



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**SILENCIAMENTO GÊNICO DE TGF- β 1 E DETERMINANTES PRECOSES DE
ÁREA DE INFARTO EM MODELO EXPERIMENTAL**

TESE DE DOUTORADO

GIOVANNA GRÜNEWALD VIETTA

Professores Orientadores:

Dra. Nadine Clausell

Dra. Ursula Matte

Porto Alegre, maio de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

SILENCIAMENTO GÊNICO DE TGF- β 1 E DETERMINANTES PRECOSES DE
ÁREA DE INFARTO EM MODELO EXPERIMENTAL

GIOVANNA GRÜNEWALD VIETTA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares para obtenção do título de Doutor em Ciências Cardiovasculares.

Professores Orientadores:

Dra. Nadine Clausell

Dra. Ursula Matte

Porto Alegre, maio de 2012.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Flavio Vietta e Karla Grinewald.
A meu esposo, Marcelo Felix de Castro. À estrela
mais linda do céu, minha avó Zaida Baptista
Nunes. Estas pessoas com muita sabedoria,
discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao
meu lado me encorajando nas horas difíceis e me
aplaudindo nos momentos de glória, sempre me
estimulando a dar grandes passos. Obrigada por
serem meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter forte nos momentos mais difíceis e me permitir ter fé quando todo o resto tinha ido embora.

A minha família, que mesmo de um jeito torto, é meu suporte. Mãe, Papis, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelos sacrifícios que fizeram e, principalmente por terem feito dos meus objetivos os seus. Esta conquista é de vocês!

A minha mãe, meu porto seguro... obrigada pelo exemplo de mulher, de força, de garra... obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando... obrigada por todo carinho, amor e dedicação! Te amo!!!!

Ao meu pai...Papis, tantas cobranças... como ser perfeita... não sou! Obrigada por estar sempre comigo, por ter me feito forte, por não me permitir desistir... obrigada pelo apoio, incentivo, carinho, amor, dedicação. Sabia?!?!?

Ao meu amor, que me pergunta se acabou ou ainda tem pós-doc... porque no TCC foi complicado, no mestrado muito difícil e no doutorado quase impossível de segurar as pontas... meu muito obrigada por estar ao meu lado e apoiar todas as minhas decisões sem cobranças. Marcelo, obrigada por ser um marido dedicado, companheiro, meu amigo de todas as horas. Ah... por enquanto sem pós-doc e com novos planos...

A minha segunda família, Fernanda, Marcelo Brilhante, Sandra, Daniel, Willian, Wolney e Terezinha, agradeço pelo apoio e carinho.

A minha amiga-irmã Julia Poeta e família obrigada por ouvir, dar colo, carinho, estimular, empurrar... obrigada pela infraestrutura oferecida a cada vez que fiquei na tua casa. Sem amigos não somos nada!

A minha "marida" Daiane Silvello e sua família meu obrigada pelo carinho, compreensão, força e principalmente pelo pouso nas várias vezes que "aluguei" um quarto na casa de vocês!

Muito obrigada a todos os meus amigos que compreenderam o momento, e estiveram comigo, dando força e torcendo por mim!

Ao Programa de Pós-graduação em Cardiologia, pela infraestrutura disponível para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos, e ao seu pessoal técnico-administrativo, que, de uma forma ou de outra, acabou por participar deste trabalho. Sirlei... obrigada por tudo!

A minha orientadora Prof^a Dr^a Nadine Clausell agradeço por ter confiado em mim, pela infraestrutura, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade, pela compreensão e apoio que me foi oferecido quando novas oportunidades apareceram na minha vida.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Ursula Matte agradeço pelo aprendizado, pela disponibilidade, pelos conselhos, compreensão e apoio na hora de decidir que caminho seguir. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Aos colegas Michael, Rafael, Luzia, Stéfanie e Fernanda Sperb agradeço pelo tempo dispensado ao "meu projeto". Nunca vou esquecer os momentos vividos na UEA... Sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível.

Aos demais professores/pesquisadores do grupo - Rohde, Kátia, Andréia, Daiane, Nidiane, Carolina, Vanessa, Amanda - meu muito obrigada pelas oportunidades de aprendizado, pelo café, bolinho, companhia, carinho... vocês fazem o trabalho mais leve e divertido!

Aos colegas do CTG que sempre estiveram prontos para ajudar no que fosse preciso agradeço pela amizade, carinho e pelos bons momentos que passamos juntos dividindo a bancada.

Aos amigos da UEA Marta, Fabiola, Eduardo, Rosa e Juliana, agradeço pelo carinho e a todo apoio que deram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionarios do Centro de Pesquisa Experimental, Everaldo, Maria, Jeferson, Patricia, entre tantos outros, obrigada por toda a atenção e carinho.

Aos funcionarios do GPPG, Eliane, Fabiana, Rafael, Rosana, entre outros obrigada pelo apoio e pela disponibilidade em resolver os problemas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS EM PORTUGUÊS.....	07
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	09
Aspectos patogênicos envolvidos no remodelamento ventricular	
Introdução	09
Aspectos Epidemiológicos.....	11
Patogênese e Progressão da Doença.....	12
Remodelamento Ventricular.....	13
O Papel do Colágeno.....	14
Cicatrização Miocárdica.....	17
O Papel do TGF- β na Cicatrização Miocárdica.....	23
Terapia Gênica.....	29
Plasmídeo.....	30
RNA de interferência (RNAi)	31
Referencias.....	35
2. RACIONAL DOS ESTUDOS.....	44
3. HIPÓTESES.....	45
3.1. Hipótese do Estudo 1.....	45
3.2. Hipótese do Estudo 2.....	45
4. OBJETIVOS.....	45
4.1. Objetivos do Estudo 1.....	45
4.2. Objetivos do Estudo 2.....	46
5. ARTIGO 1.....	48
Abstract.....	49
Introduction.....	51
Methods.....	53
Results.....	59
Discussion.....	64
References.....	69
6. ARTIGO 2.....	74
Abstract.....	75
Introduction.....	77
Methods.....	79
Results.....	84
Discussion.....	92
References.....	95
7. CONCLUSÕES.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS EM PORTUGUÊS

ANP - peptídeo natriurético atrial

CTGF - fator de crescimento de tecido colágeno

DAC - doença arterial coronariana

DC - débito cardíaco

DCV - doenças cardiovasculares

DNA - ácido desoxirribonucleico

ET - endotelina

FGF - fator de crescimento fibroblástico

IC - insuficiência cardíaca

IL - Interleucina

IM - infarto do miocárdio

MEC - matriz extracelular

miRNA - microRNA

MMP - metaloproteinases de matriz

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa Beta

OMS - organização mundial da saúde

ON - óxido nítrico

PACT - proteína ativadora dependente de proteína quinase

PGF - fator de crescimento plaquetário

RISC - *RNA-Induced Silencing Complex*

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

SD-208 - antagonista do TGF- β 1

shRNA - *short hairpin* RNA

siRNA - *short interfering* RNA

sTbRII - receptor II de TGF- β 1 solúvel

TGF- β - fator de crescimento transformador

TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TRBP - Proteína de ligação ao RNA

VE - ventrículo esquerdo

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

1. Revisão da literatura

Aspectos patogênicos envolvidos no remodelamento ventricular

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) representa um processo crônico e progressivo de remodelamento, podendo ser considerada desfecho de um grande número de doenças cardiovasculares (DCV) como a cardiopatia isquêmica, a miocardiopatia dilatada idiopática e a cardiopatia hipertensiva [1]. Estima-se que as DCV sejam responsáveis por 17,5 milhões de mortes por ano no mundo, sendo uma das causas mais frequentes de morte em países desenvolvidos. No ano de 2007 houve 1.055.507 internações por doenças do aparelho circulatório onde 268.575 foram causadas por IM e acidente vascular cerebral. As DCV representaram cerca de 30% do total de óbitos registrados neste mesmo ano. Estes pacientes requerem cuidados clínicos contínuos, tendo com isto, altos custos para os sistemas de saúde do país [2].

O infarto do miocárdio (IM) resulta em perda de cardiomiócitos por necrose e desencadeia rapidamente um processo reparativo a fim de reconstruir o miocárdio infartado e manter a integridade estrutural do ventrículo. No processo de remodelamento ventricular, o tamanho, forma e função do ventrículo são regulados por fatores mecânicos, neuro-hormonais e genéticos [3]. Esses fatores são traduzidos no interior da célula em alterações bioquímicas que levam à ativação de segundos e terceiros mensageiros (citossólicos e nucleares, respectivamente) que irão agir no núcleo da célula, regulando a transcrição e determinarão o padrão de expressão gênica que

induz à hipertrofia ventricular esquerda [4]. A figura 1 representa as fases da cicatrização e remodelamento cardíaco após IM.

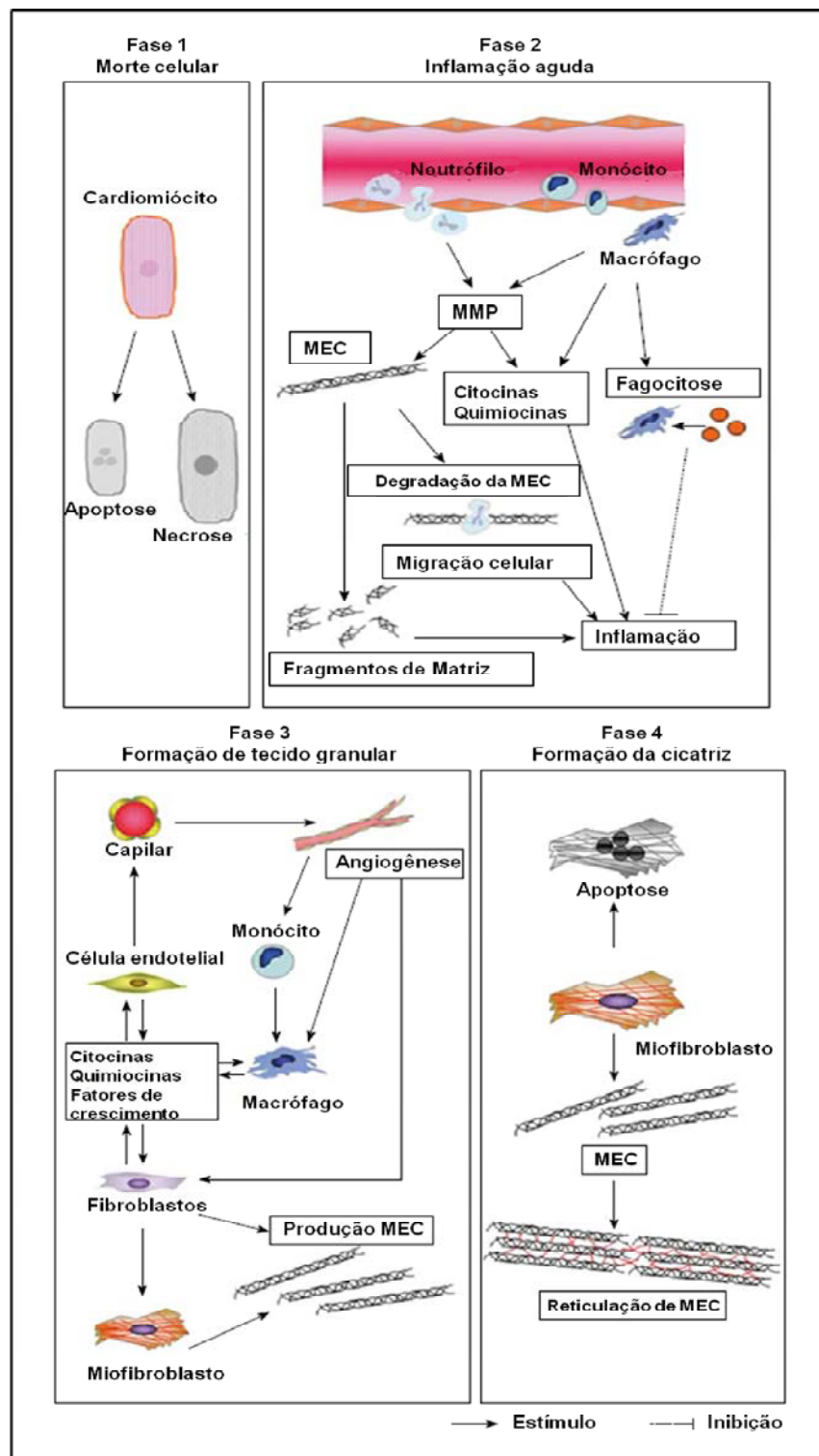


Figura 1. Fases da cicatrização e remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio. MEC = matriz extracelular; MMP = metaloproteínases de matriz; (Adaptado de Matsui *et al.* [5]).

Aspectos Epidemiológicos

As DCV tornaram-se o principal problema de saúde em todo o mundo, ultrapassando o câncer e infecções como a principal causa de morte em muitos países em desenvolvimento [6, 7]. Embora a mortalidade por doença arterial coronariana tenha diminuído devido a avanços nos tratamentos da aterosclerose, hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes [1], as DCV ainda representam 1 em cada 2,7 mortes nos Estados Unidos, traduzindo-se em aproximadamente 2,5 milhões de mortes todos os anos [7]. Além disso, a prevalência dos fatores de risco para DCV, como hipertensão, diabetes tipo II e obesidade, têm aumentado nos últimos anos [8-10].

Num estudo realizado em mais de 300 hospitais, nos Estados Unidos, foram rastreadas 2,5 milhões de internações, onde 496.534 pacientes (19,7%) tiveram IC, como desfecho primário ou secundário com uma média de permanência hospitalar de $8,7 \pm 28,6$ dias e mortalidade intra-hospitalar de 7,1%. Neste estudo, as admissões de pacientes com IC como desfecho primário ou secundário foram associadas com pior prognóstico [11].

Por outro lado, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), pelo menos 20 milhões de pessoas sobrevivem a IM e a acidentes vasculares encefálicos a cada ano, porém, requerem cuidados clínicos contínuos tendo com isto, alto custo para os sistemas de saúde de cada país [2].

Nos Estados Unidos, o custo final da morbidade e perda de produtividade gerado, a partir das DCV, em média foi de 33,6 bilhões de dólares, dados levantados pela *American Heart Association* [12].

No Brasil as DCV são as principais causas de óbito. No ano de 2007 houve 1.055.507 internações por doenças do aparelho circulatório onde 268.575

foram causadas por IM e acidente vascular cerebral. As DCV representaram cerca de 30% do total de óbitos registrados neste mesmo ano. Estima-se que as mortes por doenças crônicas no Brasil, em 2005, tenham representado uma perda de US\$ 3 bilhões devido a mortes prematuras por doença isquêmica do coração, acidente vascular encefálico e diabetes mellitus e que, nos próximos 10 anos, essa cifra chegue a US\$ 49 bilhões [13].

Patogênese e Progressão da Doença

A IC é uma síndrome ocasionada por disfunção sistólica e/ou diastólica, que não atende as necessidades de oxigenação do tecido ou com débito cardíaco (DC) compensado através de aumento anormal das pressões de enchimento, deflagrando uma complexa resposta neurohumoral e inflamatória [14, 15].

Os estudos que descreveram pioneiramente o remodelamento ventricular na progressão da IC são aqueles utilizando como modelo o desenvolvimento de IM em ratos no início da década de 80 por Pfeffer e colaboradores. Estes estudos demonstraram que a oclusão aguda da artéria coronária, particularmente quando ocorrem lesões transmurais de grandes proporções, resulta em alterações complexas da arquitetura ventricular [16].

Uma série de respostas compensatórias ocorre no ventrículo esquerdo (VE) após um IM, com o objetivo primordial de preservar o débito cardíaco. A perda aguda de cardiomiócitos resulta em uma sobrecarga miocárdica, num aumento abrupto de trabalho, que induz a um padrão único de remodelamento envolvendo tanto a borda da área de infarto quanto a regiões remotas do miocárdio. A distensão aguda do tecido miocárdico viável e a ação do

mecanismo de Frank-Starling, bem como o aumento da atividade cronotrópica e inotrópica secundária à estimulação simpática, tendem a manter a função de bomba do VE, apesar da perda abrupta do tecido contrátil [17].

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos hemodinâmicos, histológicos e moleculares envolvidos nas alterações que ocorrem no tecido cardíaco após um dano isquêmico, muitos pacientes que sofrem eventos agudos desenvolvem dilatação ventricular progressiva e, frequentemente, evoluem para quadros de IC [18].

O prognóstico para a IC ainda é ruim e os fatores mais comuns para o seu desenvolvimento são: a doença arterial coronariana (DAC), diabetes mellitus, hipertensão arterial e IM. Após IM, em torno de 30% dos pacientes irão desenvolver IC dois anos após o evento agudo, apesar de uma terapêutica otimizada. Além da disfunção orgânica primária específica do músculo cardíaco, outros órgãos sofrem influência no seu estado de saúde em detrimento da descompensação cardíaca [19].

