteração na transição para a descompensação. Esses últimos achados estão em acordo com os dados obtidos em nosso estudo.

Observamos um aumento significativo de 46% na expressão de troponina T nos animais do grupo HH e significativa redução de 33% nos animais do grupo HD. A contratilidade muscular é controlada pelo cálcio sarcoplasmático que age no receptor da troponina no filamento fino (Gordon et al., 2000). No coração humano, existem quatro isoformas de troponina T (TnT1, TnT2, TnT3, TnT4). A troponina T é o único componente do complexo de troponinas a interagir diretamente com a tropomiosina, e medeia a ligação da troponina ao filamento fino (Anderson et al., 1991). O aumento na expressão de TnT foi relatada na hipertrofia e durante a evolução para a insuficiência cardíaca em modelo de coarctação da aorta em guinea pigs (Gulati et al., 1994). Chen e colaboradores (1997) demonstraram que a expressão de TnT começa a mudar na hipertrofia compensada através de um aumento na quantidade da isoforma TnT2. Na insuficiência cardíaca congestiva em humanos, houve um aumento na expressão da isoforma fetal da TnT e esta alteração muda a capacidade de resposta dos miofilamentos ao cálcio (McAuliffe et al., 1990; Anderson et al., 1995). Porém, níveis plasmáticos elevados de troponina T foram encontrados no plasma de pacientes com hipertensão e durante o desenvolvimento do remodelamento cardíaco, o que está relacionado com a contínua lesão miocárdica causada pela sobrecarga de pressão (Pons-Lladó et al., 2000). O processo responsável pela destruição da maquinaria contrátil e liberação das

troponinas na insuficiência cardíaca foi associado com o estiramento dos cardiomiócitos devido ao aumento da pré-carga, apoptose e ativação de proteases (Del Carlo; O'Connor, 1999; Del Carlo et al., 2009). Com isso, a perda da troponina T do sistema miofibrilar prejudica o controle da interação entre a miosina e actina, alterando a contratilidade cardíaca devido a diminuição da atividade ATPase miofibrilar que é característico da insuficiência cardíaca (Adamcová; Pelouch, 1999; van der Laarse, 2002). Assim, a diminuição da expressão de TnT observada em nosso estudo poderia contribuir para a insuficiência cardíaca presente no grupo HD.

Função cardíaca

O estudo ecocardiográfico tornou-se um método bem estabelecido de avaliação da estrutura e função cardíaca na medicina humana e veterinária (Coatney, 2001). À luz dos recentes avanços tecnológicos, a capacidade de resolução dos sistemas de ultrassom tem permitido análises mais precisas, mesmo em animais tão pequenos como ratos (Litwin et al., 1995; Salemi et al., 2004) e camundongos (Tanaka et al., 1996; Hoit, 2003). O ecocardiograma é versátil, seguro, indolor, não invasivo e é um importante procedimento in vivo que permite uma série de análises em modelos animais, possibilitando a realização de estudos longitudinais (Tanaka et al., 1996; Ono et al., 2002). O estudo histopatológico dos corações provê somente informação pontual referente à estrutura cardíaca em um animal. Por outro lado, o uso de técnicas diagnósticas não invasivas baseadas em imagem permite o estudo em série das alterações cardíacas tornando-se uma ferramenta importante para o estudo da progressão natural das doenças. A hipertrofia do miocárdio é um marcador de sobrecarga crônica de pressão. O aumento da espessura da parede ventricular induzida pela sobrecarga de pressão é inicialmente benéfico para manutenção da função cardíaca. No entanto, se o estímulo hipertrófico for mantido pode resultar em insuficiência cardíaca com dilatação do ventrículo esquerdo (Dai et al., 2014). No presente estudo, o IVS mostrou-se aumentado em ambos os grupos HH e HD em comparação com o grupo sham-operado, tanto na sístole quanto na diástole. O LVID no grupo HH não apresentou diferença significativa do grupo sham-operado. Por outro lado, o LVID no grupo HD diferiu estatisticamente dos grupos HH e sham-operados. A LVPW aumentou nos dois grupos HH e HD em comparação ao grupo sham-operado. Em outro estudo, em que pesquisadores também produziram hipertrofia cardíaca por sobrecarga de pressão pela estenose da aorta abdominal mostraram significativo aumento da LVPW e IVS e uma leve redução da LVID na diástole (Cantor et al., 2005). Heyen e colaboradores (2002) relacionaram a dilatação da câmara cardíaca ao início da

