



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

*Associação de N-acetilcisteína e deferoxamina na prevenção do remodelamento cardíaco em  
ratos pós-infarto agudo do miocárdio:  
Perfil de estresse oxidativo e remodelamento ventricular*

Aluna: Amanda Phaelante Pinto

Orientador: Dr. Michael Éverton Andrades  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadine Oliveira Clausell

Porto Alegre, março de 2014

Associação de N-acetil-cisteína e deferoxamina na prevenção do remodelamento cardíaco em  
ratos pós-infarto agudo do miocárdio:  
Perfil de estresse oxidativo e remodelamento ventricular

Autora: Amanda Phaelante Pinto

Dissertação para obtenção do título de  
Mestre apresentada à Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul,  
Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares.

Orientador: Dr. Michael Andrades

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadine Clausell

Porto Alegre, março de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o auxílio financeiro do CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA.

“(...) resta esse constante esforço para caminhar dentro do labirinto, esse eterno levantar-se depois de cada queda, essa busca de equilíbrio no fio da navalha, essa terrível coragem diante do grande medo, e esse medo infantil de ter pequenas coragens.”

*Vinicius de Moraes*

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai e a todos os  
pacientes que sofreram infarto  
agudo do miocárdio.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer deveria ser o verbo mais simples de falar/escrever, mas quando nos damos conta de iniciar essa ação, faltam palavras para tamanha gratidão.

Primeiramente quero agradecer a mim mesma (!), por ter superado uma dor pessoal e iniciar essa jornada num laboratório de pesquisa cardiovascular.

À minha família. Eduardo Rodrigues, obrigada pelo nosso encontro. Dessa união surgiu amadurecimento, paciência, companheirismo e admiração. Obrigada por fazer parte dos meus planos e entrar de cabeça junto comigo no mestrado. Agradeço por todo esforço e paciência nas madrugadas e finais de semana na UEA me ajudando a tratar os ratinhos! Sem contar os dias mal dormidos e do meu humor intragável. Meu companheiro de vida te amo muito! Contigo tenho os “filhos” mais amados: Xica e Jorge, obrigada por sempre participarem dos meus momentos de estudo, com muitas lambidas, carinhos e me fazendo companhia durante a noite.

À minha mãe Lúcia Helena por ter plantado em mim a sementinha da perseverança e da luta. A força de mulher que eu tanto espelho em ser. Aprendi com a tua confiança a acreditar no meu trabalho e passar isso adiante. Mãe é mãe e é *in utero*.

Ao meu pai, Fernando Pinto. Da boca me faltam as palavras, mas do meu coração transborda... Contigo aprendi a cura para o mundo. O Amor. Sou muito grata a Deus por ter permitido o tempo que passamos juntos. Eternizou.

À minha segunda família, Tia Neca, Tia Ana, Lidi, Bê, Lalá, Rica, Carol, Leandro e Sofia! Simplesmente pelo fato de existirem.

Ao meu querido orientador, Michael Andrades, pela incansável ânsia de ensinar. Foste mestre em todos os momentos, com postura de pai durão, de professor, de investigador, de cientista, de amigo. Aprendi contigo o fundamental sobre ciência: a dúvida. E daí surgiu uma nova Amanda que metamorfoseou durante dois anos. Agradeço-te de coração toda mudança e todo conhecimento obtido nesse período participando lado a lado.

Agradeço a minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Nadine Clausell pelo exemplo de simplicidade de pessoa, do profissionalismo grandioso e por sempre amenizar os momentos de tensão com um sorriso tranquilo e um “vai dar tudo certo!”. Muito obrigada mesmo!

Ao professor Luís Eduardo Rohde, por desmistificar a cardiologia transformando conceitos complexos em ensinamentos simples e apaixonantes. Muito obrigada pela confiança e pela oportunidade de ingressar no melhor grupo de pesquisa.

À professora Andréia Biolo, pelas grandes ideias e contribuições em todos os clubes de revista. Sempre a admirei pela postura, ética e o seu grande saber e tenho como espelho o seu profissionalismo. Agradeço toda a acessibilidade a mim fornecida nas rápidas conversas nos corredores.

Ao melhor grupo de pesquisa do Clínicas. Laboratório de Pesquisa Cardiovascular. Cada um teve um papel fundamental no meu crescimento e amadurecimento.

Ao trio de ouro, Daiane Silvello, Carolina Cohen e Nidiane Martinelli. Por me receberem desde a primeira vez como a “caçula” do lab e me ensinarem da melhor forma a persistir, confiar e não desistir. Vocês três muitas vezes foram mães e irmãs do meu lado e sou muito grata a isso.

Ao Virgílio Olsen e Amanda Lopes. Os melhores ICs que alguém poderia ter. Desde o começo mergulharam de cabeça no mundo da NAC/DFX. Virgílio obrigada pela companhia nas madrugadas, pelas ECOs, cirurgias e todo empenho que tiveste durante o projeto. Ah... e pelas pizzas!! Amanda, obrigada pela dedicação e esforço em todas as tarefas. Tenho muito estima por ti e sei que teu futuro será brilhante.

À Stéfanie Schneider, minha parceira tagarela que sempre amenizou climas tensos com uma gargalhada engraçada. Obrigada pelas conversas profundas sobre o futuro, amor, trabalho e principalmente fé.

À Vanessa La Porta, por ser o meu ombro amigo de todas as horas no lab! Sempre calma e serena contribuindo com as melhores palavras em cada momento.

À Bianca Fracasso e a Juliana Rangel, por dividirem o chicote comigo! A entrada de vocês no grupo é recente, porém muito marcante. Consegui de certa forma minha independência de “irmã mais velha”, pois o Michael está mais ocupado com vocês agora. Agradeço muito a amizade e parceria!

À Kátia Gonçalves, pelo exemplo de professora e dedicação à pesquisa. Agradeço nossos momentos de conversa e socialização, foi essencial.

Ao Santiago Tobar, pela disposição e perseverança nos nossos questionamentos diários. Pelas críticas e sugestões nos clubes e por todo comprometimento que demonstraste desde o início.

Ao time das nutris, Prof Gabriela Souza, Priccila Zuchinali, Karina Almeida, Fernanda Donner pelos momentos alegres, pela parceria, pela torcida e pelos totosinhos antes da reunião.

Aos colegas de laboratório, Vânia dos Reis, Fernando Schwengber, Arthur Garbin, obrigada pelos cafés passados, pelas palavras de apoio e pela convivência diária.

Ao time da UEA, Marta, Fabíola, Rosa, Eduardo, Sônia e Tuane por toda ajuda, paciência e apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao querido secretário do CPE, Everaldo Almeida, por acreditar em mim e sempre me ajudar na resolução dos problemas que porventura aconteceram durante o desenvolvimento do projeto.

Muito obrigada mesmo!

À querida secretária do PPG da Cardio, Sirlei, agradeço todos os momentos que te dedicaste a me ouvir, sempre firme nas tuas colocações, mas com o coração de mãe que acolhe em qualquer momento.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	14
1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO, REMODELAMENTO VENTRICULAR E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA... 15	
1.3 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES .....	18
1.4 O ESTRESSE OXIDATIVO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	21
1.5 O EXCESSO DE ÍONS DE FERRO PÓS-IAM .....	23
1.6 TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA .....	25
2. HIPÓTESE .....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
ORIGINAL ARTICLE .....	34
ABSTRACT .....	35
INTRODUCTION.....	36
MATERIALS AND METHODS .....	37
RESULTS .....	42
DISCUSSION .....	43
CONCLUSION .....	46
FUNDING.....	46
CONFLICT OF INTEREST .....	46
FIGURE LEGENDS .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato

ATP: Adenosina trifosfato

ATX: Antioxidantes

AV: Valvas atrioventriculares

CAT: Catalase

DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis

DFX: Desferal, deferoxamina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

ER: Espécie reativa

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FRAP: *Ferric Reducing Ability of Plasma*

GSH: Glutathiona reduzida

GPx: Glutathiona peroxidase

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca

MMP: Metaloproteinase de matriz

NAC: N-acetilcisteína

ONOO: Peroxinitrito

SH: Sulfidrilas

SOD: Superóxido dismutase

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Taxas de mortalidade (por 100 mil habitantes) pelas principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) – Brasil para todas as idades.

**Figura 2** - Dilatação ventricular associada à IC progressiva.

**Figura 3** - Desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes.

**Figura 4** - Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss.

**Figura 5** - Ratos Wistar submetidos à sepse por ligação e punção cecal e a sobrevivência ao final de 5 dias.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Evolução das alterações morfológicas do IAM.

**Tabela 2:** Diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio.

## RESUMO

O remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio (IAM) envolve a participação do estresse oxidativo. A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que pode ter atividade pró-oxidante, devido à presença de íons de ferro. A associação de um quelante de ferro pode potencializar os efeitos antioxidantes da NAC. Nosso objetivo foi testar a associação de NAC com um quelante de ferro (deferroxamina - DFX) para avaliar parâmetros bioquímicos, ecocardiográficos e histológicos em um modelo animal de IAM. Para isso, ratos Wistar machos (60 dias de idade) foram submetidos a uma cirurgia do SHAM (sem oclusão da coronária) ou de infarto. Doze horas depois, o IAM foi confirmado por avaliação da troponina I e os animais foram alocados aleatoriamente nos seguintes grupos de tratamento: veículo, NAC (25 mg/kg por 28 dias), DFX (40 mg/kg por 7 dias), ou NAC mais DFX (NAC 25 mg/kg durante 28 dias mais DFX 40 mg/kg durante 7 dias). Todos os animais foram acompanhados por 28 dias. O IAM promoveu aumento nos níveis totais de ferro plasmático 7 dias após o procedimento e todos os tratamentos foram capazes de diminuir a concentração de ferro. O único tratamento capaz de diminuir os níveis de ferro ao final do protocolo foi NAC/DFX, quando comparado ao grupo veículo (184 µg/dL vs. 210 µg/dL). As avaliações morfofuncionais foram feitas em série pelo ecocardiograma. Os animais tratados com NAC/DFX apresentaram uma diminuição no diâmetro de câmara sistólica (7,9 mm ± 0,7 mm vs. 8,7 mm ± 1 mm) e um aumento na fração de ejeção (45,2% ± 10,9% vs 34,7% ± 8,7% , p = 0,03), ambos aos 28 dias, quando comparados com o grupo veículo. Na análise histológica (em 28 dias), o grupo NAC / DFX apresentou uma diminuição do estresse oxidativo (imunohistoquímica anti- HNE), quando comparado com o grupo veículo (p = 0,059). Portanto, a associação de NAC/DFX foi capaz de atenuar o remodelamento de câmara e melhorar a função do ventrículo esquerdo em um modelo animal de IAM enquanto que nenhum dos tratamentos teve algum efeito quando administrados sozinhos. Provavelmente, os radicais livres e os níveis de ferro contribuem para piora desse modelo, mas são necessários mais estudos para comprovar a eficácia dessa associação.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) crescem espantosamente em todo o mundo. A taxa de mortalidade por este tipo de doença é de 255 a cada grupo de 100 mil habitantes (DATASUS, 2012). No Brasil, as DCNT concentram 72% do total de óbitos, conforme dados de 2009 do Sistema de Informação de Mortalidade. Isso representa 742 mil mortes por ano e as doenças cardiovasculares estão no topo do ranking, contribuindo com 31,3% das mortes dos brasileiros (DATASUS, 2012). Apesar das doenças cardiovasculares estarem diminuindo ao longo do tempo, ainda assim, é a enfermidade com a maior taxa de mortalidade quando comparada a outras DCNT, como pode ser visto na figura 1, em um período de 20 anos.

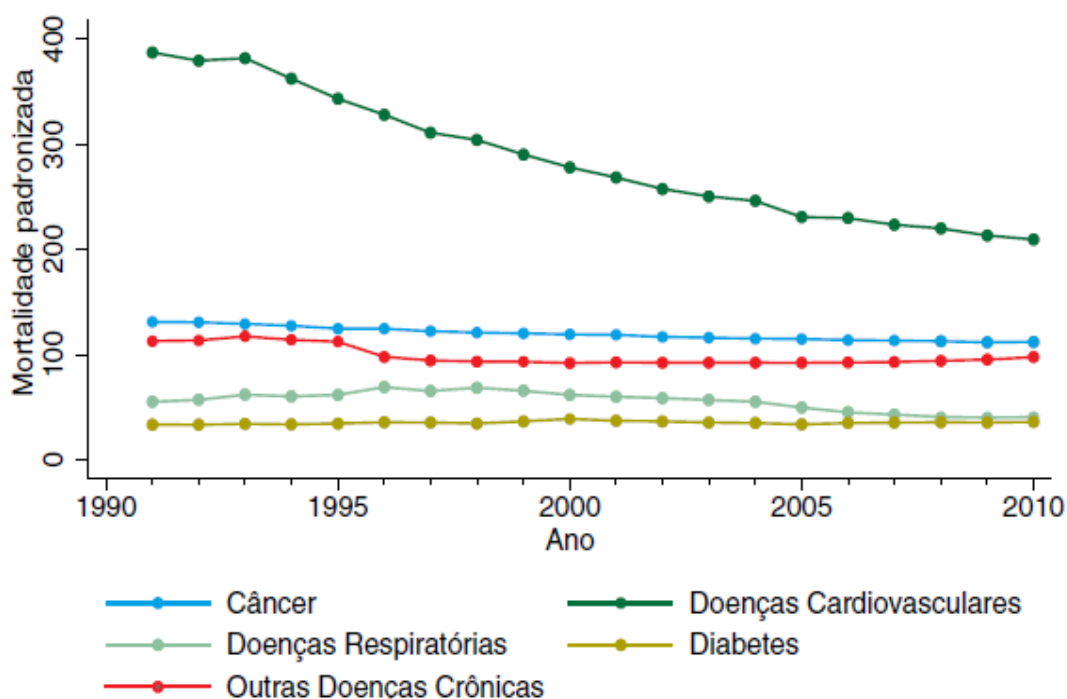


Figura 1: Taxas de mortalidade (por 100 mil habitantes) pelas principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) – Brasil para todas as idades. Fonte: DATASUS, 2011.

