Aline Derísio de Lima

Efeito do tratamento crônico do metotrexato associado à nanoemulsão de LDE no remodelamento cardíaco por infarto do miocárdio em ratos Wistar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

na, Aline Derísio de	

Lima, Aline Derísio de Efeitos do tratamento crônico do metotrexato associado à nanoemulsão de LDE no remodelamento cardíaco por infarto do miocárdio em ratos Wistar / Aline Derísio de Lima. -- São Paulo, 2017. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cardiologia. Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Remodelamento cardíaco 2. Infarto do miocárdio 3.Metotrexato 4.Nanopartículas 5.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-058/17

Dedicatória

Aos meus pais, Sandra e Mário (*in menorian*), pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e apoio inspirador. Vocês me ensinaram a importância da família e o caminho da honestidade, humildade e persistência. Sem vocês nada seria possível.

Ao meu amado noivo Bruno, pela paciência, longas conversas e apoio em todos os momentos, principalmente nos de incertezas. Não há conquista que não seja nossa.

"A vida é um ponto de interrogação. Cada ser humano, seja ele um intelectual ou iletrado, é uma grande pergunta em busca de uma grande resposta." Augusto Cury

Agradecimentos

"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos; há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossa vida e nos marcam para sempre." Cecília Meireles

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade em realizar os meus sonhos e por acreditar em mim.

A todos os funcionários do Laboratório de Metabolismo de Lípides do Incor, principalmente, Dra. Fátima e Dra. Priscila, pelo suporte na realização deste trabalho e pelos momentos de descontração durante o tão apreciado café.

À Dra Maria Carolina Guido, pela contribuição durante o trabalho.

A todos os companheiros de pós-graduação do Laboratório de Metabolismo de Lípides pelo suporte e amizade.

À Neusa Rodrigues Dini e todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação, pelo apoio em tornar esse sonho possível.

A Profa. Dra. Vera Maria Cury Salemi, pela realização e análise dos ecocardiogramas.

Ao Dr. Marcelo Dantas Tavares de Melo, pela análise dos ecocardiogramas.

Aos funcionários do Serviço de Apoio à Pesquisa e Experimentação Animal do Incor, pela assistência e cuidado com os animais.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de doutorado e de doutorado-sanduíche realizado na Boston University, possibilitando a publicação de um artigo.

À minha irmã Ariane, pelo carinho, cuidado e por ser o meu pilar em momentos difíceis.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. Introdução	1
2. Objetivos	15
3. Material e métodos	16
3.1 Modelo biológico	16
3.2 Modelo cirúrgico para infarto agudo do miocárdio	16
3.3 Protocolo experimental, tratamento e eutanásia	17
3.4 Síntese do di-Dodecil Metotrexato	18
3.5 Preparação da nanopartícula lipídica LDE e associação ao MTX	19
3.6 Ecocardiograma	20
3.7 Peso corporal e peso relativo dos órgãos	22
3.8 Ensaios laboratoriais	22
3.9 Análise histomorfométrica	23
3.10 Análise da expressão gênica	26
3.11 Análise estatística	31
4. Resultados	32
4.1 Número de animais e mortalidade	32
4.2 Ecocardiograma	32
4.3 Peso corporal e peso relativo dos órgãos	35
4.4 Ensaios laboratoriais	36
4.5 Análise histomorfométrica	37
4.6 Análise da expressão gênica por qRT-PCR	42
5. Discussão	43
6. Conclusão	53
7. Referências	54

Lista de abreviatura e siglas

AICAR – Aminoimidazol carboximida ribonucleotídeo formiltransferase

- ALT– Alanina aminotransferase
- ANOVA Análise de variância
- Apo B100 Apolipoproteína B100
- AST Alanina aminotransferase
- CD3 Cluster of differentiation 3
- CD68 Cluster of differentiation 68

CaPPesq – HCFMUSP - Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- Ct Cycle threshold
- DCV Doenças cardiovasculares
- DD Diâmetro diastólico
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- dNTP Desoxinucleotídeo trifosfato
- DS Diâmetro sistólico
- DT Tempo de desaceleração
- ECA Enzima conversora de angiotensina
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- FE Fração de ejeção
- FVC Fração de volume do colágeno
- GAPDH Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase
- HDL-C Colesterol contido na lipoproteína de alta densidade
- HE- Hematoxilina e eosina
- HPLC Cromatografia líquida de alta performance

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IC – Insuficiência cardíaca

ICAM-1-Molécula de adesão intercelular-1

IL-10-Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

Infl – Inflamação

Instituto do Coração - Incor-HCFMUSP

INT-Intersticial

I.P. – Intraperitoneal

Kg – Quilograma

LIM – HCFMUSP –Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDL-C – Colesterol contido na lipoproteína de baixa densidade

LDLR- Receptores da lipoproteína de baixa densidade

LRP1– Proteína relacionada ao receptor de LDL

MMP-2 – Metaloproteinase 2

MMP-9 – Metaloproteinase 9

MTX – Metotrexato

mVE – Massa do ventrículo esquerdo

NOX-1 – NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase 1

NOX-4 – NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase 4

PP – Parede posterior

RNA – Ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease

- RPM Rotação por minuto
- RT-PCR Reação em cadeiade polimerase em tempo real
- SE Subendocárdica
- SHAM Cirurgia fictícia
- SIV Espessuras diastólicas do septo interventricular
- SRB1- Receptor Scavenger classe B tipo 1
- TIMPs Inibidores teciduais de metaloproteinases
- TNF-a Fator de necrose tumoral tipo alfa
- TRIV Tempo de relaxamento isovolumétrico
- VE Ventrículo esquerdo
- VEGF Fator de crescimento vascular endotelial
- Vol D Volume diastólico
- Vol S Volume sistólico
- µL- microlitro
- µm Micrômetro

Lista de figuras

Figura 1. Imagens de ecocardiograma bidimensional em corte paraesternal eixo-longo mostrando o ventrículo esquerdo (VE), aorta (AO) e átrio esquerdo (AE) em diástole dos grupos SHAM e IAM-LDE no segmento de 6 semanas.

Figura 6. Fotomicrografias do tecido miocárdico do VE corado com hematoxilina e eosina. Representação da análise do diâmetro dos miócitos da região INT, com disposição longitudinal, núcleo ovalado e centralizado.26

Figura 12. Diagrama mostrando os efeitos do tratamento com ou sem MTX após 6 semanas da indução do infarto do miocárdio em ratos......43

Lista de tabelas

Tabela 1. Descrição dos ensaios TaqMan® utilizados para análise da
expressão gênica pela técnica de qRT-PCR30Tabela 2. Ecocardiograma dos grupos SHAM e IAM com ou sem tratamento
nos seguimentos de 24 horas e 6 semanas.34Tabela 3. Peso corporal e peso relativo dos órgãos do grupo SHAM e IAM
com ou sem tratamento.36Tabela 4. Enzimas hepáticas, perfil lipídico e hemograma dos grupos SHAM
e IAM com e sem tratamento.36Tabela 5. Histomorfometria dos grupos SHAM e IAM com e sem
tratamento.38

Resumo

Lima AD. Efeito do tratamento crônico do metotrexato associado à nanoemulsão de LDE no remodelamento cardíaco por infarto do miocárdio em ratos Wistar [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é a principal causa de mortalidade mundial. O IAM é acompanhado de remodelamento cardíaco, caracterizado por alterações gênicas, moleculares e celulares, com consequentes alterações no tamanho, forma e função do coração, e resultante disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Evidências experimentais e clínicas indicam que a prevenção ou o tratamento do remodelamento cardíaco beneficiam a função ventricular. A LDE é uma nanopartícula lipídica, com estrutura semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL). A LDE tem a capacidade de se concentrar em células com superexpressão de receptores de LDL, como em processos proliferativos e inflamatórios, sendo utilizada com um direcionador de fármacos a sítios específicos. Nosso laboratório demonstrou que o tratamento com metotrexato (MTX), um fármaco antiproliferativo e imunossupressor, associado à LDE reduziu acentuadamente as lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Esses resultados nos levaram à hipótese de que a LDE-MTX possa ser utilizada para processo inflamatório pós-IAM, determinante para o minimizar o remodelamento cardíaco, e seus efeitos deletérios. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito do tratamento da LDE-MTX sobre o remodelamento cardíaco em ratos submetidos ao IAM. Ratos machos Wistar (300-400g) foram submetidos ao modelo cirúrgico de IAM ou à cirurgia fictícia (SHAM). Os grupos foram divididos entre: SHAM (solução fisiológica), IAM-LDE, IAM-MTXc (metotrexato comercial), IAM-LDE-MTX. Os animais foram tratados uma vez por semana na dose de 1 mg/kg intraperitonealmente, por 6 semanas. Após 24 horas do IAM e ao final do seguimento, foi realizado o ecocardiograma. O coração, o pulmão, o fígado e os rins foram coletados para obtenção do peso relativo dos órgãos. O tamanho do IAM foi estimado pela média dos tamanhos dos IAM externo e interno. A avaliação da necrose dos miócitos, processo inflamatório, diâmetro dos miócitos e fibrose miocárdica nas regiões subendocárdica (SE) e intersticial (INT) foi realizada na região remota ao IAM. Marcadores de estresse oxidativo, inflamação, fibrose, angiogênese e os receptores de lipoproteínas foram quantificados por PCR em tempo real. O tratamento com LDE-MTX diminuiu a dilatação do VE, hipertrofia cardíaca, volumes sistólicos e diastólicos, espessura do septo interventricular e da parede posterior e massa do VE, comparado aos grupos IAM-LDE е IAM-MTXc. Além disso. houve uma melhora de aproximadamente 40% da função sistólica do VE em relação aos demais grupos IAM. O tratamento com LDE-MTX não alterou a função diastólica. O peso relativo do coração e do pulmão foi menor no grupo IAM-LDE-MTX quando comparado ao IAM-LDE. Na histomorfometria, houve diminuição no tamanho do infarto no grupo IAM-LDE-MTX quando comparado com IAM-LDE. A necrose, infiltrado inflamatório e fração de volume do colágeno nas regiões INT e SE foram menores no IAM-LDE-MTX em relação aos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc, assim como o diâmetro dos miócitos. A expressão gênica dos marcadores de estresse oxidativo e fibrose foi menor no grupo IAM-LDE-MTX quando comparado ao grupo IAM-MTXc. Com relação à inflamação, o grupo IAM-LDE-MTX apresentou menor expressão do gene para TNF-α quando comparado aos grupos IAM-MTXc e SHAM. No que se refere ao receptor de lipoproteína, nos grupos IAM-LDE-MTX houve menor expressão do gene para receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) quando comparado ao grupo tratado com MTXc. Não foi observada toxicidade em nenhum grupo. Os resultados deste estudo indicam que o tratamento com LDE-MTX melhora significantemente a função cardíaca e atenua o remodelamento cardíaco em modelo experimental cirúrgico para IAM.

Descritores: 1. Remodelamento cardíaco 2. Infarto do miocárdio 3. Metotrexato 4. Nanopartícula 5. Ratos Wistar.

Abstract

Lima AD. Effect of chronic treatment of methotrexate associated with LDE nanoemulsion on cardiac remodeling by myocardial infarction in Wistar rats [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Acute myocardial infarction (AMI) is the main cause of worldwide mortality. AMI is accompanied by cardiac remodeling, characterized by genetic, molecular and cellular alterations, with consequent changes in the size, shape and function of the heart, resulting in ventricular dysfunction and heart failure. Experimental and clinical evidence indicate that prevention or treatment of cardiac remodeling benefits the ventricular function. LDE is a lipid nanoparticle with a structure similar to low density lipoprotein (LDL). LDE has the ability to concentrate in cells with overexpression of LDL receptors, such as in proliferative and inflammatory processes, and is used with a drugtargeting agent at specific sites. Our laboratory demonstrated that the with methotrexate treatment (MTX), an antiproliferative and immunosuppressive drug, associated to LDE markedly reduced atherosclerotic lesions in aorta of rabbits submitted the to hypercholesterolemic diet. These results led us to the hypothesis that LDE-MTX could be used to minimize the post-AMI inflammatory process, determinant for cardiac remodeling, and their deleterious effects. The aim of this study was to investigate the effect of LDE-MTX treatment on cardiac remodeling in rats submitted to AMI. Male Wistar rats (300-400g) were submitted to the surgical model of AMI or Sham surgery. The groups were divided into: SHAM (saline solution), AMI-LDE, AMI-MTXc (commercial methotrexate), AMI-LDE-MTX. The animals were treated once a week at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally, for 6 weeks. After 24 hours of AMI and at the end of the follow-up, the echocardiogram was performed. The heart, lung, liver and kidneys were collected to obtain the relative weight of the organs. Infaction size was estimated by mean extern and intern size of IAM. Evaluation of myocyte necrosis, inflammatory process, myocyte diameter and

myocardial fibrosis in the subendocardial (SE) and interstitial (INT) areas was performed in remote area from AMI. Markers of oxidative stress, inflammation, fibrosis, angiogenesis and lipoprotein receptors were quantified by quantitative real-time PCR. Treatment with LDE-MTX decreased LV dilation, cardiac hypertrophy, systolic and diastolic volumes, interventricular septum and posterior wall thickness and LV mass, compared to AMI-LDE and AMI-MTXc groups. In addition, there was an improvement of approximately 40% of LV systolic function compared to other AMI groups. Treatment with LDE-MTX did not alter diastolic function. The relative weight of the heart and lung were lower in the AMI-LDE-MTX group when compared to the AMI-LDE. In morphometry, infarct size decreased in the AMI-LDE-MTX group when compared to AMI-LDE. Necrosis, inflammatory infiltrate and collagen volume fraction in the INT and SE regions were lower in AMI-LDE-MTX than in AMI-LDE and AMI-MTXc groups, as well as the myocyte diameter. The gene expression of oxidative stress and fibrosis markers were lower in the AMI-LDE-MTX group when compared to the AMI-MTXc. Regarding inflammation, the AMI-LDE-MTX group had lower expression of the TNF- α gene when compared to the AMI-MTXc group and the SHAM group. As regards the lipoprotein receptor, in the AMI-LDE-MTX there was lower expression of the gene for low-density lipoprotein (LDLR) receptor compared to MTXc treated animals. No toxicity was observed in any groups. The results of this study indicate that treatment with LDE-MTX significantly improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling in an experimental surgical model for AMI.

Descriptors: 1. Cardiac remodeling 2. Myocardial infarction 3. Methotrexate 4. Nanoparticle 5. Wistar rats.

1. Introdução

1.1 Remodelamento cardíaco no infarto agudo do miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é a principal causa de mortalidade no mundo (Mozaffarian et al., 2016). O IAM é causado por isquemia tecidual decorrente da obstrução transitória ou permanente do fluxo coronariano, com diminuição da oferta de oxigênio e de nutrientes ocasionando necrose do músculo miocárdico (Burkeet al., 2007). Geralmente, a isquemia é decorrente da ruptura da placa aterosclerótica vulnerável e formação de coágulo e/ou vasoespasmo (Kelleyet al., 1999; Sutton & Sharpe, 2000; Ashrafi et al., 2014).

Pacientes que sobrevivem ao IAM podem ter como uma das complicações possíveis a insuficiência cardíaca (IC), sendo esta uma condição associada à pior prognóstico (Opie et al., 2006; Heusch et al., 2014). Após a agressão ao miocárdio, para que ocorram as respostas compensatórias a fim de manter o débito cardíaco normal, um conjunto de alterações genéticas, moleculares e celulares se manifesta, alterando a forma, tamanho e função do coração (Pfefferet al., 1990). Este conjunto de alterações é denominado remodelamento cardíaco (Cohn et al., 2000; Savergnini et al., 2013). No início da década de 80, estudos descreveram pioneiramente em modelo experimental de IAM em ratos que o processo do remodelamento cardíaco desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular e na progressão da IC (Pfeffer et al., 1979).