Remodelamento Ventricular

A expansão da zona infartada ocorre poucas horas após o dano ao miocárdio, resultando em estresse e dilatação da parede ventricular [4]. A dilatação ventricular, embora represente um mecanismo eficiente de compensação, restabelecendo o volume sistólico, também tem sido consistentemente associada com uma diminuição de sobrevida [4, 20].

O desenvolvimento de hipertrofia nos segmentos miocárdicos não-infartados também é uma resposta compensatória comum em infartos extensos, ocorrendo, pelo menos em parte, devido a um aumento no estresse

da parede ventricular, mas sendo frequentemente insuficiente para normalizar a distribuição das forças mecânicas na cavidade ventricular [21].

Muito além de adaptações hemodinâmicas secundárias, eventos celulares e moleculares precoces pós-infarto, como a ativação de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, hipertrofia de miócitos, apoptose, necrose, fibrose, ativação proteolítica e fatores genéticos exercem papéis centrais na progressão do remodelamento ventricular [3, 4, 16, 22].

Estas modificações induzem a ativação de processos de sinalização celular através de cascatas bioquímicas que, posteriormente modularão alterações reparativas como dilatação, hipertrofia e a formação de uma cicatriz colágena. Essas alterações começam a se estabelecer imediatamente após a oclusão arterial, progredindo por várias semanas após o dano isquêmico inicial, até que as forças de distensão sejam contrabalançadas pela resistência à tração da cicatriz de colágeno [23, 24].

Muito além de implicações mecanísticas, estes eventos abrem a possibilidade de poderem ser alvo de terapias mais objetivas e eficazes no combate à progressão da doença [25].

O Papel do Colágeno

As fibras de colágeno são importantes constituintes do miocárdio contribuindo para manutenção da geometria ventricular e da estrutura conectiva dos cardiomiócitos. Alterações na estrutura e composição do colágeno têm sido relacionadas a diversos tipos de doenças miocárdicas, podendo assim, influenciar decisivamente na modificação da geometria ventricular [23, 26]. No coração humano, particularmente aquele que é insuficiente por etiologia

isquêmica, a fibrose é o achado estrutural predominante, tanto no tecido cicatricial, como nos segmentos musculares ainda viáveis do VE e direito [27]. A degradação extracelular de colágeno, bem como o remodelamento de outros componentes da matriz extracelular ocorre por ativação das enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) [28].

Há um número expressivo de diferentes MMPs descritas até o momento apresentando diferenças importantes na especificidade dos substratos e na abundância em vários tecidos. Sendo assim, sua classificação tem sido determinada de acordo com os seus substratos principais: colagenases, gelatinases e estromelisinases [27, 28]. Spinale e colaboradores demonstraram um aumento da atividade de diversas MMPs no VE de pacientes com cardiomiopatia dilatada, bem como um aumento significativo dos seus inibidores teciduais (TIMPs) [29, 30].

O reparo tecidual com aumento no *turnover* de colágeno é uma propriedade fundamental de todos tecidos vascularizados. Durante os primeiros dois dias após um IM em ratos, ocorre uma degradação da rede de colágeno no local do infarto, associado a um aumento da razão da fração de colágenos solúveis e insolúveis. Essas alterações ocorrem em decorrência de um aumento da atividade de MMPs latentes, incluindo a colagenase intersticial (MMP-1), as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e outras proteases geradas no local da injúria tecidual por células inflamatórias, como leucócitos e polimorfonucleares [29, 30]. A atividade colagenolítica após um infarto em ratos apresenta um pico característico no sétimo dia, declinando progressivamente e desaparecendo até o décimo quarto dia após o infarto.

A atividade colagenolítica inicial parece ser mediada primariamente pela ativação de MMPs latentes ou zimógenos, uma vez que a expressão de RNA mensageiro é observada somente a partir do sétimo dia após o infarto com a função de recuperar os estoques teciduais da enzima. A transcrição das TIMPs ocorre por volta do segundo dia e o seu RNA mensageiro permanece elevado pelo menos até o décimo quarto dia após o infarto [31].

De forma análoga aos processos envolvidos na degradação da matriz extracelular, os genes que regulam a síntese de proteínas de matriz se ativam progressivamente a partir do primeiro dia após um dano isquêmico ao tecido miocárdico. A formação do tecido fibroso, relatada em estudo experimental realizado em corações de ratos é visível, inicialmente no local de necrose a partir do sétimo dia, acumulando-se continuamente durante as semanas subsequentes [32].

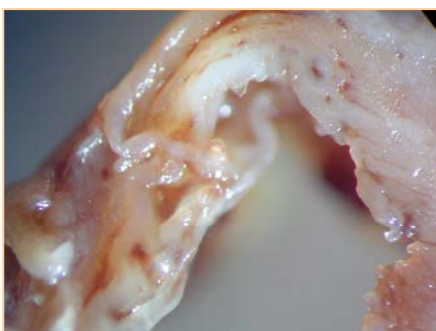


Figura 2. Parede livre do VE de um rato, sete dias após o infarto – Início da formação do tecido fibroso (dados do grupo).

A concentração de hidroxiprolina, um aminoácido específico do colágeno, começa a aumentar no sítio do infarto no final da primeira semana, acumulando-se progressivamente por um período de, pelo menos, seis semanas. As fibras de colágeno tipo I e III são responsáveis pela cicatrização no sítio de ocorrência da perda de miócitos. De forma geral, os eventos moleculares que levam a

fibrogênese persistem ativos por várias semanas, muito além do período inicial quando ocorre lise do colágeno, promovendo a deposição de colágeno fibrilar, responsável pela integridade tecidual da área em cicatrização [31].

A comparação dos locais de atividade imunohistoquímica das MMPs com os locais de deposição de colágeno, em cortes histológicos adjacentes, indica que os processos de degradação e síntese extracelular podem ser simultâneos. Quando se avalia a deposição de colágeno fibrilar nos segmentos infartados em ratos, observa-se que esta ocorre de forma paralela à expressão da MMP-9. O colágeno, entretanto, acumula-se perto das bordas endocárdicas e epicárdicas, promovendo sustentação e integridade mecânica do tecido necrótico, porém, longe das regiões onde se encontra maior expressão dessa enzima [33].

Cicatrização Miocárdica

Pós-infarto agudo do miocárdio experimental

De forma geral, o processo de dilatação ventricular pode ser influenciado por três fatores interdependentes: o tamanho do infarto, o estresse da parede ventricular e o processo de cicatrização tecidual [31, 34].

Em uma série de estudos experimentais e clínicos, Pfeffer e colaboradores demonstraram que o uso prolongado de inibidores da enzima de conversão da angiotensina está associado com uma redução significativa da dilatação ventricular subsequente, bem como um incremento importante na sobrevida daqueles pacientes sob uso desta droga. Estes estudos foram pioneiros ao indicar que a angiotensina pudesse exercer efeitos deletérios sobre

o tecido miocárdico, influenciando adversamente o remodelamento ventricular, em última análise, a cicatrização do miocárdio [16, 35, 36].

A cicatrização tecidual, propriamente dita, depende da resposta inflamatória inicial, da reabsorção do tecido miocárdico necrótico, da degradação dos tecidos conectivos e da conseqüente deposição de colágeno e formação da cicatriz fibrótica [4, 37]. Embora esses processos sejam reconhecidos de forma genérica há muitos anos, os mecanismos moleculares pelos quais o balanço entre degradação e síntese do tecido cicatricial se estabelece estão sendo parcialmente elucidados apenas recentemente.

O processo de cicatrização pode ser dividido em quatro fases: morte celular, inflamatória, proliferativa e de maturação [37]. Durante a fase inflamatória, a morte dos cardiomiócitos e a hipóxia tecidual resultam na geração de radicais livres, na ativação da cascata do sistema complemento, na ativação do Fator Nuclear Kappa Beta (NF- κ β) e da via de sinalização mediada pelos receptores Toll (*Toll Like Receptors*). Estes eventos induzem a síntese de quimiocinas como as quimiocinas- β (atraem monócitos, basófilos e linfócitos) e citocinas inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF)- α , Interleucina (IL)-1 e IL-6, e aumentam a expressão das moléculas de adesão celular nas células endoteliais e leucócitos, resultando na infiltração de monócitos, linfócitos e polimorfonucleares na área de infarto [4, 24, 38].

Durante a fase proliferativa de cicatrização, a expressão de mediadores inflamatórios é suprimida, enquanto ocorre a proliferação de fibroblastos e células endoteliais. A resposta a estes eventos se dá pela produção de proteínas que degradam a matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9) e a formação de uma extensa rede microvascular pelos miofibroblastos ativados [4, 24, 38].

Na fase de maturação os miofibroblastos expressam genes que codificam pró-colágeno tipos I e III, produzem angiotensina I e II e seus respectivos receptores, fator de crescimento transformador (TGF)- β e endotelina (ET)-1, permitindo a auto-regulação do *turnover* de colágeno. A síntese de colágeno tipo I e III, modulada por diversos fatores, incluindo deformação mecânica relacionada à angiotensina II, fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento plaquetário (PGF), peptídeo natriurético atrial (ANP) e a liberação de óxido nítrico (NO). A síntese de colágeno tipo I e III, ativada por estes fatores tem como objetivo principal a formação da cicatriz tecidual que tem como função evitar a progressiva dilatação do VE e potencial ruptura da parede infartada [4, 24, 38, 39].

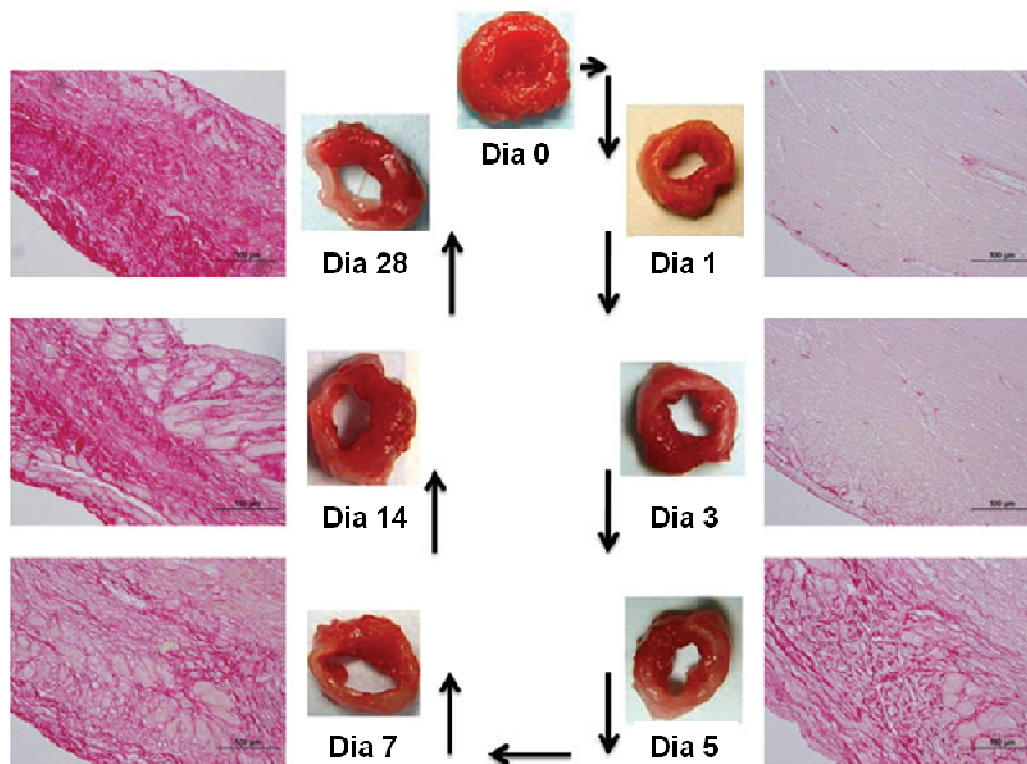


Figura 3. Progressão temporal do remodelamento cardíaco pós-infarto em camundongo. Cortes do VE corados com cloreto de trifeniltetrazólio 1% para detecção de atividade metabólica tecidual. Vermelho= tecido sadio; Branco= tecido infartado. Cortes histológicos corados com picrosirius red 1%. Vermelho= colágeno. (Figura adaptada de Lindsey *et al.*[40]).

A desequilíbrio da função fibroblástica pode levar à formação de uma extensa área de cicatriz tecidual e perda de função fisiológica cardíaca. A associação entre a formação da cicatriz e a fibrose cardíaca pós-inflamação inclui ativação, diferenciação, proliferação e secreção de uma ampla gama de moléculas inflamatórias e de remodelamento de matriz. O processo inflamatório durante a fibrogênese pode ser considerado como parte da cicatrização tecidual após injúria. Durante o processo de cicatrização, as células inflamatórias desempenham diversas funções, tais como depuração de células danificadas, e indução de diferentes reações teciduais [41, 42]. Na maioria dos

casos, o infiltrado de células inflamatórias amplifica os danos e gera estímulos fibrogênicos via secreção de mediadores solúveis, dando início a uma deposição progressiva e difusa de tecido conectivo intersticial – incluindo colágeno, em todo o miocárdio [43, 44].

A regulação do remodelamento da matriz extracelular é mediada pelos fibroblastos cardíacos que induzem a elevadas concentrações de proteínas fibrilares, especialmente colágenas. Os linfócitos T controlam o processo fibrogênico através da interação direta com os miofibroblastos e fibroblastos e da liberação de citocinas presentes no processo de cicatrização. O infiltrado de linfócitos após IM coincide com o aumento da proliferação de fibroblastos cardíacos e intensifica sua função fibrótica, atuando assim em sinergismo no remodelamento tissular após dano cardíaco. Alterações nos fibroblastos e em macromoléculas como colágeno tipo I e III, elastina e fibronectina resultam em remodelamento. A degradação do colágeno é gerenciada pela razão das MMPs de matriz, que pertencem a uma família de enzimas dependentes de zinco intersticial, e pelos TIMPs. Assim, um desequilíbrio na razão MMP-1/TIMP-1 pode ser considerado indicativo de dilatação ventricular esquerda, redução da fração de ejeção e disfunção cardíaca [45].

As MMPs formam uma família de aproximadamente 30 enzimas proteolíticas zinco-dependentes capazes de degradar diferentes componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos. Agem em diferentes processos fisiológicos e patológicos, de acordo com o substrato específico em que atuam [46]. As MMPs 2 e 9 são gelatinases com afinidade preferencial pelo colágeno IV. Um incremento significativo da atividade das MMPs miocárdicas já foi demonstrado em diversas formas de miocardiopatias,

tanto experimentais quanto clínicas. Deten e colaboradores observaram um rápido e grande aumento na expressão e atividade da MMP-9 seis horas após IM em ratos, enquanto a MMP-2 apresentou incremento de expressão e atividade no sexto dia após IM [32].

Evidências sugerem que fatores neurohumorais como angiotensina-II, aldosterona, endotelina e norepinefrina desempenham um papel crucial no desenvolvimento do remodelamento do VE. Em especial, a ativação miocárdica do sistema renina-angiotensina-aldosterona envolvendo a ação de componentes como angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina e receptor de angiotensina tipo II parecem ser fundamentais após IM [47].

A angiotensina-II induz hipertrofia dos cardiomiócitos e aumenta a proliferação e síntese de colágeno, bem como é responsável pela secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais. A aldosterona além de afetar a geometria do VE, compromete diretamente a homeostase de sódio e potássio e o desenvolvimento da fibrose miocárdica, uma vez que seu aumento é responsável pela retenção de água e sódio. Estudos demonstram incremento na produção de aldosterona em corações de ratos após IM e sugerem que o aumento da síntese de aldosterona é mediado pela via da angiotensina-II nos cardiomiócitos, podendo assim, estar envolvida no remodelamento do VE após IM [48].

A espironolactona, um bloqueador do receptor de aldosterona, é responsável pela redução da fibrose nas regiões não infartadas através do bloqueio da aldosterona cardíaca durante o processo de remodelamento miocárdico [49]. A endotelina-1 também está envolvida no processo de remodelamento ativando a expressão de receptores de endotelina ET-A e B.

Os receptores ET-A expressos nas células musculares lisas, aumentam a liberação de cálcio gerando vasoconstrição e aumento de pressão sanguínea. Já os receptores ET-B, expressos em células endoteliais, aumentam a concentração de óxido nítrico suscitando vasodilatação e redução de pressão. A interação destes mecanismos após IM resulta em hipertensão que está associada à hipertrofia cardíaca [48, 50].

O Papel do TGF- β na Cicatrização Miocárdica

Evidências sugerem que o TGF- β tem um papel importante como modulador central da fase inflamatória e fibrótica da cicatrização nas diferentes etapas do reparo cardíaco pós-infarto, sendo fundamental no remodelamento hipertrófico e fibrótico do miocárdio, mediando a proliferação de cardiomiócitos, ativação de fibroblastos e a deposição da matriz extracelular [51, 52].