No país, o número de internações hospitalares em 2012 por insuficiência cardíaca (IC) foi de aproximadamente 245.000, isto é 21,5% das internações por doenças do aparelho circulatório (DATASUS, 2012). Além das inestimáveis mortes devidas a algum problema cardiovascular, estas doenças também causam um impacto na economia do país, seja pelo custo do tratamento seja pela diminuição de indivíduos da população economicamente ativa (Abegunde, Mathers et al. 2007). O valor médio por internação do paciente com IC está estimado em R\$ 1.228,60, sendo assim, o custo anual é de aproximadamente R\$ 300 milhões (DATASUS, 2012), representando o alto custo dessa doença. Portanto, faz-se necessário investigar mecanismos que possam interferir nos fatores de morbimortalidade.

## **1.2 Infarto agudo do miocárdio, remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca**

O coração é um órgão muscular essencial para vida. Através dele, o sangue flui de áreas de alta pressão sanguínea para áreas de baixa pressão sanguínea. À medida que as paredes dos átrios se contraem, aumenta a pressão do sangue em seu interior. Esse aumento de pressão sanguínea força a abertura das valvas atrioventriculares (AV), permitindo que o sangue flua para os ventrículos. Depois que os átrios terminaram sua contração, as paredes dos ventrículos se contraem, aumentando a pressão sanguínea ventricular, e impulsionam o sangue para o tronco pulmonar e aorta, distribuindo o fluido para o restante do corpo (Bonow et al., 2011).

Justamente por funcionar como uma bomba mecânica, o coração é um órgão altamente metabólico e apresenta uma grande demanda de suporte sanguíneo com oxigênio e substrato energético. O infarto agudo do miocárdio (IAM) é acontece após a oclusão arterial coronariana resultando em obstrução do suprimento sanguíneo do miocárdio, levando a profundas consequências funcionais, bioquímicas e morfológicas. Após segundos de obstrução vascular, a glicólise aeróbica dos cardiomiócitos se interrompe, prejudicando a produção de adenosina tri

fosfato (ATP). A isquemia do miocárdio também contribui para arritmias, provavelmente por causar instabilidade elétrica das regiões miocárdicas isquêmicas (Kumar, V; Abbas, A. K e Fausto, N., 2004).

O IAM é caracterizado por diversas alterações morfofuncionais que acontecem no coração ao longo do tempo. Na tabela 1 compreendemos melhor a evolução dessa patologia.

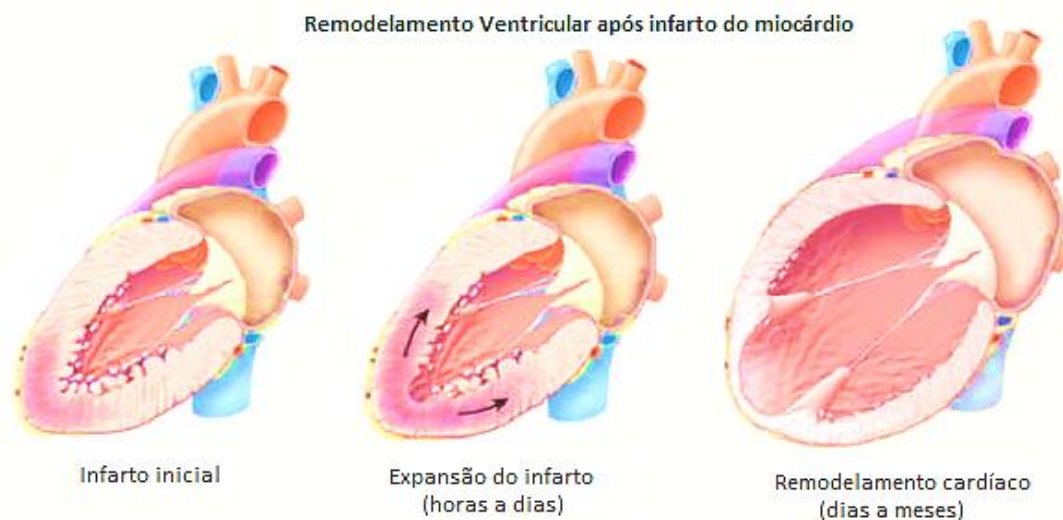
**Tabela 1:** Evolução das alterações morfológicas do IAM.

Tempo	Aspectos macroscópicos	Achados ao microscópio óptico	Achados ao microscópio eletrônico
<b>Lesão reversível</b>			
<b>0 – 1/2 horas</b>	Sem alteração	Sem alteração	Relaxamento de miofibrilas; tumefação, perda de glicogênio;
<b>Lesão irreversível</b>			
<b>1/2 - 4 horas</b>	Sem alteração	Geralmente sem alteração; ondulação nas fibras da borda	Ruptura do sarcolema; mitocôndrias com densidades amorfas
<b>4 – 12 horas</b>	Às vezes manchas escuras	Início de necrose de coagulação, edema, hemorragia	
<b>12 – 24 horas</b>	Manchas escuras	Continuação da necrose de coagulação, miócitos hipereosinofílicos, necrose marginal com faixas de contração; início de infiltrado neutrofilico	
<b>1 – 3 dias</b>	Manchas escuras com a área central do infarto amarelo-acastanhado	Necrose de coagulação com perda dos núcleos e das estriações, infiltrado intersticial de neutrófilos	
<b>3 – 7 dias</b>	Borda hiperêmica; amolecimento central amarelo-acastanhado	Início da desintegração das miofibras mortas, com morte de neutrófilos, início da fagocitose das células mortas pelos macrófagos na borda da área do infarto	
<b>7 – 10 dias</b>	Grau máximo do amolecimento e da coloração amarelo-acastanhada; margens escavadas e vermelho acastanhadas	Fagocitose avançada das células mortas, formação inicial de tecido de granulação fibrovascular nas margens	
<b>10 – 14 dias</b>	Área do infarto com bordas escavadas vermelho-acinzentadas	Tecido de granulação bem organizado, com novos vasos sanguíneos e depósito de colágeno	
<b>2 – 8 semanas</b>	Cicatriz cinza-esbranquiçada que progride na borda para o centro da área infartada	Aumento do depósito de colágeno, com redução da celularidade	
<b>&gt;2 meses</b>	Cicatrização completa	Cicatriz densa de colágeno	

Adaptado de: Kumar, V; Abbas, A. K e Fausto, N. (2004)



A fibrose e a dilatação ventricular, consequências do IAM, são fatores que contribuem para a progressão da IC, devido à proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno I e III e da ação das metaloproteinases de matriz (MMP), uma família de enzimas que catabolizam o colágeno, elastina e gelatina e que são centrais no processo de remodelamento cardíaco (Thomas, Coker et al. 1998). Portanto, uma série de alterações morfofuncionais torna o coração cada vez mais insuficiente e todos estes processos (hipertrofia ventricular, perda de contratilidade, fibrose e dilatação ventricular) são os principais componentes do remodelamento cardíaco (figura 2) (Swynghedauw, 1999).



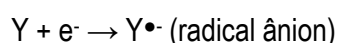
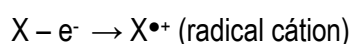
**Figura 2: Dilatação ventricular associada à IC progressiva.** Após o insulto inicial, ocorre a expansão do infarto e da parede do ventrículo, causando aumento da pressão intraventricular e diminuição do débito cardíaco. Adaptado de Jessup e Brozena (2003).

Na IC, o coração é incapaz de bombear o sangue no mesmo nível das necessidades metabólicas dos tecidos ou só é capaz de fazer isto com pressões de enchimento maiores que o normal. Na maioria dos casos de IC, o coração não consegue atender as demandas periféricas básicas; e por isso pode ser definida ainda como uma síndrome clínica e complexa que ocorre secundariamente a anormalidades da estrutura e/ou função cardíaca que prejudicam a capacidade do ventrículo esquerdo para receber ou ejetar sangue. Consequentemente, com esse conjunto disfuncional surgem algumas alterações patológicas importantes, como distúrbios

estruturais, apoptose de miócitos, alterações no citoesqueleto e remodelagem da matriz extracelular (Bonow et al., 2011).

### 1.3 Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes

Sucintamente, podemos descrever um radical livre como qualquer molécula ou átomo capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons paramagnéticos em sua órbita molecular ou atômica. Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron, ou ainda, pelo acréscimo de mais um elétron, conforme esquema abaixo (Gutteridge e Halliwell, 1992).



Espécies reativas de oxigênio (ERO) são um termo mais abrangente que inclui radicais livres e outras moléculas potencialmente reativas, mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio. Portanto, todos os radicais livres de oxigênio são ERO, mas nem todas as ERO são radicais livres de oxigênio (Halliwell, Gutteridge et al. 1992). Abaixo, na tabela 2, verificamos os diferentes tipos de radicais e não-radicais.

**Tabela 2: Diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio.** O símbolo • representa o elétron desemparelhado no último nível eletrônico da molécula ou átomo em questão.

ERO	
Radicais livres	Não-radicais
Átomo de hidrogênio, H•	Peróxido de hidrogênio, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Superóxido, O <sub>2</sub> •-	Ozônio, O <sub>3</sub>
Hidroxil, OH•	Oxigênio singlet, O <sub>2</sub> <sup>1</sup> Δg
Peroxil, RO• <sup>2</sup>	Peroxinitrito, ONOO-
Radical de cloro Cl•	Ácido hipocloroso, HOCl

Adaptado de Halliwell e Gutteridge (1992).

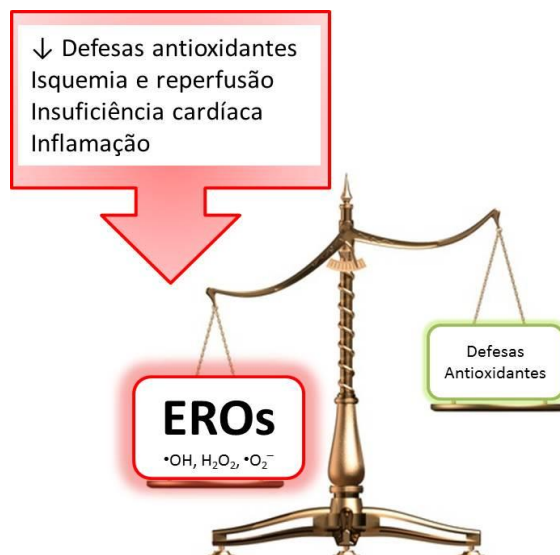
Em organismos aeróbios, a produção de espécies reativas (ER) é necessária, uma vez que este mecanismo auxilia, por exemplo, na reciclagem celular, atuando na senescência, morte e proliferação das células (Perez-Campo et al., 1998). Entretanto, o aumento excessivo de ER pode gerar um processo de estresse oxidativo, que é caracterizado por dano a biomoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) (Halliwell, Gutteridge et al. 1992) com prejuízos ao funcionamento celular (Chen, Bartholomew et al. 1998; Brown, Miller et al. 1999).

Para neutralizar a reatividade dos radicais livres, os sistemas vivos empregam substâncias que possuem o potencial de amenizar as agressões das ER, prevenindo, desta forma, os danos oxidativos no organismo. A essas substâncias denominamos antioxidantes, incluindo componentes enzimáticos (linha de defesa primária) e não-enzimáticas (linha de defesa secundária). Pode-se simplificar a definição de antioxidantes como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, retarde significativamente ou impeça a oxidação do referido substrato. Dessa forma, um antioxidante deve atrasar, prevenir ou remover o dano oxidativo de uma molécula alvo (Gutteridge e Halliwell, 2010).

Moléculas antioxidantes como as vitaminas A, C, E, glutathiona, albumina e outros reagem com os radicais doando elétrons para seus orbitais desemparelhados e/ou conjugando o radical a sua estrutura (Lobo, Patil et al., 2010). Outros antioxidantes incluem o ácido  $\alpha$ -lipoico, coenzima Q<sub>10</sub>, minerais (cobre, zinco, manganês e selênio) e diversos cofatores (ácido fólico, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>). Todos eles trabalham em sinergia uns com os outros e em relação a diferentes tipos de radicais livres (Maritim, Sanders et al., 2003). Contudo, do ponto de vista biológico, moléculas antioxidantes não são suficientes para combater a ação deletéria dos radicais, posto que estes reagem com velocidades próximas ao limite de difusão. No entanto, moléculas capazes de catalisar as reações de neutralização de radicais são cruciais para a manutenção do equilíbrio redox intracelular (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999).