insuficiência cardíaca e final do estágio compensatório (Litwin et al., 1995; Norton et al., 2002) A fração de ejeção e fração de encurtamento são parâmetros comumente utilizados para avaliar a função sistólica. Neste estudo, a fração de ejeção no grupo HH não foi estatisticamente diferente dos animais sham-operados. Ao contrário, a fração de ejeção no grupo HD reduziu 45%. A fração de encurtamento no grupo HH não diferiu dos animais do grupo sham-operado. Por outro lado, a fração de encurtamento do grupo HD reduziu 41,5%. Estes dados destacam a preservação da função sistólica nos animais do grupo HH e a piora da função cardíaca nos corações dos animais do grupo HD. Outros autores observaram diminuições significativas na fração de ejeção e fração de encurtamento nos corações dos animais com sobrecarga crônica de pressão que progrediram para dilatação (Cantor et al., 2005; Dai et al, 2014).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os animais do grupo HD apresentaram redução na expressão de miosina de cadeia pesada e troponina T e função cardíaca reduzida. Dessa forma, demonstramos que a perda da expressão dessas importantes proteínas da maquinaria contrátil contribui, pelo menos em parte, para a transição da hipertrofia compensada para descompensada neste modelo de hipertrofia cardíaca por meio da constrição da aorta abdominal. Outro importante achado foi que não houve alteração na expressão de actina sarcomérica e troponina I entre os grupos HH e HD, destacando dessa maneira que estas proteínas provavelmente não contribuíram para a transição de hipertrofia compensada para descompensada.

REFERÊNCIAS

- Adachi S, Ito H, Tamamori M, Tanaka M, Marumo F, Hiroe M. Skeletal and smooth muscle alpha-actin mRNA in endomyocardial biopsy samples of dilated cardiomyopathy patients. *Life Sci.* 1998 Aug;63(20):1779-91.
- Adamcová M, Pelouch V. Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol Res.* 1999 Mar;48(4):235-47.
- Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res.* 1991 Nov;69(5):1226–33.
- Anderson PAW, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res.* 1995 Apr;76(4):681–86.
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010 Oct;128(1):191-227.
- Berni R, Savi M, Bocchi L, Delucchi F, Musso E, Chaponnier C, Gabbiani G, Clement S, Stilli D. Modulation of actin isoform expression before the transition from experimental compensated pressure-overload cardiac hypertrophy to decompensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May;296(5):H1625-32.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002 Jan;415(6868):198–205.
- Béznak M. The effect of different degrees of subdiaphragmatic aortic constriction on heart weight and blood pressure of normal and hypophysectomized rats. *Can J Biochem.* 1955 Nov;33(6):985-94.
- Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation.* 2000 Nov;102(20):IV14-23.
- Boheler KR, Carrier L, de la Bastie D, Allen PD, Komajda M, Mercadier JJ, Schwartz K. Skeletal actin mRNA increases in the human heart during ontogenic development and is the major isoform of control and failing adult hearts. *J Clin Invest.* 1991 Jul;88(1): 323–30.
- Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to

heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res.* 1994 Jul;75(1): 23–32.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology*, 2th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2008.

Bugaisky LB, Anderson PG, Hall RS, Bishop SP. Differences in myosin isoform expression in the subepicardial and subendocardial myocardium during cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1990 Apr;66(4):1127– 32.

Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Polverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Jan; 57(3):300-9.

Cantor EJ, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 May;38(5):777-86.

Chandra M, Rundell VL, Tardiff JC, Leinwand LA, De Tombe PP, Solaro RJ. Ca(2+) activation of myofilaments from transgenic mouse hearts expressing R92Q mutant cardiac troponin T. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Feb;280(2):H705–13.

Chang AN, Potter JD. Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2005 Sep;10(3):225–35.

Chassagne C, Wisnewsky C, Schwartz K. Antithetical accumulation of myosin heavy chain but not alpha-actin mRNA isoforms during early stages of pressure-overload-induced rat cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1993 Apr;72(4):857-64.

Chen Z, Higashiyama A, Yaku H, Bell S, Fabian J, Watkins MW, Schneider DJ, Maughan DW, LeWinter MM. Altered expression of troponin T isoforms in mild left ventricular hypertrophy in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Sep; 29(9):2345-54.

