

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DO CORAÇÃO

ANA ELISA TEÓFILO SATURI DE CARVALHO

***Metabolismo energético mitocondrial
e cardiomiogênese para regeneração cardíaca***

São Paulo - 2016

ANA ELISA TEÓFILO SATURI DE CARVALHO

***Metabolismo energético mitocondrial
e cardiomiogênese para regeneração cardíaca***

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Coorientador: Dr. Vinícius Bassaneze

São Paulo – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Saturi de Carvalho, Ana Elisa Teófilo

Metabolismo energético mitocondrial e cardiomiogênese para regeneração
cardíaca / Ana Elisa Teófilo Saturi de Carvalho. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Coorientador: Vinícius Bassaneze.

Descritores: 1.Coração 2.Regeneração cardíaca 3.Análise de sequência de
RNA 4.Cardiomiócitos 5.Metabolismo energético 6.Mitocôndrias 7.Proliferação

USP/FM/DBD-192/16

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processos 2012/10109-7; 2013/17368-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [404733-2012-3], CAPES PROBITEC [23038-4156-2012-80], Ministério da Saúde do Brasil [MS-DECIT-PROADI_SUS – H. Samaritano] e Fundação Zerbini.

Dedico esta tese com amor ao meu esposo Danilo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, pelo discernimento em minhas escolhas e pelas bênçãos concedidas.

Ao meu esposo Danilo, amor da minha vida. Agradeço pelo amor e carinho que são alicerces nas minhas conquistas, e por todo incentivo, sem o qual este trabalho não seria possível. Você é a razão da minha felicidade. Amo você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Krieger pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, pelo exemplo de dedicação à ciência e pela confiança em mim depositada para realização deste projeto. Agradeço toda orientação, fundamental para meu desenvolvimento profissional e intelectual, e para minha formação como pesquisadora.

À minha grande mentora e amiga Dra. Juliana Sanajotti Nakamuta. Agradeço pela acolhida carinhosa ao LGCM e por toda dedicação a este trabalho. Sua sabedoria científica foi fundamental para minha formação e concretização deste trabalho. Nossa amizade é iluminada.

Ao meu coorientador e amigo Dr. Vinícius Bassaneze. Agradeço a orientação diária, toda a presteza em auxiliar no que fosse necessário, e o incentivo constante pela busca da verdade neste trabalho. Nossas conversas, científicas ou não, foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal, e me ensinaram que pensamentos e atitudes positivas transformam tudo.

Ao Instituto do Coração e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A todos os funcionários destas instituições que direta ou indiretamente fizeram possível a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM), em que este trabalho foi desenvolvido. Agradeço a todos os que passaram pelo laboratório durante a realização deste trabalho e que contribuíram de maneira preciosa para realização do mesmo.

À Silvana Campos, Maria de Lurdes Junqueira, Marcelly Rosal, Priscila Miagui, Ana Maria Piesco, Lucia Mariano e a todas que passaram pela secretaria do LGCM, agradeço a atenção e todo auxílio durante esses anos. À Andréia, Brendo, Sileide e Márcio Chaves por todo carinho e auxílio. Agradeço ao querido Arruda por toda ajuda e as boas risadas. Agradeço aos técnicos do LGCM, Mariliza Velho, Thiago Turaça, Elida Neri que foram fundamentais para o desenvolvimento das técnicas utilizadas neste trabalho, e a Renata Carmona, que sempre se empenhou em auxiliar.

A todos os colegas de laboratório pela convivência e considerações relevantes para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço em especial às valiosas contribuições de Gabriela Venturini e Dra. Ayumi Miyakawa.

À Dra. Miriam Helena Fonseca Alaniz, que muito me auxiliou nos experimentos e dúvidas diárias, por ceder reagentes para os experimentos enzimáticos e pela revisão crítica desta tese.

Ao querido futuro doutor André Franco, a quem tive a honra de auxiliar no início de sua trajetória científica. Agradeço a maneira como confiou em meu trabalho e pela amizade verdadeira.

A minha amiga Dra. Luciana Damous, com quem tive o prazer de trabalhar junto. Agradeço a confiança e a oportunidade de colaborar em seus trabalhos, e todas as boas e longas conversas sobre ciência e sobre a vida.