Dentre as defesas enzimáticas podemos destacar as superóxidos dismutases (SODs); são metaloenzimas que constituem a primeira linha de defesa contra os radicais livres, possuem a capacidade de catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Em humanos, existem três tipos de SOD. A SOD1 encontra-se no citoplasma das células e possui no seu centro reativo o cobre e o zinco, assim como, a SOD3. A SOD2 está presente nas mitocôndrias e usa o manganês como cofator reativo e a SOD3 localiza-se no líquido extracelular (Weisiger and Fridovich 1973; Marklund 1982; Chang, Slot et al. 1988). A catalase (CAT) é a principal enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio, reduzindo-o a água e oxigênio molecular. Em animais a CAT está presente em todos os órgãos; a CAT eritrocitária ajuda a proteger as células contra o peróxido de hidrogênio, gerado pela dismutação do radical superóxido, proveniente da auto-oxidação da hemoglobina (Chance, et al. 1979). Embora a atividade varie entre os tipos celulares, o cérebro, o coração e o músculo esquelético possuem baixos níveis de catalase. Por fim, complementando as defesas enzimáticas, a glutathione peroxidase (GPx), atua removendo os peróxidos orgânicos e inorgânicos, usando como cofator a glutathione reduzida (GSH). Estas enzimas estão distribuídas amplamente nos tecidos e são principalmente específicas para GSH como doadoras de hidrogênio (Halliwell, 1996).

A produção de ER é compensada pelas defesas antioxidantes. Porém, este balanço pode ser perdido, principalmente em enfermidades. Para Sies (1991) o estresse oxidativo é definido pelo distúrbio do balanço pró e antioxidante em favor do pró-oxidante, conduzindo ao dano celular. Logo após foi então chamado de dano oxidativo, definido por Halliwell e Gutteridge (2010) que o conceituou como lesão biomolecular causado por ataque de ER sobre os componentes de organismos vivos. O aumento do estresse oxidativo pode resultar não somente do aumento da produção de ER, mas também a partir da falha dos sistemas de defesa, recuperação e/ou substituição (Sies, 1991), conforme exemplificado na Figura 3.



**Figura 3: Desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes.** Estresse oxidativo por depleção de antioxidantes (ex.: dieta, mutações), ou ainda, estresse oxidativo por excesso de ERO (ex.: IAM, inflamação, radiação).

#### 1.4 O estresse oxidativo na insuficiência cardíaca

O processo inflamatório que decorre do insulto isquêmico, pós-IAM, associado à liberação de ferro e disfunção mitocondrial é um fator que contribui para a expansão da lesão, fibrose e dilatação ventricular. Por uma perspectiva molecular, é possível afirmar que o estresse oxidativo desempenha papel central no desenvolvimento da IC (Bolli and Marban 1999).

Existem estudos que supõem que o estresse oxidativo em modelos de hipertrofia cardíaca, cujas principais fontes seriam NADPH oxidase (Sirker, Zhang et al. 2007) e a xantina oxidase (Gladden, Zelickson et al. 2013), ambas as enzimas produtoras do radical superóxido. Como já foi dito, as ER danificam, sobretudo proteínas, lipídeos e DNA. As ER (incluindo  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOO}^-$  e o  $\text{O}_2$  singlet) oxidam resíduos de aminoácidos formando produtos de proteínas carboniladas (Halliwell, Gutteridge et al. 1992). As proteínas danificadas perdem sua função inicial e podem desenvolver outros papéis potencialmente nocivos, como por exemplo, a estimulação de receptores ligados ao processo inflamatório. Um bom exemplo desse papel é a ligação de proteínas modificadas por estresse oxidativo aos RAGEs (receptores de produtos

finais de glicação avançada) (Hartog, Voors et al. 2007). Portanto, as alterações morfofuncionais que o IAM causa no tecido devem ser estudadas mecanicamente.

As ER também podem participar na disfunção contrátil do coração. Diversos estudos demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel crítico no coração “hibernado” (coração viável, porém com dificuldade de contração) (Kaplan, Matejovicova et al. 2002). Sabe-se que a geração de radicais superóxido diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e isso pode estar envolvido na modificação de proteínas miofibrilares num coração hibernado (Gao, Liu et al. 1996). Ainda, as alterações nas proteínas miofibrilares expostas a várias ERO podem ocorrer pela oxidação dos seus grupos tióis (Suzuki, Kaneko et al. 1991).

Pacientes que sofreram episódios de IAM apresentaram níveis séricos de proteínas carboniladas mais elevadas do que indivíduos saudáveis (Maneewong, Mekrungruangwong et al. 2011). Interessantemente, pacientes com IC estabilizada também apresentaram maior concentração de proteínas carboniladas e dano oxidativo em lipídeos, sendo que este último marcador apresentou-se associado com o tempo de sobrevida em um seguimento médio de 13 meses (Radovanovic, Savic-Radojevic et al. 2012). Ainda, o dano oxidativo em proteínas de contratilidade (actina e tropomiosina) pode ser demonstrado em biópsias do ventrículo esquerdo de pacientes transplantados quando comparados a corações de doadores sem IC. Além dessas proteínas estarem comprometidas, também foram correlacionadas com a diminuição da fração de ejeção e com o aumento dos níveis da troponina I destes pacientes (Canton, Menazza et al. 2011).

A geração exacerbada de ER pode esgotar um ou mais antioxidantes. A diminuição de antioxidantes e/ou a geração de produtos oxidados podem ser mensurados como índice do estresse oxidativo (Bartosz 2003). O consumo de antioxidantes não significa, necessariamente, que o dano oxidativo ocorreu; pode simplesmente significar que o mecanismo de defesa

removeu as ER e protegeu o sistema (Huang, Ou et al. 2005). Por isso, diversas tentativas de avaliar a capacidade total de antioxidantes têm sido testadas ao invés de identificar o que tem acontecido a cada componente da rede de defesas.

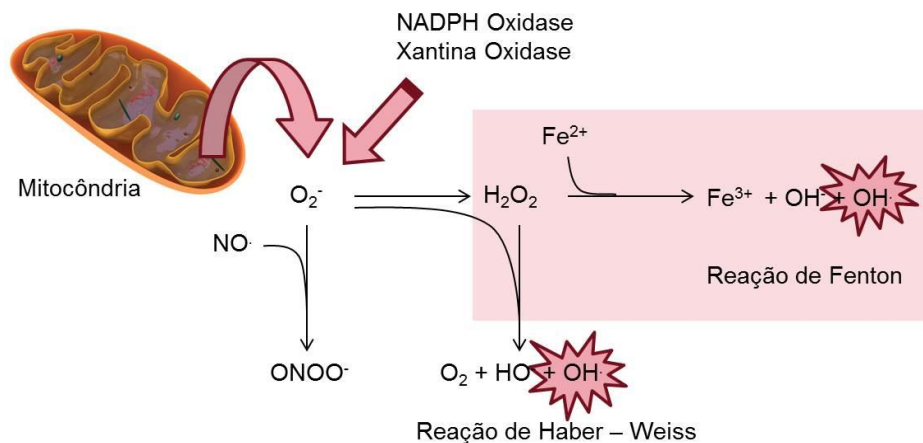
A homeostase redox é muito importante para o equilíbrio da função cardíaca, visto que mesmo a exposição ao ar poluído em camundongos saudáveis é capaz de diminuir as defesas antioxidantes plasmáticas e induzir o alargamento de ventrículo esquerdo e a perda de função cardíaca (Wold, Ying et al. 2012). No cenário da doença cardíaca isquêmica, os níveis de antioxidantes encontram-se diminuídos, provavelmente em decorrência da produção de espécies reativas em uma fase aguda da doença (Mulholland and Strain 1991). Com o intuito de averiguar o comportamento antioxidante do grupamento tiol, Tang et al. (1991) administraram três compostos de sulfidril (SH) (N-acetilcisteína [NAC], cisteína e cistamina) em corações hibernados de ratos Wistar. Tanto a NAC quanto a cisteína atenuaram a disfunção ventricular no período pós-isquemia, enquanto a cistamina não apresentou o mesmo efeito. Os autores sugeriram que o grupamento SH livre é necessário por ser benéfico, promovendo proteção ao miocárdio contra o dano de isquemia e reperfusão recente, particularmente, por melhorar o fluxo coronário durante o dano (Tang, Sun et al. 1991). Por isso, com esses estudos, podemos sugerir que a administração de um antioxidante em poucas horas após o início da lesão pode ser efetiva em prevenir o estresse oxidativo.

### **1.5 O excesso de íons de ferro pós-IAM**

Os metais de transição, em pequenas quantidades, são necessários para o organismo, pois ajudam a manter o equilíbrio da função celular. Estes metais são chamados de transição pela capacidade de alternar entre o estado oxidado e reduzido. São absorvidos a partir da dieta pelo duodeno e transportado para os locais de utilização dos tecidos, sendo usados como cofatores de reações enzimáticas. Os níveis desses metais devem ser sempre monitorados e regulados,

uma vez que a deficiência leva à perda de atividades enzimáticas cruciais, bem como o acúmulo gera reações inadequadas, como o dano oxidativo gerado pelas ER e, eventualmente, morte celular (Nelson, 1999).

O ferro é um metal de transição essencial para a fisiologia celular, pois desempenha um papel fundamental no metabolismo, como por exemplo, na síntese do grupo heme, proliferação celular e atividade da enzima citocromo P450. A importância do ferro é crucial para muitos processos catalíticos devido a sua atividade redox, que lhe permite fazer a transição do ferro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ , estado reduzido) para o ferro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ , estado oxidado) (Aisen, Enns et al. 2001). No entanto, esta reatividade do ferro permite que o mesmo participe da reação de Fenton como doador de elétrons para o peróxido de hidrogênio, produzindo desta maneira um dos radicais livres mais reativos (e prejudiciais), o radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (Wardman e Candeias, 1996), conforme pode ser visto na figura 4 abaixo:



**Figura 4: Reação de Fenton (destacada em rosa) e Reação de Haber-Weiss.** A cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e a ação das enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase são fontes constantes de superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). O superóxido é precursor de diversas ERO, por ação da SOD, formando  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e que por ação das reações de Fenton e Haber-Weiss geram o radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ).

A sobrecarga aguda e crônica de ferro promove o aumento dos níveis desse metal no coração, acompanhado de danos estruturais nas mitocôndrias (Bartfay, Butany et al. 1999). A sobrecarga de ferro cardíaco e a disfunção cardíaca contribuem para lesão ao DNA mitocondrial,



fazendo com que haja uma diminuição dessas organelas e conseqüentemente alterando a respiração celular e, portanto, prejudicando a eficiência do processo contrátil (Gao, Qian et al. 2010). Da mesma forma, mitocôndrias isoladas e incubadas na presença de  $Fe^{+2}$  apresentaram quebra de duplas-fitas de DNA, redução da transcrição de RNA mitocondrial e diminuição da produção de ATP (Asin, Perez-Martos et al. 2000).

As cardiomiopatias estão associadas com o acúmulo de íons de ferro que podem catalisar a geração de radicais livres e, com isso, agravar a doença (Guertl, Noehammer et al. 2000). Assim, estratégias para capturar íons de ferro têm sido pensadas. Em humanos submetidos à circulação extracorpórea, o uso contínuo da deferoxamina (DFX) (6 mg/kg/horas) foi capaz de proteger contra a disfunção cardíaca, sugerindo um papel protetor desse quelante de ferro (Paraskevaïdis, Iliodromitis et al. 2005).

Outro estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento com DFX em pacientes com IAM e supra desnível de segmento ST (grau mais severo de isquemia miocárdica), tratados com intervenção coronariana percutânea, diminuiria o estresse oxidativo e reduziria o tamanho de infarto, determinado por ressonância magnética. O DFX foi administrado em bolus intravenoso de 500 mg (5-10 minutos antes da reperfusão) e depois por infusão de 50 mg/kg em 12 horas. O DFX não exerceu efeito benéfico na área de infarto, porém, reduziu significativamente os níveis de isoprostano F2 (um tipo de prostaglandina originada pela peroxidação dos radicais livres) quando comparados aos do grupo placebo, confirmando seu efeito protetor contra o estresse oxidativo (Chan, Taylor et al. 2012). Coletivamente, esses resultados sugerem que a intervenção com quelantes de ferro podem trazer benefícios ao paciente com IAM ou IC.