Portanto, logo após um dano isquêmico as porções íntegras do miocárdio apresentam aumento da contratilidade como forma de manter o débito cardíaco, em resposta à perda abrupta do tecido contrátil. Isto

resulta em aumento do estresse e dilatação da parede ventricular, com aumento do gasto energético dos cardiomiócitos e expansão da área infartada, que ocorre poucas horas após o dano miocárdico (Pfeffer et al., 1990). A dilatação ventricular, embora represente um mecanismo eficiente de compensação, restabelecendo o volume sistólico, também tem sido consistentemente associada com diminuição de sobrevida (Colucci, 1997).

Blankesteijn e colaboradores (2001) classificaram o processo de restabelecimento cardíaco em quatro fases. Na primeira fase, ocorre a morte dos cardiomiócitos de 6 horas a 4 dias. A resposta inflamatória aguda começa na fase 2, em 12 a 16 horas após o início do processo isquêmico. Neutrófilos granulócitos migram para a área infartada, atingindo um pico em 24 a 48 horas após o infarto, para fagocitar e remover os miócitos mortos. Posteriormente, os macrófagos e linfócitos são recrutados juntamente com os granulócitos na área do IAM com o objetivo de remoção de células mortas por fagocitose (Frangogiannis, 2014). De 2 a 3 dias após o infarto do miocárdio, inicia-se a formação do tecido de granulação na margem da área infartada, na fase 3. Finalmente, na fase 4, o remodelamento e cicatrização da área infartada inicia-se de 2 a 3 semanas e continua por 1 ano após o infarto do miocárdio.

As alterações teciduais decorrentes do remodelamento cardíaco incluem: hipertrofia dos cardiomiócitos da região remota ao IAM, morte celular, ativação de processos inflamatórios e, por fim a ocorrência de fibrose miocárdica para formação da cicatriz de reparação tecidual (Sutton & Sharpe, 2000). Estes eventos começam a se estabelecer imediatamente após a oclusão arterial, progredindo por várias semanas após o dano isquêmico inicial. A própria agressão ao miocárdio ativa e mecanismos reparadores dano cardíaco expressa os ao concomitantemente, mas um processo pode ocorrer de maneira independente do outro. Como por exemplo, o processo inflamatório pode ocorrer tanto de forma dependente quanto de forma independente do processo de necrose pós-IAM (Haunstetter et al., 1998; Khanet al., 2006; Frangogiannis, 2014).

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento da massa do miocárdio, tanto pelo aumento do volume dos miócitos quanto pelo aumento dos componentes da matriz extracelular. Ocorre de forma compensatória ou adaptativa em resposta ao aumento da sobrecarga de pressão ou de volume visando a manutenção do débito cardíaco. No entanto, um longo período de hipertrofia promove descompensação ou má-adaptação que predispõe à morte celular e deposição de fibrose miocárdica, podendo levar a dilatação cardíaca e disfunção ventricular (Pfeffer et al., 1990; Frangogiannis, 2014).

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como concêntrica ou excêntrica (Opie et al., 2006; Aro et al., 2016). A hipertrofia concêntrica ocorre em resposta à sobrecarga de pressão. O aumento da massa ventricular, com aumento da espessura de parede e redução da cavidade, é decorrente da replicação em paralelo dos sarcômeros. Assim, a hipertrofia concêntrica desencadeia disfunção diastólica (Cantor et al., 2005; Litwin et al., 1995).

A hipertrofia excêntrica ocorre em resposta à sobrecarga de volume. O aumento da massa ventricular, seguido do aumento do volume da cavidade e da espessura de parede, se dá por replicação em série dos sarcômeros, permitindo que a célula aumente de comprimento e desencadeando a disfunção sistólica. (Cantor et al., 2005; Burchfield et al., 2013).

Nas adaptações hemodinâmicas após o infarto do miocárdio, o predomínio é a ocorrência de hipertrofia excêntrica dos cardiomiócitos (Cantor et al., 2005). Nestas circunstâncias, a hipertrofia excêntrica permite ao miocárdio adaptar-se às condições para lidar com maior volume de sangue. Se por um lado a hipertrofia excêntrica procura manter preservada a função ventricular sistólica (Bernardo et al., 2010), o aumento de raio e sobrecarga de volume tendem a piorar o déficit no metabolismo energético, remodelamento vascular e eletrofisiológico e

processos de morte dos cardiomiócitos, como ativação de apoptose, necrose e modificações no processo de autofagia (Dorn, 2009; Abbate & Narula, 2012; Burchfield et al., 2013).

A morte progressiva dos cardiomiócitos, tanto por necrose quanto por apoptose, é um dos eventos-chave que influencia o remodelamento cardíaco e está envolvida no processo de dilatação e disfunção cardíaca (Baldi et al., 2002; Whelan et al., 2010).

A necrose dos cardiomiócitos desencadeia uma intensa reação inflamatória, para remoção das células mortas e detritos de matriz, assim como para a formação de uma cicatriz à base de colágeno (Whelan, 2010). Em modelo de hamster com cardiomiopatia, a necrose foi o mecanismo predominante na perda de cardiomiócitos e está relacionada com disfunção ventricular (Ryoke et al., 2002). Entretanto, a contribuição dos diferentes tipos de morte celular no processo de remodelamento cardíaco ainda não está completamente estabelecida (Whelan et al., 2010).

A apoptose é um processo de morte celular programada, na qual estímulos internos e externos à célula podem ativar proteínas intracelulares que resulta na ativação do processo de morte celular e é acompanhado por mudanças morfológicas das células (Whelan et al., 2010). O processo de apoptose não gera inflamação, sendo os corpos apoptóticos fagocitados por macrófagos (Abbate et al., 2012). O aumento da apoptose é suficiente para induzir falência cardíaca em camundongos (Wencker et al., 2003). Prench e colaboradores (2010) mostraram em necropsias de corações de indivíduos pós-IAM alto índice apoptótico na região remota ao IAM na fase crônica.

Imediatamente após o IAM, ocorrem ativações imunomodulatória e inflamatória que são essenciais para a reparação cardíaca. Desta forma, há indução de quimiocinas e citocinas fazendo com que células inflamatórias migrem para o miocárdio infartado. Os leucócitos são os principais participantes da reação e infiltração inflamatória no coração infartado e estão predominantemente localizados na área de *border zone* (área de borda) da região infartada, onde podem interagir com cardiomiócitos viáveis. A ativação da resposta inflamatória pelo IAM também inclui o recrutamento de neutrófilos, atingindo o pico máximo no primeiro ao quarto dia de oclusão, e de macrófagos e linfócitos, que aumentam a partir do segundo dia permanecendo elevado por períodos superiores a 4 semanas após o evento (Frangogiannis, 2014).

O miocárdio infartado pode ativar os sinalizadores dos receptores *toll-like*, ocorrendo a ativação e produção de espécies reativas de oxigênio que induzem a superexpressão de citocinas e quimiocinas. A produção exacerbada destes mediadores inflamatórios pode implicar na disfunção endotelial e a progressão da IC (Anzai, 2013).

Citocinas como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também são expressas no miocárdio infartado (Irwin et al., 1999; Deten et al., 2003; Seropianet al., 2014; Ritschel et al., 2016). Estudos demonstraram maior concentração de TNF- α e IL-6 no sangue de pacientes com IC quando comparados ao grupo controle (Torre-Amione et al, 1996; Kubota et al., 2000). Camundongos *knockout* para TNF- α apresentaram redução dos eventos de ruptura cardíaca (Sun et al., 2004). Além disso, correlação positiva foi evidenciada entre IL-1 β e IL-6 na dilatação do VE em ratos infartados (Ono et al., 1998).

Estudos experimentais discutem se a inflamação pode estender a injúria isquêmica (Briaud et al., 2001; Chen et al., 2012). Entretanto, o processo inflamatório está certamente envolvido na dilatação e fibrose cardíaca, conduzindo eventos-chave na patogênese da IC pós-infarto (Frangogiannis, 2014).

Além das alterações ocorridas nos cardiomiócitos, os demais componentes celulares do miocárdio também sofrem alterações durante a hipertrofia. Sob estresse, os fibroblastos cardíacos proliferam e se diferenciam em miofibroblastos. Estes têm a capacidade de contração e secreção de colágeno I, colágeno III e fibronectina, dando início ao processo de deposição anormal de matriz extracelular e formação de fibrose, promovendo a disfunção contrátil e distúrbios no ritmo cardíaco (Burchfieldet al., 2013).

Estudos mostram que, na região remota ao IAM, o estresse da parede ventricular e a cicatrização tecidual podem influenciar no processo de dilatação cardíaca e posteriormente na IC (Hanemaaijer et al., 1993; Cohn, 2000; Frangogiannis, 2014). Em modelo de porcos e ratos, a oclusão da artéria coronária, em lesões transmurais de grandes proporções, resulta em alterações complexas da arquitetura ventricular, decorrentes do acúmulo de colágeno, que provoca rigidez da parede ventricular e reparo do tecido lesado (Etoh et al., 2001; Rohde et al., 1999).

Em modelos experimentais, logo após o IAM, foi demonstrado um aumento da expressão dos genes de colágeno I e colágeno III, durante a cicatrização no sítio onde ocorre a perda de miócitos. Nos primeiros dias após o IAM, ocorre degradação da rede de colágeno no local da lesão cardíaca (Kucharz et al., 1982; Jensen et al., 1990; Ward, 2000).

Durante o processo de IAM, existem dois tipos de fibrose miocárdica, uma na região intersticial (INT) e outra na região subendocárdica (SE). A fibrose INT é decorrente de mediadores locais como ativação do sistema renina-angiotensina, do sistema adrenérgico e de endotelinas no miocárdio remoto, que estão associados à disfunção sistólica. Já a fibrose no SE é uma consequência da diminuição da pressão de perfusão coronariana ou do fluxo coronário que contribui para progressão do remodelamento cardíaco e também para a disfunção ventricular (Weber et al., 1989; De Carvalho Frimm et al., 1997; Toyota et al., 2005).

É descrito que nas regiões infartadas e remotas ao IAM há formação do tecido fibroso em corações de ratos a partir do sétimo dia pós oclusão do fluxo coronariano, e eventos moleculares desencadeiam a fibrogênese e persistem ativos por várias semanas (Omerovic et al., 1999; Siwik et al., 2004; Koike et al., 2007). Estudos demonstram que o IAM está associado com uma abundante perda de miocárdio que é

6

substituída por uma cicatriz a base de colágeno (Guido et al., 2004; Frangogiannis, 2014).

Pesquisas com modelos animais sobre remodelamento cardíaco no IAM possibilitou, nos últimos anos, um melhor conhecimento da fisiologia das doenças cardiovasculares (DCV). Isto permitiu a investigação dos mecanismos desde os estágios iniciais da doença e dos efeitos de diferentes intervenções, incluindo o uso de fármacos. O modelo de IAM em ratos é frequentemente utilizado para mimetizar o remodelamento ventricular levando à IC, já que a progressão da disfunção do ventrículo esquerdo (VE) em modelos animais é semelhante ao observado em humanos (Goldman et al., 1995; Francis et al., 2001; Savergnini et al., 2013).

1.2 Tratamentos para o IAM

Um dos maiores desafios na área da cardiologia intervencionista é o desenho de estratégias com o objetivo de reduzir os danos do tecido do miocárdio pós-IAM. Durante a evolução da isquemia miocárdica prolongada, o processo de reperfusão é um requisito primordial para preservar os cardiomiócitos, e uma terapia de reperfusão precoce é certamente a mais efetiva estratégia para reduzir o tamanho da lesão em pacientes pós-IAM (Piot et al., 2008). Porém, a restauração do fluxo sanguíneo desencadeia uma série de eventos que, eventualmente, culminam em aceleração da apoptose podendo reduzir os efeitos benéficos da terapia de reperfusão (Timmerset al., 2012).

Estudos demonstram que as estratégias médicas convencionais para o tratamento da IC são ainda em grande parte com base nas causas e suas consequências neuro-humorais. Uma perspectiva mais ampla pode ser útil para o desenvolvimento de novos tratamentos focados na prevenção ou reverter o remodelamento cardíaco e reduzir a IC (González et al., 2011; Distefano & Sciacca, 2012). No entanto, estratégias como utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), o Captopril, e de bloqueadores de receptor de angiotensina, como o Losartan, protegem o miocárdio e reduzem a velocidade de progressão para disfunção. Entretanto, os efeitos destes fármacos sobre o miocárdio são secundários à atuação sobre os sistemas neuro-hormonais, que consequentemente estão associados com atenuação dos processos do remodelamento cardíaco (González et al., 2011; Onodera et al., 2005; Díez et al., 2002).

Trabalhos experimentais e clínicos indicam que a prevenção ou o tratamento do remodelamento cardíaco podem beneficiar a função ventricular (Schoemaker et al., 1991; Van Der Bijlet al., 2016). Sabe-se que a interferência sobre os mediadores inflamatórios resulta em remodelamento reverso com menos fibrose e melhora da função cardíaca (Hammermanet al., 1983; Vuet al.,2014). Entretanto, interferências no processo inflamatório podem ser deletérias, dependendo da fase do IAM em que são introduzidas, pois um processo fisiológico de reparo é fundamental para a manutenção da homeostasia e processo cicatricial (Schoemaker et al., 1991; Hammermanet al., 1984; Anzai, 2013).

Além disso, vários estudos experimentais sugerem que o processo inflamatório pode estender a injúria cardíaca, exercendo efeitos citotóxicos sobre os cardiomiócitos da *border zone (*Enthan et al., 1992; Francis et al., 2001; Savergnini et al., 2013). Estas observações geram um entusiasmo para o uso de novas estratégias anti-inflamatórias direcionadas para reduzir o tamanho do infarto.

As falhas dos estudos clínicos diminuíram o contentamento sobre o potencial translacional do campo, gerando déficits na área de estudo. Infelizmente, alguns ensaios clínicos não mostraram efeitos das abordagens que interferem na cascata inflamatória por meio da inibição de sinais pró-inflamatórios (tais como IL-1β) na redução do tamanho do infarto em pacientes pós-IAM (Christia & Frangogiannis, 2013; Faxon et al., 2002). Por outro lado, como o uso de anti-inflamatórios no remodelamento cardíaco foi pouco estudado e sabendo que eles podem exercer ações benéficas atenuando a dilatação cardíaca, além de, apresentarem ações cardioprotetoras e regenerativas, fica clara a importância do seu conhecimento integral para futuras possibilidades no tratamento do IAM (Saxenaet al., 2016).

Sendo assim, mesmo com a evolução de estudos na área médica para melhor compreensão da fisiopatologia do remodelamento cardíaco, muitos pacientes pós-IAM que são tratados de forma otimizada, ainda desenvolvem dilatação ventricular e progridem para IC. Assim, faz-se necessário a busca de novas opções terapêuticas do remodelamento cardíaco pós-IAM.

1.3 Metotrexato

O metotrexato (MTX) foi desenvolvido nos anos 40 como um antagonista ao ácido fólico. O fármaco inibe a enzima diidrofolato redutase e diminui os níveis da enzima tetraidrofolato. Como consequência, há diminuição da síntese de purina e pirimidina, que são essenciais na síntese e replicação do DNA (ácido desoxirribonucléico). A quebra no ciclo de duplicação do DNA celular advindo do uso do MTX resulta na liberação para o meio extracelular de adenosina, como conseqüência do acúmulo da enzima aminoimidazol carboximida ribonucleotídeo formil transferase (AICAR) (Puig, 2014).