Agradeço à Dra. Viviane M. Cáceres pelos experimentos de hemodinâmica e ao Dr. Luciano de Figueiredo Borges pelo auxílio e análises de microscopia eletrônica e de luz polarizada.

Ao Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo por ter disponibilizado o laboratório, e principalmente ao Vitor, Denise e João por todo auxílio.

Ao Laboratório de Metabolismo Energético do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Agradeço à Profa. Dra. Alicia Kowaltowski, pela valiosa colaboração a este trabalho e pelos ensinamentos mitocondriais. Agradeço ainda a todos os colegas deste laboratório que me acolheram abertamente e se envolveram também na realização deste projeto. À Camille Caldeira por todo auxílio e dedicação, e em especial à querida Dra. Maria Fernanda Forni, pelos ensinamentos, colaboração e as boas conversas guardadas carinhosamente.

Ao Laboratório de Integração dos Sistemas Biológicos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo. Agradeço ao Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira, pela contribuição fundamental a este trabalho e pelos ensinamentos, e a todos os colegas do laboratório, principalmente a doutoranda Kátia Gomes, por toda colaboração e carinho.

Ao Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Agradeço a todos que auxiliaram de alguma maneira nos experimentos de *SPECT* em especial ao Dr. Fábio L. Navarro Marques e a Silvana Prando. Agradeço também ao Centro de Medicina Nuclear e Imagem Molecular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Marco Antônio de Oliveira e Dra. Maria

Clementina P. Giorgi.

Ao Serviço de Ressonância Magnética do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao Júlio Soares e ao Dr. Carlos Rochitte.

Ao Programa de Pós-graduação em Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Agradeço aos excelentes professores pela qualidade da formação e a seriedade do ensino e aos colegas de pós-graduação. Agradeço em especial a Neusa Dini, Juliana Lattari, Mônica Souto, e a todas que passaram pela secretaria da pós-graduação, pela eficiência e solicitude.

Ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP/ CONFOCAL) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelas contribuições nos experimentos no *InCell Analyzer*. Agradeço em especial à Joelcimar Martins da Silva e Mario Costa Cruz que se dedicaram à realização deste experimento.

Ao Laboratório de Sequenciamento de Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela realização dos experimentos de sequenciamento de RNA.

Aos laboratórios de Experimentação animal do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A todos os envolvidos na manipulação dos animais e em especial aos técnicos: Mônica Nunes, Simone Fernandes, Rafael Rosa, Bruna Gonçalves, Suelen Russafa, Anelise Casagrande e Dário Ribeiro. Agradeço de modo particular ao Leno Dima, por toda sua dedicação nos cuidados com os animais neonatos, por toda presteza em auxiliar e pelas boas conversas.

Aos meus queridos amigos do grupo Café com Avental, Mariliza, Thiago, Vinícius, Aline, Samantha, Thaís, Camila Babi e Fernanda. Agradeço todo carinho que demonstraram por mim, por todas as considerações ao trabalho e por toda ajuda. Esses anos de doutoramento ficaram mais leves com a presença de vocês. Foi muito bom compartilhar de almoços, longos cafés e principalmente boas conversas científicas, filosóficas e de vida.

Aos meus pais, José Américo e Regina, pelo respeito às minhas escolhas e por me ensinarem o valor de Deus e da oração. Às minhas queridas irmãs, Heloisa e Ana Laura, sempre companheiras e admiradoras do meu trabalho, agradeço as boas risadas e conversas, e a convivência carinhosa.

A toda minha grande família, meus finados avós, meus tios e tias, primos e primas, e os agregados, todos grandes entusiastas da minha carreira acadêmica. Agradeço em especial meu sogro e sogra, Jurandi e Maria Jacy, meus cunhados, Denílson e Daniel, minha querida cunhada Andrea, e aos meus lindos sobrinhos Felipe e Henrique, pelo carinho e incentivo.

Aos meus queridos amigos e amigas que muito me incentivaram e compartilharam todos os momentos dessa trajetória. Agradeço em especial minha querida amiga e irmã Lilian Maria, que a tantos anos é minha grande incentivadora. Obrigada pelo carinho e amor que conduzem nossa abençoada amizade.