## **1.6 Tratamento com N-acetilcisteína**

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico, altamente antioxidante e usada como agente mucolítico, devido a sua capacidade de reduzir pontes dissulfeto presentes no muco (Aruoma, Halliwell et al. 1989). A NAC é absorvida rapidamente pelo organismo e apresenta meia-vida plasmática curta, com cerca de 2,5 horas, sendo indetectável após 12 horas de administração (De Caro, Ghizzi et al. 1989). Estima-se que a biodisponibilidade da NAC quando tratada oralmente seja de apenas 10% (Borgstrom and Kagedal 1990). Durante a absorção, a NAC é rapidamente metabolizada à cisteína, cujo grupo tiol, que possui propriedades antioxidantes, aumenta a síntese da glutatona, considerada um potente antioxidante, e contribui para a diminuição de agentes tóxicos, como por exemplo, sequestrando radicais livres e impedindo a formação do estresse oxidativo (Forman, et al. 1988).

A NAC está sendo amplamente avaliada tanto em estudos experimentais quanto em estudos com pacientes. Em humanos, a NAC foi eficiente em diminuir a área necrosada pelo infarto quando usada simultaneamente ao processo de recanalização da coronária em pacientes com IAM (Sochman, Vrbska et al. 1996). Além disso, a NAC foi capaz de potencializar os efeitos do dinitrato de isorbida (fármaco utilizado contra angina e IC congestiva) em pacientes com IC (Mehra, Shotan et al. 1994). Entretanto, a literatura científica ainda não apresenta consenso sobre a efetividade da terapia com NAC, pois alguns trabalhos comprovam benefício do seu tratamento (Adamy, Mulder et al. 2007), enquanto outros confirmam ineficácia do seu uso, por exemplo, no tamanho da área de infarto (Kingma and Rouleau 1989; Calvillo, Masson et al. 2003).

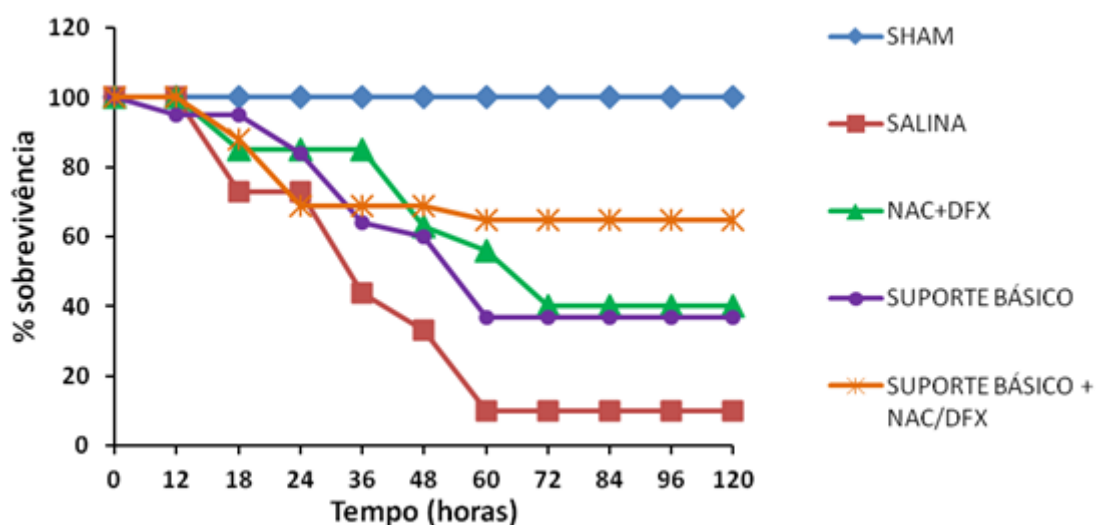
Diversos estudos experimentais em modelos de IAM demonstram melhora em parâmetros cardiovasculares com o emprego de NAC. Por exemplo, Lee et al. (2010) iniciaram o tratamento com NAC (administração intra-gástrica) 24 horas após a indução do IAM e mantiveram o tratamento por 28 dias. Ocorreu uma discreta melhora na contratilidade cardíaca e no processo de remodelamento ao final do tratamento. Esses benefícios foram creditados não aos efeitos

antioxidantes da NAC, mas sim ao seu papel no controle da expressão de alguns genes envolvidos na inervação simpática com consequente melhora nas arritmias (Lee, Lai et al. 2010). Um estudo utilizando 100 mg/kg de NAC em modelo canino demonstrou que o antioxidante preveniu a extensão da necrose do IAM, comparado com o grupo controle, depois de 2 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão (Sochman, Kolc et al. 1990). Ainda, um estudo utilizando leitões em modelo de hipóxia e reperfusão demonstrou que a NAC melhorou o índice cardíaco e diminuiu os níveis de lipoperoxidação, caspase 3 (ativação da apoptose) e lactato quando comparado ao grupo veículo, comprovando que a administração de NAC pós-ressuscitação reduziu o estresse oxidativo no miocárdio (Liu, Lee et al. 2010).

Apesar destes estudos experimentais apresentarem vantagens nestes modelos, se sabe que a NAC pode apresentar um papel dualístico. *In vitro*, os efeitos antioxidantes e pró-oxidantes de NAC e glutatona dependem do destino de seu uso. Por exemplo, na presença de ferro e peróxido de hidrogênio, concentrações crescentes de NAC aumentam a oxidação de substratos orgânicos, confirmando um efeito oxidante quando em altas concentrações (Sagrsta, Garcia et al. 2002). Da mesma forma, um estudo utilizando ratos endotoxêmicos (ratos injetados com lipopolissacarídeo [LPS] que induz a mortalidade) demonstrou que os ratos que receberam a menor dose de NAC (275 mg/kg) tinham menor mortalidade e baixos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que à medida que a dose aumentava (550 e 950 mg/kg) a mortalidade dos animais subia significativamente, acompanhada pela progressão do estresse oxidativo (Sprong, Winkelhuyzen-Janssen et al. 1998).

Portanto, é razoável admitir que a administração de um quelante de ferro juntamente com a NAC possa evitar o seu papel pró-oxidante. Nesse sentido, a associação de NAC e DFX vem sendo empregada com sucesso em variados modelos animais de sepse (Ritter, Andrades et al. 2004; Andrades, Ritter et al. 2009), falência hepática (Ritter, Reinke et al. 2004) e lesão aguda pulmonar (Ritter, da Cunha et al. 2006). Essa associação de NAC/DFX foi capaz de diminuir a

concentração de moléculas marcadoras de estresse oxidativo e também de mortalidade, mesmo quando administrada algumas horas após o início da doença. Além disso, o NAC/DFX associada à terapia básica (antibióticos e reposição volêmica) potencializou o tratamento aumentando a sobrevivência quando comparado ao suporte básico sozinho (figura 4) (Ritter, Andrades et al. 2004). Por fim, esta associação potencialmente benéfica não foi testada em modelos de IAM com vistas a examinar seus efeitos sobre parâmetros de remodelamento ventricular e estresse oxidativo.



**Figura 5: Ratos Wistar foram submetidos à sepse por ligação e punção cecal e a sobrevivência ao final de 5 dias foi avaliada.** Esse modelo rende uma mortalidade de 90% em ratos não-tratados (salina). O tratamento com antibióticos (clindamicina e ceftriaxone) e reposição volêmica reduz a mortalidade para 60% (Suporte Básico), similar à terapia com NAC/DFX. A terapia antioxidante conjuntamente com o suporte básico foi capaz de diminuir a mortalidade para 30% (Suporte Básico+NAC+DFX). Adaptado de Ritter, Andrades et al. (2004).

## **2. HIPÓTESE**

O efeito protetor da NAC sobre as alterações ecocardiográficas, histológicas e bioquímicas induzidas pelo IAM pode ser potencializado pela coadministração com DFX.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do tratamento com NAC/DFX sobre parâmetros de função e remodelamento ventricular no coração de ratos submetidos ao procedimento de IAM e mantidos com terapia farmacológica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 3.2.1 Avaliar se o tratamento associado diminui área de infarto avaliada por histologia;
- 3.2.2 Avaliar se o tratamento associado administrado pós-IAM altera parâmetros estruturais e funcionais por ecocardiografia;
- 3.2.3 Avaliar se o tratamento associado diminui o dano oxidativo em biomoléculas no coração de ratos por imunohistoquímica.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abegunde, D. O., C. D. Mathers, et al. (2007). "The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries." Lancet **370**(9603): 1929-1938.
- Adamy, C., P. Mulder, et al. (2007). "Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats." J Mol Cell Cardiol **43**(3): 344-353.
- Aisen, P., C. Enns, et al. (2001). "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism." Int J Biochem Cell Biol **33**(10): 940-959.
- Andrades, M., C. Ritter, et al. (2009). "Antioxidant Treatment Reverses Organ Failure in Rat Model of Sepsis: Role of Antioxidant Enzymes Imbalance, Neutrophil Infiltration, and Oxidative Stress." J Surg Res.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-597.
- Asin, J., A. Perez-Martos, et al. (2000). "Iron(II) induces changes in the conformation of mammalian mitochondrial DNA resulting in a reduction of its transcriptional rate." FEBS Lett **480**(2-3): 161-164.
- Bartfay, W. J., J. Butany, et al. (1999). "A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice." Cardiovasc Pathol **8**(6): 305-314.
- Bartosz, G. (2003). "Total antioxidant capacity." Adv Clin Chem **37**: 219-292.
- Bolli, R. and E. Marban (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." Physiol Rev **79**(2): 609-634.
- Bonow, M., Douglas L. Mann, MD, Facc, Douglas P. Zipes, MD and Peter Libby, MD (2011). "Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine." **9th ed.**
- Borgstrom, L. and B. Kagedal (1990). "Dose dependent pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral dosing to man." Biopharm Drug Dispos **11**(2): 131-136.
- Brown, M. R., F. J. Miller, Jr., et al. (1999). "Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells." Circ Res **85**(6): 524-533.
- Calvillo, L., S. Masson, et al. (2003). "In vivo cardioprotection by N-acetylcysteine and isosorbide 5-mononitrate in a rat model of ischemia-reperfusion." Cardiovasc Drugs Ther **17**(3): 199-208.
- Canton, M., S. Menazza, et al. (2011). "Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure." J Am Coll Cardiol **57**(3): 300-309.
- Chan, W., A. J. Taylor, et al. (2012). "Effect of iron chelation on myocardial infarct size and oxidative stress in ST-elevation-myocardial infarction." Circ Cardiovasc Interv **5**(2): 270-278.
- Chance, B. Et al (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**, 527.
- Chang, L. Y., J. W. Slot, et al. (1988). "Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2169-2179.
- Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou (1999). "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms." Food Chem Toxicol **37**(9-10): 949-962.
- Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, et al. (1998). "Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." Biochem J **332** ( Pt 1): 43-50.
- Kumar, V; Abbas, A. K; Fausto, N. (2004) "Robbins & Cotran:Patologia -Bases Patológicas das Doenças." 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- DATASUS. (2012). "Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade ", from <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?acao=11&id=31730>.
- De Caro, L., A. Ghizzi, et al. (1989). "Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers." Arzneimittelforschung **39**(3): 382-386.
- Forman, MB, Puett DW, Cates CU, et al. (1988) "Glutathione redox pathway and reperfusion injury: effects of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function." Circulation **78**(2): 202-213.
- Gao, W. D., Y. Liu, et al. (1996). "Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium." Circulation **94**(10): 2597-2604.

- Gao, X., M. Qian, et al. (2010). "Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload." Free Radic Biol Med **49**(3): 401-407.
- Gladden, J. D., B. R. Zelickson, et al. (2013). "Xanthine oxidase inhibition preserves left ventricular systolic but not diastolic function in cardiac volume overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **305**(10): H1440-1450.
- Guertl, B., C. Noehammer, et al. (2000). "Metabolic cardiomyopathies." Int J Exp Pathol **81**(6): 349-372.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (1992). "Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge." Free Radic Biol Med **12**(1): 93-95.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (2010). "Antioxidants: Molecules, medicines, and myths." Biochem Biophys Res Commun **393**(4): 561-564.
- Halliwell, B. (1996). "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans." Free Radic Res **25**(1): 57-74.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge, et al. (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J Lab Clin Med **119**(6): 598-620.
- Hartog, J. W., A. A. Voors, et al. (2007). "Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications." Eur J Heart Fail **9**(12): 1146-1155.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." J Agric Food Chem **53**(6): 1841-1856.
- Jessup, M. and S. Brozena (2003). "Heart failure." N Engl J Med **348**(20): 2007-2018.
- Kaplan, P., M. Matejovicova, et al. (2002). "Effect of myocardial stunning on thiol status, myofibrillar ATPase and troponin I proteolysis." Mol Cell Biochem **233**(1-2): 145-152.
- Kingma, J. G., Jr. and J. R. Rouleau (1989). "Effect of N-acetylcysteine on tissue necrosis during acute myocardial infarction in rabbits." Can J Cardiol **5**(6): 321-326.
- Lee, T. M., P. Y. Lai, et al. (2010). "Effect of N-acetylcysteine on sympathetic hyperinnervation in post-infarcted rat hearts." Cardiovasc Res **85**(1): 137-146.
- Liu, J. Q., T. F. Lee, et al. (2010). "Effects of post-resuscitation treatment with N-acetylcysteine on cardiac recovery in hypoxic newborn piglets." PLoS One **5**(12): e15322.
- Lobo, V., A. Patil, et al. (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." Pharmacogn Rev **4**(8): 118-126.
- Maneewong, K., T. Mekrungruangwong, et al. (2011). "Combinatorial Determination of Ischemia Modified Albumin and Protein Carbonyl in the Diagnosis of NonST-Elevation Myocardial Infarction." Indian J Clin Biochem **26**(4): 389-395.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders, et al. (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review." J Biochem Mol Toxicol **17**(1): 24-38.
- Marklund, S. L. (1982). "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7634-7638.
- Mehra, A., A. Shotan, et al. (1994). "Potentiation of isosorbide dinitrate effects with N-acetylcysteine in patients with chronic heart failure." Circulation **89**(6): 2595-2600.
- Mulholland, C. W. and J. J. Strain (1991). "Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction." Clin Biochem **24**(5): 437-441.
- Nelson, N. (1999). "Metal ion transporters and homeostasis." EMBO J **18**(16): 4361-4371.
- Paraskevaïdis, I. A., E. K. Iliodromitis, et al. (2005). "Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance." Eur Heart J **26**(3): 263-270.
- Perez-Campo, R., M. Lopez-Torres, et al. (1998). "The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach." J Comp Physiol B **168**(3): 149-158.
- Radovanovic, S., A. Savic-Radojevic, et al. (2012). "Markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure." J Card Fail **18**(6): 493-501.
- Ritter, C., M. E. Andrades, et al. (2004). "Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis." Crit Care Med **32**(2): 342-349.
- Ritter, C., A. A. da Cunha, et al. (2006). "Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat." Crit Care Med **34**(2): 471-477.
- Ritter, C., A. Reinke, et al. (2004). "Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats." Crit Care Med **32**(10): 2079-2083.