Os peptídeos TGF- β 1, 2 e 3, pertencentes à superfamília TGF- β , são alguns dos mais conhecidos peptídeos pleiotrópicos e multifuncionais, com potentes efeitos diretos sobre diferentes tipos celulares. Estão envolvidos em vários processos biológicos como no desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celular, apoptose, deposição de matriz extracelular e regulação da resposta imune. Entretanto, as ações do TGF- β são moduladas pelo contexto do meio extracelular em que se encontra, do tipo celular sobre o qual atua e das citocinas presentes no ambiente alvo [51, 52].

O TGF- β 1 está envolvido como um dos maiores contribuintes para fibrose tecidual em diferentes órgãos e sistemas. Na presença de dano ao tecido cardíaco, o TGF- β 1 promove ativação fibrogênica, induzindo a proliferação e diferenciação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos,

gerando produção de colágeno, estimulando a expressão de proteínas da matriz extracelular, aumentando a produção e liberação de fator de crescimento de tecido colágeno (CTGF) e ativando vias apoptóticas (Figura 4). Além disto, estudos demonstram que o TGF- β 1 tem um importante papel no desenvolvimento da fibrose e do remodelamento miocárdico, afetando os processos de cicatrização e a função cardíaca após IM [53, 54]. Zhang, Xu e seus colaboradores observaram que após IM a expressão do TGF- β 1 está aumentada tanto no tecido infartado quanto nos tecidos adjacentes, fortalecendo a associação do TGF- β 1 e suas vias de regulação com o processo de remodelamento pós IM [55, 56].

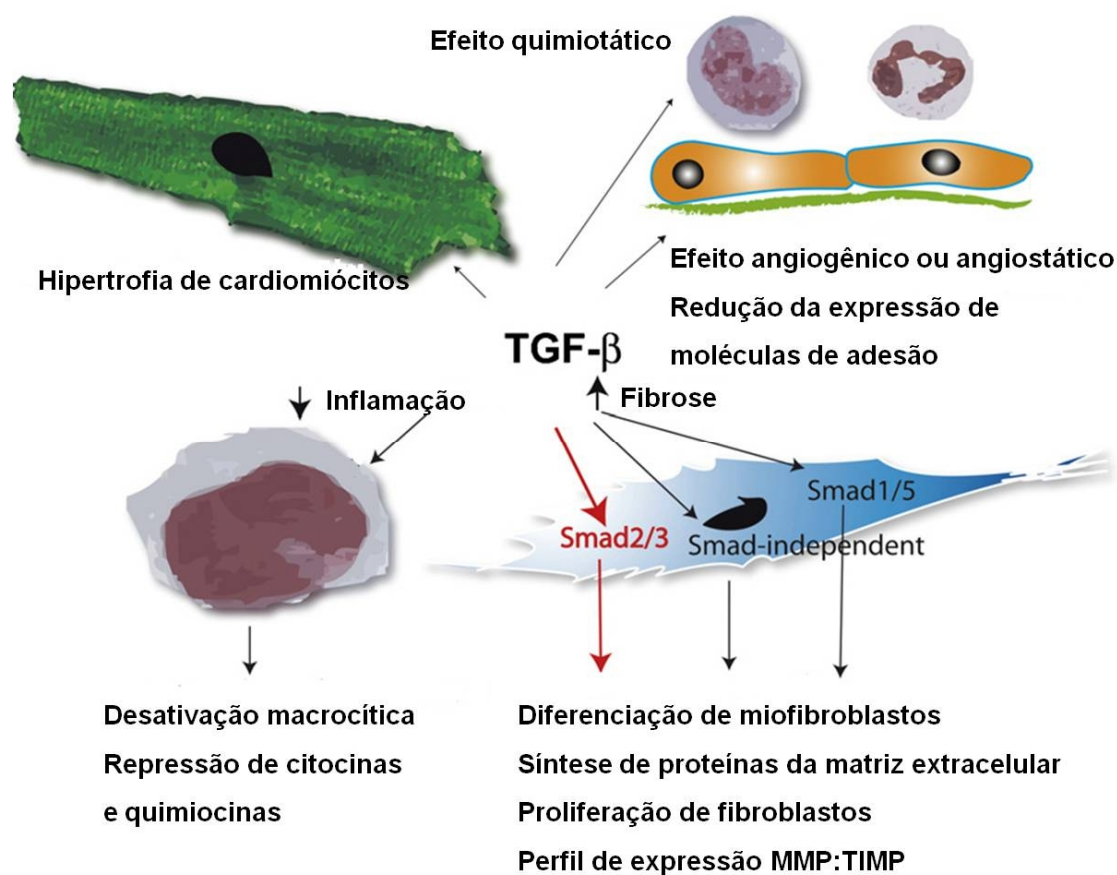


Figura 4. Sinalização do TGF- β 1 pós-infarto.

(Adaptado de Frangogiannis [57])

Além disso, o TGF- β 1 desempenha um importante papel no recrutamento de monócitos para a área de cicatrização, auxiliando na formação de tecido granular. A ativação da via de sinalização do TGF- β 1 auxilia, inicialmente, a supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no miocárdio infartado, resultando na redução do infiltrado inflamatório. Posteriormente, também participa dos mecanismos que regulam a deposição de tecido fibroso, modulando o fenótipo dos miofibroblastos. Isto é possível devido à indução da síntese protéica da matriz extracelular e pela preservação da matriz através do aumento da expressão dos TIMPs. As ações do TGF- β 1 sobre o endotélio resultam na diminuição da adesão leucocitária e na inibição da migração de neutrófilos em toda a camada endotelial, através da diminuição da expressão superficial da E-selectina [58, 59].

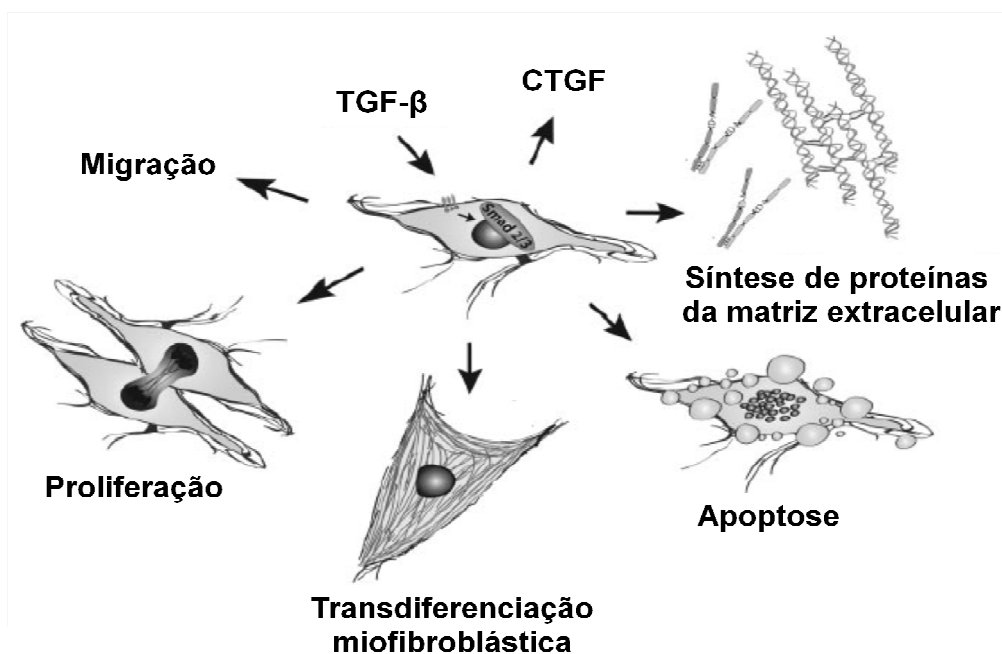


Figura 5. TGF- β 1 promovendo ativação fibrogênica.

CTGF = fator de crescimento de tecido colágeno (Adaptado de Dobaczewski [54]).

Pequenas concentrações de TGF- β 1 são capazes de ativar monócitos, estimulando a síntese de uma variedade de citocinas (IL-1, TNF- α), quimiocinas (proteína quimiotática de Monócito-1), e fatores de crescimento e aumento da expressão de integrinas. Em contraste ao efeito da ativação do TGF- β 1 em monócitos sanguíneos periféricos, ele exerce uma ação predominantemente supressiva sobre os macrófagos maduros [51, 52].

Alguns estudos experimentais que inibiram a sinalização ou usaram anticorpo anti-TGF- β 1 mostraram efeitos antagônicos [59-62]. Ikeuchi e colaboradores inibiram a sinalização do TGF- β 1 em dois diferentes protocolos. No primeiro a inibição foi induzida sete dias antes do infarto e foi observada uma maior mortalidade e uma exacerbada disfunção do VE em resposta a um aumento do processo inflamatório. No segundo protocolo a sinalização foi inibida nos dias zero e sete pós-infarto, observando-se atenuação da disfunção ventricular, menor volume de colágeno na região infartada e menor expressão de IL-6 e de IL-1 [59].

Da mesma forma, Okada e colaboradores inibiram a sinalização do TGF- β 1 três dias (protocolo 1) e quatro semanas (protocolo 2) após o infarto observando uma maior sobrevida em relação aos animais infartados sem tratamento, atenuação do remodelamento do VE e dos parâmetros ecocardiográficos no protocolo 1. Já no protocolo 2, em que a inibição da sinalização se deu após doença crônica, não foi observada qualquer diferença na geometria ventricular ou na funcionalidade do tecido em relação ao grupo controle, indicando que o efeito preventivo relacionado a inibição do TGF- β 1 poderia ser atribuído a sua ação no tecido granuloso durante a fase subaguda do IM [60].

Ellmers e colaboradores administraram por via oral um antagonista do TGF- β 1 (SD-208) um dia após o IM. Após 30 dias de tratamento observaram uma tendência a redução da expressão gênica do TGF- β 1 nos grupos tratados e os níveis de expressão de colágeno-1 foram similares aos de animais não infartados. Os animais tratados com SD-208 apresentaram uma redução de angiotensinogênio e da expressão gênica do receptor tipo I de angiotensinogênio tipo II e da enzima conversora de angiotensina. Além disso, a pressão arterial média, mensurada ao final dos 30 dias de tratamento, apresentou-se reduzida, demonstrando o efeito hipotensor do SD-208. Assim, a inibição do TGF- β 1 parece desencadear uma ação regulatória sobre o sistema renina-angiotensina, reduzindo a pressão arterial e atenuando os efeitos do remodelamento [62].

Seguindo a mesma linha experimental, Frantz e colaboradores utilizaram um anticorpo anti-TGF- β 1 uma semana antes ou cinco dias após o IM. Entretanto, obtiveram resultados que vão de encontro a achados prévios, observando aumento de mortalidade e uma maior dilatação ventricular em ambos os tratamentos quando comparados aos controles [61].

Lian e colaboradores a fim de testar a eficácia da utilização do receptor II de TGF- β 1 solúvel (sTbRII) como inibidor competitivo do TGF- β 1, cultivaram fibroblastos cardíacos de ratos neonatos. Os fibroblastos cardíacos foram tratados por 30 minutos com 50 ng/mL do sTbRII antes da exposição ao TGF- β 1 (5 ng/mL) ou PBS, observando-se uma inibição da diferenciação e proliferação dos fibroblastos cardíacos. Num segundo momento, trabalhando em um modelo animal de IM com ratos Sprague–Dawley, Lian e colaboradores utilizaram 100ng do sTbRII diluído em 20 μ L de PBS injetados em três pontos do coração

(dois pontos na borda do infarto e um ponto na área infartada), quatro dias após IM dez animais e foram comparados com animais não tratados. Os animais foram avaliados por quatro semanas, sendo quatro animais de cada grupo sacrificados duas semanas após tratamento para avaliação da diferenciação dos miofibroblastos. Comparado ao grupo IM não tratado, o grupo IM tratado com sTbRII apresentou uma redução na expressão e na densidade óptica da α -SMA na área infartada em duas semanas, o que sugere uma inibição da transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos após o IM. Na avaliação da função do VE por parâmetros hemodinâmicos quatro semanas após tratamento, o grupo tratado, comparado ao grupo IM não tratado, apresentou melhor pressão sistólica ventricular esquerda, melhor taxa de variação de pressão no tempo e menor pressão diastólica final do VE, sugerindo melhor conservação de função de VE. Também foi observada uma menor deposição de colágeno na região de infarto dos animais tratados, após quatro semanas [63].

O conjunto destes dados sugerem que diferentes maneiras de inibição do TGF- β 1 ao nível protéico podem levar a resultados distintos de acordo com o tempo de início do tratamento [59-64]. Ampliando o espectro de formas de interferir nesta rota biológica, a terapia gênica surge como ferramenta para uma inibição local de TGF- β 1 através da utilização de um shRNA (*short hairpin RNA*) [65, 66] no modelo experimental de IM.

A utilização da terapia gênica como ferramenta no tratamento das DCV ainda é pouco explorada. Entretanto, está emergindo como uma potencial opção para pacientes que sofrem de DCV, incluindo a doença arterial coronariana, doença vascular periférica, enxerto venoso e insucesso no implante de stent. Estudos pré-clínicos têm mostrado resultados promissores

para uma ampla variedade de genes, em particular genes que codificam fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e FGF [67].

Terapia Gênica

A base da terapia gênica consiste na introdução de material genético em células de um organismo com objetivo terapêutico. Este material genético, sob a forma de DNA, RNA ou oligonucleotídeos, pode ter a finalidade de substituir a função de um gene deficiente, aumentar a expressão de um gene de interesse ou inibir a expressão de um gene deletério nas células-alvo [68]. Os agentes utilizados para a transferência gênica são conhecidos como vetores. O vetor ideal possui algumas características altamente desejáveis, entre as quais: capacidade de carrear um transgene de tamanho ilimitado, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável do transgene, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, baixo custo, fácil produção e manipulação e ainda possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade. Até o presente momento, este vetor não pode ainda ser obtido. No entanto, entre as alternativas disponíveis, pode-se sempre escolher aquele que melhor se adapte às características terapêuticas desejadas no tratamento [68, 69].

Há duas formas principais de transferência gênica: os métodos virais e os não virais. Para utilização de terapia gênica viral, o transgene substitui regiões gênicas de certos vírus, as quais geralmente estão associadas à patogenicidade viral. Assim, nestes vetores o vírus é modificado e atenuado, tornando-se incapaz de causar qualquer quadro patológico. Já os métodos não

virais incluem a administração direta do DNA nú, o uso de lipossomas e os vetores nanoestruturados. Os lipossomos são partículas lipídicas com núcleo aquoso, capazes de se ligar ao DNA. Os vetores nanoestruturados são polímeros que formam verdadeiras redes de interação ao DNA [68, 70].

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular, relativamente simples, porém eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante [68, 71]. Para a introdução de plasmídeos nas células, é preciso fragilizar a membrana celular, o que pode ser obtido por diversos métodos, como o emprego de choques elétricos ou substâncias que fragilizam quimicamente a membrana celular. Outra alternativa consiste em aplicar uma grande quantidade de plasmídeos nas vizinhanças das células, de modo que, mesmo com eficiência muito baixa, uma pequena fração seja capaz de cruzar a membrana [69].

Plasmídeo

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular com capacidade de replicação independente e estável, mantendo seu número constante através de várias gerações, no estado não integrado ao cromossomo do hospedeiro. Amplamente utilizados como ferramentas de manipulação genética, aumentam ou regulam a produção de proteínas [72]. Para tal expressão há necessidade da clonagem do gene de interesse no vetor (sob controle de promotor) e de um cassete de expressão otimizado, tanto em nível transcricional como traducional [72, 73].

Para utilização destes vetores é necessária a transformação de bactérias *Escherichia coli* através de choque térmico e posterior incubação em

meio de cultura suplementado com antibiótico específico. As bactérias que contiverem uma ou mais cópias do plasmídeo expressam o gene que confere resistência aos antibióticos, resultando somente no crescimento de colônias modificadas.

Em seguida deste processo de seleção de colônias, é preparado um inóculo para replicação de células modificadas. Finalizando o processo, é realizado o isolamento dos plasmídeos bacterianos por meio de extração por kit comercial (PureLink™ HiPure Filter Plasmid Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

RNA de interferência (RNAi)

O ácido ribonucléico (RNA) possui um importante papel no controle da expressão gênica, através de um mecanismo chamado de RNA de interferência (RNAi). Inicialmente imaginou-se que esse mecanismo ocorresse apenas em condições experimentais, porém logo se descobriu tratar-se de um mecanismo natural e amplamente distribuído entre os diferentes organismos (mamíferos, insetos, plantas). Em 2001, descobriu-se que o mecanismo de RNAi faz parte do sistema de controle da expressão gênica de eucariotos através do microRNA (miRNA). O miRNA é uma pequena molécula de RNA que forma uma alça de cerca de 21 nucleotídeos, que sofre a ação da enzima Dicer e ligação a um complexo protéico chamado *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC), para silenciamento do RNA-alvo, conforme descrito a seguir. Geralmente, um miRNA é capaz de silenciar mais de um gene, e cada gene sofre a ação de vários miRNA [74].