Aos membros da banca examinadora pela gentileza e contribuições.

À FAPESP pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

A todos meu muito obrigada!

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”

(Antoine de Saint-Exupéry)

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	19
2.0	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3.0	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Cirurgia de ressecção apical cardíaca.....	35
3.2	Ressonância magnética	36
3.3	Ensaio de imunofluorescência	36
3.4	<i>Single Photon Emission Tomography (SPECT)</i>	38
3.5	Estudos Hemodinâmicos	39
3.6	Isolamento de mitocôndria cardíaca.....	40
3.7	Consumo de oxigênio pela mitocôndria cardíaca isolada e pelo coração neonato.....	41
3.8	Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria cardíaca isolada e pelo coração neonato.....	42
3.9	Quantificação de ATP	42
3.10	Atividade da enzima hexoquinase	43
3.11	Extração de proteína	43
3.12	<i>Western Blot</i>	44
3.13	Atividade da enzima citrato sintase	45
3.14	Microscopia eletrônica de transmissão	45
3.15	Extração de RNA.....	46
3.16	Sequenciamento de RNA – <i>Illumina</i>	47
3.17	Transcrição do DNA complementar	48
3.18	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	48
3.19	Extração de cardiomiócitos.....	51

3.20	Determinação da produção de lactato	52
3.21	Atividade da enzima lactato desidrogenase	53
3.22	Medidas das Taxas de consumo de oxigênio (OCR).....	53
3.23	<i>High Content Screening Assay (HCS)</i>	54
3.24	Ensaio de viabilidade celular por MTT	55
3.25	Análise estatística.....	55
4.0	RESULTADOS.....	57
4.1	Regeneração cardíaca em ratos neonatos após ressecção do ápice cardíaco	58
4.2	Dano metabólico tardio após ressecção do ápice cardíaco.....	67
4.3	Análise do sequenciamento de RNA– <i>Illumina</i>	75
4.4	Metabolismo mitocondrial e cardiomiogênese	82
5.0	DISCUSSÃO	94
6.0	CONCLUSÕES	108
7.0	REFERÊNCIAS	110
8.0	APÊNDICES.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de ressecção logo após cirurgia.	59
Figura 2. Quantificação de troponina I cardíaca (a.u./mm ²), deposição de fibras de colágeno de acordo com Picrosirius (porcentagem de área) e marcação de conexina 43 no tecido cardíaco neoformado.....	61
Figura 3. Perfusão do miocárdio mensurada por <i>Single Photon Emission Tomography</i> (SPECT) dos segmentos do coração de animais R1d e R7d.....	62
Figura 4. Resposta cardíaca à pós-carga.	64
Figura 5. Retas de regressão linear do trabalho cardíaco em função do incremento de pressão sistólica.....	65
Figura 6. Quantificação de colágeno intersticial em cortes histológicos coronais de coração de animais <i>sham</i> , R7d e R1d após 60 dias da cirurgia de ressecção pelo ensaio de Picrosirius.....	67
Figura 7. Consumo de oxigênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais <i>sham</i> , R1d e R7d após 60 dias da cirurgia de ressecção.	69
Figura 8. Liberação relativa de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais <i>sham</i> , R1d e R7d após 60 dias da cirurgia de ressecção.	70
Figura 9. Liberação absoluta de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais <i>sham</i> , R1d e R7d com 60 dias da cirurgia de ressecção após adição de antimicina A (A) e rotenona (B).....	71
Figura 10. Liberação de peróxido de hidrogênio em tecido cardíaco de R1d, R7d e seus respectivos <i>sham</i> após 5 dias da cirurgia de ressecção.	72
Figura 11. A) Produção de ATP (nmol.μg prot ⁻¹); B) Atividade da enzima hexoquinase (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹); e C) <i>Western blot</i> da fração citosólica e mitocondrial do ventrículo esquerdo de corações de animais <i>sham</i> , R1d e R7d, após 60 dias da cirurgia de ressecção cardíaca.	73

Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão do ventrículo esquerdo.	74
Figura 13. Número de mitocôndrias cardíacas e atividade da enzima citrato sintase.	75
Figura 14. Controle de qualidade dos dados gerados pelo RNASeq.	76
Figura 15. Análise de componente principal (PCA).	77
Figura 16. Matriz de Poisson.	78
Figura 17. MAPlots.	79
Figura 18. <i>Heatmaps</i> de genes relacionados a vias metabólicas detectados pelos <i>RNASeq</i>	80
Figura 19. Expressão relativa entre P1 e P7.	82
Figura 20. Consumo de oxigênio normalizado, produção de lactato e atividades enzimáticas teciduais em corações neonatais.	84
Figura 21. Taxas de consumo de oxigênio em cultura de cardiomiócitos.	86
Figura 22. Consumo de oxigênio, produção de lactato e razão O_2/CO_2 em tecido cardíaco neonatal ressectado em comparação ao <i>sham</i>	88
Figura 23. Proliferação celular na presença de soro.	89
Figura 24. Proliferação de cardiomiócitos.	90
Figura 25. Viabilidade celular por MTT em cardiomiócitos tratados com diferentes doses de rotenona.	91
Figura 26. Redução do consumo de oxigênio diminui a taxa de proliferação de cardiomiócitos P1. ..	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para o qRT-PCR.....	49
Tabela 2. Parâmetros biométricos e hemodinâmicos dos grupos <i>sham</i> , R7d e R1d em condições basais.....	63
Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos dos grupos <i>sham</i> , R7d e R1d em condições de estresse.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- Acetil- CoA – acetil coenzima A
- ADS – tampão ADS
- ATP - do inglês "*Adenosine triphosphate*" ou adenosina trifosfato
- BrdU – bromodeoxiuridina
- CCCP – do inglês "*carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*"
- CDK - quinases dependente de ciclina
- cDNA - do inglês "*Complementar desoxiribonucleic acid*" ou ácido desoxirribonucléico complementar
- CO₂ – dióxido de carbono
- DMEM - do inglês "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*"
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA - do inglês "*Desoxiribonucleic acid*" ou ácido desoxirribonucléico
- EDPVR - do inglês "*End-diastolic pressure volume relation*" ou relação entre pressão volume no final da diástole
- ERO – Espécie reativa do oxigênio
- ESPVR - do inglês "*End-sistolic pressure volume relation*" ou relação entre pressão volume no final da sístole
- FADH₂ – flavina adenina dinucleótido
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- HCS – do inglês "*high content screening*"
- HRP – do inglês "*horseradish peroxidase*"
- iPSC – do inglês "*induced Pluripotent stem-cell*"
- LVEDP – do inglês "*Left ventricular end-diastolic pressure*" ou pressão diastólica final no ventrículo esquerdo
- M199 – meio 199
- MTT – solução da base de "*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*"
- NADH – nicotinamida adenina dinucleótido
- NBS – do inglês "*newborn calf serum*"
- O₂ – oxigênio
- OCR – do inglês "*oxygen consumption rate*" ou taxa de consumo de oxigênio
- P1 – do inglês "*postnatal day 1*" ou rato neonato com 1 dia de vida
- P7 - do inglês "*postnatal day 7*" ou rato neonato com 7 dias de vida
- PBS - do inglês "*Phosphate buffer saline*" ou tampão salina fosfato
- PHE – feninefrina
- PVDF - fluoreto de polivinilideno
- qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

- R1 – neonato ressectado com 1 dia de vida
- R1D1 – rato neonato ressectado com 1 dia de vida e coleta após 1 dia da cirurgia
- R1D5 – rato neonato ressectado com 7 dias de vida e coleta após 5 dias da cirurgia
- R1D5 – rato neonato ressectado com 1 dia de vida e coleta após 5 dias da cirurgia
- R7 - neonato ressectado com 7 dia de vida
- R7D1 – rato neonato ressectado com 7 dias de vida e coleta após 1 dia da cirurgia
- RNA - do inglês “*Ribonucleic acid*” ou ácido ribonucléico
- RNAm - do inglês “*Messenger ribonucleic acid*” ou ácido ribonucléico mensageiro
- RNASeq – Sequenciamento de RNA
- S1D1 – rato neonato *sham* com 1 dia de vida e coleta após 1 dia da cirurgia
- S1D5 – rato neonato *sham* com 1 dia de vida e coleta após 5 dias da cirurgia
- S7D1 – rato neonato *sham* com 7 dias de vida e coleta após 1 dia da cirurgia
- S7D5 – rato neonato *sham* com 7 dias de vida e coleta após 5 dias da cirurgia
- SPECT – do inglês “*Single Photon Emission Tomography*”
- SV - do inglês “*Stroke volume*” ou volume cardíaco
- SW - do inglês “*Stroke work*” ou trabalho cardíaco