- Sagrsta, M. L., A. E. Garcia, et al. (2002). "Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation." Free Radic Res **36**(3): 329-340.
- Sies, H. (1991). "Oxidative stress: from basic research to clinical application." Am J Med **91**(3C): 31S-38S.
- Sirker, A., M. Zhang, et al. (2007). "Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure." Am J Nephrol **27**(6): 649-660.
- Sochman, J., J. Kolc, et al. (1990). "Cardioprotective effects of N-acetylcysteine: the reduction in the extent of infarction and occurrence of reperfusion arrhythmias in the dog." Int J Cardiol **28**(2): 191-196.
- Sochman, J., J. Vrbska, et al. (1996). "Infarct Size Limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients." Clin Cardiol **19**(2): 94-100.
- Sprong, R. C., A. M. Winkelhuyzen-Janssen, et al. (1998). "Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1283-1293.
- Suzuki, S., M. Kaneko, et al. (1991). "Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals." Biochim Biophys Acta **1074**(1): 95-100.
- Swynghedauw, B. (1999). "Molecular mechanisms of myocardial remodeling." Physiol Rev **79**(1): 215-262.
- Tang, L. D., J. Z. Sun, et al. (1991). "Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart." Br J Pharmacol **102**(3): 601-606.
- Thomas, C. V., M. L. Coker, et al. (1998). "Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy." Circulation **97**(17): 1708-1715.
- Wardman, P. and L. P. Candeias (1996). "Fenton chemistry: an introduction." Radiat Res **145**(5): 523-531.
- Weisiger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem **248**(13): 4793-4796.
- Wold, L. E., Z. Ying, et al. (2012). "Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution." Circ Heart Fail **5**(4): 452-461.

**Artigo a ser encaminhado à:**  
**CARDIOVASCULAR RESEARCH**  
**ORIGINAL ARTICLE**

---

**Association of N-acetylcysteine and Deferoxamine Improves Cardiac Function in  
Wistar Rats After Acute Myocardial Infarction**

Amanda Phaelante<sup>1,2</sup>, Amanda Lopes<sup>1</sup>, Virgílio Olsen<sup>1</sup>, Santiago Alonso Tobar Leitão<sup>1</sup>,  
Carolina Cohen<sup>1</sup>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>, Luís Eduardo Rohde<sup>1,2</sup>, Felipe Dal-Pizzol<sup>3</sup>, Nadine  
Clausell<sup>1,2</sup>, Michael Andrades<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory, Experimental Research  
Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 12201,  
Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil;

<sup>2</sup>Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>3</sup>Universidade do Extremo Sul Catarinense, Departamento de Medicina. Avenida  
Universitária, 1105, Criciúma, SC, 88806-000, Brazil;

**Corresponding Author:**

Michael Andrades  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Centro de Pesquisa Experimental  
Ramal: +55 (51) 3359 8852  
Fax: +55 (51) 3359 8761  
michaelandrades@gmail.com

## ABSTRACT

**Aim:** To test the association of N-acetylcysteine (NAC) and (deferroxamine – DFX) with cardiac remodeling in a rodent model of ischemic heart failure. **Methods and results:** Male Wistar rats (2 months-old) were subjected to a SHAM surgery or acute myocardial infarction (AMI) by the occlusion of the left anterior descending artery. Twelve hours after, AMI was confirmed by cTnl evaluation and the animals were randomized in the following treatments: vehicle, NAC (25 mg/kg for 28 days), DFX (40 mg/kg for 7 days), or NAC plus DFX (NAC 25 mg/kg for 28 days plus DFX 40 mg/kg for 7 days). Plasma iron levels increased in AMI group at 7 days after the surgery (261 µg/dL) when compared with SHAM group (167 µg/dL) ( $p=0.001$ ) and at 28 days, only NAC/DFX was able to decrease (184 µg/dL) levels of iron compared to AMI group (210 µg/dL) ( $p<0.05$ ). All animals were followed for 28 days and morphofunctional assessments were measured by echocardiography. Animals treated with NAC/DFX showed an increase in ejection fraction at 28 days when compared with vehicle group ( $45.2\% \pm 10.9\%$  vs.  $34.7\% \pm 8.7\%$ ,  $p=0.03$ ). On histological analysis (at 28 days), no treatment had effect on oxidative stress (immunohistochemistry anti-HNE) ( $p=0.06$ ). **Conclusion:** The association of NAC/DFX was able to attenuate chamber remodeling and improve left ventricle function in an animal model of AMI whereas either NAC or DFX had no effect when given alone.

**KEYWORDS:** N-acetylcysteine, Deferroxamine, Heart Failure, Myocardial Infarction, Oxidative Stress.

## INTRODUCTION

Acute myocardial infarction (AMI) is defined as an interruption of the myocardial blood flow promoting myocardial injury and the release of cell content<sup>1</sup>, such as troponins, miRNA, and iron<sup>2</sup>. In this scenario, free radical generation and oxidative stress take place and may be caused both by inflammatory cells infiltrating the myocardium and by cardiomyocytes after the onset of necrosis<sup>3</sup>. Free radical generation is central in the events that follow ischemic injury, such as cardiomyocytes death, impaired contractility, and fibrosis<sup>4</sup>. Depending on the extension of myocardial injury caused by AMI, left ventricular pump failure may occur, leading to a condition called heart failure<sup>5</sup>.

N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant that has been used in clinical practice for several decades. NAC may be used as mucolytic agent and for the treatment of numerous disorders, such as acetaminophen intoxication, doxorubicin-induced cardiotoxicity, stable angina pectoris, ischemia-reperfusion cardiac injury, acute respiratory distress syndrome, and others<sup>6</sup>. The beneficial effect of NAC may be credited to its antioxidant potential, either directly, and indirectly, by replenishing glutathione levels<sup>7</sup>. However, NAC use in cardiology is still under debate since clinical studies have not completely agreed with animal studies<sup>8,9</sup>. The likely explanation could be the latent pro-oxidant potential of NAC that may occur when it reacts with iron ions<sup>10, 11</sup>.

Deferoxamine (DFX) is a well-known iron chelator that has been employed with some success in the management of AMI<sup>12</sup>, cardiomyopathies<sup>13</sup>, and percutaneous angioplasty<sup>14</sup>. DFX has an extremely high affinity for Fe<sup>+3</sup> decreasing its availability for reactive oxygen species (ROS) production<sup>15</sup>. A promising feature of DFX is its ability of improving antioxidant potential of NAC when given together, as previously demonstrated in both clinical<sup>16</sup> and experimental setting<sup>17, 18</sup>. Despite this well-known potential, the association of NAC and DFX has not been explored in experimental cardiovascular injury setting. Thus, the aim of this study is to verify the effects of the

combination of NAC and DFX in histological, biochemical, and echocardiograph parameters, in a model of AMI in Wistar rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

All procedures followed during this investigation conform to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85 – 23, revised 1996) following the ARRIVE guidelines, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (CEUA) by the number 110202.

### **Animals**

A total of 48 male Wistar rats (2 months old) were subjected to AMI (n=37) or SHAM surgery (n=11) as described below. The actual sample number used for each analysis is presented in respective figures or table legends, since due to technical issues the set of data available varied from one animal to another. All animals were kept in a vivarium in a light cycle scheme: dark 12 hours: 12 hours, 22°C, with food and water ad libitum.

### **Myocardial infarction and SHAM procedures**

The animals were weighed and anesthetized with Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally. After being placed in the supine position and intubated with a peripheral intravenous catheter for mechanical ventilation (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) (frequency: 75-80 breaths/min, tidal volume: 2 mL) with O<sub>2</sub> supplementation and maintained on a 37°C hot plate. Sequentially, a surgical small incision was made in the chest and pectoral muscles being put away using a retractor between the ribs to allow better visualization. The pericardium was broken away and left atrium to visualize the left anterior descending coronary artery, which was occluded with a mononylon 6.0 thread, causing myocardial ischemia. After ligation of the coronary artery, the thoracic incision was closed using mononylon 5.0 thread and pneumothorax drained through the air suction with a 10 mL syringe. Analgesic was

given (bupivacaine 1 mg/kg, intramuscular) and animals were removed from mechanical ventilation and placed in a heated environment and enriched with O<sub>2</sub> to the recovery<sup>19, 20</sup>. The procedure has a mortality trans and postsurgical of 25%. Control animals (SHAM) underwent the same surgical procedure without artery occlusion.

### **Treatment**

Rats were randomly assigned into either vehicle (saline, n=10) group, NAC (25 mg/kg/day for 28 days, n=9), DFX (40 mg/kg/day for 7 days, n=9), or NAC plus DFX (NAC 25 mg/kg/day for 28 days plus DFX 40 mg/kg/day for 7 days, n=9). Drugs were started 12 hours after myocardial infarction. All animals were followed for 28 days. The drugs were administered by subcutaneous injection.

### **Troponin I (cTnI) and total iron measurements**

Heparinized blood samples (1 mL) were drawn by retro-orbital plexus puncture 12 hours after surgery under 2.5% of isoflurane anesthesia. Samples were immediately centrifuged at 1000 x g for 10 min, and the plasma was stored at -80°C for posterior biochemical analysis. The cTnI concentration was evaluated by electrochemiluminescence immunoassay (ADVIA Centaur CP, TnI-Ultra™, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA). This ultra-sensitive method is capable to identify cTnI values ranging between 0.006 up to 50 ng/mL and presents cross-reactivity with rat cTnI, as previously demonstrated<sup>21, 22</sup>. The total iron was evaluated by Fe<sup>+2</sup> quelation by ferrozine<sup>23</sup> in an automated method (ADVIA Centaur CP™) capable of identifying values ranging between 2 up to 1000 µg/dL. The method uses guanidinium chloride to avoid protein precipitation and is free from interference of cooper. The end product absorbs light at 571/658 nm and the results were expressed as µg/dL.

### **Echocardiogram**

Echocardiographic analyses were performed in order to follow the progression of cardiac remodeling after myocardial infarction. The images were collected at 2, 14, and 28 days after AMI. To this end, the animals were induced anesthesia with 2.5% of

isoflurane and maintained anesthetized with 1.5%, shaved and placed in the left lateral position (45° angle). We used echocardiography Philips Systems – HD-7 (Andover, MA, USA) with a 12-3 MHz transducer and a depth of 2 cm. We measured longitudinal and transverse axis (two chambers). The linear measurements taken from images obtained by M-mode were: left ventricular (LV) diameters at end-diastole (LVDD) and end-systole (LVSD). The ejection fraction (EF) was calculated by Teicholz formula ( $EF = \frac{(\text{Diastolic ventricular volume})^3 - (\text{Systolic ventricular volume})^3}{(\text{Diastolic ventricular volume})^3} \times 100$ ) and the fractional shortening (FS) by formula ( $FS = \frac{(\text{Diastolic ventricular volume} - \text{Systolic ventricular volume})}{\text{Diastolic ventricular volume}}$ )<sup>24</sup>. The extent of infarction (MI %), assessed by measuring the length of akinetic and / or region area hypokinetic (RAH) of the ventricular walls is expressed as a percentage of the total perimeter of endocardial (PE) in three transverse sections of the LV (the edges of the mitral valve leaflets, papillary muscles and apical), using the formula:  $MI \% = \frac{RAH}{PE} \times 100$ <sup>25</sup>. The images were captured by an operator who was blinded to the study groups.