Coatney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J.* 2001;42(3):233-47.

Clement S, Chaponnier C, Gabbiani G. A subpopulation of cardiomyocytes expressing α -skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ Res.* 1999 Nov; 85(10):e51– 58.

- Copeland O, Nowak KJ, Laing NG, Ravenscroft G, Messer AE, Bayliss CR, Marston SB. Investigation of changes in skeletal muscle alpha-actin expression. In normal and pathological human and mouse hearts. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010 Sep;31(3):207-14.
- Craig R, Lehman W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native. Interacting thick and thin filaments. *J Mol Biol.* 2001 Aug;311(5):1027-36.
- Dai WJ, Dong Q, Chen MS, Zhao LN, Chen AL, Li ZC, Liu SM. Alterations in cardiac structure and function in a modified rat model of myocardial hypertrophy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014 Oct;34(5): 626-33.
- Del Carlo CH, Pereira ACB, Cassaro CMS, Latorre Mdo R, Oliveira Junior MT, Ramires JA. Cardiac troponin T for risk stratification in decompensated chronic heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2009 May;92(5):372-80.
- Del Carlo CH, O'Connor CM. Cardiac troponins in congestive heart failure. *Am Heart J.* 1999 Oct;138(4 Pt 1):646-53.
- de Simone G, Gottdiener JS, Chinali M, Maurer MS. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J.* 2008 Mar; 29(6):741–47.
- de Tombe PP. Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998 Feb; 37(2):367-80.
- Dos Santos DO, Blefari V, Prado FP, Silva CA, Fazan R Jr, Salgado HC, Ramos SG, Prado CM. Reduced expression of adherens and gap junction proteins can have a fundamental role in the development of heart failure following cardiac hypertrophy in rats. *Exp Mol Pathol.* 2016 Feb; 100(1):167-76.
- Frazier AH, Ramirez-Correa GA, Murphy AM. Molecular mechanisms of sarcomere dysfunction in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Prog Pediatr Cardiol.* 2011 Jan;31(1):29–33.
- Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Rosenkranz S, Hirth-Dietrich C, Arnold G, Paul M, Böhm M. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension.* 1997 Sep;30(3 Pt 1):383-91.

- Freire G, Ocampo C, Ilbawi N, Griffin AJ, Gupta M. Overt expression of AP-1 reduces alpha myosin heavy chain expression and contributes to heart failure from chronic volume overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Oct;43(4):465-78.
- Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med.* 1992 Oct;327(14):998-1008.
- Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, Vargiu P, Simongini I, Laragh JH. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992 Jun; 19(7):1550-58.
- Gomes AC, Falcão-Pires I, Pires AL, Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Rodent models of heart failure: an updated review. *Heart Fail Rev.* 2013 Mar;18(2):219-49.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975 Jul; 56(1):56-64.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews.* 2000 Apr; 80(2):853–924.
- Guihaire J, Haddad F, Boulate D, Capderou A, Decante B, Flécher E, Eddahibi S, Dorfmueller P, Hervé P, Humbert M, Verhoye JP, Darteville P, Mercier O, Fadel E. Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload. *J Heart Lung Transplant.* 2014 Feb;33(2):194-202.
- Guggilam A, Hutchinson KR, West TA, Kelly AP, Galantowicz ML, Davidoff AJ, Sadayappan S, Lucchesi PA. In vivo and in vitro cardiac responses to beta-adrenergic stimulation in volumeoverload heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Apr; 57:47–58.
- Gulati J, Akella AB, Nikolic SD, Starc V, Siri F. Shifts in contractile regulatory protein subunits troponin T and troponin I in cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jul;202(1):384-90.
- Gupta M, Zak R. Reversibility of load-induced changes in myosin heavy chain gene expression. *Am J Physiol.* 1992 Mar;262(3 Pt 2):R346-9.
- Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Oct;43(4):388-403.