RESUMO

Saturi de Carvalho, A.E.T. ***Metabolismo energético mitocondrial e cardiomiogênese para regeneração cardíaca*** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Apesar dos avanços dos últimos anos, a reposição de cardiomiócitos permanece como um dos maiores desafios da medicina regenerativa. A comprovação da existência de mecanismos endógenos de proliferação cardíaca nos impulsionou a buscar o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal. Neste trabalho foi testada a hipótese da influência do metabolismo energético mitocondrial na cardiomiogênese, e seu impacto na regeneração cardíaca. No primeiro momento, foi descrito pela primeira vez o modelo de ressecção apical cardíaca em ratos neonatos. Demonstrou-se que há um período restrito as primeiras 24 horas de vida em que o animal é capaz de regenerar o tecido cardíaco, formando novos cardiomiócitos e permitindo a manutenção da função cardíaca na vida adulta. Esta capacidade é perdida 7 dias após o nascimento, havendo apenas reparo com tecido fibroso e prejuízo à função cardíaca. De maneira interessante, os dados apontaram para hipoperfusão da região apical em ambos os animais ressectados. Isso possivelmente acarretou em dano mitocondrial na vida adulta, sem influenciar a função cardíaca. De maneira a investigar os eventos moleculares da regeneração cardíaca neonatal foi realizado o sequenciamento de RNA dos corações de ratos neonatos de 1 e 7 dias de vida, ressectados e *sham*, pela técnica de *RNASeq*, que apontou a relevância da idade nas diferenças de expressão de genes relacionados ao metabolismo, sendo que a intervenção da ressecção pouco influenciou o perfil de expressão gênica. Os resultados mostraram a troca de expressão de isoformas da via glicolítica com a maturação pós-natal, e a hiper-regulação da expressão de genes das vias da β -oxidação, fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarboxílico durante o mesmo período. Entretanto, os dados funcionais da atividade metabólica do tecido cardíaco e cultura de cardiomiócitos neonatais mostraram que tanto a glicólise anaeróbia quanto o consumo de oxigênio relacionado à oxidação mitocondrial estiveram elevados no neonato de 1 dia, e foram reduzidos com o desenvolvimento cardíaco. As elevadas taxas de consumo de oxigênio nas culturas de cardiomiócitos de 1 dia de vida foram relacionadas principalmente à produção de ATP. Esses cardiomiócitos foram capazes de proliferar em cultura na presença de soro como estimulador. Assim sendo, as análises de expressão gênica sozinhas pareceram ser indicadores parciais do estado funcional do metabolismo. A inibição não letal da fosforilação oxidativa evidenciou a importância do metabolismo mitocondrial na capacidade proliferativa dos cardiomiócitos na vida pós-natal. Os dados sugerem que o primeiro dia após o nascimento abrange uma alta demanda energética tanto para a diferenciação terminal quanto para a última fase robusta de proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal, e assim evidenciam a importância do metabolismo mitocondrial no processo regenerativo.

Descritores: coração; regeneração cardíaca; análise de sequenciamento de RNA; cardiomiócitos; metabolismo energético; mitocôndrias; proliferação.