### **Histological and immunohistochemical assessment**

After the last echocardiographical assessment, the animals were euthanized and had the hearts removed and separated in three shares (basal, medial, and apical). Immediately the sections were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin for determination of infarct size and oxidative stress. Slices were stained with Picrosirius Red to estimate the infarct size. Sections were photographed using Q Capture Pro Software v.5.1.1.14 (Q Imaging Co. Burnaby, BC, Canada). For each section of the heart (basal, medial, and apical), five partial photos were obtained (at 10-fold magnification). The red staining area indicates the infarcted zone whereas the green staining area indicates the healthy zone. The pixels for each stain was determined with the aid of software (Adobe Photoshop CS2) and the infarcted area was estimated by the formula:  $\frac{\text{pixels zone infarct area}}{(\text{pixels zones infarct area} + \text{pixels zone healthy})}$

area) x 100. The values represent the mean value among the basal, medial, and apical areas.

Tissue oxidative stress was determined by immunodetection of 4-hydroxynonenal, which is a marker of lipid peroxidation. Briefly, paraffin-embedded tissues were sectioned (5  $\mu$ m), deparaffinized, and rehydrated. The slides were incubated with unmasking buffer (sodium citrate 10 mM, pH 6) at 95°C for 30 min for antigen retrieval and then subsequently incubated with 5% nonfat milk in TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton 0.025% pH 7.6) for 1 hour to block the nonspecific binding sites. After several washes with TTBS the sections were incubated with a rabbit anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (25  $\mu$ g/mL diluted in TTBS) overnight at 4°C. After 3 washes with TTBS the sections were incubated in 3% hydrogen peroxide (25 minutes) to block endogenous peroxidase. After washes, the antigen was demonstrated using secondary anti-rabbit polymer HRP and DAB chromogen and counterstaining with haematoxylin. The proportion of lipid peroxidation products was quantified using Image J software and the colour deconvolution plugin. DAB intensity was measured in the apical heart. The final DAB intensity was calculated according to the formula:  $f=255-i$ , where  $f$  is final DAB intensity and  $i$  is the mean DAB intensity varying from 0 (dark brown, highest expression) to 255 (white, no expression)<sup>26</sup>.

#### **Determination of sulfhydryls group in plasma**

This assay was performed according to Soszynski et al<sup>27</sup> to detect reduced thiol groups as an indicative of plasma redox status. The protein samples were previously assayed by the Bradford method. Briefly, free SH groups of plasma sample (45  $\mu$ L) were reacted with 10  $\mu$ L of 10 mM DNTB (diluted in ethanol). The reaction was measured spectrophotometrically at 412 nm in microplate by following the formation of the yellowish 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB). The concentration of color complex protein was determined using the linear equation obtained with a standard curve of reduced glutathione. Results were reported as nmol of SH/mg protein.

#### **Determination of protein carbonyl content in plasma**



Protein carbonyl content, a marker of oxidized proteins, was measured spectrophotometrically according to Levine et al<sup>28</sup>. The protein samples were previously assayed by the Bradford method. We used 20  $\mu$ L of sample for the reaction. After proteins precipitation with 20% TCA and centrifugation at 1.100 g for 3 min at 4 °C, pellet was dissolved in 10 mM of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) diluted in 2 M HCl. After 3 washings with ethanol-ethylacetate (1:1), pellet was dissolved in 20 mM potassium phosphate (pH 2.3) containing 6 M guanidine-HCl and absorbance measured at 380 nm in plastic plate using the molar extinction coefficient of 22.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Results were expressed as nmol carbonyl residues/mg protein.

#### **Determination of total antioxidant capacity of plasma by FRAP assay**

The antioxidant plasma capacity, assayed in terms of the ferric reducing ability of plasma (FRAP), was performed according to Benzie and Strain<sup>29</sup>. At low pH the plasma mediated reduction of ferric-tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) to a ferrous form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) produces blue color. Seven microliters of plasma were diluted with distilled water (18  $\mu$ L) and reacted with 175  $\mu$ L of FRAP reagent (0.83 mM TPTZ, 1.67 mM  $\text{FeCl}_3$ , 250 mM acetate buffer). A standard curve was constructed with  $\text{FeSO}_4$  (range: 0.75 – 12.5 nmol) and assayed in the same conditions described above. The absorbance was measured in microplate reader at 593 nm and the results were expressed as  $\mu$ mol/L.

#### **Statistical analysis**

Quantitative analyses were performed using the Software Package for Statistical Science (SPSS for Windows, version 16, SPSS Inc.; Chicago, IL). Data are presented as means  $\pm$  standard error. After verifying that the variables were normally distributed by means of Shapiro-Wilk normality testing, the effects of NAC/DFX in different groups were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD test. The temporal analyses of the plasma samples were examined by Generalized Estimating Equations (GEE) followed by Bonferroni test. Differences with a p value of  $\leq 0.05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Plasma cTnl and iron levels

Plasma cTnl levels increased in the AMI group when compared with SHAM group 12 hours after the surgery (*Figure 1*). Also, cTnl levels did not differ among the animals before the start of the treatment, (data not shown) indicating that ischemic lesions were similar. Plasma iron levels increased in AMI group at 7 days after the surgery (261  $\mu\text{g/dL}$ ) when compared with SHAM group (167  $\mu\text{g/dL}$ ) ( $p=0.001$ ). All treatments prevented this increase, keeping the values at the SHAM levels. At 28 days only NAC/DFX group decreased the levels of iron (184  $\mu\text{g/dL}$ ) when compared to AMI group (210  $\mu\text{g/dL}$ ) (*Figure 2*).

### Echocardiogram analysis

All echocardiographic analyses were performed sequentially at 2, 14, and 28 days in order to follow the cardiac remodeling overtime. Homogeneity between infarcts was confirmed by echocardiographic analyses 2 days after the surgery, which demonstrated no difference in akinetic areas, dilation or function (*Table 1*). Treatments had no effect on echocardiographic parameters at 2 and 14 days. However, at the end of experimental design (28 days) NAC/DFX group presented decreased systolic diameter (7.9 mm  $\pm$  0.7 mm vs. 8.7 mm  $\pm$  1 mm,  $p=0.04$ ) compared to AMI group (*Figure 3A*), and improvement in ejection fraction when compared with vehicle treated group (45.2%  $\pm$  10.9% vs. 34.7%  $\pm$  8.7%,  $p=0.03$ ) (*Figure 3B*). Neither NAC nor DFX modified the functional characteristics when given alone. Others additional echocardiographic data are shown in *Table 1*.

### Infarct size by histology

As expected, fibrosis was higher in AMI group compared to SHAM (SHAM=1.5%  $\pm$  5% vs. AMI=31%  $\pm$  11%). None of the treatments had any effect on infarct size (*Figure 4A*).

### Cardiac oxidative stress

To investigate whether the NAC/DFX association altered cardiac oxidative stress we examined a lipid peroxidation marker, namely 4-HNE, by immunohistochemistry. The lipid peroxidation was reduced in the group that received NAC alone (*Figure 4B*). Unexpectedly, the association NAC/DFX did not alter this oxidative parameter ( $p=0.06$ ).

### **Plasma oxidative stress**

Plasma oxidative markers were evaluated overtime. Unexpectedly, no change was detected among the groups in plasma carbonyl, sulfhydryl, or total antioxidant potential (assessed by FRAP) (*Table 2*) within each time.

## **DISCUSSION**

In this study, we have investigated the role of the association of an antioxidant with an iron chelator in a model of AMI in Wistar rats on echocardiographic, biochemical, and histological parameters. We show, for the first time, that the association of NAC and DFX improved cardiac function 28 days after AMI in an animal model, whereas neither NAC nor DFX exerted beneficial effects when given alone.

NAC has been tested as a treatment for AMI in both experimental and clinical settings with controversial results<sup>30, 31</sup>. Despite being a potent antioxidant, NAC may present a pro-oxidant property when contacting iron ions<sup>11</sup>. In fact, it has been demonstrated that patients suffering of AMI presented increased serum iron levels, which are followed by lipid peroxidation products after the ischemic event<sup>2</sup>. Since the reaction between iron and NAC may yield free radicals in biological systems<sup>10, 11</sup>, it can be suggested that the lack of beneficial effect seen in some studies that employed NAC alone may be related to presence of high levels of iron. This suggestion finds support on previous studies in animal model of sepsis<sup>17</sup> and liver failure<sup>32</sup> that demonstrated the effectiveness association of NAC and DFX.

The levels of iron ions presented no difference between the SHAM and AMI groups at 12 hours after the myocardial insult, perhaps due to the early evaluation. The

total iron levels were increased 7 days after the AMI and all treatment groups prevented this increase. NAC/DFX group was the only group capable of reducing iron levels until the end of the protocol. In this study, we measured total plasma iron, which is composed by both catalytic and non-catalytic pool and the values are in agreement with previous study<sup>33</sup>. However, it is suggested that only the catalytic iron pool is involved on iron-induced oxidative stress through the Fenton Reaction. Catalytic iron levels in plasma were two orders of magnitude below the levels found for total plasma iron<sup>34, 35</sup>. Thus, despite evidencing effects of NAC/DFX on plasma iron levels, we suggest that a more accurate assay should be employed in order to unveil the effects of the treatments in the catalytic iron pool.

In the current protocol the rats received DFX for only 7 days following the AMI whereas NAC was given every day for 28 days. The DFX dose and regimen were chosen based on previous studies that have already employed this combination<sup>17, 18</sup> and on the behavior of iron release post-AMI described in humans<sup>2</sup>. The cardiac function was followed by echocardiography for 28 days and an improvement could be seen only at the end of protocol for NAC/DFX treated rats, with a net improvement of 10% in ejection fraction and decreased of systolic chamber diameter. However, no improvement in cardiac remodeling parameters could be seen. Lee et al. (2010) demonstrated that rats subjected to myocardial infarction and treated for 28 days with NAC 250 mg/kg (intra-gastric) had improvement of nearly 4% in the fractional shortening and a reduction in chamber dilation. This beneficial effect attributed to NAC alone may be regarded to some differences seen when comparing the studies designs, such as NAC dose or route of administration. Moreover, it cannot exclude the fact that the effect of NAC could be enhanced if we reduced the iron overload system<sup>36</sup>.

We also attempted to uncover the mechanism underlying the improvement in cardiac function in rats treated with NAC/DFX. First, we tried a non-invasively approach where the systemic oxidative stress was assessed in time-course fashion. Previously, we and others have demonstrated that plasma oxidative stress is a reliable surrogate

of the organ oxidative stress<sup>17,18</sup>. In the present study, we evaluated oxidative stress parameters in plasma and we did not detect important effects of the treatments in the times assessed. Some authors evaluated parameters of oxidative stress in plasma and found a decrease of these parameters<sup>16</sup>. Surprisingly, AMI group also did not differ from SHAM group in all measurements. To exclude the possibility that plasma evaluation could mask organ differences, we decided to evaluate cardiac oxidative stress using an antibody designed against 4-HNE, the main lipoperoxidation side product<sup>37</sup>. Despite the NAC/DFX group did not reach statistical significance, it is clearly perceived a decrease in oxidative stress compared with AMI group. Curiously, NAC-treated rats also presented lower levels of 4-HNE in the heart tissue and this suggests that other mechanisms than lipoperoxidation are involved in cardiac dysfunction.

Increased production of ROS during heart failure impacts on proteins involved in the excitation-contraction coupling and the Ca<sup>2+</sup> handling, such as ryanodine receptor<sup>38</sup>. Moreover, mitochondrial calcium influx is one of the most common factors of inducing mitochondrial derived ROS generation. The mitochondrial DNA (mtDNA) could be a major target for ROS mediated damage for any reasons. The mitochondria do not have a complex chromatin organization consisting of histone proteins that may serve as protection against ROS. The mtDNA has a limit repair activity against DNA damage and a large part of superoxide radical is formed inside the mitochondria and cannot pass through the membranes. Hence, ROS damage may be contained largely within the mitochondria<sup>39</sup>.

Our study had some limitations that should be considered. First, the total iron measured in this study is not the catalytic iron, or iron that participates in oxidative stress. Instead, due to the assay characteristics, we measured total iron, which is two order of magnitude higher than catalytical iron. Thus, we suggest that the major changes of NAC/DFX in this fraction could not be detected. Second, we did not perform oxidative stress analyses in cardiac tissue, except for HNE, the major lipid peroxidation

by-product. The effect of NAC/DFX on HNE levels indeed suggests that a further assessment must be performed in other oxidative stress markers in cardiac tissue.

## **CONCLUSION**

In summary, our study showed the association of NAC and DFX was able to improve left ventricle function in an animal model of AMI in spite of not decreasing myocardial oxidative stress. This suggests that the antioxidant effects of NAC (potentiated by association with DFX) are protectively acting on cardiac function. Nevertheless, these data may be provocative into the development of novel treatment strategies to attenuate or prevent myocardial remodeling that leads to ventricular dysfunction and heart failure. Therefore, more strategy must be designed to explore these results.