Há evidências de que o MTX também possa interferir na modulação da resposta inflamatória. A adenosina, por meio de seus receptores, é um mediador chave do efeito anti-inflamatório do MTX, entretanto, o mecanismo envolvido na regulação endógena da inflamação pela adenosina não está completamente elucidado (Cronstein, 2010). Mecanismos de regulação da inflamação já foram observados durante a redução de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e pela redução de moléculas de adesão, como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e E-selectina (Chan &Cronstein, 2002).

Da classe dos quimioterápicos com ação antiproliferativa e imunossupressora, MTX é amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de doenças, como câncer, psoríase, doença de Crohn e principalmente na artrite reumatóide (Kuhn et al., 2010; Khan et al., 2011; Scott, 2012; Patel, 2014). Alguns estudos têm demonstrado o benefício do tratamento com MTX no IAM. Em ratos com miocardite tratados com MTX, houve aumento da fração de ejeção e de fração de encurtamento do VE, diminuição de mediadores inflamatórios, diminuição do diâmetro diastólico do VE e fibrose miocárdica (Zhang et al., 2009). O uso do MTX na fase aguda reduziu o tamanho do IAM em cães submetidos à isquemia e reperfusão pelo mecanismo de adenosina quinase e seu potente efeito cardioprotetor (Asanuma et al., 2004).

A comparação entre pacientes com tratamento medicamentoso e com a intervenção cirúrgica, como a revascularização, demonstrou que o MTX pode retardar a progressão da aterosclerose e estabilizar angina (Risos et al., 2014). Pacientes com DCV tratados com MTX apresentaram menor concentração de LDL oxidada e menor risco de outros eventos cardiovasculares (Ajeganova et al., 2012). Houve diminuição do processo inflamatório, redução no risco de DCV e melhora da qualidade de vida em pacientes com falência cardíaca decorrente da artrite reumatóide após o tratamento com MTX (Gong et al., 2006; Popkovet al., 2015).

Micha e colaboradores (2011) avaliaram que os pacientes com artrite reumatóide, psoríase ou poliartrite tratados com MTX possuem menor risco de DCV e menor risco de IAM quando comparados com pacientes não tratados com MTX, indicando que o tratamento com antiinflamatório, especialmente com o MTX, pode reduzir os riscos de DCV. Infelizmente, apesar dos resultados promissores de estudos experimentais, o tratamento em pacientes com IAM focado na inflamação não foi bem-sucedido e vários medicamentos anti-inflamatórios não conseguiram obter sucesso na melhora da função cardíaca em investigações clínicas. O desapontamento a partir destes primeiros resultados clínicos teve consequências duradouras neste campo de pesquisa. Considerando o papel crítico no processo inflamatório em resposta à lesão cardíaca e a participação de mediadores inflamatórios na reparação e remodelamento cardíaco pós-IAM, houve uma diminuição de novos estudos e abordagens na prática clínica com tratamentos anti-inflamatórios (Frangogiannis, 2014).

A ação do MTX reflete tanto em sua eficácia na terapia de doenças proliferativas como em algumas de suas manifestações de toxicidade. Dentre as várias reações de hipersensibilidade, o MTX pode desencadear anafilaxia, urticária, angioedema, pneumonite aguda, vasculite cutânea, toxicidade epidermoidal e hepática, anemia hemolítica e magaloblástica, citopenia, hepatite e insuficiência renal. Esses efeitos colaterais ocorrem em virtude da inespecificidade desse agente em relação às células alvo, o que pode ser revertido a partir da ligação do MTX a transportadores que aumentem sua especificidade (Lundberg, 1994; Aslibekyan et al., 2014).

Alguns trabalhos investigaram a veiculação de MTX em nanopartículas de lipossoma, visando diminuir os efeitos tóxicos do MTX, em células de câncer renal (Pignatello et al., 2000). A associação lipossoma-metotrexato-anticorpos teve maior efeito inibitório comparada a formulação comercial, além de aumentar o efeito imunomodulador do MTX em ratos com artrite reumatóide (Prabhu et al., 2012). Esses resultados podem aumentar o interesse em estudar novas abordagens terapêuticas com medicamentos de ação anti-inflamatória como o MTX.

1.4 Nanopartícula lipídica artificial (LDE)

Em 1987, iniciaram-se os estudos visando reproduzir o metabolismo da LDL por meio de uma emulsão com composição lipídica semelhante à da LDL natural (LDE), sem a porção proteica da lipoproteína, a apolipoproteína B100 (apo B100) (Maranhão et al., 1993). A LDE apesar de não possuir a apoB100, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas plasmáticas e adquire a apo E (Maranhão et al., 1997). Estudos com modelos experimentais mostraram que a LDE apresenta cinética plasmática semelhante a da LDL natural, sugerindo que sua captação ocorra pelas mesmas vias que retiram a LDL da circulação (Maranhão et al., 1993).

Em estudos de competição, a LDL natural compete com a LDE pela captação celularem linfócitos, comprovando que a remoção de ambas é feita pelo mesmo receptor (Maranhão et al., 1997). A apoE adquirida pela LDE da circulação tem mais afinidade pelo receptor de LDL do que a apo B100 presente na LDL natural (Hirata et al., 1999).

A LDL é o principal transportador de colesterol no plasma humano, carregando cerca de 2/3 do colesterol total. Assim, associações de fármacos às nanopartículas lipídicas criam uma nova biodistribuição dos fármacos a ela incorporados (Couto et al., 2007; Dietschy et al., 1993; Goldstein et al., 1979).

A concentração das nanopartículas lipídicas no sítio de interesse e seu efeito terapêutico baseiam-se no fato de que tecidos em proliferação celular acelerada exibem expressão aumentada dos receptores de LDL. O aumento de expressão desses receptores é consequente da necessidade aumentada de lípides para a síntese de novas membranas celulares exigida por processos de proliferação acelerada (Ho et al., 1978). Baseado no fato de que a LDE é mais captada por tecidos com alta proliferação celular, foi levantada a hipótese de que a LDE poderia atuar como veículo para direcionar fármacos quimioterápicos para tecidos neoplásicos. Um estudo em linhagens celulares leucêmicas demonstrou que a incorporação do MTX à LDE aumentou a captação da droga em 90 vezes (Moura et al., 2011).

Em modelos animais com implante de tumores, associações da LDE com os quimioterápicos daunorrubicina (Dorlhiac-Llacer et al., 2001), carmustina (Teixeira et al., 2004), etoposídeo (LoPrete et al., 2006; Valduga et al., 2003) e paclitaxel (Rodrigues et al., 2005) reduziram drasticamente a toxicidade destes fármacos, aumentando a ação antitumoral e a sobrevida desses animais.

Estudos pré-clínicos com paclitaxel, etoposídeo e carmustina associados à LDE realizados em pacientes com câncer de mama (Maranhão et al., 2002), ovário (Azevedo et al., 2005; Dias et al., 2007), linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (Pinheiro et al., 2006) e mieloma múltiplo (Hungria et al., 2004) demonstraram menor toxicidade dos quimioterápicos associados à LDE quando comparados ao uso dos fármacos em sua formulação comercial, mesmo quando administrados em doses superiores às utilizadas no tratamento convencional.

O aumento dos receptores de LDL também está presente em outras doenças proliferativas e inflamatórias, entre elas podemos destacar a aterosclerose (Zhu et al., 2002). Em experiências realizadas em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol, foi demonstrado que a LDE se concentra duas vezes mais nas artérias com lesões ateroscleróticas em comparação com as artérias de coelhos submetidos à dieta normal (Maranhão et al., 2008). O tratamento com o quimioterápico paclitaxel associado à LDE de coelhos com aterosclerose induzida por dieta resultou em redução de cerca de 60% nas lesões, com diminuição da relação íntima/média em quatro vezes, sem que toxicidade apreciável fosse registrada (Maranhão et al., 2008). Em trabalhos subsequentes, foi demonstrado que outro quimioterápico associado à LDE, o etoposídeo, também reduziu as lesões ateroscleróticas em coelhos em 85% (Tavares et al., 2011). Em pacientes com doença arterial coronária e aterosclerose, também foi observado que a LDE é captada

por segmentos arteriais e reduziu as lesões ateroscleróticas (Couto et al., 2003; Shiozaki et al., 2016).

Em estudos com coelhos submetidos à indução de artrite tratados com LDE-MTX, foi observada redução no influxo de leucócitos no fluido sinovial em aproximadamente 65% (Mello et al., 2016). Além disso, em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com LDE-MTX, foi observada redução entre 75% e 81% da lesão aterosclerótica, de 2 vezes da espessura de parede da aorta, da expressão gênica de MMP-9, TNF- α e IL-1 β e aumento da expressão de IL-10 (Bulgarelli et al., 2013; Leite et al., 2015).

Ao destacarmos os resultados prévios do uso da nanopartícula lipídica no tratamento de diversas patologias, principalmente no tratamento com o MTX, podemos concluir que o MTX apresentou ação anti-aterosclerótica e pode apresentar potencial no tratamento de doenças em que o processo inflamatório é importante, como no caso do IAM. Essa importância é ainda mais ressaltada por não existir estudos que demonstrem o efeito imunomodulador do MTX na fase crônica do IAM.

Portanto, elaboramos a hipótese de que o MTX associado à LDE possa potencializar o efeito anti-inflamatório e imunomodulador do fármaco, devido ao seu tropismo pelos tecidos alvo, e contribuir para a prevenção do remodelamento cardíaco pós-IAM.

2. Objetivos

Investigar os efeitos do MTX associado à nanopartícula LDE sobre o remodelamento cardíaco em ratos submetidos ao modelo de IAM, avaliando-se a hipertrofia cardíaca, a fibrose miocárdica, a estrutura e função ventricular, necrose dos miócitos, o estresse oxidativo e o processo inflamatório.

3. Material e métodos

3.1 Modelo biológico

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo "The Universities Federation for Animal Welfare".

Ratos machos Wistar foram utilizados, pesando entre 300-400g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O protocolo experimental foi aprovado pela CaPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (nº 271/12).

3.2 Modelo cirúrgico para infarto agudo do miocárdio

A técnica de indução do IAM utilizada foi uma modificação das descritas por Selye e colaboradores (1960) e Koike e colaboradores (2007). Os animais foram anestesiados com xilazina (CEVA, Brazil) (10mg/kg i.p.) e cetamina (Cristália, Brasil) (50mg/kg i.p.), entubados orotraquealmente com jelco 14G e submetidos à ventilação mecânica (rodent Ventilator, modelo 683, Harvard, USA) com frequência de 60 ciclos/min e volume corrente de 10 mL/kg. Uma incisão transversal na pele foi realizada sobre o hemitórax esquerdo para exposição dos músculos peitorais, os quais foram delicadamente afastados. A seguir, a toracotomia foi realizada no nível do terceiro espaço intercostal para a visibilização da parede ântero-lateral do VE próximo à base do coração.

Após periocardiotomia, a artéria coronária esquerda foi identificada na região do átrio esquerdo à emergência da artéria pulmonar. A ligadura da artéria foi realizada com fio de nylon 6.0, um a dois mm após a origem. A isquemia resultante foi visualizada pelo descoramento muscular da parede livre do VE. A parede do tórax foi suturada com fio de polipropileno 3.0 e o ar do espaço pleural foi drenado. Os músculos peitorais foram reposicionados e os animais foram mantidos em mesa cirúrgica aquecida a 37°C até o retorno da anestesia.

O grupo de cirurgia fictícia (SHAM) foi submetido aos mesmos procedimentos, porém, sem a ligadura da artéria coronária. Após a recuperação plena da cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo três animais durante todo o tempo de seguimento. Os animais receberam água e comida à vontade e permaneceram durante todo o experimento em local com temperatura e ciclo de luz controladosno Biotério do Instituto do Coração (Incor-HCFMUSP), sob responsabilidade da veterinária Dra Edna Aparecida Diniz Paulo.

3.3 Protocolo experimental, tratamento e eutanásia

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

1. SHAM: animais submetidos à cirurgia fictícia tratados com solução fisiológica.

2. IAM-LDE: animais submetidos ao IAM tratados com LDE.

3. IAM-MTXc: animais submetidos ao IAM tratados com MTX comercial.

4. IAM-LDE-MTX: animais submetidos ao IAM tratados com a nanopartícula LDE associada ao MTX.

Os animais foram tratados uma vez por semana durante 6 semanas com MTXc (Hytas, Accord Farmacêutica, Brasil) (50mg/ml) (0,63mg/kg) e MTX-LDE (1mg/kg) intraperiotoneal (i.p.). A modificação do MTX para a incorporação na LDE aumenta a massa molar do fármaco. Portanto, consideramos a massa molar do MTX comercial (498,44g/mol) e do di-dodecilmetotrexato (791,48 g/mol) para o cálculo das doses utilizadas. Os animais do grupo IAM-LDE foram tratados com solução fisiológica equivalente ao volume injetado nos animais IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX (100-200µL).

Após 24 horas da indução do infarto, foi realizado o ecocardiograma inicial, logo após a recuperação dos animais da anestesia foi iniciado o tratamento. Uma vez por semana durante 6 semanas, os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos. Após tempo de seguimento, a eutanásia dos animais foi realizada após o ecocardiograma final por dose letal de anestésico tiopental sódico (Cristália, 1,0g/mL).

Abaixo está representado o esquema do protocolo experimental:



3.4 Síntese do di-Dodecil Metotrexato

Metotrexato (sal sódico) (2,0 g, 4,01 mmol) foi diluído em 120 mL de dimetilsulfóxido e foram adicionados carbonato de césio (1,43 g, 4,40 mmol) e brometo de dodecila (2,5 g, 10 mmol). Após 24 horas de agitação, à temperatura ambiente, foram adicionados 100 mL de água e o 18 produto foi extraído com clorofórmio (5x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (3x 100 mL), seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada. O produto foi purificado em coluna de sílica-gel (230-400 mesh), utilizando como fase metanol/clorofórmio 2,5%/5% e por último, metanol 100 mL. O rendimento da reação foi de 98% e o ponto de fusão foi de 122-124°C.

3.5 Preparação da nanopartícula lipídica LDE e associação ao MTX

A nanopartícula lipídica (LDE) foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por 64% de fosfatidilcolina, 33% colesterol esterificado, 1% de colesterol não esterificado e 2% de triglicérides (Maranhão et al., 1993). O di-dodecilmetotrexato (Moura et al., 2011) foi fundido aos lípides numa razão de 5:1 em massa lípides:fármaco. A emulsificação dos lípides foi iniciada adicionando-se solução tampão TRIS-HCI 0,001MpH 8,05, e um agente tensoativo, Tween 80 (Merck, Alemanha) em um homogenizador de alta pressão, Microfluidizer -M110S (Microfluidizer[®] Processor, Microfluidics[™], EUA). O processo de homogenização ocorreu durante 30-40 minutos a uma temperatura constante de 55-60°C, e o diâmetro das partículas l ipídicas foi monitorado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK) durante todo o período de produção. A nanopartícula foi esterilizada em filtro de policarbonato 0,22 µm (Merck Millipore Corporation, Billerica, EUA) e armazenada a 4°C. A quantificação do di-dodecilmeto trexato associado à LDE foi determinada utilizando o HPLC - Shimadzu LC10A (Shimadzu, EUA).

3.6 Ecocardiograma

O exame ecocardiograma foi realizado 24 horas após a indução do IAM e ao final das 6 semanas de tratamento. O aparelho utilizado foi o Sequóia 512 (Mountain View, EUA), com transdutor linear de 14MHz. Os registros dos traçados do modo M e do Doppler com velocidade de 100 mm/s foram analisados. Todos os exames seguiram as normas preconizadas pela American Society of Echocardiography (Salemi et al., 2005; Lang et al., 2005). O ecocardiograma foi realizado pela Profa. Dra. Vera Maria Salemi e Dr. Marcelo Melo do Laboratório de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração do HCFMUSP.