- Hewett TE, Grupp IL, Grupp G, Robbins J. Alpha-skeletal actin is associated with increased contractility in the mouse heart. *Circ Res.* 1994 Apr;74(4):740-6.
- Heyen JR, Blasi ER, Nikula K, Rocha R, Daust HA, Friedrich G, Van Vleet JF, De Ciechi P, McMahon EG, Rudolph AE. Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Nov;283(5):1775-84.
- Hoit BD. Spectral and color M-mode Doppler in genetically altered mice. *Minerva Cardioangiol.* 2003 Dec;51(6):609–18.
- Houser SR, Margulies, KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res.* 2003 Mar;92(4):350-8.
- Hunkeler NM, Kullman J, Murphy AM. Troponin I isoform expression in human heart. *Circ Res.* 1991 Nov;69(5):1409-14.
- Hutchinson KR, Guggilam A, Cismowski MJ, Galantowicz ML, West TA, Stewart JA Jr, Zhang X, Lord KC, Lucchesi PA. Temporal pattern of left ventricular structural and functional remodeling following reversal of volume overload heart failure. *J Appl Physiol.* 2011 Dec; 111(6):1778–88.
- Kent RL, Mann DL, Cooper G. Signals for cardiac muscle hypertrophy in hypertension. *J CardiovascPharmacol.* 1991; 17(Suppl 2):S7-13.
- Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):379–82.
- Konhilas JP, Irving TC, Wolska BM, Jweied EE, Martin AF, Solaro RJ, de Tombe PP. Troponin I in the murine myocardium: influence on length dependent activation and inter filament spacing. *J Physiol.* 2003 Mar;547(Pt3):951–61.
- Kumar A, Crawford K, Close L, Madison M, Lorenz J, Doetschman T, Pawlowski S, Duffy J, Neumann J, Robbins J, Boivin GP, O'Toole BA, Lessard JL. Rescue of cardiac alpha-actin deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr;94(9):4406–11.
- Jones WK, Grupp T, Doetschman G, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, Boivin G, Gulick J, Ng WA, Robbins J. Ablation of the murine α myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional defects in the heart. *J. Clin. Invest.* 1996 Oct; 98(8):1906–17.

- Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996 May;275(20):1557–62.
- Lewinter MM, Vanburen P. Myofilament remodeling during the progression of heart failure. *J Card Fail*. 2002 Dec; 8(6 Suppl):S271-5.
- Li RC, Tao J, Guo YB, Jiang H, Shi L, Tu X, Huang J, Zhu X, Wang H. In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res*. 2013 Feb;112(4):601-5.
- Li Y, Wu G, Tang Q, Huang C, Jiang H, Shi L, Tu X, Huang J, Zhu X, Wang H. Slow cardiac myosin regulatory light chain 2 (MYL2) was down-expressed in chronic heart failure patients. *Clin Cardiol*. 2011 Jan;34(1):30-4.
- Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995 May;91(10):2642-54.
- Long CS, Ordahl CP, Simpson PC. Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest* 1989 Mar;83(3):1078-82.
- Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest*. 1997 Nov;100(9):2315-24.
- Lu QW, Wu XY, Morimoto S. Inherited cardiomyopathies caused by troponin mutations. *J Geriatr Cardiol JGC*. 2013 Mar;10(1):91–101.
- Machackova J, Barta J, Dhalla NS. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. *Can J Cardiol*. 2006 Sep;22(11):953-68.
- Marques MA, de Oliveira GA. Cardiac Troponin and Tropomyosin: Structural and Cellular Perspectives to Unveil the Hypertrophic Cardiomyopathy Phenotype. *Front Physiol*. 2016 Sep;7:429.

- Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1981 Aug;49(2):525–32.
- Metzger JM, Westfall MV. Covalent and noncovalent modification of thin filament action: the essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ Res*. 2004 Feb; 94(2):146–58.
- McAuliffe JJ, Gao L, Solaro RJ. Changes in myofibrillar activation and troponin-C Ca^{2+} binding, associated with troponin-T isoform switching in developing rabbit heart. *Circ Res*. 1990 May;66(5):1204–16.
- McConnell BK, Moravec CS, Bond M. Troponin I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*. 1998 Feb; 274(2 Pt 2):H385-96.
- McNally EM, Kraft R, Bravo-Zehnder M, Taylor DA, Leinwand LA. Full-length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences. Comparisons suggest a molecular basis for functional differences. *J Mol Biol*. 1989 Dec;210(3):665–71.
- Missov E, Calzolari C, Pau B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation* 1997 Nov; 96(9):2953–58.
- Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000 Mar;86(4):386-90.
- Monnet E, Chachques JC. Animal models of heart failure: what is new? *Ann Thorac Surg*. 2005 Apr;79(4):1445-53.
- Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 2008 Mar;77(4):659–66.
- Moore JR, Leinwand L, Warshaw DM. Understanding cardiomyopathy phenotypes based on the functional impact of mutations in the myosin motor. *Circ Res*. 2012 Jul; 111(3):375–85.
- Nair KG, Cutilletta AF, Zak R, Koide T, Rabinowitz M. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. I. Experimental model; changes in heart weight, RNA content, and nuclear RNA polymerase activity. *Circ Res*. 1968 Sep;23(3):451-62.
- Nahrendorf M, Hu K, Fraccarollo D, Hiller KH, Haase A, Bauer WR, Ertl G. Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 Jan; 284(1):H241-8.