O RNAi é uma poderosa ferramenta para o estudo da função dos genes a partir de seu silenciamento e uma alternativa potencial para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, é um dos mecanismos mais específicos e eficientes de silenciamento gênico [75, 76]. Entre as estratégias de indução do RNAi está a administração direta de moléculas de RNA dupla fita de 21 pares de base, os *short interfering RNA* (siRNA), capazes de induzir um silenciamento temporário. Outra estratégia consiste na introdução de um plasmídeo que codifica uma pequena molécula de RNA em forma de grampo, ou shRNA, capaz de ativar o mecanismo endógeno de silenciamento [65, 66].

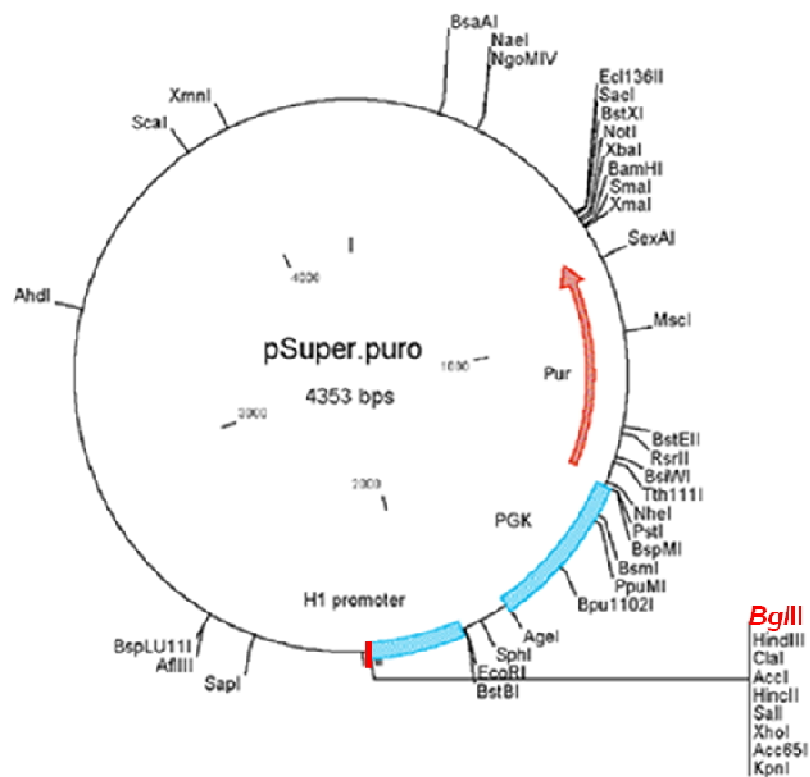


Figura 6. Mapa do pSUPER- shRNA TGF- β 1.

PGK e H1= regiões promotoras; Pur= gene de resistência a puramicina. A inserção do shRNA TGF β 1 é feita no sítio múltiplo de clonagem, usando a enzima *BglIII*, em vermelho na figura.

O mecanismo de ação do shRNA envolve uma série de passos, que são comuns à via dos miRNA (Figura 5). Os shRNAs são sintetizados no núcleo das células, posteriormente processados e transportados para o citoplasma através da Exportina-5 e em seguida incorporado a RISC para a sua ação [75]. O shRNA pode ser transcrito pela RNA polimerase II ou III através de promotores no cassete de expressão [77]. No citoplasma, o shRNA é ligado a outro complexo contendo a enzima DICER RNase III e TRBP/PACT onde o *loop* do *hairpin* é retirado para formar uma dupla-fita siRNA com 2 nucleotídeos projetados na região 3' [78-80]. O complexo DICER gerencia o transporte da dupla-fita siRNA para a proteína Ago2 contendo RISC. O RISC liga-se a uma das fitas do RNA e percorre o citoplasma em busca de fragmentos complementares a essa região [81]. Quando esses fragmentos são encontrados, eles se pareiam à região complementar, e o RNA mensageiro é clivado, impedindo a sua tradução e, conseqüentemente, a formação da proteína [82].

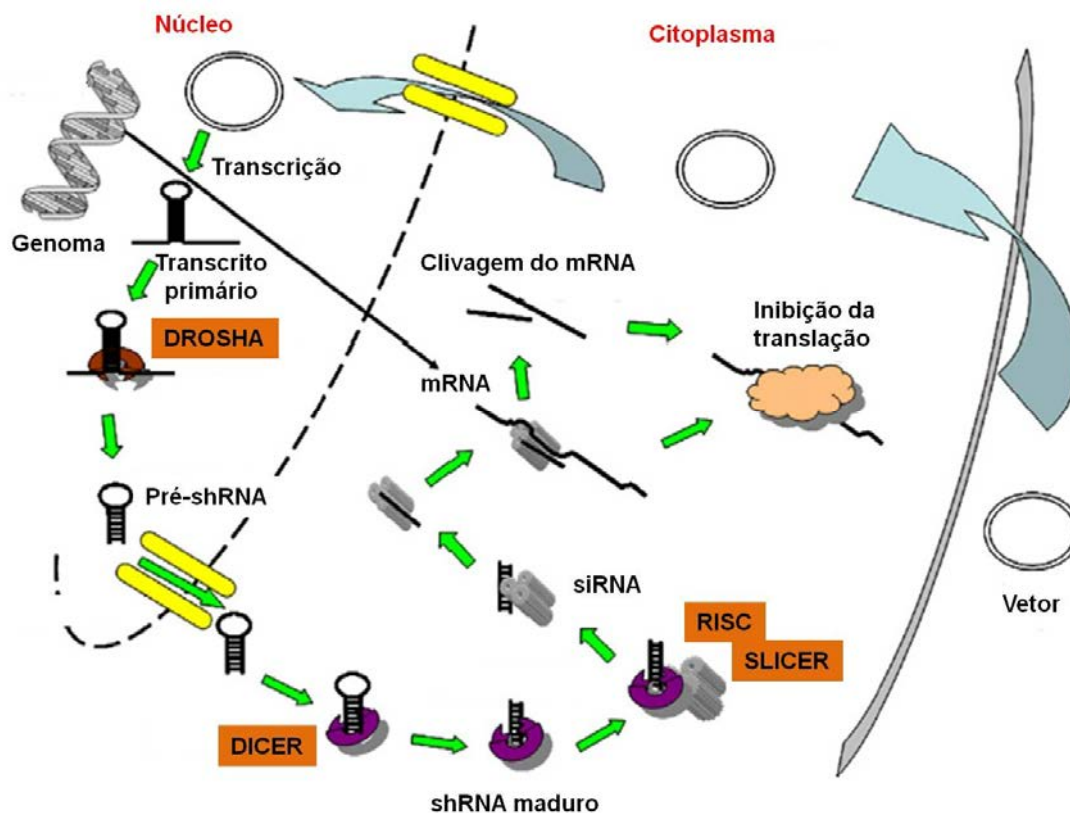


Figura 5. Mecanismo de ação do shRNA.

Após a entrega do vetor no citoplasma, o vetor tem de ser transportado para o núcleo para a transcrição. O transcrito primário é processado pelo complexo *DROSHA* formando o pré-shRNA. Este é exportado para o citoplasma onde é clivado pelo complexo *DICER*. Em seguida liga-se a *RISC* e *SLICER*. Este complexo processa a clivagem do mRNA-alvo impedindo a sua tradução. O complexo permanece ativo e pode silenciar outras moléculas de mRNA-alvo. mRNA = ácido ribonucleico mensageiro; RISC = RNA-Induced Silencing Complex; shRNA = short interfering RNA (Adaptado de Rao [66]).

Referencias

1. Smith, S.C., Jr., et al., *AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2363-72.
2. OMS. www.who.int Acesso: 20/04/2012.
3. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 250-6.
4. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
5. Matsui, Y., J. Morimoto, and T. Uede, *Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction*. *World J Biol Chem*, 2010. **1**(5): p. 69-80.
6. LeGrand, C., *Fifty-third World Health Assembly: impact on cardiovascular disease*. *Can J Cardiol*, 2000. **16**(7): p. 857-9.
7. Thom, T., et al., *Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. e85-151.
8. Appel, L.J., et al., *Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association*. *Hypertension*, 2006. **47**(2): p. 296-308.
9. Haffner, S.M., *Can reducing peaks prevent type 2 diabetes: implication from recent diabetes prevention trials*. *Int J Clin Pract Suppl*, 2002(129): p. 33-9.

10. Wyatt, S.B., K.P. Winters, and P.M. Dubbert, *Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem*. Am J Med Sci, 2006. **331**(4): p. 166-74.
11. Ng, T.M., et al., *Characteristics, drug therapy, and outcomes from a database of 500,000 hospitalized patients with a discharge diagnosis of heart failure*. Congest Heart Fail, 2008. **14**(4): p. 202-10.
12. Sieck, S.G. and M.G. Moseley, *Observation unit economics*. Heart Fail Clin, 2009. **5**(1): p. 101-11, vii.
13. Datasus. www.datasus.gov.br Acesso:20/04/2012.
14. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. Circulation, 2007. **116**(22): p. 2634-53.
15. Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend, *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2023-39.
16. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
17. Yousef, Z.R., S.R. Redwood, and M.S. Marber, *Postinfarction left ventricular remodelling: where are the theories and trials leading us?* Heart, 2000. **83**(1): p. 76-80.
18. Rumberger, J.A., et al., *Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans*. J Am Coll Cardiol, 1993. **21**(3): p. 673-82.

19. Savoye, C., et al., *Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire [REVE] study group)*. Am J Cardiol, 2006. **98**(9): p. 1144-9.
20. White, H.D., et al., *Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction*. Circulation, 1987. **76**(1): p. 44-51.
21. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
22. Anversa, P., *Myocyte death in the pathological heart*. Circ Res, 2000. **86**(2): p. 121-4.
23. Bozkaya, Y.T., et al., *Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive cardiac conduction disease*. Pacing Clin Electrophysiol, 2008. **31**(10): p. 1284-90.
24. El-Menyar, A.A., *Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art*. J Card Fail, 2008. **14**(1): p. 61-74.
25. Prabhu, S.D., *Post-infarction ventricular remodeling: an array of molecular events*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(4): p. 547-50.
26. Marwick, T.H. and C.Y. Wong, *Role of exercise and metabolism in heart failure with normal ejection fraction*. Prog Cardiovasc Dis, 2007. **49**(4): p. 263-74.
27. Weber, K.T., *Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2488-92.
28. Brown, R.D., et al., *Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(1): p. 200-5.

29. Spinale, F.G., et al., *Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function*. *Circ Res*, 1998. **82**(4): p. 482-95.
30. Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
31. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
32. Deten, A., et al., *Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(6): p. 1191-207.
33. Rohde, L.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 1999. **99**(23): p. 3063-70.
34. Mill, J.G., et al., *Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart*. *Braz J Med Biol Res*, 2011. **44**(9): p. 890-8.
35. Pfeffer, M.A., et al., *Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril*. *Circulation*, 1985. **72**(2): p. 406-12.
36. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. *Circ Res*, 1979. **44**(4): p. 503-12.
37. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.

38. Sun, Y., et al., *Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats*. J Lab Clin Med, 2000. **135**(4): p. 316-23.
39. Daskalopoulos, E.P., B.J. Janssen, and W.M. Blankesteyn, *Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges*. Microsc Microanal, 2012. **18**(1): p. 35-49.
40. Lindsey, M.L. and R. Zamilpa, *Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction*. Cardiovasc Ther, 2012. **30**(1): p. 31-41.
41. Blumbach, K., et al., *Defective granulation tissue formation in mice with specific ablation of integrin-linked kinase in fibroblasts - role of TGFbeta1 levels and RhoA activity*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 22): p. 3872-83.
42. Yates, C.C., et al., *Lack of CXC chemokine receptor 3 signaling leads to hypertrophic and hypercellular scarring*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1743-55.
43. Riad, A., et al., *Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6954-61.
44. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
45. Wei, L., *Immunological aspect of cardiac remodeling: T lymphocyte subsets in inflammation-mediated cardiac fibrosis*. Exp Mol Pathol, 2011. **90**(1): p. 74-8.
46. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.

47. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *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, 2000. **35**(3): p. 569-82.
48. Takano, H., et al., *Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies*. Intern Med, 2003. **42**(6): p. 465-9.
49. Delcayre, C., et al., *Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling*. Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1346-51.
50. Rehsia, N.S. and N.S. Dhalla, *Potential of endothelin-1 and vasopressin antagonists for the treatment of congestive heart failure*. Heart Fail Rev, 2010. **15**(1): p. 85-101.
51. Stavropoulou, A., et al., *uPA, uPAR and TGFbeta expression during early and late post myocardial infarction period in rat myocardium*. In Vivo, 2010. **24**(5): p. 647-52.
52. Schiller, M., D. Javelaud, and A. Mauviel, *TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing*. J Dermatol Sci, 2004. **35**(2): p. 83-92.
53. Leask, A. and D.J. Abraham, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 816-27.
54. Dobaczewski, M., et al., *Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction*. Circ Res, 2010. **107**(3): p. 418-28.

55. Yin, Z., et al., *Effects of silencing transforming growth factor-beta1 by RNA interference plasmid on rat renal allograft fibrosis using Smads pathway*. Urology, 2011. **77**(3): p. 762 e1-7.
56. Xu, X., et al., *Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium*. Circ J, 2005. **69**(10): p. 1275-83.
57. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. Pharmacol Res, 2008. **58**(2): p. 88-111.
58. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
59. Ikeuchi, M., et al., *Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(3): p. 526-35.
60. Okada, H., et al., *Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure*. Circulation, 2005. **111**(19): p. 2430-7.
61. Frantz, S., et al., *Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 485-92.
62. Ellmers, L.J., et al., *Transforming growth factor-beta blockade down-regulates the renin-angiotensin system and modifies cardiac remodeling after myocardial infarction*. Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5828-34.
63. Lian, R., et al., *Soluble transforming growth factor-beta1 receptor II might inhibit transforming growth factor-beta-induced myofibroblast*

- differentiation and improve ischemic cardiac function after myocardial infarction in rats. Coron Artery Dis, 2010. 21(6): p. 369-77.*
64. Frantz, S., et al., *Impact of different bone marrow cell preparations on left ventricular remodelling after experimental myocardial infarction. Eur J Heart Fail, 2008. 10(2): p. 119-24.*
65. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, 2004. 431(7006): p. 343-9.*
66. Rao, D.D., et al., *siRNA vs. shRNA: similarities and differences. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(9): p. 746-59.*
67. Yla-Herttuala, S. and J.F. Martin, *Cardiovascular gene therapy. Lancet, 2000. 355(9199): p. 213-22.*
68. Rubanyi, G.M., *The future of human gene therapy. Mol Aspects Med, 2001. 22(3): p. 113-42.*
69. Herweijer, H. and J.A. Wolff, *Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. Gene Ther, 2007. 14(2): p. 99-107.*
70. Romano, G., et al., *Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. Stem Cells, 2000. 18(1): p. 19-39.*
71. Voss, C., *Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. Biotechnol Annu Rev, 2007. 13: p. 201-22.*
72. Solem, C. and P.R. Jensen, *Modulation of gene expression made easy. Appl Environ Microbiol, 2002. 68(5): p. 2397-403.*
73. del Solar, G., et al., *Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(2): p. 434-64.*

74. Lopez-Fraga, M., T. Martinez, and A. Jimenez, *RNA interference technologies and therapeutics: from basic research to products*. BioDrugs, 2009. **23**(5): p. 305-32.
75. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
76. Shim, M.S. and Y.J. Kwon, *Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo*. FEBS J, 2010. **277**(23): p. 4814-27.
77. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
78. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
79. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
80. Lee, Y.S., et al., *Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways*. Cell, 2004. **117**(1): p. 69-81.
81. Sontheimer, E.J. and R.W. Carthew, *Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1409-10.
82. Preall, J.B. and E.J. Sontheimer, *RNAi: RISC gets loaded*. Cell, 2005. **123**(4): p. 543-5.

2. Racional dos estudos

O TGF- β 1 é um polipeptídeo multifuncional que desempenha um importante papel na patofisiologia da IC, com diferentes efeitos nas várias etapas do processo de cicatrização e remodelamento após o IM. Recentes estudos demonstraram que a inibição TGF- β 1 ao nível protéico pós IM pode atenuar o remodelamento cardíaco e retardar a insuficiência cardíaca; entretanto, várias questões permanecem em aberto, entre elas o momento da intervenção e a maneira como é feita a inibição. Diferentes trabalhos têm utilizado estratégias como antagonistas e anticorpos anti-TGF- β . Em todos estes casos ocorre uma inibição sistêmica da via do TGF- β , sem que seu efeito direto sobre o músculo cardíaco possa ser observado de forma mais seletiva. Até o presente momento o uso de silenciamento gênico tendo como alvo o TGF- β ainda não foi explorado no contexto do processo de remodelamento ventricular pós-IM.

Além disto, considerando que nos propusemos a comparar diâmetros pós-IM em animais tratados ou não com RNAi TGF- β , e que esta variável (diâmetro pós-IM) guarda estreita correlação com área de IM, realizamos um estudo de cunho operacional analisando níveis de troponina-I e parâmetros ecocardiográficos em animais submetidos a IM a fim de melhor caracterizar a ocorrência de e a extensão de área de IM comparativamente à análise histológica.