ABSTRACT

Saturi de Carvalho, A.E.T. *Mitochondrial energy metabolism and cardiomyogenesis for cardiac regeneration* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Despite advances in recent years, the replacement of cardiomyocytes remains one of the biggest challenges in regenerative medicine. The existence of endogenous mechanisms of cardiac proliferation prompted us to seek the understanding of molecular events involved in cardiomyocyte proliferation in postnatal life. In this study, we investigated the influence of mitochondrial energy metabolism in cardiomyogenesis, and its impact on cardiac regeneration. At first, it was described for the first time the model of heart apical resection in neonatal rats, where there is a limited period the first 24 hours of life that animal is able to regenerate cardiac tissue, forming new cardiomyocytes and allowing the maintenance cardiac function in adulthood. This ability is lost seven days after birth, when repair is basically by fibrotic tissue and consequent impairment for heart function. Interestingly, data showed hypoperfusion of the apical region in both resected animals, which possibly resulted in mitochondrial damage in adulthood without affecting heart function. In order to investigate the molecular events of neonatal cardiac regeneration was performed RNA sequencing of hearts from newborn rats with 1 and 7 days of life, resected and *sham*, which pointed out the importance of age in the different expression of genes related to metabolism, and the intervention of resection had little influence on this. The results showed exchange of expression of enzymes isoforms from glycolytic pathway and hyper-regulation of genes from β -oxidation, oxidative phosphorylation and tricarboxylic acid cycle pathways, during postnatal maturation. However, the functional data of the metabolic activity of cardiac tissue and culture of neonatal cardiomyocytes showed that both anaerobic glycolysis and oxygen consumption related to mitochondrial oxidation were higher in 1-day-old newborns, and were reduced with cardiac development. The high rates of oxygen consumption in 1-day-old cardiomyocytes were related mainly to ATP production. These 1-day-old cardiomyocytes were able to proliferate in culture by serum stimulation. Therefore, the analysis of gene expression alone appeared to be a partial indicator of functional state of metabolism. The non-lethal inhibition of oxidative phosphorylation highlighted the importance of mitochondrial metabolism in the proliferative capacity of cardiomyocytes in postnatal life. Data suggest that the first day after birth covers a high energy demand for both terminal differentiation of cardiac cells and last robust phase of cardiomyocyte proliferation in postnatal life, and show the importance of mitochondrial metabolism in the regenerative process.

Descriptors: heart; cardiac regeneration; RNA sequencing; cardiomyocytes; energy metabolism; mitochondria; proliferation.

1.0 Introdução

A limitada capacidade regenerativa cardíaca na vida pós-natal segue como um dos maiores desafios da medicina cardiovascular. O coração é descrito como um órgão não regenerativo, pois apesar das células cardíacas dividirem ativamente durante o desenvolvimento embrionário, logo após o nascimento, tais células perdem consideravelmente sua capacidade proliferativa [1-3]. Em decorrência da capacidade insuficiente dos cardiomiócitos adultos de se dividirem, a regeneração do coração após lesão fica comprometida, como ocorre no infarto do miocárdio. Com a perda de bilhões de cardiomiócitos a reparação tecidual se dá basicamente por tecido fibrótico não contrátil e o coração lesado tende a compensar a perda da capacidade contrátil hipertrofiando os cardiomiócitos. Isso resulta, em longo prazo, no remodelamento cardíaco adverso que frequentemente progride para insuficiência cardíaca [4].

Nos últimos anos, várias estratégias terapêuticas têm sido propostas para a reparação cardíaca. Ainda experimentais, estas incluem terapias de reposição celular com células-tronco adultas derivadas da medula óssea [5, 6] e de tecido adiposo [7-9], ativação de progenitores endoteliais [10, 11], e mais recentemente, células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), com alta capacidade de gerar todos os tipos de tecidos [12]. O transplante intramiocárdico de células-tronco já mostrou efeitos na melhora da função cardíaca em quadros de infarto do miocárdio em ratos por promover formação de novos vasos, porém foi ineficiente em promover a regeneração do tecido cardíaco contrátil [5]. As estratégias de reposição celular, entretanto, encontram diversas limitações técnicas e éticas, sendo que uma alternativa possível seria explorar os mecanismos endógenos de regeneração cardíaca. Nesse sentido, apesar das diferenças de tamanho do coração, atividade do ciclo celular e características específicas dos cardiomiócitos entre humanos e modelos animais, esses últimos são fundamentais para os avanços da medicina regenerativa.