- Narolska NA, Eiras S, van Loon RB, Boontje NM, Zaremba R, Spiegelberg SR, Stoker W, Huybregts MA, Visser FC, van der Velden J, Stienen GJ. Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium. *J Muscle Res Cell Motil.* 2005;26(1):39-48.
- Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest.* 1997 Nov;100(9):2362-70.
- Noguchi T, Kihara Y, Begin KJ, Gorga JA, Palmiter KA, LeWinter MM, VanBuren P. Altered myocardial thin-filament function in the failing Dahl salt-sensitive rat heart: amelioration by endothelin blockade. *Circulation.* 2003 Feb;107(4):630-35.
- Norton GR, Woodiwiss AJ, Gaasch WH, Mela T, Chung ES, Aurigemma GP, Meyer TE. Heart failure in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Feb; 39(4):664–71.
- Ono K, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Sakata Y, Nishikawa N, Mano T, Kuzuya T, Takeda H, Hori M. Echo Doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):109–17.
- Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 1998 May; 280(5364):750–52.
- Prado CM, Ramos SG, Alves-Filho JC, Elias J Jr, Cunha FQ, Rossi MA. Turbulent flow/low wall shear stress and stretch differentially affect aorta remodeling in rats. *J Hypertens.* 2006 Mar;24(3):503-15.
- Prado CM, Rossi MA. Circumferential wall tension due to hypertension plays a pivotal role in aorta remodelling. *Int J Exp Pathol.* 2006 Dec;87(6):425-36.
- Prado CM, Ramos SG, Elias J Jr, Rossi MA. Turbulent blood flow plays an essential localizing role in the development of atherosclerotic lesions in experimentally induced hypercholesterolaemia in rats. *Int J Exp Pathol.* 2008 Feb;89(1):72-80.
- Protonotarios N, Tsatsopoulou A. Naxos disease and Carvajal syndrome: cardiocutaneous disorders that highlight the pathogenesis and broaden the spectrum of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2004 Aug; 13(4):185-94.
- Pons-Lladó G, Ballester M, Borrás X, Carreras F, Carrió I, López-Contreras J, Roca-Cusachs A, Marrugat J, Narula J. Myocardial cell damage in human hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Dec;36(7):2198-203.

Rabinowitz M, Zak R. Biochemical and cellular changes in cardiac hypertrophy. *Annu Rev Med.* 1972;23:245-62.

Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J.* 1992 Sep;124(3):700-9.

Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 1992 May;267(15):10551-60.

Salemi VMC, Pires MD, Cestari IN, Cestari IA, Picard MH, Leirner AA, Mady C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artif Organs.* 2004 Apr; 28(4):332–7

Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M. Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res.* 1986 Nov;59(5):551-55.

Seidman JG, Seidman C. The Genetic Basis for Cardiomyopathy: from Mutation Identification to Mechanistic Paradigms. *Cell* 2001 Feb;104(4):557-67.

Seidman JG, Seidman C. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circulation Research* 2011 Mar;108(6): 743-50.

Schaub MC, Hefti MA, Zuelling RA, Morano I. modulation contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res.* 1998 Feb; 37(2): 381-404.

Squire JM. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Apr;7(2):247–57.

Stilli D, Bocchi L, Berni R, Zaniboni M, Cacciani F, Chaponnier C, Musso E, Gabbiani G, Clément S. Correlation of alpha-skeletal actin expression, ventricular fibrosis and heart function with the degree of pressure overload cardiac hypertrophy in rats. *Exp Physiol.* 2006 May;91(3):571–80.