3. Hipóteses

3.1. Hipótese do Estudo 1

O silenciamento gênico do TGF- β 1, se aplicado imediatamente após IM, pode interferir na expressão de genes relacionados aos processos de cicatrização e remodelamento miocárdico, influenciando na progressão das alterações estruturais e funcionais do VE.

3.2. Hipótese do Estudo 2

A mensuração de troponina-I coletada em 8 horas associada à ecocardiografia realizada em 48 horas após infarto pode prever a ocorrência de e estimar a área de infarto presente em 14 dias determinada por histologia.

4. Objetivos

4.1. Objetivos do Estudo 1

Objetivo principal

Avaliar os efeitos da inibição do TGF- β 1 no remodelamento do VE, através de um shRNA-TGF- β 1, injetado imediatamente após a indução de IM experimental em ratos.

Objetivos específicos

1. Avaliar a área de infarto e as variáveis ecocardiográficas (diâmetro diastólico final, diâmetro sistólico final, fração de ejeção, fração de encurtamento) em 14 e 28 dias após IM comparando animais tratados e não tratados;

2. Mensurar os níveis de expressão dos genes TGF- β 1, colágeno I e III, e MMP-2 e os níveis de TGF- β 1 no miocárdio em ambos os grupos.

3. Verificar o silenciamento da expressão de TGF- β 1 no miocárdio após 48 horas do infarto.

4.2. Objetivos do Estudo 2

Objetivo principal

Verificar se a mensuração de troponina-I em 8 horas e/ou a ecocardiografia em 48 horas após infarto são capazes de prever a ocorrência de e estimar a área de infarto após 14 dias analisada por histologia.

Objetivos específicos

1. Mensurar troponina-I 8 horas após indução de infarto e correlacionar com a área de infarto obtida por ecocardiografia 48 horas e 14 dias e histologia 14 dias após infarto.

2. Determinar um ponto de corte para os valores de troponina-I capaz de prever a ocorrência de infarto.

3. Avaliar as variáveis ecocardiográficas em 48 horas e 14 dias após infarto e correlacionar com a área de infarto por histologia em 14 dias.

4. Determinar um ponto de corte para os valores obtidos para área de infarto por ecografia capaz de estimar o tamanho do infarto.

5. Explorar a associação de dados da troponina-I em 8 horas com dados obtidos por ecocardiografia em 48 horas e 14 dias em estimar áreas de infarto confirmada por análise histológica.

5. Artigo 1

Cardiac gene silencing for TGF- β 1 modulation of functional and structural left ventricular remodeling processes post experimental infarction

Abstract

Background: Evidence suggests that transforming growth factor (TGF)- β is a central mediator involved in the inflammatory and fibrotic phase of healing and may critically modulate many cellular steps in post-infarction cardiac repair. Different forms of inhibition of TGF- β activity in animal models of myocardial infarction (MI) showed controversial functional and remodeling effects.

Aim: To evaluate whether TGF- β 1 gene silencing immediately after MI causes changes in cardiac function and/or remodeling evaluated 28 days post-MI.

Methods: Male Wistar rats underwent experimental MI and 5 μ g/100 μ L of shRNA-TGF- β 1 (shRNA, n=14) or empty plasmid (EP, n=14) were injected into the heart muscle below the coronary occlusion point. Cardiac troponin-I (cTnI) levels were measured 8 hours after MI. Echocardiography evaluation was performed in 14 and 28 days. Animals were killed 28 days after surgery and quantitative real-time PCR to TGF- β 1, collagen I and III, and matrix metalloproteinase (MMP)-2 was performed. Heart levels of TGF- β 1 were measured by ELISA. Six animals were killed 48 hours after plasmid injection to confirm TGF- β 1 silencing.

Results: All animals had cTn-I levels above 5.49 ng/dL and mean infarct size was around 36%. There was no difference between shRNA and EP groups in most echocardiographic parameters except for ejection fraction, increased in shRNA group compared to EP at 28 days (p= 0.05). There was no significant difference in gene expression between groups. However, there were trends for increase in collagen III and decrease in collagen I, especially when only the

apical region was considered. At 48 hours, shRNA group had a 2.5 fold reduction in TGF- β 1 expression.

Conclusions: Our results suggest that shRNA treatment has the potential to increase collagen III expression 28 days after MI and ameliorate ejection fraction.

Keywords: TGF- β 1 silencing, shRNA, myocardial infarction, remodeling

Introduction

Congestive heart failure is a prevalent disease that emerged as a leading cause of mortality and morbidity worldwide. Patients with heart failure have a poor prognosis and a high probability to be readmitted to hospital, despite multi-drug treatment [1, 2]. The most common cause of heart failure is myocardial infarction (MI). Myocardial infarction induces remodeling of the left ventricle (LV), characterized by LV dilatation and reduced cardiac performance [3, 4]. This remodeling process involves death or hypertrophy of cardiomyocytes, hyperplasia of cardiac fibroblasts, and the expression of several cytokines. These, in turn, lead to a fibrotic reparative process that extends from the site of infarction [5]. Increased myocardial collagen and abnormal matrix structure result in myocardial stiffness, leading to ventricular systolic and diastolic dysfunction, and is associated with continued disease progression during the chronic stage [6].

Evidence suggests that transforming growth factor (TGF)- β 1 is a central mediator involved in the inflammatory and fibrotic phase of healing and may critically modulate many cellular steps in post-infarction cardiac repair. Activation of TGF- β 1 signaling pathways result in resolution of the inflammatory infiltrate and may be important in suppressing expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the infarcted myocardium [7, 8]. Furthermore, TGF- β 1 regulates fibrous tissue deposition, particularly collagen types I and III, by mediating acquisition of the myofibroblastic phenotype, inducing extracellular matrix protein synthesis, and promoting matrix preservation through increased expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) [6, 8].

Due to its pivotal role in cardiac remodeling after MI, different strategies have been used to suppress TGF- β 1 activity in animal models of MI; however, controversial results have been produced. Franz *et al.* used a blocking antibody against TGF- β 1 resulted in increased mortality and worsen LV remodeling [9]. On the other hand, Ellmers *et al.* showed that a specific inhibitor of TGF- β receptor 1 reduced mean arterial pressure and collagen type I [10]. Okada *et al.*, using a soluble TGF- β type II receptor to competitively inhibit TGF- β 1, showed significant improvement in cardiac function and survival [1]. Such conflicting results may be due to the time-dependent effect of anti-TGF- β 1 treatment, as demonstrated by Ikeuchi *et al.* [11].

Despite their different strategies, all the above mentioned studies used systemic approaches to block TGF- β 1 activity at the protein level. The localized suppression of gene expression can be achieved by small interfering RNA (siRNA) which is a powerful endogenous process initiated by short double stranded RNAs, resulting in sequence-specific posttranscriptional gene silencing [12]. It remains unexplored whether gene silencing targeting TGF- β 1 products may interfere in the cardiac repair process post-MI and consequently affect cardiac function.

In this study, we hypothesized that treatment with a local injection of a plasmid vector carrying short hairpin (sh) RNA for TGF- β 1 immediately after MI would block TGF- β 1 activity and attenuate the development of cardiac hypertrophy and fibrosis after infarction. We then examined the effects of this therapy on gene expression of key molecules involved in ventricular remodeling and studied structural and functional LV changes 28 days post experimental MI.

Methods

Animals

A total of 28 male Wistar rats, 8 week-old, were subjected to experimental MI procedure as described below. All animals were maintained on a 12 hours light-dark cycle receiving water and food *ad libitum*. All procedures were performed according to protocols approved by the institutional research ethics committee, and the present study conforms to the guide for the care and use of laboratory animals.

Experimental myocardial infarction procedure and plasmid injection

Myocardial infarction was induced according to a procedure previously described in the literature and adapted in our laboratory [13]. Briefly, animals were placed in dorsal decubitus position and anesthetized with ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg) administered intraperitoneally. Following the orotracheal intubation, animals were submitted to mechanical ventilation with a Harvard ventilator, Model 683 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) (frequency: 75-80 breaths/min, tidal volume: 2.0 mL) with O₂ supplementation and maintained in a 37°C hot plate. Subsequently, a surgical incision was performed in the skin along the left sternal margin, division of the *pectoralis* and transverse muscles was performed. Thoracotomy was performed at the 2nd intercostal space and the thorax was opened without exteriorization of the heart [13]. The left anterior descending coronary artery was identified and occluded with a 6-0 mononylon suture underneath the left atrial appendage. Immediately after that, 5µg of plasmid (see below) dissolved in 100 µL of saline were

injected into the myocardial in four different positions below the coronary occlusion point using a hypodermic syringe. Next, the thoracic cavity was closed with a 5-0 mononylon thread, muscles were repositioned and the skin sutured. All animals received analgesia after surgical procedure (bupivacaine 1mg/Kg).

Plasmid

The shRNA TGF- β 1 cloned onto pSuper [14] was kindly provided by the group of Professor Michel Weller (Tübingen, Germany). As a control, pSuper without the specific shRNA TGF- β 1 was used (empty plasmid, [EP]). Plasmids were grown in *Escherichia coli* DH5- α , (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and extracted with Maxiprep commercial kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Groups of 14 animals randomly chosen prior to surgery received the plasmid containing TGF- β 1-shRNA (shRNA) or the EP.

Troponin-I measurements

Heparinized blood samples (one milliliter) were collected by retro-orbital plexus puncture 8 hours after surgery under isofluran anesthesia. Animals received subcutaneous saline volume replacement after blood collection. Samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and plasma stored at -80°C. Troponin-I mensuration was performed by automated standard method using electrochemiluminescence immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY, USA). This measurement was performed in a subset of the animals sacrificed 28 days after MI (n=10, five from each group).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed 14 and 28 days after MI, as described previously [13]. Animals were placed in left lateral decubitus position (45° angle) to obtain cardiac images under sedation. An EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), with a 12–13 MHz transducer was used at 2 cm depth with fundamental and harmonic imaging. Images were captured by an operator blinded to study groups.

Left ventricular dimensions

Left ventricular (LV) diastolic and systolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at papillary muscle level), and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity). Diastolic and systolic diameters (cm) were measured using the M-Mode in the previously described three planes. Final value for each animal was obtained considering the average of all three planes.

Myocardial infarction size

On each echocardiographic transverse plane (basal, middle and apical) the arch corresponding to the segments with infarction (regions or segments of the myocardium showing one the following changes in myocardial kinetics: systolic movement akinesis and/or hypokinesis region — AHR) and the total endocardial perimeter (EP) were measured at end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as $\%IS = (AHR/EP) \times 100$ [15].

LV systolic function

Left ventricular ejection fraction was calculated as: (end diastolic volume–end-systolic volume/ end-diastolic volume) x 100; end-diastolic and end-systolic cavity volumes were calculated using Simpson's rule [16]. Left ventricular fractional shortening (LVFS) values were obtained by using the following equation: $LVFS = \frac{DD-SD}{DD} \times 100$ (diastolic diameter — DD; systolic diameter — SD) [15]. Fractional shortening was calculated as $[(LVEDD/LVESD)/LVEDD] \times 100$ [17].

Heart harvesting

A small group of animals (n=6, three from each group) was killed 48 hours after MI to determine the efficiency of gene silencing. The other 22 animals were killed after 28 days. Heart dissection was quickly performed on cold saline after anesthesia with ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg). Next, three sections of LV (apex, middle and base) were cut in the borderline of MI and stabilized using RNAlater® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or immediately snap frozen in liquid nitrogen to determine tissue TGF-β1 concentration.

Quantitative real-time PCR analysis

RNA was extracted using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using 3 μg of RNA with Oligo (dT) 12-18 primer, using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Quantitative real-time PCR analysis was performed on selected genes (TGF- β 1, Collagen type I and III, matrix metalloproteinase (MMP)-2) and normalized to β -actin. Primer sequences are given in Table 1. PCRs were performed using Mycoplasma Kit-Sybr Green (LGC Biotechnology, Cotia, SP, Brazil) on an MxPro 3000p (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at 60°C annealing temperature.

Table 1. Primer sequences for quantitative real-time PCR.

mRNA	Primers	
	Forward	Reverse
TGF-β1	GGACCTGGGTTGGAAGTGGAT	TGTGTCCAGGCTCCAAATATAGG
Collagen-I	CTGGTCCTCGTGGTCTCCCTG	GGAGATGATGGGGAAGCTGG
Collagen-III	CTGGTGAGCGAGGACGACCAGG	CCCCTGGCTCAAATGGCTC
MMP-2	CCTTGACCAGAACACCATCG	CCTGAAACCGTGGATGATGC
ACT	CAAGATCATTGCTCCTCCTGAG	GACTCATCGTACTCCTGCTTGC

TGF- β 1= transforming growth factor b1; MMP-2 =matrix metalloproteinase 2; ACT= β Actin.

Heart levels of TGF- 1

Heart levels of TGF- β 1 28 days after MI were measured in non-infarcted areas, as previously described [18, 19]. Briefly, tissue from non-infarcted area was separated in apical and middle areas and homogenized separately in PBS containing 1% Triton and Complete TM Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) in a proportion of 1mL of buffer for 100 mg of tissue. Next, homogenized samples were centrifuged at 3220 x g for 15 min at 4°C. Supernatants were collected and 60 μ L were separated and

used for TGF- β 1 determination by ELISA (Quantikine TGF- β 1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), following the manufacturer's instructions. Protein content was measured by the Bradford assay and results were expressed as pg TGF- β 1/mg protein.

Statistical analysis

Quantitative evaluations were analyzed using the Software Package for Statistical Science (SPSS) (SPSS for Windows; Version 16, SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Variable distribution was tested using Shapiro-Wilk. Data were expressed as mean \pm SD (for normal distribution data) or median, 25 and 75 percentile and 95% confidence interval. Correlation data were analyzed using Pearson correlation. The comparison between groups was performed primarily by the interaction test and secondarily by Student's *t* test or Mann Whitney test. Data with *p* values \leq 0.05 were considered statistically significant.

Results

Infarct characterization

No deaths occurred during the experimental period (28 days). Infarct size in the control group was $37\pm 13\%$ 14 days after MI and $36\pm 14\%$ 28 days after MI. Ejection fraction was $47\pm 13\%$ in 14 days and $41\pm 14\%$ in 28 days, whereas shortening fraction was $21\pm 9\%$ and $18\pm 10\%$, respectively.

Infarct size was correlated with cTnI levels measured 8 hours post MI ($58\pm 28\text{ng/mL}$). In the control group (EP), a strong correlation with cTnI was obtained both for 14 days echocardiography data ($p= 0.01$, $r^2= 0.9$) as for 28 days echocardiography data ($p= 0.007$, $r^2= 0.937$), as shown in Figure 1.

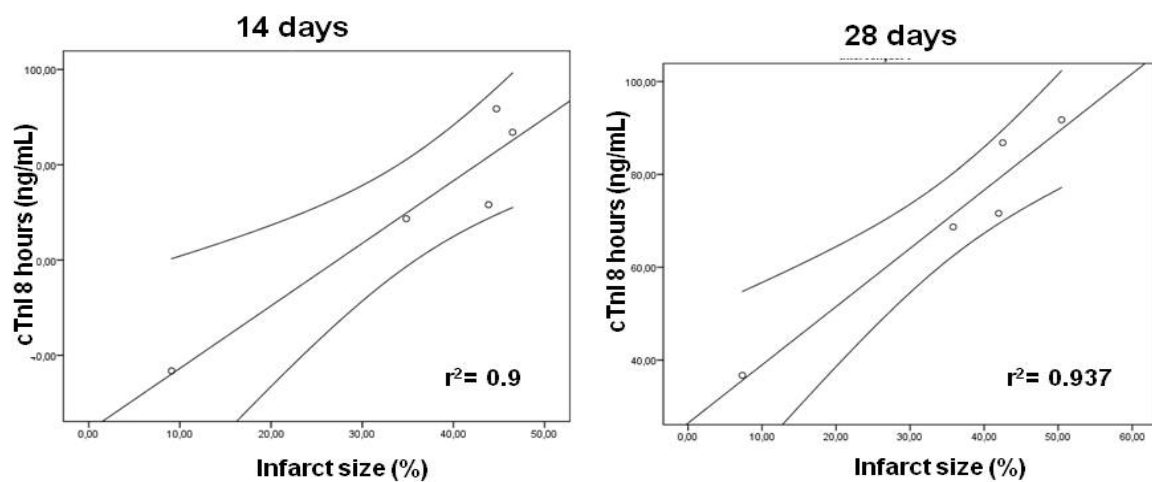


Figure 1. Correlation between cTnI and infarct size in the empty plasmid group by echocardiography assessment. $p = 0.01$ and 0.007 for 14 and 28 days, respectively. Pearson correlation test.