Para obtenção das imagens ecocardiográficas,os animais foram submetidos à tricotomia do tórax e sedação comxilazina (CEVA) (10mg/kg i.p.) e cetamina (Cristália) (50mg/kg i.p.), e então posicionados em decúbito dorsal, com eletrodos aderidos às patas para registro simultâneo do traçado eletrocardiográfico, para identificação do ciclo cardíaco e determinação da frequência cardíaca. As imagens foram gravadas em DVD para posterior análise, sendo o resultado final oriundo da média obtida de três ciclos cardíacos diferentes.

Os parâmetros ecocardiográficos avaliados e calculados foram: diâmetro diastólico (DD), diâmetro sistólico (DS), volume diastólico do ventrículo esquerdo (Vol D), volume sistólico do ventrículo esquerdo (Vol S), espessuras diastólicas do septo interventricular (SIV) e da parede posterior (PP), massa do ventrículo esquerdo (mVE), picos da onda E e da onda A, relação E/A, tempo de desaceleração (DT), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), fração de ejeção pelo método de Simpson (FE). As Figuras 1 e 2 mostram as imagens de alguns desses parâmetros analisados. Os parâmetros morfológicos ecocardiográficos foram normalizados pelo peso corporal. A fórmula utilizada para obter a mVE está representada abaixo:
$$mVE = 0.8x1,04 x [(DD+PP+SIV)^{3}-DD^{3}]+0.6$$

100



Figura 1. Imagens de ecocardiograma bidimensional em corte paraesternal eixo-longo mostrando o ventrículo esquerdo (VE), aorta (AO) e átrio esquerdo (AE) em diástole dos grupos SHAM e IAM-LDE no segmento de 6 semanas.Observa-se o aumento das dimensões do VE no grupo infartado.



Figura 2.Imagens de ecocardiograma representando o modo-M do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos SHAM e IAM-LDE no segmento de 6 semanas.Observa-se aumento das dimensões do VE no grupo infartado.

3.7 Peso corporal e peso relativo dos órgãos

Os animais foram pesados no dia da cirurgia, uma vez por semana, para ajuste da dose, e ao final do segmento. Após a eutanásia, o coração, os pulmões, o fígado e os rins foram retirados, limpos e pesados. O peso relativo de cada órgão foi normalizado pelo peso corporal obtido ao final do segmento dos animais para obtenção do peso relativo (g/kg) (Guido MC et al., 2004 e 2007).

3.8 Ensaios laboratoriais

Imediatamente após a eutanásia, o sangue foi coletado pela veia cava inferior, e amostras de sangue e plasma foram enviados para o Laboratório de Investigação Médica (LIM 03) do HCFMUSP. Para análise do hemograma completo e plaquetas, as amostras de sangue foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA. Pelo método automatizado (Poch 100iV Diff Sysmex - Roche, Suíça), foram analisados os seguintes parâmetros: eritrócitos, leucócitos e plaquetas (método automatizado de Fônio). Quando necessário, foi realizado estudo morfológico de extensão sanguínea corados com corante panóptico para confirmação de resultado. Para análise de perfil bioquímico, foi coletado sangue em tubo com anticoagulante heparina. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Analisamos os seguintes parâmetros: 1. Perfil lipídico: colesterol total, colesterol contido na lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e triglicérides, pelo método enzimático colorimétrico automatizado (COBAS c 111 - Roche). 2. Perfil hepático: alanina aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), pelo método cinético automatizado (COBAS c111 - Roche).

3.9 Análise histomorfométrica

Uma fatia transversal do coração na porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e dela obtidos cortes histológicos coronais de 5 µm de espessura realizados.

A preparação das lâminas foi realizada sob supervisão da Dra Vera Aiello do Laboratório de Anatomia Patológica do Incor-HCFMUSP. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e tricrômio de Masson e as medidas histomorfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems Itd. UK).

Lâminas coradas com tricrômio de Masson foram escaneadas e o tamanho do IAM foi estimado pela divisão da área do IAM e a área total do VE. Os resultados foram demonstrados em porcencetagem (Koike et al., 2007) (Figura 3).

Tamanho do IAM (%) <u>= área do IAM</u> x 100 área total VE

A morfometria do VE foi estudada na região remota ao IAM em duas regiões distintas: a região INT e a região SE. Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com HE, sob aumento de 40x. A hipertrofia foi medida pelo diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (µm). Foram selecionados apenas miócitos da região INT do VE com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados (Guido et al., 2004 e 2007) (Figura 6).

Para a avaliação da fibrose miocárdica, foram utilizados cortes histológicos corados com tricrômio de Masson, sob aumento de 20x. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (FVC, %), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em azul, e a área total do miocárdio (Guido et al., 2004 e 2007) (Figura 7).

FVC (%) = $\frac{\text{área de colágeno}}{\text{área total do tecido}} \times 100$

Para a avaliação de forma qualitativa da necrose dos miócitos, foram utilizados cortes corados com HE em aumento de 40x. A necrose foi identificada pelo aspecto nuclear (picnótico ou cariólise) e pelo aspecto citoplasmático (contração de bandas, vacuolização e hipereosinofilia), além da degradação dos miócitos (Figura 4). Para a avaliação do processo inflamatório foi determinada a infiltração leucocitária em cortes corados com HE em aumento de 40x. Os miócitos foram identificados morfologicamente pelo aspecto nuclear e citoplasmático. A infiltração de leucócitos foi estimada pela razão entre o número de leucócitos e a área do miocárdio (células/mm²) (Koike et al., 2007) (Figura 5).



Figura 3. Imagens dos miocárdios corados com tricômio de Masson. Representação da medida do tamanho do IAM.



Figura 4.Fotomicrografias do tecido miocárdico do VE corado com hematoxilina e eosina. Representação da análise de necrose das regiões INT e SE.As setas indicam a) hipereosinofilia; b) degradação dos miócitos e c) cariólise.



Figura 5.Fotomicrografias do tecido miocárdico do VE corado com hematoxilina e eosina. Representação da análise do processo inflamatório da região INT e SE, como indicado nas setas.



Figura 6. Fotomicrografias do tecido miocárdico do VE corado com hematoxilina e eosina. Representação da análise do diâmetro dos miócitos da região INT, com disposição longitudinal, núcleo ovalado e centralizado.



Figura 7. Fotomicrografias do tecido miocárdico do VE corado com tricômio de Masson. Representação da análise de fibrose miocárdica da região INT e SE, como indicado nas setas.

Isolamento do RNA Total

Após a eutanásia dos animais, fragmentos de 100 mg de tecido do VE da região remota ao IAM foram retirados e conservados em solução de RNAlater® (Ambion Life Technologies, USA). O RNA total foi extraído utilizando-se a homogenização do tecido com o reagente TRIZOL® (Invitrogen Life Technologies, USA) conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose denaturante e sua concentração determinada por meio de leitura em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm, no aparelho NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). O RNA isolado foi armazenado a -80°C e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

Transcrição Reversa: Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para cada 8,0µL contendo 2,5µg de RNA a ser reversamente transcrito foram adicionados 0,5µL de Oligo dT (0,5 µg/µL, Invitrogen Life Technologies), 0,5uL de Random Hexamers (50 ng/µL, Invitrogen Life Technologies) e 1,0µL de solução com mistura de dNTPs (10mM, Invitrogen). Este produto foi incubado por 5 minutos a 65℃ para sua denaturação e, em seguida, foi imediatamente resfriado (etapa realizada no gelo) por no mínimo 2 minutos.

A seguir, foram adicionados a cada amostra 2µL do tampão de síntese 10x (RT Buffer, Invitrogen Life Technologies), 4,0µL de MgCl2 25mM, 2,0µL de DTT 0,1M (Invitrogen Life Technologies), 1,0uL de inibidor de RNase (RNaseOUT 40U/uL, Invitrogen Life Technologies,) e, por fim, 1,0uL da enzima transcriptase reversa (Superscript III Reverse Transcriptase 200U/µL, Invitrogen Life Technologies), totalizando um volume final de 20uL de reação. Cada amostra foi levemente

homogeneizada e novamente incubada por 10 minutos a 25° , por 50 minutos a 50° e, por fim, por 5 minutos a 85° .

No final, foi pipetado 1,0uL da enzima RNase-H e incubada por mais 20 minutos a 37°C. Após esta etapa, as amostra s foram diluídas na proporção 1:20 em tampão Tris-EDTA e armazenadas em -20°C.

Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise da expressão gênica, foram avaliados genes referentes ao processo inflamatório (CD3, CD68, IL-1β, IL-6, IL-10 e TNFα), a fibrose miocárdica (colágeno I e III, MMP-2 e MMP-9), ao estresse oxidativo (NOX-1 e NOX-4), a angiogênese (VEGF), e aos receptores de lipoproteínas (LDLR, LRP1 e SRB1) (Tabela 1). Para isso, foi realizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real. O sistema de detecção selecionado para o estudo foi o sistema TaqMan, que utiliza, além dos primers, sondas fluorescentes para a quantificação do produto de PCR. Esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando a padronização da reação.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies, EUA) que contém um software que gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (threshold) é definido automaticamente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (background) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o threshold é chamado Ct (cycle threshold).

Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão menor que 0,4 ou quando apresentaram diferença de Ct<1. Em cada reação foi pipetado um volume final de 12uL, constituídos de 6uL do reagente

TaqMan Gene Expression Master Mix 2x (Applied Biosystems Life Tchnologies); 2,4uL de água ultrapura; 0,6uL do ensaio TaqMan Gene Expression Assays 20x (Applied Biosystems Life Tchnologies) específico para cada gene alvo que foi analisado, e para o gene normalizador (GAPDH); no final, foram adicionados 3,0uL de cDNA diluído (1:20). As condições de termociclagem da reação seguiram os parâmetros de fábrica do aparelho ajustados para um pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos primers e extensão.

A quantificação da expressão gênica relativa foi calculada por meio do método Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). O valor de Δ Ct equivale à diferença entre a média do Ct do gene de interesse e a média do Ct do gene normalizador. A diferença entre os valores de Ct (Δ Ct) entre as amostras para cada gene alvo, após normalização pelo Ct do gene de expressão constante (housekeeping gene ou endogenous control gene), reflete sua expressão diferencial. O $\Delta\Delta$ Ct dá-se pela diferença do Δ Ct da amostra alvo (grupo de estudo) – o Δ Ct da amostra controle (grupo controle). O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída.

A fórmula utilizada para obter a expressão relativa está representada abaixo:

Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta CT}$

onde: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ amostra tratada - ΔC_T amostra controle

e $\Delta C_T = C_T$ gene de interesse – C_T gene de referência

Símbolo	Nomenclatura	Identificação do ensaio	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto amplificado(pb)
CD3	Cluster differentation 3	Rn01422553_g1	CTTCTTCACCAATGTCATCTCCATA	94
CD68	Cluster differentation 68	Rn01495634_g1	TCGGGCCATGCTTCTCTTGCGCCAG	62
COLI	Colágeno tipo I	Rn01463848_m1	CCAAGAAGACATCCCTGAAGTCAGC	115
COL III	Colágeno tipo III	Rn01437681_m1	CTCAAGAGCGGAGAATACTGGGTTG	71
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Rn01775763_g1	AGGAGTCCCCATCCCAACTCAGCCC	175
IL-1β	Interleucina 1 beta	Rn00580432_m1	AGCCAACAAGTGGTATTCTCCATGA	74
IL-6	Interleucina 6	Rn01410330_m1	GGATATAACCAGGAAATTTGCCTAT	121
IL-10	Interleucina 10	Rn00563409_m1	GATTTTAATAAGCTCCAAGACAAAG	70
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baixa densidade	Rn00598442_m1	GGCTGCATCAATGTGACCCAGTGCG	76
LRP1	Receptor de lipoproteínas de baixa densidade-Proteína relacionada 1	Rn01503901_m1	AAATCCTGCAAGAAACCTGAACATG	61
MMP-2	Metaloproteinase da matriz extracelular 2	Rn01538170_m1	AAGAATCAGATCACATACAGGATCA	63
MMP-9	Metaloproteinase da matriz extracelular 9	Rn00579162_m1	TCACTACCAAGACAAGGCCTATTTC	72
NOX 1	NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase 1	Rn00586652_m1	ACTGCCCACCCCAAGTCTGTGGTGG	82
NOX 4	NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato)oxidase 4	Rn00585380_m1	GAGACTGGACAGAAAGATTCCGAGA	96
SRB1	Receptor Scavenger classe B tipo 1	Rn00580588_m1	TCCTGGTCCTGGGAGGGGCAGTGAT	75
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa	Rn01525859_g1	CCAACAAGGAGGAGAAGTTCCCAAA	92
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial	Rn01511601_m1	GGAGCAGAAAGCCCATGAAGTGGTG	69

Tabela 1.Descrição dos ensaios TaqMan®* utilizados para análise da expressão gênica pela técnica de qRT-PCR

*Ensaios *TaqMan*® adquiridos da *Life Technologies*. Rn – identificação da espécie, *Rattus novergicus*. Pb – pares de base.

3.11 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram expressos em média ± erro padrão. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para determinar se o conjunto de dados da amostra tem distribuição normal ou anormal, ou para calcular se a probabilidade da variável aleatória subjacente está normalmente distribuída. O teste ANOVA com o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para a realização de comparações múltiplas. Para variáveis com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

4. Resultados

4.1 Número de animais e mortalidade

Para a realização desse estudo foram utilizados 50 ratos. Desses, 12 ratos foram submetidos à SHAM e 38 foram submetidos à cirurgia de IAM. Não houve mortalidade no grupo SHAM, entretanto 32% dos animais IAM foram a óbito em até 24 horas pós-cirurgia. As principais causas de mortalidade foram arritmia ventricular imediatamente após a ligadura da artéria coronária e possível insuficiência cardíaca aguda. Após 24 horas, os animais foram divididos entre os grupos: IAM-LDE (n=13), IAM-MTXc (n=12) e IAM-LDE-MTX (n=13). No final do período experimental, a porcentagem de mortalidade foi de 14%, 35% e 11% nos grupos IAM-LDE, IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX, respectivamente. Nos grupos IAM, principalmente o grupo IAM-LDE, a mortalidade ocorreu especialmente na 5ª semana, possivelmente por insuficiência cardíaca crônica e edema pleural.

4.2 Ecocardiograma

De acordo com os resultados de ecocardiograma representados na Tabela 2, a cirurgia fictícia não promoveu qualquer alteração na função e estrutura do ventrículo esquerdo (VE).

Em todos os grupos IAM, houve um aumento dos diâmetros (DD e DS) e dos volumes diastólicos e sistólicos (Vol D e Vol S) no seguimento de 24 horas após a indução do infarto quando comparado ao grupo SHAM. Ao final do tratamento, no seguimento de 6 semanas após a indução do infarto, os diâmetros e volumes sistólicos e diastólicos não foram alterados nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc, enquanto que houve diminuição desses parâmetros no grupo IAM-LDE-MTX (p<0,05), se aproximando dos valores observados no grupo SHAM. Não houve aumento da espessura do septo interventricular (SIV) e espessura da parede posterior (PP) nos 3 grupos IAM no seguimento de 24 horas, em relação ao SHAM. Entretanto, após 6 semanas da cirurgia, o grupo IAM-LDE-MTX apresentou uma redução significativa nos parâmetros descritos quando comparado com os grupos IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05) (Tabela 2).

Em todos os grupos estudados, não foi observada nenhuma diferença na massa do ventrículo esquerdo (mVE) no seguimento de 24 horas. Após 6 semanas, houve um aumento na mVE nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc quando comparando ao grupo SHAM (p<0,05). Entretanto, o tratamento com LDE-MTX foi capaz de prevenir esse aumento (Tabela 2).