## **FUNDING**

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Secretaria de Ciência e Tecnologia da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS # 11/1970-3), and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

## **CONFLICT OF INTEREST**

None to declare.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Plasma cTnI levels 12 hours after myocardial infarction induction.** The cTnI levels were assessed in the SHAM group (n=11), AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=9), and in AMI+NAC/DFX (n=9) animals. AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine). Bars represent mean  $\pm$  standard error. The means were compared using ANOVA one-way post-hoc LSD. Values of SHAM:  $6.49 \pm 3.08$  (ng/mL). (\*) indicates difference between SHAM with AMI group;  $p < 0.05$ .

**Figure 2: Plasma total iron on subsequent days.**

The total iron levels were assessed in all groups. Symbols represent mean. The means were compared using GEE test post-hoc Bonferroni. SHAM (n=9), AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=8), and in AMI+NAC/DFX (n=8) animals. AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine), (\*) indicates difference between SHAM and AMI group. (†) indicates difference between AMI, and NAC/DFX group;  $p < 0.05$ .

**Figure 3: Cardiac functions assessed by echocardiography at 2, 14 and 28 days post-surgery.** Evaluation by echocardiography was performed in SHAM group (n=11), AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=9), and in AMI+NAC/DFX (n=9) animals. (A) Systolic diameter. Values of SHAM: 2 days ( $3.3 \pm 0.9$  mm), 14 days ( $3.7 \pm 0.7$  mm), and 28 days ( $4.0 \pm 0.9$  mm). (B) Ejection fraction. Values of SHAM: 2 days ( $85.3 \pm 3.2\%$ ), 14 days ( $86.1 \pm 1.8\%$ ), and 28 days ( $82.1 \pm 2.9\%$ ). AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine). Bars represent mean  $\pm$  standard error. The means were compared using ANOVA one-way post-hoc LSD. (\*) indicates difference between SHAM and AMI group;  $p < 0.05$ . (†) indicates difference between AMI, and treatment groups;  $p < 0.05$ .

**Figure 4: Histological evaluations performed 28 days after surgery.** (A) The percentage of fibrosis evaluated by Picrosirius was performed in SHAM group (n=11),

AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=9), and in AMI+NAC/DFX (n=9) animals. Values of SHAM:  $1.45 \pm 1.3$  (%). (B) The lipid peroxidation was evaluated in order to monitor the oxidative stress in tissue, the immunohistochemistry was performed in SHAM group (n=6), AMI (n=5), AMI+NAC (n=4), AMI+DFX (n=6), and in AMI+NAC/DFX (n=4) animals. Values of SHAM:  $21.7 \pm 3.5$  (pixels). AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine). Bars represent mean  $\pm$  standard error. The means were compared using ANOVA one-way post-hoc LSD. (\*) indicates difference between SHAM and AMI group;  $p < 0.05$ . (†) indicates difference between AMI and NAC group;  $p < 0.05$ .

**Table 1: Echocardiographic analysis at 2, 14, and 28 days.**

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error.

SHAM (n=11), AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=9), and in AMI+NAC/DFX (n=9) animals. AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine). (\*) indicates difference between SHAM and AMI group;  $p < 0.05$ . (†) indicates difference between AMI and NAC/DFX group;  $p < 0.05$ .

**Table 2: Assessments of oxidative stress at 12 hours, 2, 7, and 28 days.**

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error.

SHAM (n=9), AMI (n=10), AMI+NAC (n=5), AMI+DFX (n=8), and in AMI+NAC/DFX (n=8) animals. AMI (acute myocardial infarction), NAC (N-acetylcysteine), DFX (deferoxamine), FRAP (ferric reducing ability of plasma). (\*) indicates difference between SHAM and AMI group;  $p < 0.001$ .



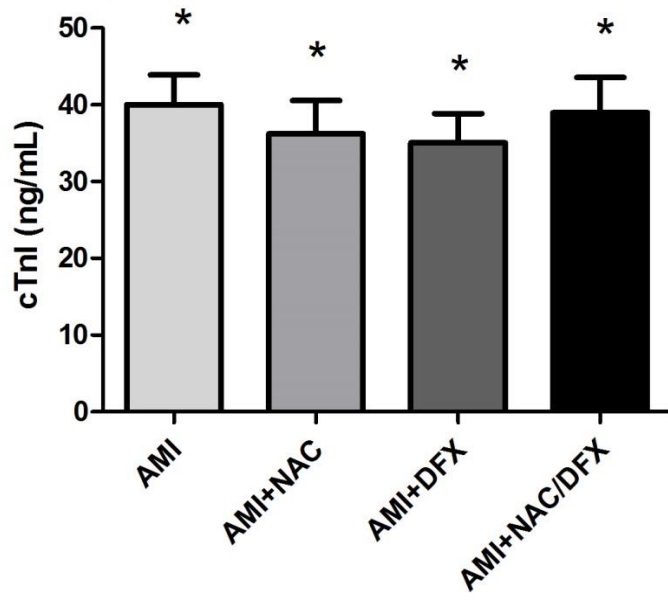


Figure 1

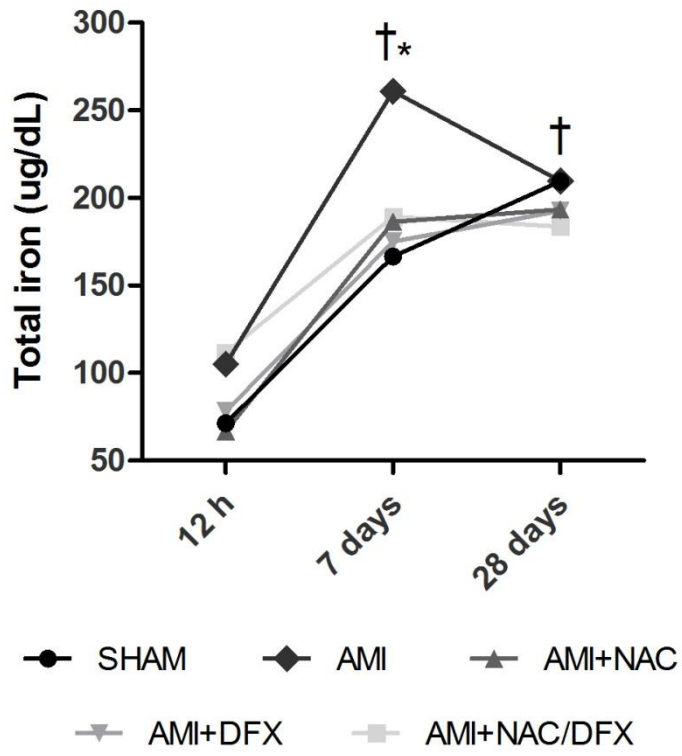


Figure 2

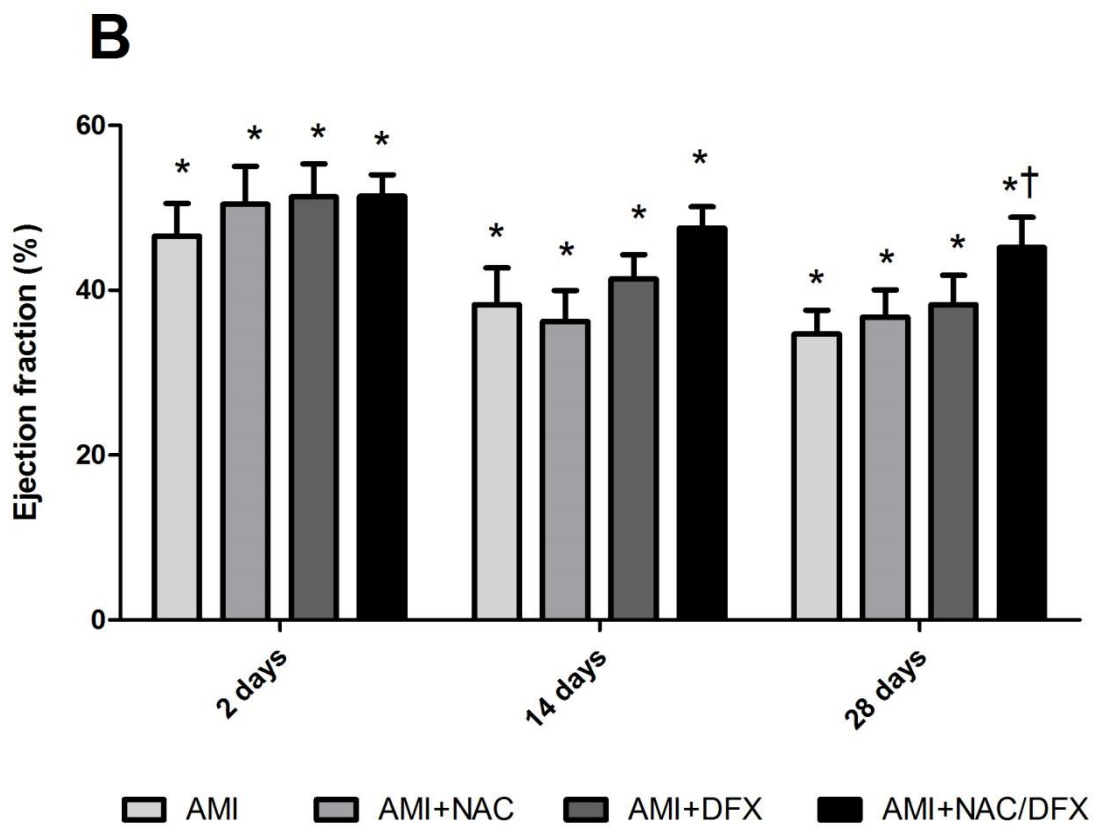
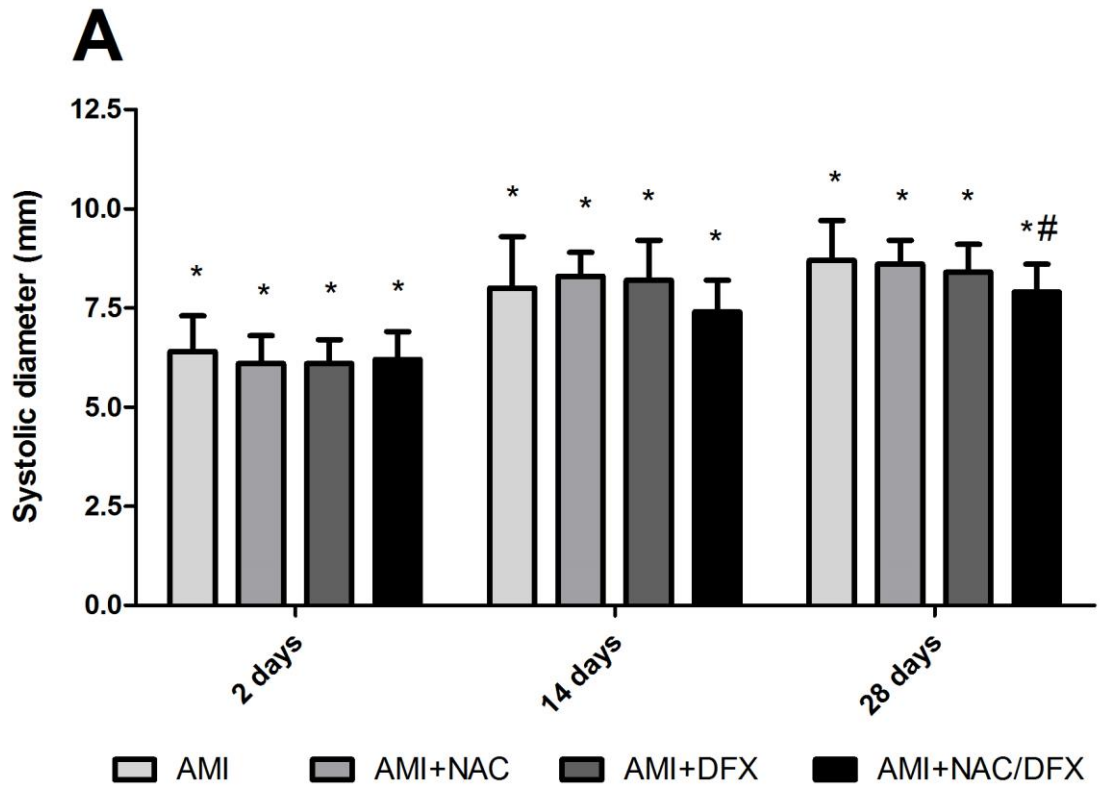