Effects of TGF- 1 silencing

Troponin I levels

All animals had cTn-I levels above 5.49 ng/dL, thus confirming that occlusion of left anterior descending coronary artery was effective in inducing MI (Vietta et al., unpublished). There was no difference in mean cTnI values measured 8 hours after MI between groups treated with shRNA or EP (51.2 ± 36.4 ng/dL vs. 58.06 ± 28 ng/dL, $p= 0.72$).

Echocardiography data

Echocardiography was performed 14 and 28 days after MI in both EP and the shRNA treated animals. Infarct area was $31 \pm 12\%$ at 14 days after MI and $36 \pm 12\%$ at 28 days after MI in the shRNA group. There was no difference between shRNA treatment and EP in most echocardiographic parameters (Table 2). The exception were ejection fraction, that was higher in shRNA group compared to EP at 28 days ($p= 0.05$), and systolic diameter that increased at 28 days in both groups compared to the 14 days assessment.

Table 2. Cardiac function in rats 14 and 28 days post-MI, with or without treatment with TGF- β 1-shRNA.

	14 days		28 days	
	EP	shRNA	EP	shRNA
N	11	11	11	11
Infarcted area %	36.50 \pm 12.73	30.41 \pm 12.12	36.37 \pm 14.47	35.58 \pm 11.66
Systolic diameter, cm	0.63 \pm 0.03	0.65 \pm 0,06	0.68 \pm 0.05	0.67 \pm 0.03
Diastolic diameter, cm	0.50 \pm 0.08	0.50 \pm 0.09	0.75 \pm 0.13 [#]	0.71 \pm 0.10 [#]
Ejection fraction, %	42.01 \pm 10.76	45.76 \pm 11.14	38.06 \pm 11.08	47.10 \pm 9.01 [*]
Left ventricular FS, %	20.58 \pm 9.12	23.60 \pm 9.30	17.70 \pm 9.63	20.16 \pm 8.08

t Test - Independent Samples, Assuming Unequal Variances. EP = empty plasmid; FS= fractional shortening. [#] Significantly different from EP and shRNA, respectively at 14 days. ^{*} Significantly different from EP at 28 days.

Collagen type I and III and MMP 2 expression

Gene expression analysis of TGF- β 1 target genes showed no significant difference between groups when the average of all three heart areas was considered (Figure 2). However, there was a trend for increase in collagen III and for a decrease in collagen I in treated animals, especially when only the apical region was considered (p=0.06).

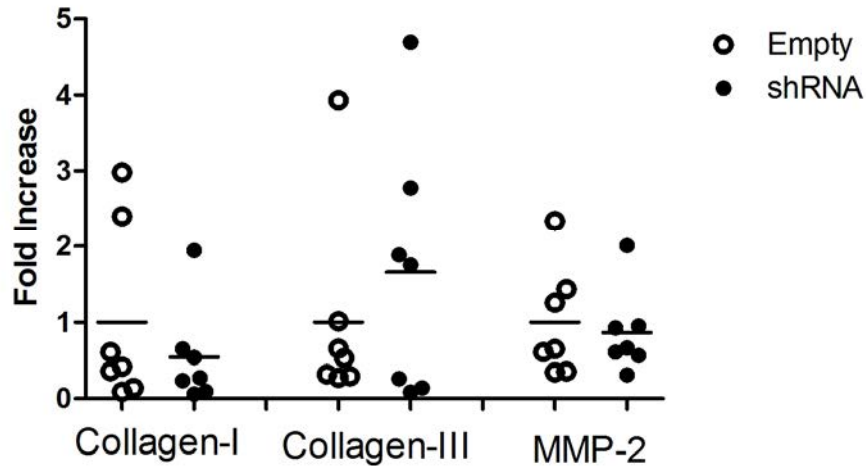


Figure 2. Cardiac gene expression of collagen I, collagen III, and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in rats 28 days after MI. Horizontal bar represents mean. Values were normalized against EP group. $p=NS$, Mann-Whitney Test to mean value of basal, medial and apical gene expression.

Gene Expression and protein levels of TGF- β 1

Transforming growth factor - β 1 gene expression analysis showed a 30% reduction in shRNA treated group at the end of experimental period when compared to EP group (Figure 3A), although this difference was not statistically significant. In addition, myocardial TGF- β 1 concentration was not different between shRNA treatment and EP (135.56 ± 62.64 pg/mg vs 118.06 ± 31.86 pg/mg, $p=0.39$).

Since this lack of difference could be due to gene deliver problems, a small group of six animals was submitted to MI and sacrificed 48 hours later. In the three animals receiving TGF- β 1-shRNA, a 2.5 fold decrease in TGF- β 1 expression was detected ($p=0.05$), as shown in Figure 3B.

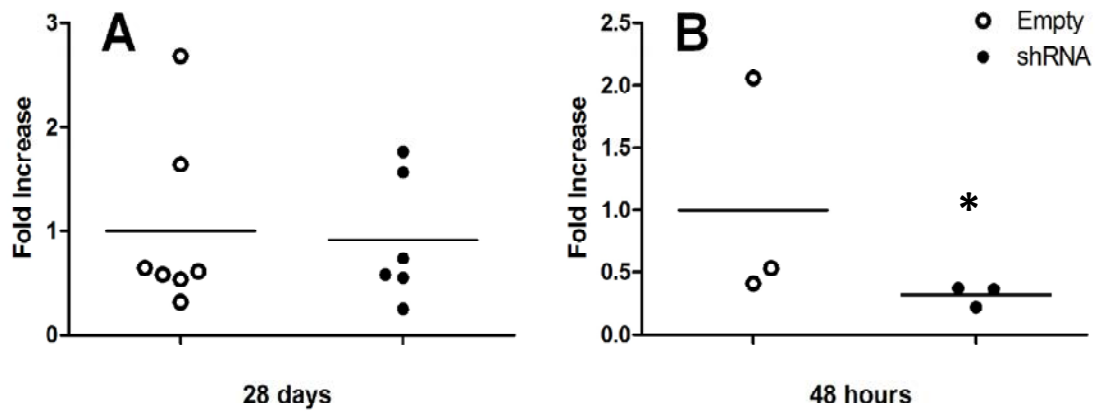


Figure 3. Cardiac gene expression of TGF- β 1 in rats after myocardial infarction. A - 28 days after myocardial infarction. B- 48 hours after myocardial infarction. Horizontal bar represents mean. Values were normalized against EP group at 48 hours and 28 days, respectively. * $p=0.05$, Mann-Whitney Test for mean value of basal, medial and apical gene expression.

DISCUSSION

In the present study, the effects of silencing TGF- β 1 immediately post-cardiac insult were evaluated 48 hours and 28 days post-MI in male Wistar rats. Within this time-frame we were able to show no major differences in echocardiographic parameters comparing animals treated with and without shRNA TGF- β 1, although LV ejection fraction was slightly, but significantly, increased in the treated group. Similarly, no major changes in tissue-related components of LV remodeling were seen, but trends to changes in the collagen type I/III ratio in the apical region were observed by using shRNA for TGF- β 1.

Our MI experimental model was modified compared to traditional techniques [20, 21], allowing shorter surgery duration and faster mechanical ventilation weaning, possibly contributing to a low mortality rate [13]. Nonetheless, we were able to obtain moderate to severe infarct sizes, similar to those reported by Frantz et al. and Okada et al. [1, 9].

Cardiac troponin I was measured 8 hours after MI as a surrogate marker for infarct size, to ensure that both shRNA and EP groups had comparable infarct sizes at the beginning of the study. Strong correlation was obtained in EP group both for 14 days echocardiography data as for 28 days echocardiography data. Other groups have demonstrated that cTnI can be a useful predictor of infarct size [22, 23]. Another study from our group showed that cTnI assessed at 8 hours post MI can be used to confirm occurrence of MI and together with echocardiography assessment, to estimate infarct size by histology (Vietta et al., unpublished).

Silencing of TGF- β 1 by shRNA did not alter most echocardiographic parameters in treated animals. The only exception was for ejection fraction that was higher in shRNA group than in EP group. The effect of shRNA on ejection fraction, however, was not correlated to a change in infarcted area. Myocardial infarction causes local and remote changes in cardiac structure, wall stress and hemodynamics that are dynamic in nature [24]. In turn, it is well known that a number of cellular, molecular and oxidative changes occurring post-ischemic injury may influence cardiac remodeling and thus, cardiac function post-MI [25]. The time-line of changes in cardiac function post-MI could have been disrupted by the early (concomitant to MI procedure) TGF- β 1 silencing in this experimental design. In other words, the relatively well preserved, or even slightly increased ejection fraction seen at the end of the experimental observational period, may indicate re-adaptation to changes in structure potentially influenced by transient effects of TGF- β 1 silencing very early in the ischemic event. Alternatively, the different pattern in ejection fraction observed may be due to the incapacity of animals from the EP group to recuperate cardiac function later on due to ongoing cellular and inflammatory mechanisms-TGF- β 1 related.

In order to evaluate the effects of TGF- β 1 silencing, downstream target genes known to be modulated by TGF- β 1 during post-MI healing process were studied. However, no effect on selected target genes collagen type I and III and MMP-2 could be shown after 28 days. In spite of that, the expression of collagen type III showed trends to increase and of collagen type I to decrease in the apical region. Accordingly, it is possible that TGF- β 1 early gene silencing may have caused transient changes in collagen and other matrix components

early on that were compensated later on, at 28 days. Therefore, as only a small difference in ejection fraction was observed in echocardiography data, it is not surprising that expression of these genes were also not altered in treated animals. The trend for increase in collagen type III expression may suggest a delay in the remodeling process. Nonetheless, previous studies have shown that collagen type III expression usually peaks up relatively late post-MI (second to fourth week post-MI) [26], which may have allowed “collagen type III-sparing” from TGF- β 1 early gene silencing protocol.

In addition, no difference was observed in total ventricular gene expression for TGF- β 1 between groups 28 days after MI. This is consistent with other studies that have shown that TGF- β 1 expression is regulated temporally after infarction, peaking immediately after MI and then reducing over time [10, 27]. This also helps to explain why we have not detected any difference in TGF- β 1 tissue levels after 28 days. However, we observed a 2.5 time reduction in shRNA group after 48 hours, compared to EP group. This reduction confirms that transfection was effective and that shRNA was being properly expressed.

Transforming growth factor- β 1 activity has been linked to a broad spectrum of biological actions including cellular growth, proliferation, and differentiation [28]. It has a central role in the inflammatory and fibrotic response necessary for post-MI repair. However, it is also a key mediator of the pathological fibrotic and hypertrophic remodeling [7, 8, 29, 30]. It is possible that the lack of positive results in our study is related to the moment in which TGF- β 1 expression was suppressed. In fact, Ikeuchi et al. were the first to show a time-dependent effect of anti-TGF- β 1 treatment. When mice were injected with a plasmid expressing the extracellular domain of TGF- β type II receptor 7 days

before coronary ligation, it increased mortality during 24 h after MI, as well as exacerbated LV dilatation and contractile dysfunction. When injections occurred at the day of surgery or 7 days later, LV dilatation and contractile dysfunction were prevented [11]. Franz et al. used a blocking antibody against TGF- β 1 one week before or five days after coronary artery ligation in mice and observed a decrease in collagen production and an increase in MMP expression. However, in both groups, anti-TGF- β treatment increased mortality and worsened LV remodeling [9]. On the other hand, Ellmers et al. showed that a specific inhibitor of TGF- β receptor 1, given orally for 30 days after infarction, reduced mean arterial pressure and significantly decreased collagen I, as well as cardiac mass [10]. Similarly, Okada et al. (2005), using a soluble TGF- β type II receptor to competitively inhibit TGF- β given 3 days after MI showed significantly improved cardiac function and survival, and attenuation of ventricular dilatation and remodeling after 4 weeks [1].

Unlike the previous studies mentioned above, we used shRNA methodology to examine the cardiac effects of *in situ* TGF- β 1 gene inhibition. Silencing of TGF- β 1 by RNA interference has been shown in liver fibrosis [31], renal allograft fibrosis [32], and to induce antitumor immunity [33], for example. In the current study we used a direct gene transfer with naked plasmid DNA via intramyocardial injection of plasmid encoding TGF- β 1-shRNA. It has been previously demonstrated that muscle cells are able to uptake free DNA [34, 35]; in addition, naked plasmid injection in myocardial muscle has been used both in animal models [35, 36] and in human protocols [37, 38]. Our current observation that the plasmid was effective to reduce TGF- β 1 gene expression 48 hours after injection confirms the usefulness of this procedure.

On the other hand, it is possible that, given the infarct size obtained by left anterior descending coronary artery ligation, this level of down regulation in gene expression, at this time-point (concomitant with MI procedure), was not sufficient to show any effect in downstream genes or a benefit in cardiac remodeling after 28 days. In addition, since in this model, gene silencing depends on plasmid expression, we speculate that cell death occurring immediately after injection may have further decreased silencing efficiency. This is an important difference regarding the experiments of Okada et al., Franz et al., and Ellmers et al. [1, 9, 10].

Our data should be viewed considering study limitations which include the use of a single plasmid dose at only one time-point. Also, the endpoints were evaluated only 28 days later, and, since shRNA silencing is transitory, differential effects could have been observed at intermediate time points. Furthermore, the aggregation of hemodynamic parameters, to echocardiography assessment, could have helped to clarify changes in other cardiac function parameters, including more subtle systolic and diastolic indices, in the treated group.

In conclusion, the results presented in the current study indicate that shRNA treatment may have the potential to increase collagen type III expression 28 days after MI and ameliorate ejection fraction. Further evaluation of the temporal changes in cardiac remodeling using shRNA for TGF- β is warranted in order to allow more efficient gene silencing strategies, such as repeated plasmid injections, increased plasmid concentration or the use of multi-gene RNA silencing.

References

1. Okada, H., et al., *Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure*. *Circulation*, 2005. **111**(19): p. 2430-7.
2. Stukel, T.A., et al., *Association of hospital spending intensity with mortality and readmission rates in Ontario hospitals*. *JAMA*, 2012. **307**(10): p. 1037-45.
3. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. *Med Clin North Am*, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
4. Bauersachs, J. and J.D. Widder, *Endothelial dysfunction in heart failure*. *Pharmacol Rep*, 2008. **60**(1): p. 119-26.
5. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *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*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
6. Brown, R.D., et al., *Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(1): p. 200-5.
7. Stavropoulou, A., et al., *uPA, uPAR and TGFbeta expression during early and late post myocardial infarction period in rat myocardium*. *In Vivo*, 2010. **24**(5): p. 647-52.
8. Schiller, M., D. Javelaud, and A. Mauviel, *TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing*. *J Dermatol Sci*, 2004. **35**(2): p. 83-92.

9. Frantz, S., et al., *Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 485-92.
10. Ellmers, L.J., et al., *Transforming growth factor-beta blockade down-regulates the renin-angiotensin system and modifies cardiac remodeling after myocardial infarction*. Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5828-34.
11. Ikeuchi, M., et al., *Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(3): p. 526-35.
12. Wullner, U., et al., *Targeted delivery of short interfering RNAs--strategies for in vivo delivery*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2009. **4**(1): p. 1-8.
13. Tavares, A.M., et al., *Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction*. Life Sci, 2010. **87**(23-26): p. 699-706.
14. Friese, M.A., et al., *RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7596-603.
15. Peron, A.P., et al., *Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure*. Arq Bras Cardiol., 2006. **86**: p. 105-112.
16. Mercier, J., *Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children*. Circulation, 1982. **65**: p. 962-969.

17. Moises, V.A., et al., *Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography.* Arq Bras Cardiol, 2000. **75**(2): p. 125-36.
18. Sun, Y., et al., *Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart.* J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(8): p. 1559-69.
19. Zhang, M.L., et al., *Effects of therapy using the Celacade system on structural and functional cardiac remodelling in rats following myocardial infarction.* Can J Cardiol, 2009. **25**(7): p. e241-7.
20. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats.* Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 291-300.
21. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats.* Circ Res, 1979. **44**(4): p. 503-12.
22. Metzler, B., et al., *Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction.* Clin Chim Acta, 2002. **325**(1-2): p. 87-90.
23. Jiang, B.H., et al., *Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction.* Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(3): p. e85-9.
24. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.* Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.

25. Khaper, N., et al., *Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(7): p. 1033-49.
26. Deten, A., et al., *Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(6): p. 1191-207.
27. Sun, Y., et al., *Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats*. *J Lab Clin Med*, 2000. **135**(4): p. 316-23.
28. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.
29. Lijnen, P.J., V.V. Petrov, and R.H. Fagard, *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)*. *Mol Genet Metab*, 2000. **71**(1-2): p. 418-35.
30. Behnes, M., et al., *Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) in atrial fibrillation and acute congestive heart failure*. *Clin Res Cardiol*, 2011. **100**(4): p. 335-42.
31. Cheng, K., N. Yang, and R.I. Mahato, *TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis*. *Mol Pharm*, 2009. **6**(3): p. 772-9.
32. Yin, Z., et al., *Effects of silencing transforming growth factor-beta1 by RNA interference plasmid on rat renal allograft fibrosis using Smads pathway*. *Urology*, 2011. **77**(3): p. 762 e1-7.
33. Conroy, H., et al., *Gene silencing of TGF-beta1 enhances antitumor immunity induced with a dendritic cell vaccine by reducing tumor-associated regulatory T cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(3): p. 425-31.