A Figura 8 mostra a evolução da função sistólica do VE representado pelos valores da fração de ejeção (FE). Em 24 horas de seguimento, houve uma diminuição da FE nos 3 grupos IAM comparados ao grupo SHAM. Entretanto, o tratamento com LDE-MTX melhorou a função sistólica do VE, visto que houve um aumento de 40% da FE, em comparação aos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc. Ao contrário, o tratamento com o MTX comercial não surtiu efeito na função sistólica do VE.

Não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos estudados nos seguintes parâmetros: onda E/A, DT e TRIV.

	SHAM (n=12)		IAM-LDE (n=13)		IAM-MTXc (n=12)		IAM-LDE-MTX (n=13)	
	24 horas	6 semanas	24 horas	6 semanas	24 horas	6 semanas	24 horas	6 semanas
DD (mm/mg)	20 ± 1	19 ± 1	23 ± 1*†	23 ± 2*†	23 ± 2*†	22 ± 1†	22 ± 1†	20 ± 1 ^{‡§}
DS (mm/mg)	13 ± 1	13 ± 1	17 ± 1*†	19 ± 2 ^{*†}	17 ± 2*†	17 ± 2 ^{*†}	16 ± 1*†	13 ± 1 ^{‡§∆#¥}
Vol D (mL/mg)	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1*†	1.5 ± 0.1*†	1.4 ± 0.1*†	1.3 ± 0.1*†	1.3 ± 0.1*†	1.1 ± 0.1 ^{‡§∆#¥}
Vol S (mL/mg)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	$0.8 \pm 0.1^{*\dagger}$	0.9 ± 0.1*†	$0.7 \pm 0.1^{*\dagger}$	0.8 ± 0.1*†	$0.7 \pm 0.1^{*\dagger}$	$0.5 \pm 0.1^{\ddagger \& \Delta \# ¥}$
SIV (mm/mg)	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.6 ± 0.2	2.7 ± 0.1 ^{‡∆¥}
PP (mm/mg)	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.3	3.6 ± 0.2	2.9 ± 0.1 ^{‡∆¥}
mVE (mg/mg²)	17 ± 1	16 ± 1	17 ± 1	22 ± 2 ^{*†‡}	16 ± 1	21 ± 2*†‡∆	17 ± 1 ^{§#}	17 ± 1 ^{§#}
Relação E/A	2.0 ± 0.3	1.8 ± 0.2	3.0 ± 0.5	2.7 ± 0.4	1.8 ± 0.1	2.5 ± 0.3	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.4
DT (mseg)	53 ± 7	54 ± 5	36 ± 3	40 ± 3	37 ± 3	44 ± 3	36 ± 3	45 ± 4
TRIV (mseg)	32 ± 2	31 ± 1	29 ± 2	28 ± 2	28 ± 1	31 ± 2	25 ± 1	30 ± 1
FE (%)	60 ± 2	71 ± 2	37 ± 2 ^{*†}	$37 \pm 4^{*\dagger}$	$36 \pm 3^{*\dagger}$	37 ± 4 ^{*†}	$39 \pm 5^{*\dagger}$	55 ± 3 ^{‡§∆#¥}

Tabela 2. Ecocardiograma dos grupos SHAM e IAM com ou sem tratamento nos seguimentos de 24 horas e 6 semanas.

DD, diâmetro diastólico; DS, diâmetro sistólico; Vol D, volume diastólico do ventrículo esquerdo (VE); Vol S, volume sistólico do VE; SIV, espessura do septo interventricular; PP, espessura da parede posterior; mVE, massa do VE; E, onda E; A, onda A; DT, tempo de desaceleração do VE; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico do VE; FE, fração de ejeção. *p<0,05 vs SHAM 24 horas; †p<0,05 vs SHAM 6 semanas; ‡p<0,05 vs IAM-LDE 24 horas; §p<0,05 vs IAM-LDE 6 semanas; Δp<0,05 vs IAM-MTXc 24 horas; #p<0,05 vs IAM-MTXc 6 semanas; ¥p<0,05 vs IAM-LDE-MTX 24 horas.



Figura 8. Fração de ejeção (%) dos grupos SHAM e IAM com ou sem tratamento nos seguimentos de 24 horas e 6 semanas. * p<0.01 vs SHAM 24 horas; † p<0.001 vs SHAM 6 semanas; § p<0.01 vs IAM-LDE 24 horas; # p<0,05 vs IAM-LDE 6 semanas; ¥ p<0,01 vs IAM-MTX 24 horas; &p<0,05 vs IAM-MTXc 6 semanas; £ p<0,01 vs IAM-LDE-MTX 24 horas.

4.3 Peso corporal e peso relativo dos órgãos

Como representado na Tabela 3, não foi observado diferença no peso corporal no início e ao final do seguimento em todos os grupos estudados. Os pesos relativos do coração e do pulmão foram menores no grupo tratado com IAM-LDE-MTX em relação aos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05).

	SHAM (n=12)	IAM-LDE (n=13)	IAM-MTXc (n=12)	IAM-LDE-MTX (n=13)
Peso corporal (g)				
Inicial	328±18	365±16	372±20	389±8
Final	435±16	468±14	463±10	507±9
Peso relativo (mg/g)				
Coração	3,3±0,1	4,0±0,4 [*]	3,9±0,2	$3,6\pm0,2^{\#}$
Pulmão	5,2±0,2	6,6±0,5 [*]	5,7±1,0	$5,2\pm0,5^{\#}$
Fígado	34,1±0,7	32,6±1,7	36,8±1,1	34,0±0,9
Rins	8,0±0,2	7,1±0,4*	7,2±0,2	7,4±0,4

Tabela 3.Peso corporal e peso relativo dos órgãos do grupo SHAM e IAM com ou sem tratamento.

* p<0,05 vs SHAM; # p<0,05 vs IAM-LDE.

4.4 Ensaios laboratoriais

Como representado na tabela 4, não houve diferença no hemograma enzimas hepáticas e no perfil lipídico em todos os grupos estudados, indicando que os tratamentos não provocaram toxicidade.

Tabela 4.Enzimas hepáticas, perfil lipídico e hemograma dos grupos SHAM e IAM com e sem tratamento.

	SHAM (n=12)	IAM-LDE (n=9)	IAM-MTXc (n=8)	IAM-LDE-MTX (n=12)
Eritrócitos(milhões/mm ³)	7,7±0,2	8,1±0,2	7,6±0,1	8,5±0,1
Leucócitos(mil/mm ³)	7,3±0,6	6,8±0,4	5,9±1,4	6,8±0,4
Hemoglobina (g/dL)	17,6±0,4	16,9±0,8	15,8±0,9	16,2±0,4
Plaquetas(mil/mm ³)	624±90	732±27	711±173	759±33
ALT(U/L)	55±2	68±8	61±14	53±5
AST(U/L)	86±4	107±18	91±21	96±10
Colesterol total(mg/dL)	68±3	71±3	78±18	80±4
HDL-C (mg/dL)	54±2	55±3	56±13	55±3
TG(mg/dL)	58±11	63±7	89±20	66±9

ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; HDL-C, colesterol contido na lipoproteína de alta densidade; TG,triglicerídeos.

4.5 Análise histomorfométrica

Os resultados das análises histomorfométricasde todos os grupos estudados estão representados na Tabela 5. O tamanho do infarto foi menor no grupo IAM-LDE-MTX quando comparado ao grupo IAM-LDE (p<0,05) (Figura 8). Ainda assim, o tratamento com LDE-MTX reduziu o diâmetro dos miócitos comparando com os grupos IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05).

A Figura 9 mostra fotomicrografias representativas da necrose dos miócitos nas regiões INT e SE, em todos os grupos estudados. Nas duas regiões analisadas, observa-se menor presença de necrose dos miócitos no grupo IAM-LDE-MTX comparando IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05) (Tabela 5). Nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc, foram identificados predominantemente resquícios de miócitos deteriorados (Figura 9).

Como indicado na Tabela 5 e Figura 10, o tratamento com LDE-MTX diminuiu o processo inflamatório de maneira eficaz tanto na região INT quanto na região SE, quando comparado com os grupos IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05). No infiltrado inflamatório da região INT do grupo (p<0,05), foi observada presença de neutrófilos e linfócitos, enquanto que na região SE foi observada predominantemente a presença de macrófagos (Figura 10).

A fração de volume do colágeno (FVC) nas regiões INT e SE está representadas na Figura 11. O grupo tratado com LDE-MTX demonstrou menor fração de volume de colágeno nas regiõesestudadas em relação ao grupo IAM-LDE e IAM-MTXc (p<0,05) (Tabela 5).

	SHAM	IAM-LDE	IAM-MTXc	IAM-LDE-MTX
	(n=7)	(n=4)	(n=8)	(n=10)
Tamanho IAM (%)		31±3	18±5	9±5 [#]
Diâmetro dos miócitos (µm)	10,0±0,3	16,2±0,3 [*]	14,7±0,5 [*]	12,0±0,4 ^{*#¥}
Necrose				
INT	1,1±0,1	2,9±0,3 [*]	2,6±0,3 [*]	1,3±0,1 ^{#¥}
SE	2,1±0,1	4,9±0,1 [*]	3,8±0,4 [*]	1,9±0,2 ^{#¥}
Células inflamatórias (n⁰cél/mm²)				
INT	1,4±0,2	3,8±0,1 [*]	2,1±0,1 [*]	1,3±0,1 ^{#¥}
SE	2,4±0,3	4,8±0,1 [*]	4,3±0,2 [*]	$2,4\pm0,2^{\#}$
FVC (%)				
INT	1,3±0,2	3,0±0,3 [*]	2,6±0,1 [*]	1,8±0,2 ^{#¥}
SE	1,9±0,2	4,3±0,4 [*]	3,6±0,2 [*]	2,2±0,2 ^{#¥}

Tabela 5. Histomorfometria dos grupos SHAM e IAM com e sem tratamento.

SE, região subendocárdica do VE; INT, região intersticial do VE; FVC, fração de volume do colágeno; *p<0,05 vs SHAM; #p<0,05 vs IAM-LDE; ¥p<0,05 vs IAM-MTXc.



Figura 8. Representação do tamanho do IAM em corações corados com tricômio de Masson dos grupos SHAM, IAM-LDE, IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX.As setas indicam as regiões de IAM.

Região INT



Região SE



Figura 9. Fotomicrografias representativas da necrose dos miócitos nas regiões INT e SE do VE coradas com hematoxilina e eosina dos grupos SHAM, IAM-LDE, IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX. As setas indicam núcleos picnóticos, cariólise, citoplasma hipereosinifílico, infiltrado de macrófagos e resquícios de miócitos degradados.Aumento: 40x







Região INT



Região SE



Figura 11. Fotomicrografias representativas da fração de volume do colágeno nas regiões INT e SE do VE coradas com tricrômio de Masson dos grupos SHAM, IAM-LDE, IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX. As setas indicam fibrose miocárdica, em coloração azul. Aumento: 40x.

4.6 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Como apresentada na Tabela 6, a análise da expressão gênica por qRT-PCR mostrou que houve redução da expressão de TNF-α no grupo IAM-LDE-MTX quando comparado com os grupos SHAM e IAM-MTXc (p=0,006 e p=0,03, respectivamente). A expressão dos marcadores Col I (p=0,034), MMP-2 (p=0,043), NOX-4 (p=0,001) foi menor no grupo IAM-LDE-MTX quando comparada com o grupo IAM-MTXc. A expressão de LDLR foi menor no grupo IAM-LDE-MTX em comparação ao grupo IAM-MTXc (p=0,002). Os demais genes analisados não apresentaram diferença de expressão, tanto nos grupos tratados como no grupo SHAM (Tabela 6).

Tabela 6. Expressão gênica de marcadores inflamatórios, fibrose, estresse oxidativo, receptores de lipoproteínas e angiogênese nos grupos SHAM e IAM com e sem tratamento.

	SHAM (n=7)	IAM-LDE (n=5)	IAM-MTXc (n=6)	IAM-LDE-MTX (n=13)
CD3	1,0±0,1	1,9±0,5	1,4±0,2	1,2±0,2
CD68	1,0±0,1	1,9±0,2	2,1±0,8	1,1±0,2
Col I	1,0±0,0	1,3±0,3	2,5±1,0	0,8±0,1 [#]
Col III	1,0±0,0	7,1±3,0	3,6±1,6	2,2±0,7
IL-1 β	1,0±0,1	1,3±0,4	1,4±0,5	0,7±0,1
IL-6	1,0±0,0	2,7±1,6	2,1±0,9	1,8±0,7
IL-10	1,0±0,1	0,7±0,1	1,2±0,7	1,3±0,2
LDLR	1,0±0,1	1,0±0,3	2,1±0,4	0,8±0,1 [#]
LRP1	1,0±0,0	1,4±0,2	1,8±0,7	0,9±0,1
MMP-2	1,0±0,0	1,3±0,2	2,3±0,7	1,0±0,1 [#]
MMP-9	1,0±0,1	3,4±1,5	4,1±2,5	1,8±0,3
NOX-1	1,0±0,0	3,1±1,3	5,3±2,0	1,5±0,2
NOX-4	1,0±0,0	0,9±0,2	1,7±0,3	$0,7\pm0,0^{\#}$
SRB1	1,0±0,0	1,1±0,1	1,2±0,2	0,9±0,0
TNF-α	1,0±0,1	0,7±0,1	0,9±0,1	0,5±0,0 ^{*,#}
VEGF	1,0±0,1	0,8±0,1	1,0±0,1	0,8±0,1

CD3, cluster differentation 3; CD68, cluster differentation 68; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III; IL, interleucina; LDLR, receptor de lipoproteínas de baixa densidade; LRP1, receptor de lipoproteínas de baixa densidade-proteína relacionada 1; MMP, metaloproteinases da matriz extracelular; NOX, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase; SRB1, receptor scavenger classe B tipo 1; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial. *p<0,05 vs SHAM, #p<0,05 vs IAM-MTXc.

5. Discussão

Um sumário contendo os principais resultados encontrados no estudo está ilustrado na Figura 12.



Figura 12. Diagrama mostrando os efeitos do tratamento com LDE-MTX e MTXc após 6 semanas da indução do infarto do miocárdio em ratos, comparando IAM-LDE vs SHAM, IAM-MTXc vs SHAM, IAM-LDE-MTX vs IAM-LDE e IAM-MTXc.

Os estudos experimentais e de fisiopatologia cardiovascular têm utilizado quase que exclusivamente do rato e de camundongos para o modelo experimental do IAM. Este modelo experimental já está consolidado na literatura como modelo de IC, desde seus primeiros princípios técnicos inicialmente descritos por Heimburger (1946) e Johns & Olson (1954) até os mais recentes trabalhos (Fishbein et al., 1978; Litwin, 1995; Francis et al.,

2001; Savergnini et al., 2013; Vu et al., 2015), que caracterizam implicações cardíacas e sistêmicas bastante semelhantes às dos humanos.

A facilidade na reprodução e rápido ciclo de vida também aumentam a vantagem do seu uso. Apesar da escolha da linhagem dos animais ser de pouca relevância, a maioria dos trabalhos com ratos utiliza a linhagem Wistar. Outra particularidade metodológica envolvendo animais de experimentação é a escolha do sexo. Estudos têm demonstrado que ratos machos apresentam diferente padrão de remodelamento do VE com maior espessura da parede posterior e maior diâmetro dos miócitos na região remota ao IAM após 6 semanas da indução de IAM, em comparação com fêmeas (Fishbeinet al., 1978; Spadaro et al., 1980; Litwin et al., 1994; Gosselin et al., 1998; Litwin et al., 1999;Savergnini et al., 2013). Assim sendo, a maioria dos estudos utilizam ratos machos para reproduzir o modelo de IAM.