Suurmeijer AJ, Clément S, Francesconi A, Bocchi L, Angelini A, Van Veldhuisen DJ, Spagnoli LG, Gabbiani G, Orlandi A. Alpha-actin isoform distribution in normal and

failing human heart: a morphological, morphometric and biochemical study. *J Pathol.* 2003 Mar;199(3):387-97.

Swynghedauw B, Delcayre C. Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu.* 1982;12:137-83.

Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev.* 1986 Jul;66(3):710-71.

Swynghedauw B. *Cardiac Hypertrophy and Failure.* London: INSERM/John Libbey Eurotext, 1990.

Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* 1996 Sep;94(5):1109–17.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* 2007 Jul;116(3):258-67.

Vanburen P, Alix SL, Gorga JA, Begin KJ, LeWinter MM, Alpert NR. Cardiac troponin T isoforms demonstrate similar effects on mechanical performance in a regulated contractile system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 May;282(5):H1665-71.

Vanburen P, Okada Y. Thin filament remodeling in failing myocardium. *Heart Fail Rev.* 2005 Sep;10(3):199-209.

Van der Laarse A. Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2002 Oct; 56(1):8-14.

Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, Levy D. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: the Framingham Heart study. *JAMA.* 2002 Feb; 287(8):1003–10.

Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Nov;34(11):1435-42.

Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 2011 Apr; 364(17):1643–56.

Wilson k, Lucchesi PA. Myofilament dysfunction as an emerging mechanism of volume overload heart failure. *Pflugers Arch*. 2014 Jun;466(6):1065-77.

Willott RH, Gomes AV, Chang AN, Parvatiyar MS, Pinto JR, Potter JD. Mutations in Troponin that cause HCM, DCM AND RCM: what can we learn about thin filament function? *J Mol Cell Cardiol*. 2010 May;48(5):882-92.

Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Isoproterenol-induced cytotoxicity troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem*. 1998 Jun; 44(6 Pt 1):1198–208.

Yin Z, Ren J, Guo W. Sarcomeric Protein Isoform Transitions in Cardiac Muscle: A Journey to Heart Failure. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan;1852(1):47–52.

Zile MR, De Santis SM, Baicu CF, Stroud RE, Thompson SB, McClure CD, Mehurg SM, Spinale FG. Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2011 May;4(3):246-56.

ANEXO - Protocolo do 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 “*Remodelamento das proteínas contráteis cardíacas na transição da hipertrofia compensada para falência cardíaca*”, registrado com o número **050/2016**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos**, 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 23 de maio de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 80 ratos Wistar machos pesando 150g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Vigência da autorização: 23/05/2016 a 02/02/2017.

We certify that the Protocol *n° 050/2016*, entitled “*Remodeling of cardiac contractile proteins in the transition from compensated hypertrophy to heart failure*”, 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 of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/23/2016. 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 80 male Wistar rats weighing 450g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. This certificate is valid until 02/02/2017.

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2016

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

APÊNDICE A – COLORAÇÕES

Hematoxilina e eosina

As lâminas foram desparafinizadas em série decrescente de álcoois e lavadas em água corrente. Em seguida, coradas pela hematoxilina de Harris por 3-5 minutos. Lavadas em água corrente e diferenciadas em solução álcool-ácido a 1% e lavadas por 15 minutos. Após, foram coradas em solução de eosina-fluxina por 10 a 30 segundos e passadas em álcool 95% para a retirada do excesso de corante. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

APÊNDICE B – REAGENTES E SOLUÇÕES

Hematoxilina de Harris

Em um balão volumétrico foram misturados 1000 mL de água destilada quente e 5 g de cristais de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto.

Alumem de Potássio

Utilizou-se 100 g de alumem de potássio dissolvidos na água destilada quente. Esta solução foi misturada com a solução de Hematoxilina de Harris citada acima. Deixamos ferver por 1 minuto.

Óxido vermelho de mercúrio

O balão foi removido do fogo para acrescentar 2,5 g de óxido vermelho de mercúrio. O balão foi colocado novamente no fogo até a solução tornar-se cor púrpura escura. A solução foi filtrada após o resfriamento.

Solução Eosina-Floxina

Foram misturados 62,5 mL de solução estoque de eosina a 1% 6,25 mL de solução estoque de floxina a 1% e 487,5 mL de ácido acético glacial.