Figure 3

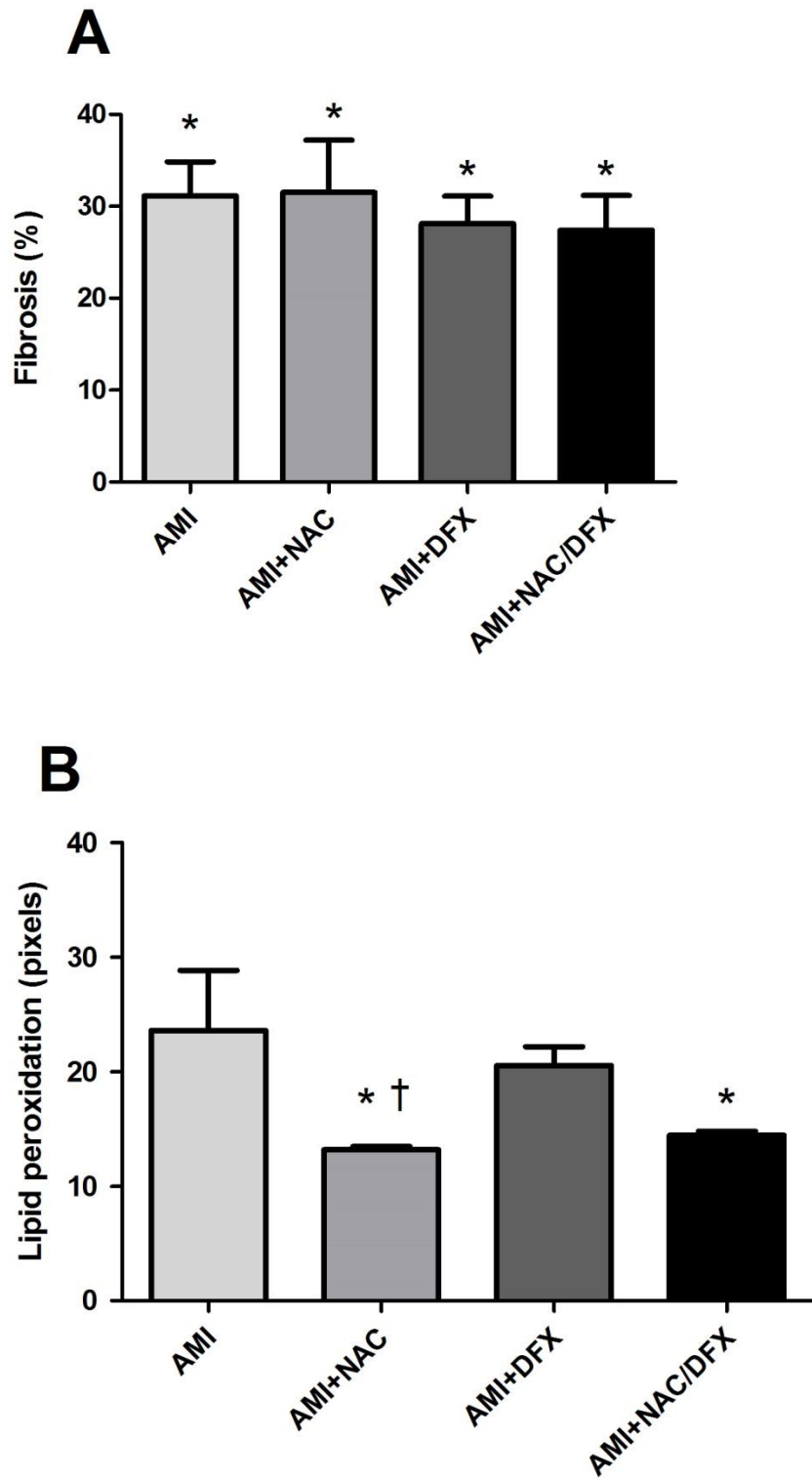


Figure 4

**Table 1**

<b>Variables</b>	<b>Groups</b>	<b>2 days</b>	<b>14 days</b>	<b>28 days</b>
<b>Infarcted Area (%)</b>	SHAM	0	0	0
	AMI	40.7 ± 2.8*	37.4 ± 3.3*	34.5 ± 2.3*
	AMI+NAC	41.5 ± 1.7*	38.2 ± 2.4*	31.5 ± 1.9*
	AMI+DFX	40.9 ± 2.6*	35.3 ± 2.0*	35.1 ± 3.2*
	AMI+NAC/DFX	37.2 ± 1.9*	33.9 ± 2.6*	33.4 ± 1.8*
<b>Fractional shortening (%)</b>	SHAM	49.8 ± 3.6	49.5 ± 2.3	45.4 ± 3.3
	AMI	19.3 ± 2.1*	15.3 ± 2.1*	13.3 ± 1.3*
	AMI+NAC	21.2 ± 2.3*	14.1 ± 1.7*	14.2 ± 1.4*
	AMI+DFX	21.8 ± 2.1*	16.5 ± 1.4*	15.1 ± 1.5*
	AMI+NAC/DFX	21.5 ± 1.4*	19.7 ± 1.3*	18.6 ± 1.9*
<b>Diastolic Diameter (mm)</b>	SHAM	6.6 ± 0.6	7.3 ± 0.7	7.3 ± 0.6
	AMI	7.9 ± 0.8*	9.5 ± 1.0*	10 ± 0.8*
	AMI+NAC	7.8 ± 0.6*	9.6 ± 0.3*	10 ± 0.5*
	AMI+DFX	7.8 ± 0.4*	9.8 ± 0.9*	9.8 ± 0.5*
	AMI+NAC/DFX	7.9 ± 0.5*	9.2 ± 0.8*	9.7 ± 0.4*
<b>Posterior Wall (mm)</b>	SHAM	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.4
	AMI	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.4
	AMI+NAC	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2†	1.5 ± 0.2
	AMI+DFX	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.4†	1.7 ± 0.3
	AMI+NAC/DFX	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.4†	1.8 ± 0.3

**Table 2**

<b>Variable</b>	<b>Groups</b>	<b>12 h</b>	<b>2 days</b>	<b>7 days</b>	<b>28 days</b>
<b>Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)</b>	SHAM	0.58 ± 0.07	2.50 ± 0.23	1.41 ± 0.07	1.31 ± 0.18
	AMI	0.73 ± 0.09	3.27 ± 0.53	1.51 ± 0.09	1.46 ± 0.22
	AMI+NAC	0.79 ± 0.22	3.41 ± 0.57	2.03 ± 0.36*	1.34 ± 0.21
	AMI+DFX	0.71 ± 0.06	2.91 ± 0.44	1.63 ± 0.12	1.58 ± 0.23
	AMI+NAC/DFX	0.70 ± 0.15	2.70 ± 0.36	1.71 ± 0.13	1.02 ± 0.23
<b>Sulfhydryl (nmol sulfhydryl/mg protein)</b>	SHAM	1.84 ± 0.14	1.33 ± 0.13	1.80 ± 0.20	2.15 ± 0.11
	AMI	1.96 ± 0.20	0.94 ± 0.19	1.75 ± 0.23	2.33 ± 0.18
	AMI+NAC	1.92 ± 0.10	0.81 ± 0.27	1.54 ± 0.36	2.16 ± 0.34
	AMI+DFX	1.72 ± 0.27	1.08 ± 0.16	1.47 ± 0.32	2.42 ± 0.26
	AMI+NAC/DFX	1.75 ± 0.26	0.80 ± 0.19	1.40 ± 0.33	1.93 ± 0.29
<b>FRAP μmol/L</b>	SHAM	302.13 ± 15.10	224.87 ± 6.24	267.71 ± 15.76	242.00 ± 9.41
	AMI	288.17 ± 15.84	232.37 ± 7.62	265.15 ± 17.97	263.79 ± 14.84
	AMI+NAC	308.10 ± 23.76	241.50 ± 9.78	306.74 ± 43.92	267.99 ± 15.68
	AMI+DFX	281.55 ± 11.09	231.61 ± 8.95	294.83 ± 19.22	240.42 ± 6.82
	AMI+NAC/DFX	319.15 ± 21.46	238.23 ± 9.67	262.85 ± 27.05	242.49 ± 13.52

## REFERENCES

1. Theroux P, Ross J, Jr., Franklin D, Covell JW, Bloor CM, Sasayama S. Regional myocardial function and dimensions early and late after myocardial infarction in the unanesthetized dog. *Circ Res* 1977;**40**:158-165.
2. Baykan M, Celik U, Orem A, Malkoc M, Erdol C, Baykan EC, *et al.* Iron status and its relationship with lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* 2001;**56**:277-281.
3. Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM, *et al.* Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2010;**13**:1033-1049.
4. Lombardi R, Rodriguez G, Chen SN, Ripplinger CM, Li W, Chen J, *et al.* Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms. *Circulation* 2009;**119**:1398-1407.
5. Bonow, M., Douglas L. Mann, MD, Facc, Douglas P. Zipes, MD and Peter Libby, MD (2011). "Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine." **9th ed.**
6. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1830**:4117-4129.
7. Sochman J. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?! *J Am Coll Cardiol* 2002;**39**:1422-1428.
8. Peker O, Peker T, Erdogan D, Ozaydin M, Kapan S, Sutcu R, *et al.* Effects of intravenous N-acetylcysteine on periprocedural myocardial injury after on-pump coronary artery by-pass grafting. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2008;**49**:527-531.
9. Braunersreuther V, Jaquet V. Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;**13**:97-114.
10. Sagrista ML, Garcia AE, Africa De Madariaga M, Mora M. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2002;**36**:329-340.
11. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;**157**:1283-1293.
12. Chopra K, Singh M, Kaul N, Andrabi KI, Ganguly NK. Decrease of myocardial infarct size with desferrioxamine: possible role of oxygen free radicals in its ameliorative effect. *Mol Cell Biochem* 1992;**113**:71-76.
13. Yang T, Brittenham GM, Dong WQ, Levy MN, Obejero-Paz CA, Kuryshev YA, *et al.* Deferoxamine prevents cardiac hypertrophy and failure in the gerbil model of iron-induced cardiomyopathy. *J Lab Clin Med* 2003;**142**:332-340.
14. Chan W, Taylor AJ, Ellims AH, Lefkovits L, Wong C, Kingwell BA, *et al.* Effect of iron chelation on myocardial infarct size and oxidative stress in ST-elevation-myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv* 2012;**5**:270-278.
15. Gutteridge JM, Richmond R, Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J* 1979;**184**:469-472.
16. Fraga CM, Tomasi CD, Biff D, Topanotti MF, Felisberto F, Vuolo F, *et al.* The effects of N-acetylcysteine and deferoxamine on plasma cytokine and oxidative damage parameters in critically ill patients with prolonged hypotension: a randomized controlled trial. *J Clin Pharmacol* 2012;**52**:1365-1372.
17. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;**32**:342-349.
18. Ritter C, da Cunha AA, Echer IC, Andrades M, Reinke A, Lucchiari N, *et al.* Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med* 2006;**34**:471-477.
19. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;**44**:503-512.
20. Tavares AM, da Rosa Araujo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Bello-Klein A, *et al.* Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 2010;**87**:699-706.

21. O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, Marchak MA, Prumboom-Brees I, Brees DJ, *et al.* Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim* 2006;**40**:153-171.
22. Vietta GG, Andrades ME, Dall'alba R, Schneider SI, Frick LM, Matte U, *et al.* Early use of cardiac troponin-I and echocardiography imaging for prediction of myocardial infarction size in Wistar rats. *Life Sci* 2013;**93**:139-144.
23. Artiss JD, Vinogradov S, Zak B. Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. *Clin Biochem* 1981;**14**:311-315.
24. dos Santos L, Mello AF, Antonio EL, Tucci PJ. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res* 2008;**41**:199-201.
25. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. [Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure]. *Arq Bras Cardiol* 2006;**86**:105-112.
26. Neto EP, Fuhrich DG, Carson DD, Engel BJ, Savaris RF. Elafin expression in mucosa of fallopian tubes is altered by hydrosalpinx. *Reprod Sci* 2013.
27. Soszynski M, Bartosz G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radic Biol Med* 1997;**23**:463-469.
28. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;**233**:346-357.
29. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;**239**:70-76.
30. Bodemann T, Langescheid C, Hochrein H. Nitrate tolerance and its management by N-acetylcysteine (studies of patients with severe chronic heart failure). *Z Kardiol* 1989;**78**:328-334.
31. Meyer M, Bell SP, Chen Z, Nyotowidjojo I, Lachapelle RR, Christian TF, *et al.* High dose intracoronary N-acetylcysteine in a porcine model of ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 2013;**36**:433-441.
32. Ritter C, Reinke A, Andrades M, Martins MR, Rocha J, Menna-Barreto S, *et al.* Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. *Crit Care Med* 2004;**32**:2079-2083.
33. Annet J.C. Roodenburg, West CE, Anton C. Beynen. Iron status in female rats with different, stable plasma retinol concentrations. *Nutrition Research* 1996;**16**:1199-1209.
34. Lele S, Shah S, McCullough PA, Rajapurkar M. Serum catalytic iron as a novel biomarker of vascular injury in acute coronary syndromes. *EuroIntervention* 2009;**5**:336-342.
35. Steen DL, Cannon CP, Lele SS, Rajapurkar MM, Mukhopadhyay B, Scirica BM, *et al.* Prognostic evaluation of catalytic iron in patients with acute coronary syndromes. *Clin Cardiol* 2013;**36**:139-145.
36. Lee TM, Lai PY, Chang NC. Effect of N-acetylcysteine on sympathetic hyperinnervation in post-infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:137-146.
37. Casasco A, Calligaro A, Casasco M, Tateo S, Icaro Cornaglia A, Reguzzoni M, *et al.* Immunohistochemical localization of lipoperoxidation products in normal human placenta. *Placenta* 1997;**18**:249-253.
38. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:310-321.
39. Tsutsui H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med* 2001;**40**:1177-1182.