34. Alexander, M.Y., et al., *Gene transfer and models of gene therapy for the myocardium*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(9): p. 661-8.
35. Sundararaman, S., et al., *Plasmid-based transient human stromal cell-derived factor-1 gene transfer improves cardiac function in chronic heart failure*. Gene Ther, 2011. **18**(9): p. 867-73.
36. Rastogi, S., et al., *Myocardial transfection with naked DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents the progression of heart failure in dogs*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1501-9.
37. Tio, R.A., et al., *Functional characteristics of coronary vasomotor function following intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding for vascular endothelial growth factor165*. Endothelium, 2005. **12**(3): p. 103-6.
38. Huwer, H., et al., *Simultaneous surgical revascularization and angiogenic gene therapy in diffuse coronary artery disease*. Eur J Cardiothorac Surg, 2001. **20**(6): p. 1128-34.

6. Artigo 2

Early use of cardiac troponin-I and echocardiography imaging for prediction of myocardial infarction size in an experimental model

Abstract

Background: Non-invasive approaches to early estimate myocardial infarct (MI) area include plasma injury markers and echocardiography imaging. However, early non-invasive evaluation of myocardial infarct size in animal models and its relation to the real infarct area by histology remains challenging.

Aim: To assess whether cardiac troponin-I (cTnI) collected 8 hours after MI and echocardiographic parameters assessed 48 hours after MI can predict occurrence of and infarct size at 14 day post-MI.

Methods: Male Wistar rats, 8 week-old, were subjected to MI ($n=39$) or sham surgery ($n=12$) procedure. cTnI levels were measured 8 hours after MI. Echocardiography evaluation was performed in 48 hours and in 14 days. Animals were killed 14 days after procedure and hearts were removed, dissected and paraffin-blocked. Histology analysis was performed using Sirius red staining.

Results: cTnI plasma levels were considerably increased in the MI group when compared to the sham group (22.8 ± 13.3 ng/mL vs. 1.5 ± 1.7 ng/mL). Infarct areas by echocardiography in 48 hours and in 14 days were $28.4\% \pm 16.2$ and $26.2\% \pm 16.5$, respectively, whereas by histology we observed $16.9\% \pm 8.5$. There was a positive correlation between cTnI levels and infarct size assessed by either echocardiography or histology. Also, echocardiographic infarct size at 48 hours after MI correlated well with infarct size assessed by histology 14 days post MI. A cutoff value for cTnI of 5.49 ng/mL predicted MI, as well as echocardiographic detection of akinesia higher than 1.97% in 48 hours. Echocardiographic imaging at 48 hours was useful to discriminate small from medium/large MI areas.

Conclusions: We found that a cutoff value for cTnI of 5.49 ng/mL could be used to accurately predict infarct in this model, whereas echocardiography images taken 48 hours after MI predicted infarcted area 14 days after the experimental procedure.

Keywords: Experimental infarction, troponin-I, infarct area, echocardiography

Introduction

Transmural myocardial infarction (MI) is a pivotal event that triggers adverse ventricular remodeling, which includes cardiomyocyte loss, extracellular matrix deposition and fibroblast growth [1, 2]. This remodeling process may lead to ventricular dysfunction and eventually to a congestive heart failure [1].

Currently, both rat and mice MI model generated through left anterior descending coronary ligation are the most frequently used preclinical methods causing heart failure, allowing testing of therapeutic interventions [3, 4]. This experimental model is simple, economical and widespread in the literature. However, limitation mainly concerning the variability of the resultant infarct sizes, ranging from 8 to 65%, severely limits the use of this technique, especially when anti-remodeling therapies are studied [5]. Since infarct size is a major determinant of ventricular remodeling, it must be carefully estimated before starting a potential intervention, in order to avoid attributing to the intervention any beneficial effect that may be related to the model intrinsic variability in infarct area, *a priori*.

The gold standard assay to evaluate infarct size is histological analysis, which, necessarily, can only be performed at the end of the experimental protocol. Non-invasive approaches to evaluate infarct area as early as possible include plasma injury markers and echocardiography imaging. Both were shown to successfully predict final ventricular remodeling parameters when assessed from 24 hours to 5 days after MI in humans [6, 7]. However, early non-invasive evaluation of MI size in animal models and its relation to the histology data found *post mortem* remains unexplored. Therefore, the purpose of the present study was

to evaluate whether cardiac troponin-I (cTnI) collected 8 hours after MI and echocardiographic parameters collected 48 hours after MI can predict the occurrence of and infarct size at 14 days post-MI.

Methods

Animals

A total of 51 rats (male Wistar, 8 week-old) were subjected to MI ($n=39$) or sham surgery ($n=12$) as described below. All animals were maintained on a 12 hours light-dark cycle receiving water and food *ad libitum*. All procedures were performed according to protocols approved by the institutional committee, and the present study conforms to the guide for the care and use of laboratory animals.

Myocardial infarction and sham procedures

Myocardial infarction was induced according to a procedure previously described in the literature and adapted in our laboratory [8]. Briefly, animals were placed in dorsal decubitus position and anesthetized with ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg) administered intraperitoneally. Following the orotracheal intubation, animals were submitted to mechanical ventilation with a Harvard ventilator, Model 683 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) (frequency: 75-80 breaths/min, tidal volume: 2.0 mL) with O₂ supplementation and maintained in a 37°C hot plate. Subsequently, a surgical incision was performed in the skin along the left sternal margin, division of the pectoralis and transverse muscles was performed. Thoracotomy was performed at the 2nd intercostal space and the thorax was opened without exteriorization of the heart [8]. The left anterior descending coronary artery was identified and occluded with a 6-0 mononylon suture underneath the left atrial appendage. Next, the thoracic cavity was closed with a 5-0 mononylon thread, muscles were repositioned and the skin sutured. The sham

group was also submitted to thoracotomy without ligation of coronary artery. All animals received analgesia after surgical procedure (bupivacaine 1mg/Kg).

Troponin-I measurements

Heparinized blood samples (one mL) were collected by retro-orbital plexus puncture 8 hours after surgery under isofluran anesthesia. Animals received subcutaneous saline volume replacement after blood collection. Samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and plasma stored at -80°C. The cTn-I mensuration was performed by automated standard method using electrochemiluminescence immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY, USA).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed 48 hours and 14 days after MI, as previously described [8]. Animals were placed in left lateral decubitus position (45° angle) to obtain cardiac images under sedation. An EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), with a 12–13 MHz transducer was used at 2 cm depth with fundamental and harmonic imaging. Images were captured by an operator blinded to study groups.

Left ventricular dimensions

Left ventricular (LV) diastolic and systolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at papillary muscle level), and apical (distal from the

papillary muscle but before the final curve cavity). Diastolic and systolic diameters (cm) were measured using the M-Mode in the previously described three planes. Final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes.

Myocardial infarction size

On each echocardiographic transverse plane (basal, middle and apical) the arch corresponding to the segments with infarction (regions or segments of the myocardium showing one the following changes in myocardial kinetics: systolic movement akinesis and/or hypokinesis region — AHR) and the total endocardial perimeter (EP) were measured at end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as $\%IS = (AHR/EP) \times 100$ [9].

Left ventricular systolic function

Left ventricular ejection fraction was calculated as: (end diastolic volume–end-systolic volume/ end-diastolic volume) x 100; end-diastolic and end-systolic cavity volumes were calculated using Simpson's rule [10]. Left ventricular fractional shortening (LVFS) values were obtained by using the following equation: $LVFS = DD-SD/DD \times 100$ (diastolic diameter — DD; systolic diameter — SD). Fractional shortening was calculated as $[(LVEDD/LVESD)/LVEDD] \times 100$ [11].

Heart harvesting

The 51 animals were killed after 14 days. Heart dissection was quickly performed on cold saline after anesthesia with Ketamine (100mg/kg) and Xylazine

(10mg/kg). The hearts were removed, dissected, formalin-fixed and paraffin-blocked.

Morphometric and histological measurements

Histopathological studies were performed using Sirius red staining (Direct Red 80, Sigma Aldrich). Sections were photographed using Q Capture Pro Software v. 5.1.1.14 (Q Imaging Co. Burnaby, BC, Canada). For each area of the heart (basal, medial, and apical), five partial photos were obtained (10-fold magnification) to construct the whole image of the heart section using the software Adobe Photoshop CS2 v.9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA). The red staining area indicated infarcted zone and green staining area indicated healthy zone. A pixel value was obtained for each zone and the ratio of infarcted zone pixel to total pixel indicates the percentage of infarction. Values represent the mean value among basal, medial, and apical areas. To predict infarct area the sample were divided into tertiles according to infarct size by 14 days histology (small MI < 15.26%, moderate MI ≥ 15.26 to 21.16%, and large MI $\geq 21.16\%$).

Statistical analysis

Quantitative evaluations were analyzed using the Software Package for Statistical Science (SPSS) (SPSS for Windows; Version 16, SPSS Inc.; Chicago, IL). Variable distribution was tested using Shapiro-Wilk and Spearman correlation was applied when required. Mean comparison were made using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc analysis. Data are expressed as mean \pm SD. Receiver operator curves (ROC) were constructed to determine significant cutoffs

for the diagnosis of MI, assessed by histology. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were also determined. Significant differences were considered at a p value ≤ 0.05 .

Results

Infarct characterization

Plasma cTnl Levels

Plasma troponin levels 8 hours post-MI were markedly increased in MI group when compared to sham group (22.8 ± 13.3 ng/mL vs. 1.5 ± 1.7 ng/mL), as showed in Figure 1.

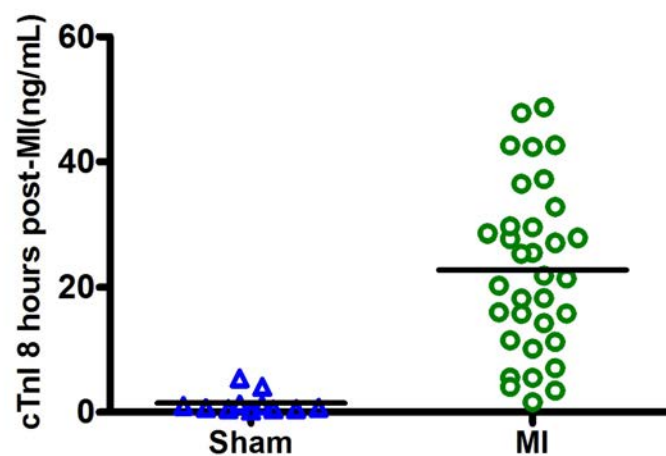


Figure 1. Plasma cTnl levels 8 hours after myocardial infarction induction procedure. MI = myocardial infarction. Horizontal bar represents mean. *t* Test, $p=0.001$.

Echocardiographic and histology analyses

As assessed by echocardiography imaging, infarction size averaged $28.4 \pm 16.2\%$ and $26.2 \pm 16.5\%$, 48 hours and 14 days after MI, respectively. Infarction size had an average of $16.9 \pm 8.5\%$ when assessed by Sirius Red

histology analysis 14 days post-MI (Figure 2). Other echocardiographic data are expressed in Table 1.

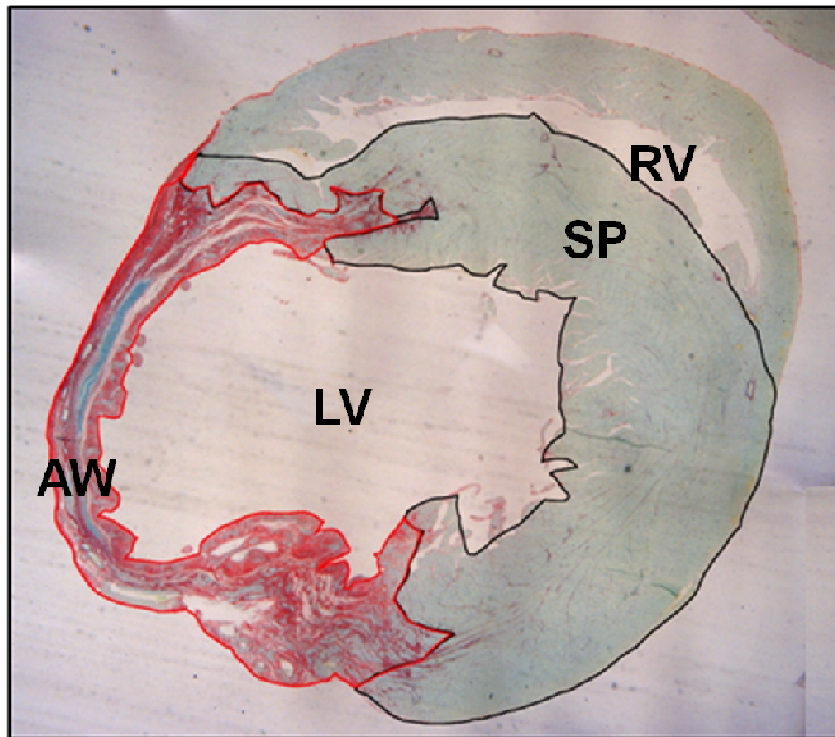


Figure 2. Sirius Red histology 14 days post-myocardial infarction. Illustrative photomicrograph of an infarcted heart, showing the apical region with the fibrotic tissue (red stain) and the normal myocardium tissue (green). Red line= LV infarcted region; black line= LV health tissue. AW= anterior wall, LV= left ventricle, SP= septum, RV= right ventricle.

Table 1. Cardiac function in rats 48 hours and 14 days post-MI, with or without MI.

	48 hours		14 days	
	SHAM	MI	SHAM	MI
N	8	36	8	36
Infarct area, %	0	28.4±16.2	0	26.2±16.5
Ejection fraction, %	80.3±3.2	55.1±15.3*	73.8±6.3	46.2±18.8 [#]
Left ventricular FS, %	51.9±5.4	27.5 ±12.1*	53.1±8.4	26.4±14.6 [#]

Values expressed mean ± SD. FS= fractional shortening. * Significantly different from SHAM at 48 hours (*t* test, $p < 0.001$). [#] Significantly different from SHAM at 14 days (*t* test, $p < 0.001$).

Correlation between plasma cTnl levels 8 hours post-MI and infarction size

Plasma cTnl 8 hours post-MI concentration correlated well with echocardiography measurements of infarction size at 14 days after MI ($r=0.49$, $p=0.003$) (Figure 3A). Also, plasma cTnl levels were correlated to histological assessment of infarction area ($r=0.66$, $p < 0.001$) (Figure 3B).

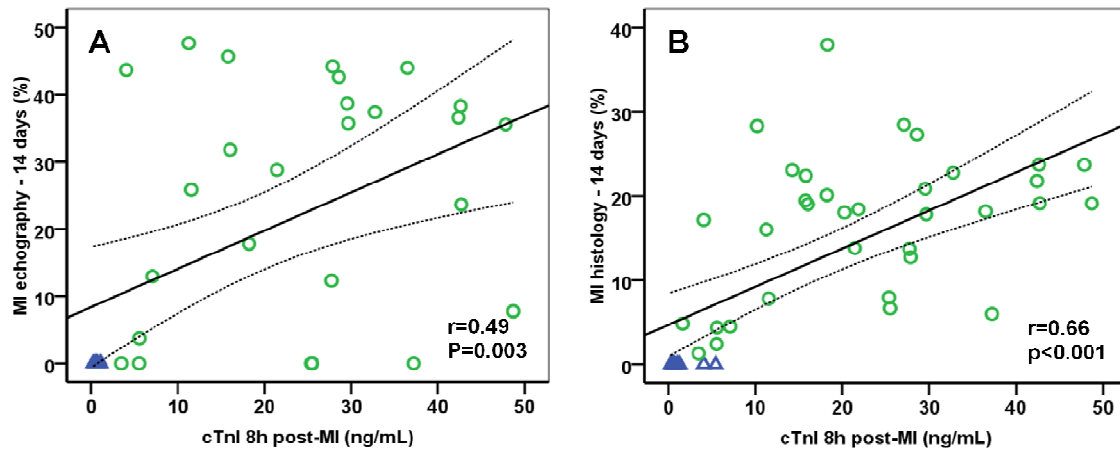


Figure 3. Correlation between plasma cTnI levels and infarction areas. A – cTnI levels vs. echocardiographic infarct size at 14 days after MI (n=33); **B -** cTnI levels vs. histology infarct size at 14 days after MI. Δ Sham; \circ MI. MI = myocardial infarction.

Correlation between infarction size assessed by echocardiography and histology

There was a strong positive correlation among echocardiography evaluation 48 hours and 14 days post-MI procedure with histological measurements ($r=0.85$, $p<0.001$; $r=0.86$, $p<0.001$; respectively) (Figure 4A and B).