A escolha do período de seguimento de 6 semanas após a indução do IAM e o tratamento baseou-se na concepção de que nesse período já se estabelecem as características relativas ao remodelamento cardíaco como, hipertrofia, dilatação e disfunção cardíaca (Litwin et al., 1995; Anand et al., 1997; Wasserstrom et al., 2000; Kanashiro et al., 2002; Sjaastad et al., 2005; Wang et al., 2015). Como nosso objetivo foi estudar o efeito do tratamento proposto sobre o remodelamento cardíaco global, este pareceu-nos um momento adequado.

A disfunção cardíaca em ratos reflete a extensão do infarto produzida pela oclusão coronariana. Depois dos primeiros trabalhos aplicarem o ecocardiograma em ratos submetidos ao IAM, os estudos morfofuncionais cardíacos ganharam a importante possibilidade do acesso *in vivo*, *in situ* e com medidas repetidas para o acompanhamento de doenças cardiovasculares, assim como dos efeitos terapêuticos testados (Baily et al., 1993; Litwin et al., 1994; Burrell et al., 1996; Schwarz et al., 1998; Moisés et al., 2000).

Dentre os animais IAM, selecionamos para este estudo apenas ratos com IAM grande, ou seja, que apresentaram FE menor que 40%, no ecocardiograma realizado 24 horas após a indução do infarto. De acordo com a American Society of Echocardiography (Lang et al., 2005) e critérios de ecocardiograma em ratos pós-IAM (Moisés et al.,2000), o IAM com FE menor que 40% são considerados grandes e apresentam importantes alterações estruturais e funcionais no VE (Sjaastad et al., 2000; Lang et al., 2005).

A opção pelo uso de infartos de grande extensão foi com o intuito de promover um déficit funcional realmente importante. De acordo com descrições prévias (Pfeffer et al., 1979; Fletcher et al., 1981; Pfeffer et al., 1990), a extensão do infarto está fortemente associada com dilatação ventricular, disfunção hemodinâmica e mortalidade. Esse efeito na área de infarto pode ser observado pelo grau de disfunção ventricular e pela taxa de mortalidade observada no decorrer do protocolo.

O ecocardiograma realizado 24 horas após modelo cirúrgico para indução do IAM evidenciou aumento dos diâmetros do VE, indicando dilatação ventricular e aumento dos volumes diastólicos e sistólicos comparando com o grupo SHAM. Além disso, a FE nos 3 grupos infartados estava diminuída quando comparado ao grupo SHAM. Corroborando com nossos dados, diversos autores têm relatado alterações no ecocardiograma após oclusão coronariana em ratos, como disfunção ventricular, ainda na fase aguda pós-IAM (Litwin et al., 1994; Liu et al., 1997; Litwin et al., 1999; Solomon et al., 1999; Moisés et al., 2000; Sjaastad et al., 2000; Burstein et al., 2007; Miranda et al., 2007; Sallinen et al., 2007). De fato, Solomon e colaboradores (1999) mostraram, por avaliações morfofuncionais seriadas por ecocardiograma na fase aguda do IAM em ratos, que há depressão na função cardíaca global e aumento no volume diastólico do VE detectado em IAM grande, após 48 horas da oclusão coronariana. Sallinen (2007) e Miranda e coraboradores (2007) observaram nos animais infartados uma dilatação ventricular já ao fim das primeiras 24 horas.

Sendo assim, a obtenção desses dados basais, antes do início dos tratamentos nos permitiu evidenciar que já havia disfunção sistólica caracterizada por acinesia da parede ântero-septo-apical, com dilatação ventricular. Além disso, possibilitou também examinar a evolução temporal ao fim das seis semanas de tratamento em comparação à avaliação basal.

Após 6 semanas da indução do IAM, o tratamento com LDE-MTX foi capaz de diminuir os diâmetros e volumes sistólico e diastólico aproximadamente nos valores mensurados no grupo SHAM. Em contraste, não houve diminuição desses parâmetros nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc em comparação ao grupo SHAM. Não existe na literatura o efeito do MTX sobre o remodelamento cardíaco pós-IAM, e tão pouco sobre o processo de dilatação ventricular. Contudo, podemos especular que a ausência de expansão do infarto e menor sobrecarga sobre o miocárdio remanescente, observadas no grupo LDE-MTX, podem ter contribuído para prevenção de maiores acréscimos nas dimensões ventriculares.

A massa do VE estava aumentada nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc, mas o grupo tratado com LDE-MTX apresentou habilidade de prevenir esse aumento. Os resultados da massa do VE corroboram com as informações já divulgadas por outros autores que descreveram aumento na massa cardíaca depois de seis semanas de IAM, principalmente nos animais com grandes infartos (Pfeffer et al., 1991; Anand et al., 1997; Gosselin et al., 1998; Wasserstrom et al., 2000; Zimmerman et al., 2001; Sjaastad et al., 2005).

Avaliando a função sistólica, o grupo IAM-LDE-MTX apresentou aumento da FE em 40%, em comparação aos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc nos seguimentos de 24 horas e 6 semanas e em comparação ao IAM-LDE-MTX no seguimento de 24 horas. Enquanto que no grupo tratado com MTXc não houve nenhum efeito na função sistólica. Quanto à função diastólica, apesar do aumento da razão E/A indicar padrão restritivo caracteristico do IAM, os animais que sofreram a indução do IAM não foram diferentes do grupo SHAM tanto no seguimento de 24 horas e 6 semanas.

Em resumo, podemos afirmar que o tratamento com LDE-MTX promoveu a melhora da função sistólica, diminuição dos volumes, diâmetros sistólicos e diastólicos, prevenção do aumento da massa do VE, que pode ser atribuído a redução do tamanho do IAM ou aos efeitos na área remota ao IAM.

A mortalidade nas primeiras 24 horas seguintes à oclusão coronariana foi de 32%, número equivalente ao da literatura utilizando outras linhagens de ratos (Opitz et al., 1995; Leenen & Yuan, 2001; Zhu et al.,

46

2006). De fato, parece haver um consenso que, nas primeiras horas seguintes à oclusão coronariana, ocorre uma série de eventos arrítmicos, principalmente taquicardia ventricular e fibrilação ventricular, concentradas em dois momentos críticos: entre o pós-cirúrgico imediato e os 30 minutos; e entre os 90 minutos e 9 horas pós-oclusão arterial. É descrito que após estes dois momentos geralmente ocorrem um "silêncio" nos episódios de arritmias letais que se perduram pelos primeiros 2 ou 3 dias (Opitz et al., 1995).

Após o início do tratamento, a porcentagem de mortalidade foi de 14%, 35% e 11% nos grupos IAM-LDE, IAM-MTXc e IAM-LDE-MTX, respectivamente. Aparentemente, as mortes dos ratos, especialmente na 5° semana, foram em decorrência de IC e edema pulmonar (Flumignan et al., 2006).

Quanto à toxicidade, assim como nos estudos que também avaliaram a associação de outros quimioterápicos à LDE, os ratos toleraram bem o tratamento, não apresentando efeitos colaterais na dose administrada, quando avaliados pesos corporais, hemograma, enzimas hepáticas e perfil lipídico (Dorlhiac-Llacer et al., 2001; Valduga et al., 2003; Teixeira et al., 2004; Rodrigues et al., 2005; LoPrete et al., 2006; Bulgarelli et al, 2013).

O peso relativo do coração dos animais tratados com LDE-MTX foi menor comparado com o grupo IAM-LDE, confirmando os resultados apresentados de menor hipertrofia dos miócitos pela análise histomorfométrica. Ademais, houve aumento significante no peso relativo dos pulmões do grupo IAM-LDE quando comparado ao SHAM. O edema pulmonar, caracterizado pelo acúmulo anormal de líquido e consequente aumento do peso do órgão, geralmente ocorre em consequência da disfunção do VE (Francis et al., 2001; Saito et al., 2002; Yamamoto et al, 2012). Como o peso relativo dos pulmões foi menor no grupo IAM-LDE-MTX, pode-se sugerir que o tratamento com LDE-MTX teve a habilidade de melhorar a função do VE e, consequentemente, preveniu que ocorresse edema pulmonar.

Como descrito anteriormente, a isquemia miocárdica resultando do IAM induz um processo fisiopatológico, incluindo déficit de oxigênio, hipertrofia cardíaca, morte celular, inflamação e fibrose miocárdica. Por isso, as alterações morfológicas específicas do remodelamento cardíaco pós-IAM foram avaliadas por meio de diversas metodologias no presente trabalho.

Os animais do grupo IAM-LDE apresentaram tamanho de infarto de 31%, enquanto que os animais tratados com MTXc e LDE-MTX apresentaram tamanho de infarto de 18% e 9%, respectivamente. Vale ressaltar que o grupo IAM-LDE-MTX mostrou menor extensão do infarto, comparando aos animais do grupo SHAM e IAM-LDE. Alguns autores consideram infartos menores que 30% como pequeno (Fletcher et al., 1981; Anversa et al., 1986).

Após a morte celular no miocárdio infartado, há perda de tecido contrátil, hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos e fibrose reparativa, contribuindo para a diminuição da complacência cardíaca (Swynghedauw, 1999). O aumento da porção infartada nos animais sem tratamento deve ter ocorrido, principalmente, nos primeiros dias, e pode ser entendido pelo conceito de expansão do infarto (Hutchins & Bulkley, 1978). Após o infarto, ocorrem estiramento e aumento da região infartada, não mais por necrose adicional, mas sim, por apoptose, rearranjo e deslizamento do tecido necrótico friável, que se iniciam agudamente e podem persistir até a completa resolução da cicatrização (Weisman & Healy, 1987; Olivetti et al., 1990; Swynghedauw, 1999; Opie et al., 2006). Este processo é parte integrante do remodelamento agudo no pós-infarto (Swynghedauw, 1999; Opie et al., 2006)

Levando em consideração que a limpeza dos debrís celulares pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos é fundamental na cicatrização do infarto, no entanto, a modulação desta resposta inflamatória é importante para prevenir excessiva degradação tecidual levando à expansão do infarto e IC (Kempf et al., 2012). Alguns estudos demonstram que a limitação do tamanho do infarto é uma importante estratégia para controlar a IC (Resnekov, 1977; Geltman, 1979). Sendo assim, os efeitos da limitação do infarto de diversos fármacos com ações anti-inflamatórias foram testados na tentativa de encontrar tratamentos eficazes para o IAM (Madias et al., 1982; Scheuer et al., 1997; Kempf et al, 2012).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que o tratamento com LDE-MTX evitou o aumento da área infartada, possivelmente devido aos efeitos sobre a área remota ao IAM. Essa prevenção do aumento da área infartada pode ter relação com a liberação para o meio extracelular de adenosina por meio do acúmulo da AICAR, promovida pelo MTX. Hori e colaboradores (1994) reportaram que a presença de AICAR no miocárdio e que a liberação aumentada de adenosina pode limitar o tamanho do infarto. Além disso, o tratamento com LDE-MTX teve efeito positivo na região remota ao IAM consequentemente evitando o aumento da região infartada. Ainda assim, no tratamento com LDE-MTX, a restrição na expansão do IAM repercutiu positivamente sobre a função cardíaca global, como demostrado por outros autores (Jin et al., 2002; Ahmet et al., 2008).

Outro processo importante analisado no presente estudo foi a necrose na área remota ao IAM. A região SE é mais vulnerável do que a região INT pela redução da perfusão e hipóxia, sendo mais susceptível a inflamação, fibrose, estresse oxidativo e morte celular (de Carvalho Frimm et al., 2003; Toyota et al., 2005). Todavia, pouco se sabe a respeito das consequências sobre o tecido remoto ao infarto, por isso, é importante destacar a metodologia utilizada no nosso estudo avaliando as duas regiões, INT que também tem a sua importância no processo pós-IAM como explicado anteriormente e a região SE. Sendo assim, o tratamento com LDE-MTX reduziu a necrose em ambas as áreas, principalmente na região SE. Este é um resultado importante que destaca as propriedades farmacológicas de um novo tratamento.

Alguns estudos clínicos demonstram que pacientes após o IAM com IC expressam excessivamente mediadores inflamatórios no plasma podendo levar a progressão da IC. O tratamento com LDE-MTX reduziu o número de células inflamatórias da região remota ao IAM, tanto na região INT quanto na região SE. Porém, esses efeitos não foram atribuídos ao grupo tratado com MTX comercial. Deste modo, o efeito do tratamento com LDE-MTX no processo inflamatório pode oferecer percepções mecanísticas importantes.

Após o IAM, o tecido cardíaco tem a capacidade de secretar uma grande quantidade de TNF- α e outros fatores inflamatórios, o que pode

causar alterações na estrutura e função nos miócitos e agravamento da hipóxia pornativação de células T citotóxicas (Kong et al, 2011). Foi observado que TNF-α tem a capacidade de diminuir a contratilidade dos miócitos (Finkel et al., 1992) e induzir a hipertrofia dos cardiomiócitos (Yokoyama et al., 1997), apoptose (Ing et al., 1999), necrose (Dorn, 2009) e o remodelamento intersticial (Siwik et al., 2000).

Zhang e colaboradores (2009) sugerem que os efeitos antiinflamatórios do MTX podem resultar na melhora do remodelamento e função cardíaca em ratos com miocardite, pela diminuição dos níveis plasmáticos de TNF-a. A partir disso, vale ressaltar que o tratamento com LDE-MTX promoveu redução na expressão gênica de TNF-a de 50% quando comparado com os grupos SHAM e 45% quando comparado ao grupo IAM-MTXc. Os resultados de redução do infiltrado inflamatório no grupo IAM-LDE-MTX, que pode ter ocorrido pelo aumento dos níveis de adenosina, corroboraram com alguns estudos que demonstram que o MTX promove uma redução da adesão neutrofílica e dos leucócitos no exsudato por meio do aumento de adenosina (Cronstein et al., 1991 e 1993; Cronstein, 2010). Além disso, alguns estudos indicam que o aumento dos níveis de adenosina no IAM está envolvido na redução de hipóxia, no tamanho do infarto, morte celular, inflamação, hipertrofia cardíaca e fibrose miocárdica (Hori et al., 1994; Kis et al., 2003; Asanuma et al., 2004; Toufektsian et al., 2006; Wakeno et al., 2006; Ge et al., 2010).

Os animais tratados com LDE-MTX apresentaram menor hipertrofia dos miócitos na região remota ao IAM comparando com os outros animais que foram submetidos ao IAM. Após o período de 4 a 6 semanas de infarto em ratos, já se identifica hipertrofia dos cardiomiócitos da zona de transição (Olivetti et al., 1986), como também observada em nosso estudo nos grupos infartados. Nossos dados sugerem que o tratamento com LDE-MTX foi capaz de abrandar o aparecimento da hipertrofia cardíaca, provavelmente por prevenir a extensão do IAM, o processo inflamatório e melhorar a função do VE infartado.

O remodelamento, além de cursar com a hipertrofia dos cardiomiócitos, promove alterações em todos os componentes no tecido

cardíaco, inclusive, com maior deposição de colágeno na região remota ao IAM (Swynghedauw, 1999). Após as 6 semanas de oclusão, evidenciamos aumento significativo da fibrose nas regiões INT e SE, principalmente nos grupos IAM-LDE e IAM-MTXc no miocárdio remoto ao infarto, o que está de acordo com a maioria dos estudos que demonstraram aumento da síntese e deposição de colágeno pós-IAM em ratos (Cleutjens et al., 1995; Zimmerman et al., 2001; Jin et al., 2002; Prabhu et al., 2016).

A fisiopatologia da fibrose miocárdica ocorre devido o aumento na relação entre MMP/inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) que está associado ao maior grau de dilatação e disfunção ventricular (Spinale, 2007). Por outro lado, da mesma forma que ocorre o aumento na quantidade das TIMPs, o TGF-β1 superexpresso participa do aumento de fibrose, estimulando a proliferação de fibroblastos, promovendo a deposição e inibindo a degradação de colágeno (Lijnen et al., 2000; Spinale, 2007). Como o acúmulo descontrolado da matriz extracelular por proteínas estruturais como o colágeno pode comprometer a elasticidade do tecido miocárdico, o colágeno é intensamente degradado na região infartada (Van Kerckhoven et al., 2000; Wu et al., 2000). Sendo assim, o excesso de colágeno em consequência ao progresso das alterações cardíacas contribui para o déficit da contratilidade e do relaxamento miocárdico, além de favorecer a disfunção diastólica e a progressão para a IC (Leite et al., 1995; Milanez et al., 1997; Mill et al., 2003).