Já foi bem conceituado que invertebrados inferiores possuem capacidade de regeneração de estruturas e órgãos internos após lesão em qualquer estágio da vida [13]. Para estudos com coração, o *zebrafish* é um modelo muito utilizado devido a sua alta capacidade regenerativa frente a diferentes tipos de lesão cardíaca como ressecção de até 20% do ventrículo [14, 15], crioinjúria [16], ou após falência cardíaca por ablação de cardiomiócitos [17]. Nesses animais, a lesão no coração adulto induz preferencialmente a proliferação de cardiomiócitos pré-existentes [14]. Embora não se observe tamanha eficiência em coração de mamíferos na vida pós-natal, tem sido demonstrada a existência de renovação de cardiomiócitos em humanos e outros mamíferos.

Em estudos pioneiros, Soonpaa & Field demonstraram em corações sadios e submetidos à lesão, indícios de 0,0006% e 0,0083% de cardiomiócitos em atividade proliferativa, respectivamente [1, 18]. De maneira elegante, Bergmann e colaboradores evidenciaram renovação de cardiomiócitos humanos ao longo da vida. Por meio da análise da concentração do isótopo de carbono-14 incorporado ao DNA em decorrência da contaminação do ambiente associada aos testes nucleares durante a Guerra Fria observou-se uma taxa de renovação celular que varia de 0,5-2,0% ao ano ao longo da vida. Os valores mais altos estavam na primeira e segunda década e os mais baixos a partir da quarta década, justamente quando a necessidade de reparação seria maior em caso de um eventual infarto. A somatória destes valores ao longo de sete décadas de vida resultaria em renovação de quase 50% das células do coração [19]. Recentemente, Molova e colaboradores mostraram que cardiomiócitos humanos continuam a proliferar em baixas taxas durante os primeiros 20 anos de vida, sendo importante para o crescimento e desenvolvimento do coração humano no período pós-natal [20].

Em um trabalho pioneiro, Porrello e colaboradores observaram a geração de

cardiomiócitos em camundongos neonatos de um dia de vida após a ressecção de 15% do ventrículo esquerdo na região apical, com completa regeneração do local ressectado por tecido cardíaco [21]. Esse estudo demonstrou que a capacidade de regeneração do coração pós-natal nestes animais é mantida de forma exuberante por pelo menos um dia após o nascimento por meio da proliferação de cardiomiócitos. Esta capacidade de regeneração é perdida em camundongos neonatos com sete dias de vida, sendo observada a formação de tecido fibrótico [21]. O mesmo processo regenerativo em neonatos também foi observado após outros tipos de lesões. Após infarto do miocárdio induzido pela ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda, camundongos de um dia de vida foram capazes de regenerar o miocárdio infartado e recuperar a função cardíaca com a proliferação de cardiomiócitos [22, 23]. Além disso, uma expressiva resposta angiogênica foi associada com a regeneração observada nesses animais [23]. Também após crioinjúria, camundongos recém-nascidos foram capazes de gerar novos cardiomiócitos e regenerar grande parte do tecido cardíaco afetado [24, 25]. Neste caso, além da proliferação de cardiomiócitos, foi observada a contribuição de células progenitoras c-kit+ para a formação de novos cardiomiócitos e angiogênese [25]. Em nosso laboratório, o fenômeno de regeneração cardíaca foi demonstrado pela primeira vez em ratos e constituiu um dos objetivos do presente estudo [26].

Alguns mecanismos já foram propostos como importantes no processo de regeneração cardíaca em neonatos. O fator de transcrição *Meis1* e a família de micro-RNAs miR-15 foram descritos como reguladores do ciclo celular de cardiomiócitos. A expressão de ambos no período neonatal foi associada com o aprisionamento do ciclo celular de cardiomiócitos de camundongo, sendo que a deleção *in vivo* e *in vitro* desses fatores foi suficiente para aumentar a proliferação de cardiomiócitos, mesmo em corações adultos [27,

28]. Mais recentemente, o aumento da tensão de oxigênio após o nascimento foi associado com o aprisionamento do ciclo celular de cardiomiócitos devido ao aumento da liberação de espécies reativas do oxigênio (EROs) e subsequente dano ao DNA [29].