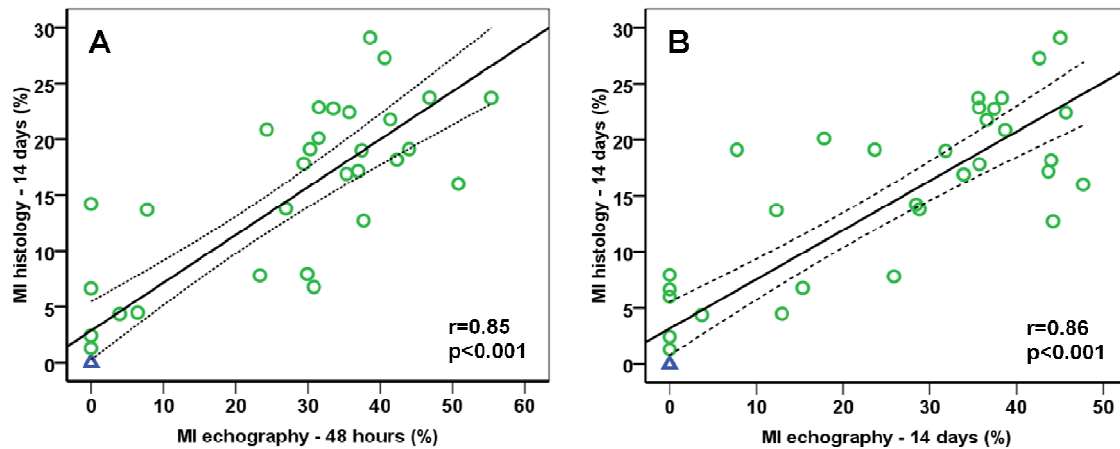


Figure 4. Correlation between echocardiography and histology. A - Relation between echocardiography assessment at 48 hours and mean histology infarct size; **B** - Relation between echocardiography assessment at 14 days and mean histology infarct size. Δ Sham; \circ myocardial infarction.

Predictive value of cTnI at 8 hours and echocardiography imaging at 48 hours

A receiver operator curve analysis was performed with cTnI levels 8 hours and echocardiographic data 48 hours post-MI in order to determine a predictive cutoff value for the occurrence of myocardial infarction (Figure 5).

We found that plasma cTnI levels higher than 5.49 ng/mL predicted infarction by echocardiography with a sensitivity of 94% and specificity of 100%. (Figure 5A). Infarction size, evaluated 48 hours by echocardiographic imaging, higher than 1.97% predicted infarction with a sensitivity of 86.7% and specificity of 100% (Figure 5B). The predictive values are described in Table 2.

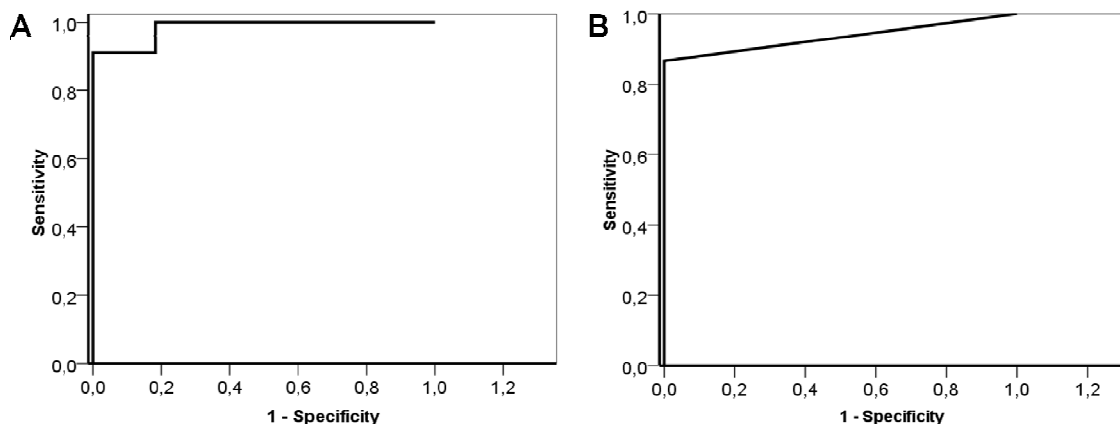


Figure 5. Receiver operating curve for the prediction of MI by histology according to cTn levels at 8 hours post-MI and echocardiography at 48 hours post-MI. A- Analysis for the sensitivity and specificity of cTnI at 8 hours (area under the curve = 0.989, $p < 0.001$) to predict infarct size at 14 days; **B-** Analysis for the sensitivity and specificity of echocardiography performed at 48 hours (area under the curve = 0.933, $p < 0.001$) to predict infarct size at 14 days. MI = myocardial infarction.

Table 2. Predictive values of plasma cTnI levels and echocardiography 48 hours post-MI.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
cTnI (5.49 ng/mL)	94	100	100	73
Echo 48h (1.97%)	86.7	100	94.1	100

cTnI - Troponin-I; Echo 48h- Echocardiography 48 hours; PPV - positive predictive value; NPV - negative predictive value.

In order to clarify whether plasma cTnI at 8 hours and echocardiography imaging 48 hours post MI were useful for predicting infarction area (small, medium and large MIs) 14 days after MI, values obtained by the two techniques were grouped according to the histological infarct size (Figure 6). As can be seen in Figure 6 B and C, both echocardiographic imaging at 48 hours and 14 days, but not plasma cTnI at 8 hours, were useful for discriminating small from medium/large infarctions

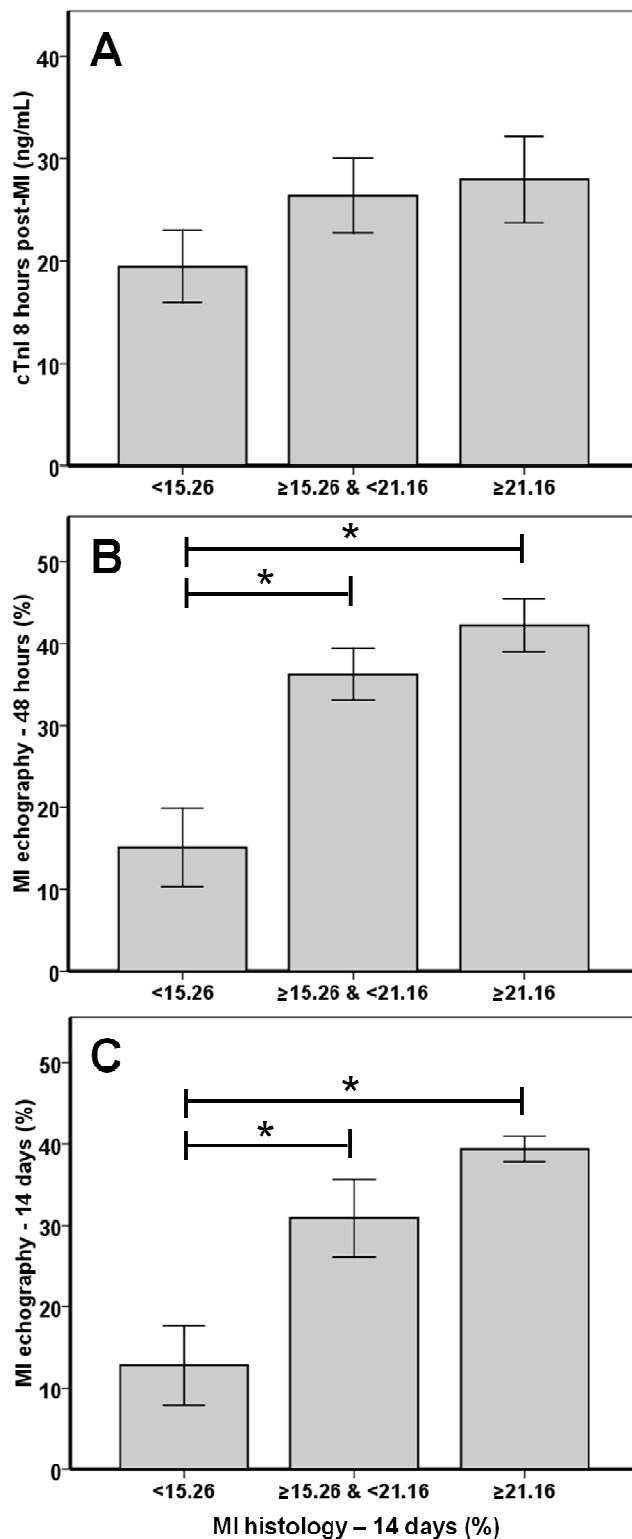


Figure 6. Histology infarction size related to the cTn-I and echocardiography data. **A** - Relation between histology infarct size and plasma cTn-I levels 8 hours post-MI (n=10, 11, and 10, respectively). **B** - Relation between histology infarct size and echocardiography 48 hours post-MI (n=9, 8 and 6, respectively). **C** - Relation between histology infarct size and echocardiography 14 days post-MI (n=10, 8 and 6, respectively). ANOVA followed by Tukey Test. *p<0.005.

Discussion

In the present study, we evaluated the correlation between early plasma cTnI levels and echocardiography imaging with infarct area assessed by histology. We observed that cTnI levels as early as 8 hours can confidently predict infarct occurrence and are well related to MI areas 14 days post procedure in an experimental model. Moreover, both echocardiography data obtained 48 hours post-procedure and the cTnI levels at 8 hours could distinguish small from medium/large areas assessed by histology at 14 days. To our knowledge, the present study adds novel information regarding accuracy to early predict occurrence of and size of experimental infarcts.

Rat and mice are largely used as preclinical models of infarction. A major pitfall in this model may be attributed to its variability, which ranges from 8 to 65% [5]. This variability severely limits the model and the results of early interventions may not be accurately determined. Thus, to circumvent this variability, increased number of animals is often necessary. Alternatively, an early non-invasive biomarker, as cTnT, that could predict infarction has been studied [6, 7].

Troponin is the preferred biomarker for the detection of myocardial necrosis and is a class I indication for the clinical diagnosis of MI [12-16]. Several studies have demonstrated that patients with acute coronary syndromes, increased concentrations of troponin closely correlate with the presence, complexity, and severity of epicardial coronary artery disease, as well as with decreased myocardial perfusion [12, 17]. In animal models, non invasive cardiac biomarkers have been employed to estimate infarction size. The methodology is simple,

economical and excludes operator bias. Accordingly, Metzler et al evaluated plasmatic cTnT levels 24 hours after MI and observed a positive correlation with infarction size by triphenyltetrazolium chloride ($r=0.84$) [18]. Also, Jiang et al assessed cTnT levels 24 hours after MI and correlated with the infarction size at 5 weeks post-MI ($r=0.87$) [7]. However, earlier infarct size prediction estimates would be desirable in order to deliver therapies right after or concomitant to MI induction. In the present study we demonstrated that cTnI plasmatic levels are consistently increased 8 hours after MI. Moreover, plasma levels of cTnI presented strong correlation with infarction size assessed by histology 14 days after MI. Of note, cTnI has the advantage, over cTnT, to be more cardio-specific [16].

Echocardiographic imaging has been used to evaluate infarct size in animals. In the first hours after MI induction the scar tissue and myocardial hibernation/stunning may interfere and overestimate infarction size, respectively [19]. Thus, imaging acquired very early may be misleading. Nevertheless, few studies have employed this methodology to predict infarction size. Santos et al demonstrated that echocardiography measurement may accurately estimate infarction size 7 days after infarction induction [20]. Our study verified that an earlier timing of echocardiography evaluation (48 hours post-MI) may accurately estimate infarction size by histology at 14 days. Therefore, this may be an important tool to timely evaluate and estimate infarct size in animal experiments.

Using a ROC curve analysis we also demonstrated that cTnI levels higher than 5.49ng/mL 8 hours after the MI provides a reliable cutoff value for the diagnosis of MI in this rat model. The good positive predictive value observed here helps to exclude those false-positive MI animals of experimental protocols.

However, this cutoff value had no ability to differentiate infarct size ranges and thus echocardiography imaging was also evaluated in the present study.

In fact, we aggregated data from 48 hours echocardiography and were able to discriminate small from medium and larger infarcts. This information may be instrumental to study left ventricular remodeling process in a more detailed manner, since previous studies have clearly shown that infarction sizes smaller than 16% have a different pattern of remodeling; accordingly, animals showing such small infarct areas ought to be excluded from studies exploring interventional strategies to halt or modulate remodeling progression [6] .

Our data should be viewed considering some study limitations. Firstly, despite performed by a skilled and blinded operator, echocardiographic analysis was carried out by a single observer. Thus, we could not exclude that part of the variability in infarction size found with echocardiography may be related to the observer bias. Secondly, blood was strictly collected 8 hours after MI, coincident with the releasing time of large amounts of cTnI at a rapid pace; this may have contributed to some degree of variation on cTnI levels.

In conclusion, we found that a cutoff value for cTnI of 5.49 ng/mL at 8 hours post-MI could be used to accurately predict infarct in this model, using a fast, inexpensive, and readily available assay. Moreover, echocardiography images taken 48 hours after MI may predict infarcted areas 14 days later. Taken together our data may help to readily select animals that may be kept in an experimental protocol, achieving more homogenous infarct groups and consequently substantially reducing sample sizes necessary to demonstrate treatment effects, while improving power of trials addressing anti-remodeling therapies.

References

1. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
2. Vilahur, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(3): p. 522-33.
3. Zaragoza, C., et al., *Animal models of cardiovascular diseases*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 497841.
4. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**(4): p. 503-12.
5. Degabriele, N.M., et al., *Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction*. Exp Physiol, 2004. **89**(4): p. 497-505.
6. Minicucci, M.F., et al., *Echocardiographic predictors of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats*. Arq Bras Cardiol, 2011. **97**(6): p. 502-6.
7. Jiang, B.H., et al., *Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(3): p. e85-9.
8. Tavares, A.M., et al., *Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction*. Life Sci, 2010. **87**(23-26): p. 699-706.

9. Peron, A.P., et al., *Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure*. Arq Bras Cardiol., 2006. **86**: p. 105-112.
10. Mercier, J.C., et al., *Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children*. Circulation, 1982. **65**(5): p. 962-9.
11. Moises, V.A., et al., *Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography*. Arq Bras Cardiol, 2000. **75**(2): p. 125-36.
12. Wong, G.C., et al., *Elevations in troponin T and I are associated with abnormal tissue level perfusion: a TACTICS-TIMI 18 substudy. Treat Angina with Aggrastat and Determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis in Myocardial Infarction*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 202-7.
13. Jaffe, A.S., et al., *It's time for a change to a troponin standard*. Circulation, 2000. **102**(11): p. 1216-20.
14. Morrow, D.A., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes*. Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 552-74.
15. Thygesen, K., J.S. Alpert, and H.D. White, *Universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(22): p. 2173-95.

16. Daubert, M.A. and A. Jeremias, *The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings*. Vasc Health Risk Manag, 2010. **6**: p. 691-9.
17. Wilson, S.R., et al., *Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial*. Am Heart J, 2009. **158**(3): p. 386-91.
18. Metzler, B., et al., *Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction*. Clin Chim Acta, 2002. **325**(1-2): p. 87-90.
19. Pierard, L.A., et al., *Identification of viable myocardium by echocardiography during dobutamine infusion in patients with myocardial infarction after thrombolytic therapy: comparison with positron emission tomography*. J Am Coll Cardiol, 1990. **15**(5): p. 1021-31.
20. dos Santos, L., et al., *Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications*. Braz J Med Biol Res, 2008. **41**(3): p. 199-201.

7. Conclusões

Estudo 1

Foram avaliados os efeitos da inibição do TGF- β 1 no remodelamento do VE, através de um shRNATGF- β 1, injetado no miocárdio imediatamente após a indução de IM experimental em ratos. Em relação aos objetivos específicos podemos concluir que:

1. Não houve diferença na área de infarto e na maioria dos parâmetros ecocardiográficos entre os grupos tratado e controle. A fração de ejeção foi maior no grupo tratado quando comparado ao controle.

2. Os níveis de expressão dos genes: TGF- β 1, colágeno I e III, MMP-2 no miocárdio não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

3. Nos animais sacrificados em 48 horas após infarto, o shRNA- TGF- β 1 apresentou uma redução de 2,5 vezes na expressão de TGF- β 1 no miocárdio.

Estudo 2

A mensuração de troponina-I em 8 horas após infarto associada à ecocardiografia em 48 horas após infarto é capaz de prever a ocorrência de e estimar a área de infarto após 14 dias. Em relação aos objetivos específicos podemos concluir que:

1. Os níveis plasmáticos de troponina-I mensurados 8 horas após indução de infarto estão correlacionados com a área de infarto obtida por ecocardiografia e histologia 14 dias após infarto.

2. Níveis de troponina-I maiores do que 5,49 ng/mL determinam a ocorrência de infarto neste modelo.

3. As variáveis ecocardiográficas em 48 horas e em 14 dias após infarto se correlacionam positivamente com a área de infarto por histologia em 14 dias.

4. Uma área de infarto maior do que 1.97% na ecocardiografia em 48 horas após infarto é capaz de estimar o tamanho do infarto após 14 dias.

5. A associação de dados de troponina I e de ecocardiografia em 48 horas diferencia magnitudes de áreas de infarto (pequena vs. média e grande).