Neste cenário, foi observado que o tratamento com LDE-MTX diminuiu a fibrose nas regiões SE e INT, como indicado na redução da fração de volume de colágeno por histomorfomometria na região remota ao IAM. Ainda assim, vale ressaltar que o tratamento com LDE-MTX promoveu uma redução na expressão gênica do Col I (68%) e MMP-2 (57%), marcadores de fibrose, quando comparado com o grupo IAM-MTXc. Embora não tenhamos investigado os mecanismos pelos quais a terapia com LDE-MTX possa ter agido em favor da menor deposição de colágeno no INT e SE, sugerimos um efeito direto do MTX na produção dos principais componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos, como observado por Nabai e colaboradores (2015) em cepas de fibroblastos em

51

tecido de cicatriz hipertrófica. A redução do colágeno observada com o tratamento com LDE-MTX pode ser explicada também pela regulação no processo do remodelamento cardíaco, como diminuição do processo inflamatório e, consequentemente, redução no processo de fibrose cardíaca (Frangogiannis, 2014).

Assim como foi demonstrado que a adenosina desempenha um papel chave na regeneração de tecidos e processo de fibrose (Chan, 2010), o estímulo do receptor de adenosina A2B pode suprimir a produção de colágeno pelos fibroblastos na região cardíaca (Dubeyet al., 1998). Estes resultados são coerentes com a observação de que a estimulação de receptores A2B previne o remodelamento cardíaco e protege contra as elevações do volume de colágeno cardíaco e da fibrose cardíaca após a indução de IAM em ratos Wistar, consequentemente melhora da função cardíaca (Chan &Cronstein, 2002; Wakeno et al., 2006). Sendo assim, no presente estudo, sugere-se que o mecanismo para a menor deposição de colágeno em miocárdio remanescente de animais tratados com LDE-MTX deve-se também ao acúmulo de adenosina.

Os efeitos atribuídos pelo tratamento com LDE-MTX para a melhora da função cardíaca que não foram observados pelo grupo tratado com MTX comercial podem ser explicados pelo fato de que o MTX associado à nanopartícula LDE teve sua ação farmacológica potencializada pela capacidade da LDE de se concentrar em processos inflamatórios e proliferativos, promovendo assim um tratamento mais efetivo pelo direcionamento a sítios específicos sem nenhuma toxicidade; efeitos estes que não podem ser atribuídos à droga comercial.

O controle do remodelamento cardíaco principalmente do processo inflamatório na área remota ao infarto e a prevenção da extensão da área infartada representam uma importante estratégia para a manutenção da função ventricular. Estes resultados indicam que o tratamento com LDE-MTX pode ser um candidato para futuros ensaios clínicos.

52

6. Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que o tratamento com LDE-MTX, além de não causar toxicidade, promoveu a melhora da função sistólica do VE, a redução do tamanho do infarto e dos efeitos prejudiciais do remodelamento cardíaco. Esta notável melhora na condição pós-IAM indica que o tratamento LDE-MTX pode ser um forte candidato para futuros ensaios clínicos.

7. Referências

Abbate A, Narula J. Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. *Heart Fail Clin.* Jan;8(1):79-86;2012.

Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, Woo AY-H, Morrell C, Poosala S, Xiao R-p, Lakatta EG, TalanMI. Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with β -2adrenoreceptor (AR) agonist and β -1 AR blocker in dilated cardiomyopathy post myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. 325(2):491-99;2008.

Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahash AJC, Gupta S, John R, Popescu F, Chandrashekhar Y. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart withsystolic dysfunction. *Circulation*. 96(11):3974-84;1997.

Anversa P,Beghi C,Kikkawa Y,Olivetti G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res.*Jan;58(1):26-37;1986.

Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. Review. *Circ J.* 77:580-7;2013.

Aro AL, ChughSS. Clinical diagnosis of electrical versus anatomic left ventricularhypertrophy: prognostic and therapeutic implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol*.9(4).pii:e003629, Apr;2016.

Asanuma H, Sanada S, Ogai A, Minamino T, Takashima S, Asakura M, Ogita H, Shinozaki Y, Mori H, Node K, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Methotrexate and MX-68, a new derivative of methotrexate, limit infarct size via adenosine-dependent mechanisms in canine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 43(4):574-9;2004.

Ashrafi R,Hussain H, Brisk R, Boardman L, Clive Weston. Clinical disease registries in acute myocardial infarction. *World J Cardiol.* 26;6(6):415-23;2014.

AslibekyanS, Sha J, Redden DT, Moreland LW, O'Dell JR, Curtis JR, Mikuls TR, Reynolds RJ, Danila MI, Bridges SL Jr. Gene-body mass index interactions are associated with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis. *Ann RheumDis.* 73(4):785-6;2014.

Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 97(1):178-82;2005.

Baily RG, Lehman JC, Gubin SS, Musch TI. Non-invasive assessment of ventricular damagein rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 27(5):851-55;1993.

Baldi A, Abbate A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A, Dobrina A, Rossiello R, Silvestri F, Baldi F, Di Sciascio G. Apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 34(2):165-74;2002.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 128(1):191-227;2010.

Blankesteijn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutiens JP, DaemenMJ,Smits JF. Dynamic of cardiac wound healing following myocardial infartion: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*.173:75-82;2001.

Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, Cicogna AC. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supravalvar aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol.* 88(2):225-33;2007.

Briaud SA, Ding ZM, Michael LH, Entman ML, Daniel S, Ballantyne CM.. Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectinknockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H60–67;2001.

Bulgarelli A, Leite AC Jr, Dias AA, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27(6):531-9;2013.

Burchfield KS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Ciculation*. 128(4):388-400;2013.

Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am.* 91(4):553-72;2007.

Burrell LM, Chan R, Phillips PA, Calafiore P, Tonkin AM, Johnston CI. Validation of an echocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 23:570-2;1996.

Burstein B, Maguy A, Clement R, Gosselin H, Poulin F, Ethier N, Tardif J-C, Hebert TE,Calderone A, Nattel S. Effects of resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) treatment on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. 323(3):916-232007.

Cannon RO 3rd, Butany JW, McManus BM, Speir E, Kravitz AB, Bolli R, Ferrans VJ. Early degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Cardiol.* 52:390-395;1983.

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.* 38(5):777-86;2005.

Chan ES, Cronstein BN. Adenosine in fibrosis. Mod Rheumatol. Apr;20(2):114-22;2010.

Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 4(4):266-73;2002.

Chen W, Saxena A, Li N, Sun J, Gupta A, Lee DW, Tian Q, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:2598–2608;2012.

Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 43:986–995;2013.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 35(3):569-82;2000.

Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol.* 4;80(11A):15L-25L;1997.

Couto, RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids*. 42(5):411-8;2007.

Cronstein B. How does methotrexate suppress inflammation? Clin Exp Rheumatol. 28(5):S21-3;2010.

Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88(6):2441;1991.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest*. 92(6):2675-82,Dec;1993.

Damås JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T, Tonnessen T, Geiran OR, Aass H, Simonsen S, Christensen G, Froland SS, Attramadal H,Gullestad L, Aukrust P. Myocardial expression of CC- and CXC- chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res.* 47(4):778-87,Sep;2000.

David-Couto R, Dallan LAO, Lisboa LAF, Kawabe LT, Oliveira SA, Maranhão RC. Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. *Atheroscler Suppl.* (2):227-8;2003.

de Carvalho Frimm C, Koike MK, Cúri M. Subendocardial fibrosis in remote myocardium results from reduction of coronary driving pressure during acute infarction in rats. *Arq Bras Cardiol.* 80(5):509-20;2003.

de CarvalhoFrimm C, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart. *J Lab Clin Med*.129(4):439-46;1997.

Deten A,Volz HC, Briest W, Zimmer HG.Differential cytokine expression in myocytes and non-myocytes after myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*. 242(1-2):47-55;2003.

Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhão RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59(1):105-11;2007.

Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhão RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59(1):105-112007.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 34(10):1637-59;1993.

Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*. 28;105(21):2512-7,May;2002.

Distefano G, Sciacaa P. Molecuar pathogenesis of myocardial and new potential therapeutics targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr*. 38:41;2012.

Dorlhiac-Llacer PE, Marquezini MV, Toffoletto O, Carneir RCG, Maranhão RC, Chamone DAF. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelgenous leukemia blast cells. *Braz J Med Biol Res.* 34:1257-63;2001.

DornGW 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res*.15;81(3):465-73,Feb;2009.

Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Hypertension*. 31(4):943–8;1998.

EtohT, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, Baicu S, Mukherjee R, Manhaini M, Spinale FG. Myocardial and insterstitial matrix metalloproteinases activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(3):H987-94;2001.

Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol.* 40:1199–204;2002.

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 17;257(5068):387-9,Jul;1992.

Fishbein M, Maclean D, Maroko P. Experimental myocardial infarction in the rat: Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* 90(1):57-70;1978.

Fletcher P, Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volumerelations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res.* 49(3):618-261981.

Flumignan RLG, Kanashiro RM, Saraiva RM, Portes LA, Antonio EL, Ishigai MMS, Tucci PJF. Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously. *Braz J Med Biol Res.* 39:1323-28;2006.

Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.281(5):R1734-45,Nov;2001.

Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 11(5):255-65;2014.

Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev.* 16:13-21;2011.

Ge ZD,Van Der Hoeven D,Maas JE,Wan TC,Auchampach JA. A(3) adenosine receptor activation during reperfusion reduces infarct size through actions on bone marrow-derived cells. *J Mol Cell Cardiol*.49(2):280-6,Aug;2010.

Geltman EM, Ehsani AA, Campbell MK, et al. The influence of location and extent of myocardial infarction on long-term ventricular dysrhythmia and mortality. *Circulation*. 60:805–814;1979.

Goldman, S, Raya, T.E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail*. 1(2):169-177;1995.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci.* 76(1):333-7;1979.

Gong K, Zhang Z, Sun X, et al. The nonspecific anti-inflammatory therapy with methotrexate for patients with chronic heart failure.*Am Heart* J.151(1):62–68;2006.

Gong K, Zhang Z, Sun X, Zhang X, Li A, Yan J, Luo Q, Gao Y, Feng Y. The nonspecific anti-inflammatory therapy with methotrexate for patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 151(1):62-8;2006.

González A, Ravassa S, Beaumont J, López B, DíezJ. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 25; 58(18):1833-43,Oct;2011.

Gosselin H, Qi X, Rouleau J. Correlation between cardiac remodelling, function, andmyocardial contractility in rat hearts 5 weeks after myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol.* 76(1):53-62;1998.

Guido MC, de Carvalho FrimmC, Koike MK, Cordeiro FF, Moretti AI, Godoy LC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(11):1165-72;2007.

Guido MC, Koike MK, Frimm C de C. Low coronary perfusion pressure is associated with endocardial fibrosis in a rat model of volume overload cardiac hypertrophy. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 59(5):228-35;2004.

Hammerman H, Schoen FJ, Braunwald E, Kloner RA. Drug-induced expansion of infarct: morphologic and functional correlations. *Circulation*. 69: 611-7;1984.

Hammerman H, Kloner RA, Schoen FJ, Brown EJ Jr, Hale S, Braunwald E. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 67(6):1290-5;1983.

Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*. 296(3):803-9;1993.

Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 15;82(11):1111-29;1998.

Heimburger R. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg.* 52:677-89,Jun;1946.

Heusch G,Libby P,Gersh B,Yellon D,Böhm M,Lopaschuk G,Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*.31;383(9932):1933-43,May;2014.

Hirata RDC, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1437(1):53-62;1999.

Ho YK, Smith RG,Brown MS,Goldstein JL.Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 52(6)1099-114;1978.

Hockman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. 65: 1446-50;1982.

Hori M, Kitakaze M, Takashima S, et al. AICA riboside improves myocardial ischemia in coronary microembolization in dogs. *Am J Physiol*. 267:H1483–H1495;1994.

Hungria VT, Latrilha MC,Rodrigues DG,Bydlowski SP,Chiattone CS,Maranhão RC. Metabolism of a cholesterol rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53(1):51-60;2004.

Hutchins G, Bulkley B. Infarct expansion versus extension: Two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 41(7):1127-32;1978.

Ing DJ,Zang J,Dzau VJ,Webster KA,Bishopric NH. Modulation of cytokineinduced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res*.8-22;84(1):21-33,Jan;1999.

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 99(11):1492-8;1999.

Jensen LT, Hørslev-Petersen K, Toft P, Bentsen KD, Grande P, Simonsen EE, Lorenzen I. Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation*. 81(1):52-7;1990.

Jin H, Yang R, Lu H, Ogasawara AK, Li W, Ryan A, Peale F, Paoni NF. Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res.* 12(4):208-15;2002.

Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 140(5):675-82;1954.

Kanashiro R, Nozawa E, Murad N, Gerola L, Moisés V, Tucci P. Myocardial infarction scarplication in the rat: Cardiac mechanics in an animal model for surgical procedures. *Ann Thorac Surg.* 73(5):1507-13;2002.

Kelley ST, Malekan R, Gorman JH 3rd, Jackson BM, Gorman RC, Suzuki Y, Plappert T, Bogen DK, Sutton MG, Edmunds LH Jr. Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. *Circulation*. 99(1):135-42;1999.

KempfT,Zarbock A,Vestweber D,Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities inmyocardialinfarct healing. *J Mol Med (Berl)*.90(4):361-9,Apr;2012. Khan OA,Blann AD, Payne MJ, Middleton MR, Protheroe AS, Talbot DC, Taylor M, Kirichek O, Han C, Patil M, Harris AL. Continuous low-dose cyclophosphamide and methotrexate combined with celecoxib for patients with advanced cancer. *Br J Cancer*. 104(12):1822-7;2011.

Khan R,Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. 118(1):10-24,May;2006.

KisA,Baxter GF,Yellon DM. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, anadenosineA1/A2A receptor agonist: role of A2A receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther*.17(5-6):415-25,Sep-Nov;2003.

Koike MK, Frimm C de C, Cúri M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. *Int J ExpPathol.* 88(4):279-90;2007.

Kong SS, Liu JJ, Hwang TC, Yu XJ, Lu Y,Zang WJ.Tumour necrosis factor-α and its receptors in the beneficial effects of vagal stimulation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 38: 300-306;2011.

Kubota T, Miyagishima M, Alvarez RJ, Kormos R, Rosenblum WD, Demetris AJ, Semigran MJ, Dec GW, Holubkov R, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, McNamaraDM. Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-on set and end-stage congestive heart failure. J Heart Lung Transplant. 19(9):819-24;2000.

Kucharz E, Drozdz M, Cerazy B, Jendryczko A. Collagen metabolism in patients with myocardial infarction. *Cor Vasa*. 24:339-341;1982.

Kuhn A, Ruland V, Patsinakidis N, Luger TA. Use of methotrexate in patients with psoriasis. *Clin Exp Rheumatol.* 28(5):S138-44;2010.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA,Picard MH,Roman MJ,Seward J,Shanewise JS,Solomon SD,Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines Standards and Committee;European Association of Echocardiography. Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee: European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr. 18(12):1440-63;2005.

Leenen FHH, Yuan B. Mortality after coronary artery occlusion in different models of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension*. 37(2):209-15;2001.

Leite Ac Jr, Solano Tv, Tavares Er, Maranhão Rc. Use of combined chemotherapy with etoposide and methotrexate, both associated to lipid nanoemulsions for atherosclerosis treatment in cholesterol-fed rabbits. Cardiovasc Drugs Ther. 29(1):15-22,Feb;2015.

Leite CM, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Changes in collagen content in the residual myocardium surviving after infarction in rats. Influence of propranolol or hydralazine therapy. *Arch Med Res*.26: 79-84;1995.

Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 89(1):345-54;1994.

Litwin SE, Katz SE, Litwin CM, Morgan JP, Douglas PS. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*. 91(3):173-83;1999.

Litwin SE. The rat model of postinfarction heart failure. *Heart Failure*.11(5):182-95;1995.

Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 272(2):H722-27;1997.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Method*. Methods. 25(4):402-8;2001.

LoPrete A, Maria DA, Rodrigues DG, Valduga CJ,Ibañez OC,Maranhão RC. Evaluation in melanoma bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. *J Pharm Pharmacol.* 58(6):801-8;2006.

Lundberg B. The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllotoxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture. *Int J Pharm*.109:73;1934.

Madias JE, Hood WB Jr. Effects of methylprednisolone on the ischemic damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 65:1106–1113;1982.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling lowdensity lipoprotein. *Lipids*. 28(8):691-6;1993.

Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*. 32(6):627-33;1997.

Maranhão RC, Graziani SR,Yamaguchi N,Melo RF,Latrilha MC,Rodrigues DG,Couto RD,Schreier S,Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patiens. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49:487;2002.

Maranhão, RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*. 197(2):959-66;2008.

Mello SB, Tavares ER, Guido MC, Bonfá E, Maranhão RC. Anti-inflammatory effects of intravenous methotrexate associated with lipid nanoemulsions on antigen-induced arthritis. *Clinics.* 71(1):54-8, Jan; 2016.

Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, Mozaffarian D. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. Am J Cardiol. 1;108(9):1362-70,Nov;2011.

Milanez MC, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Effects of captopril on interstitial collagen in the myocardium after infarction in rats. *J Card Fail*. 3:189-197;1997.

Mill JG, Milanez MC, Resende MM, Gomes MGS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Experim Pharmacol Physiol.* 30: 739-744;2003.

Mill JG,Stefanon I,dos Santos L,BaldoMP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progresison for heart failure. *Braz J Med Biol Res*.44(9):890-8,Sep;2011.

Miranda A, Costa-e-Sousa RH, Werneck-de-Castro JPS, Mattos EC, Olivares EL, Ribeiro VP, Silva MG, Goldenberg RCS, Campos-de-Carvalho

AC. Time course of echocardiographic and electrocardiographic parameters in myocardial infarct in rats. *An Acad Bras Ciênc*. 79(639-48); 2007.

Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos F^o O, Andrade JLD, Carvalho ACC, Tucci PJF. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 75:131-36;2000.

Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*. 6:2285-95;2011.

Mozaffarian D,Benjamin EJ,Go AS,Arnett DK,Blaha MJ,Cushman M,Das JP,Fullerton SR,de Ferranti S,Després HJ,Howard VJ,Huffman MD, IsasiCR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S,Mackey RH,Magid DJ,McGuire DK,Mohler ER 3rd,Moy CS,Muntner P,MussolinoME,Nasir K,Neumar RW,Nichol G,Palaniappan L,Pandey DK,Reeves MJ,Rodriguez CJ,Rosamond W,Sorlie PD,Stein J,Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB; American Heart Association **Statistics** Committee andStrokeStatistics Subcommittee. HeartDiseaseandStrokeStatistics-2016Update: Report А from the AmericanHeartAssociation. 2016.

Nabai L, Kilani RT, Aminuddin F, Li Y, Ghahary A. Methotrexate modulates the expression of MMP-1 and type 1 collagen in dermal fibroblast. Mol Cell Biochem. 409(1-2):213-24,Nov;2015.

Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alen J, Horslev-Petersen K, Luukkainen RK,Combe B, Burmester GR, Devlin J, Ferraccioli G, Morelli A, Hoekstra M, Majdan M, Sadkiewicz S, Belmonte M, Holmqvist AC, Choy E, Tunc R, Dimic A, Bergman M, Toloza S, Pincus T; QUEST-RA Group. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther.* 10(2):R30,2008.

Olivetti G, Capasso J, Sonnenblick E, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 67(1):23-34;1990.

Olivetti G, Ricci R, Beghi C, Guideri G, Anversa P. Response of the border zone to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol.* 125(3):476-83;1986.

Omerovic E, Bollano E, Basetti M, Kujacic V, Waagstein L, Hjalmarson A, Waagstein F, Soussi B. Bioenergetic, functional and morphological consequences of postinfarct cardiac remodeling in the rat. J Mol Cell Cardiol. 31(9):1685-95;1999.

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 98(2):149-56;1998.

Onodera H,Matsunaga T,Tamura Y,Maeda N,Higuma T,Sasaki S,Mori Y,Yoshimachi F,Ishizaka H,Hanada H,Osanai T,Okumura K. Enalapril supress ventricular remodeling more effectively than losartan in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*.150(4):689, Oct;2005.

Opie LH,Commerford PJ,GPrechersh BJ,Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*.28;367(9507):356-67,Jan;2006.

Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary arteryocclusion in the rat: Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation*. 92(2):253-61;1995.

Patel V, Wang Y, MacDonald JK, Chande N. Methotrexate for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 26(8):CD006884;2014.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 260(5):H1406-14;1991.

Pfeffer Ma, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.*CircRes.* 81(4):1161-72;1990.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats.*Circ Res*. 44(4):503-12;1979.

Pignatello R, Spampinato G, Sorrenti V, Di Giacomo C, Vicari L, McGuire JJ, Russell CA, Puglisi G, Toth I. Lipophilic methotrexate conjugates with antitumor activity. *Eur J Pharm Science*. 10(3): 237–245;2000.

Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol.* 57(5):624-30;2006.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. N Engl J Med. 359:473-81;2008.

Popkova TV, Novikova DS, Gasparyan AY, Nasonov EL. Cardiovascular effects of methotrexate in rheumatoid arthritis revisited. Curr Med Chem. 22(16):1903-10;2015.

Prabhu SD, FrangogiannisNG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 24;119(1):91-112, Jun;2016.

Prabhu P,Shetty R, Koland M, Vijayanarayana K, Vijayalakshmi KK, Nairy MH, Nisha GS. Investigation of nano lipid vesiscles of methotrexate for antirheumatoid activity. *Int J Nanomedicine*. 7:177-86;2012.

Prech M, Marszałek A, Schröder J, Filas V, Lesiak M, Jemielity M, Araszkiewicz A, Grajek S. Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 1;105(9):1240-5,May;2010.

Puig L. Methotrexate: new therapeutic approaches. *Actas Dermosifiliogr*. 105(6):583-9,Jul-Aug;2014.

Resnekov L. The intermediate coronary care unit. A stage in continued coronary care. *Br Heart J*. 39:357-362;1977.

Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis.* 65(4):465-70,Apr;2006.

Risos L, Berkenboom G. Revascularization versus medical treatments in stable coronary artery disease: predicting the future of novel drug therapies for stable angina. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63(3):213-7;2014.

Ritschel VN, Seljeflot I, Arnesen H, Halvorsen S, Eritsland J, Fagerland MW, Andersen GØ. Circulating Levels of IL-6 Receptor and gp130 and Long-Term

Clinical Outcomes in ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 13;5(6)pii:e003014,Jun;2016.

Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ,Couto RD,Ibañez OC,Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 55(6):565-76;2005.

Rohde LE, Aikawa M,Cheng GC,Sukhova G,Solomon SD,Libby P,Pfeffer J,Pfeffer MA,Lee RT. Echocardiographic-derived left ventricular end-systolic regional wall stress and matrix remodeling after experimental myocardial infarction. *J Am CollCardiol*. 33(3):835-42;1999.

Rohde LE, Aikawa M,Cheng GC,Sukhova G,Solomon SD,Libby P,Pfeffer J,Pfeffer MA,Lee RT. Echocardiographic-derived left ventricular end-systolic regional wall stress and matrix remodeling after experimental myocardial infarction. *J Am CollCardiol.* 33(3):835-42;1999.

Roman MJ, Salmon JE. Cardiovascular manifestations of rheumatologic diseases. Circulation. 116:2346–2355;2007.

Ryoke T, Gu Y, Ikeda Y, Martone ME, Oh SS, Jeon ES, Knowlton KU, Ross J Jr. Apoptosis and oncosis in the early progression of left ventricular dysfunction in the cardiomyopathic hamster. *Basic Res Cardiol*. 97(1):65-75;2002.

Saito T, Hu F, Tayara L, Fahas L, Shennib H, Giaid A. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283(1):H339-45;2002.

Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr*. 6(1):41-6;2005. Sallinen P, Mänttäri S, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H, Saarela S. Time course of changes in the expression of DHPR, RyR2, and SERCA2 after myocardial infarctionin the rat left ventricle. *Mol Cell Biochem*. 303(1):97-103;2007.

Savergnini SQ, Ianzer D, Carvalho MB, Ferreira AJ, Silva GA, Marques FD, Peluso AA, Beiman M, Cojocaru G, Cohen Y, Almeida AP, Rotman G, Santos RA. The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PLoS One*. 8(3):e57757;2013.

Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res.* 167(1):152-66, Jan; 2016.

Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Belló-Klein A. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 341(1-2):1-8,Aug;2010.

Scheuer DA, Mifflin SW. Chronic corticosterone treatment increases myocardial infarct size in rats with ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 272:R2017–R2024,1997.

Shiozaki AA, Senra T, Morikawa AT, Deus DF, Paladino-Filho AT, Pinto IM, Maranhão RC. Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles. *Clinics*. 71(8):435-9, Aug;2016.

Schoemaker RG, Debets JJ, Struyker-Boudier HA, Smits JF. Delayed but not immediate captopril therapy improves cardiac function in conscious rats, following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 23(2):187-97;1991.

Schwarz ER, Pollick C, Meehan WP, Kloner RA. Evaluation of cardiac structures andfunction in small experimental animals: Transthoracic, transesophageal, and intraventricular echocardiography to assess contractile function in rat heart. *Basic Res Cardiol.* 93(6):477-86;1998.

Scott DL. Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther*. 91(1):30-43;2012.

Selye E, Bajunsj E, Grasso S, Mendell P. Simple techiniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*.11:398-407;1960.

Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 63(16):1593–1603;2014.

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 86(12):1259-65;2000.

Sjaastad I, Birkeland J, Ferrier G, Howlett S, Skomedal T, Bjørnerheim R, Wasserstrom J, Sejersted O. Defective excitation-contraction coupling in hearts of rats with congestive heart failure. *Acta Physiol Scand.* 184(1):45-58;2005.

Sjaastad I,Sejersted OM,Ilebekk A,Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*.89(4):1445-54,Oct;2000.

Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, Weinblatt ME, Avorn J, Setoguchi S, Canning C, Schneeweiss S. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Dis.* 65:1608–1612;2006.

Solomon S, Greaves S, Rayan M, Finn P, Pfeffer M, Pfeffer J. Temporal dissociation of leftventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction inrats. *J Card Fail*. 5(3):213-23;1999.

Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 104(4):179-83;1980.

Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* 87(4):1285-342;2007.

Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*.110(20):3221-8;2004.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 101(25):2981-8;2000.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 79(1):215-62;1999.

Tavares ER, Freitas FR, Diament J, Maranhão RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. *Int J Nanomedicine*. 6:2297-304;2011.

Teixeira RS, Cury R, Maranhão RC. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *J Pharm Pharmacol*. 56(7):909-14;2004.

Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res.* 1;94(2):276-83,May;2012.

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis fator-α and tumor necrosis factor repector in failing human heart. *Circulation.* 15;93(4):704-11;1996.

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis fator-α and tumor necrosis factor repector in failing human heart. *Circulation*. 1996;15;93(4):704-11.

Toufektsian MC, Yang Z, Prasad KM, Overbergh L, Ramos SI, Mathieu C, Linden J, French BA. Stimulation of A2A-adenosine receptors after myocardial infarction suppresses inflammatory activation and attenuates contractile dysfunction in the remote left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.290(4):H1410-8, Apr;2006.

Toyota E, Ogasawara Y, Hiramatsu O, Tachibana H, Kajiya F, Yamamori S, Chilian WM.Dynamics of flow velocities in endocardial and epicardial coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.288(4):H1598-603;2005; Valduga CJ, Fernandes DC, LoPrete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol*. 55(12):1615-22;2003.

VAN DER Bijl P, Delgado V, Bax JJ. QRS remodeling to predict left ventricular reverse remodeling after cardiac resynchronization therapy. *J Cardiovasc Electrophysiol*.27(5):600-1, May; 2016.

Van Kerckhoven R, Kalkman EAJ, Saxena PR, Schoemaker RG. Altered cardiac collagenand associated changes in diastolic function of infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res.* 46(2):316-23;2000.

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrixmetalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal andspatial window. *Cardiovasc Res.* 69: 604-613;2006.

Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, Oñate B, Casaní L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 50: 522-533;2011.

Vu TD, Pal SN, Ti LK, Martinez EC, Rufaihah AJ, Ling LH, Lee CN, Richards AM, Kofidis T. An autologous platelet-rich plasma hydrogel compound restores left ventricular structure, function and ameliorates adverse remodeling in a minimally invasive large animal myocardial restoration model: a translational approach: Vu and Pal "MyocardialRepair: PRP, Hydrogel and Supplements". *Biomaterials*. 45:27-35,Mar;2015.

Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N,Kitakaze M. Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation*. 31;114(18):1923-32,Oct;2006.

Wang XF, Qu XQ, Zhang TT, Zhang JF. Testosterone suppresses ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats following myocardial infarction. *Exp Ther Med.* 9(4):1283-1291,Apr;2015.

Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 102(10):1186-91;2000.

Wasserstrom JA, Holt E, Sjaastad I, Lunde PK, Odegaard A, Sejersted OM. Altered E-Ccoupling in rat ventricular myocytes from failing hearts 6 wk after MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(2):H798-807;2000.

Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC Jr, Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, KorsgaardN, Leier CV, Mendelsohn FA, MotzWH, MulvanyMJ, Bodo ES. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol*. 20(1):3-16;1992.

Weisman HF, Healy B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: Pathophysiologic concepts. *Prog Cardiovasc Dis.* 30(2):73-110;1987.

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 111;(10)1497–1504;2003.

Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*. 72:19-44;2010.

Wu Y, Cazorla O, Labeit D, Labeit S, Granzier H. Changes in titin and collagen underliediastolic stiffness diversity of cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 32(12):2151-62;2000.

Yamamoto T, Takeda S, Sato N, Akutsu K, Mase H, Nakazato K, Mizuno K, Tanaka K. Noninvasive ventilation in pulmonary edema complicating acute myocardial infarction. *Circ J*. 76(11):2586-91;2012

Yokoyama T,Nakano M,Bednarczyk JL,McIntyre BW,Entman M,Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*.4;95(5):1247-52,Mar;1997.

Zhang Z, Zhao P, Li A, Lv X, Gao Y, Sun H, Ding Y, Liu J. Effects of methotrexate on plasma cytokines and cardiac remodeling and function in postmyocarditis rats. *Mediators Inflamm*. 389-720;2009.

Zhu y, Bujo H, Yamazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider WJ, Saito Y. Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation*. 105(15):1830-1836;2002.

Zhu YZ, Chong CL, Chuah SC, Huang SH, Nai HS, Tong HT, Whiteman M, Moore PK.Cardioprotective effects of nitroparacetamol and paracetamol in acute phase ofmyocardial infarction in experimental rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(2):H517-24;2006.

Zimmerman SD, Thomas DP, Velleman SG, Li X, Hansen TR, McCormick RJ. Time courseof collagen and decorin changes in rat cardiac and skeletal muscle post-MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(4):H1816-22;2001.