Neste sentido, alguns estudos já demonstraram que a proliferação de cardiomiócitos pré-existentes é a principal fonte de novos cardiomiócitos no coração de mamíferos, tanto no miocárdio sadio quanto submetido a uma lesão [30, 31]. Apesar de usarem estratégias diferentes, esses trabalhos concordaram que a proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal ocorre apenas em taxas muito baixas. Além disso, a participação de progenitores cardíacos no surgimento de novos cardiomiócitos mostrou-se limitada, e possivelmente, pouco significativa para a regeneração após lesão [30].

A existência dos mecanismos endógenos de proliferação cardíaca abre precedentes para estudos das vias de regulação desses processos. Isso porque, o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na progressão e aprisionamento do ciclo celular de cardiomiócitos de mamíferos na vida pós-natal favorece a compreensão de terapias de reposição celular.

A atividade proliferativa está inversamente relacionada aos níveis de diferenciação celular nos últimos estágios da embriogênese. A proliferação celular tem altas taxas no início da embriogênese, quando o estado de diferenciação celular é menor. A proliferação dos cardiomiócitos praticamente cessa logo após a primeira semana de vida e há uma transição da hiperplasia para a hipertrofia no crescimento do miocárdio. Esta transição é caracterizada morfológicamente pelo aumento da densidade de miofibrilas, aparecimento de discos intercalares maduros e a formação de cardiomiócitos binucleados [32, 33]. O estímulo dado pelo aumento de pressão e volume sanguíneos induz o desenvolvimento da hipertrofia do miocárdio, por meio da ativação de vias de sinalização nos cardiomiócitos que passam a

expressar um perfil de genes e proteínas distinto. Tais alterações são acompanhadas pela biogênese de mitocôndrias e aumento da síntese de proteínas miofibrilares, o que leva a formação de novos sarcômeros e hipertrofia dos cardiomiócitos [34]. Assim, a demanda energética dos cardiomiócitos aumenta exponencialmente logo após o nascimento devido à necessidade contrátil desses para suprir o aumento da demanda de fluxo sanguíneo. Corroborando essa hipótese, Jeter & Cameron demonstraram, de forma pioneira, um ligeiro aumento na proliferação de cardiomiócitos de galinha no primeiro dia após o nascimento, e sugeriram que esse fenômeno estaria relacionado às adaptações à circulação sanguínea pós-natal, seguidas pelo bloqueio do ciclo celular [35].

Um estudo descreveu a proliferação de cardiomiócitos em três períodos distintos do desenvolvimento em camundongos, períodos fetal, neonatal e adulto, por meio da incorporação de bromodeoxiuridina (*BrdU*) no núcleo das células. Foi constatado que no dia 14,5 da vida embrionária a taxa de proliferação de cardiomiócitos foi de 22,95% e ocorreu de forma uniforme no conteúdo de DNA, enquanto no dia 3 da vida neonatal essa taxa foi reduzida para 9,6%. Na sequência, a taxa de proliferação regrediu para 0,94% no dia 7 da vida neonatal e 0,02% no dia 14. Neste momento, o último ciclo de síntese de DNA e cariocinese ocorreu na ausência de citocinese, resultando na binucleação da grande maioria dos cardiomiócitos. No dia 21 após o nascimento e no animal adulto, não foi detectada nenhuma proliferação celular sugerindo que a síntese de DNA cessou completamente por volta da terceira semana de vida [3].

Os níveis de expressão e atividade das principais ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) diminuem entre o período embrionário e o primeiro dia da vida pós-natal em cardiomiócitos de camundongos. Logo após o nascimento, os cardiomiócitos ainda são capazes de proliferar. No quinto dia de vida ocorre um pico de expressão e atividade dessas

ciclinas e CDKs, que foi relacionado com a geração de cardiomiócitos binucleados. Após esse período, uma hipo-regulação sustentada desses fatores auxilia no aprisionamento do ciclo celular dos cardiomiócitos [36].

Recentemente foi demonstrado que corações de camundongos neonatos sem lesão apresentaram robusta formação de cardiomiócitos até a primeira semana de vida [37]. A maioria dos cardiomiócitos de corações de neonatos de dois dias de vida permaneceu mononucleada e foi capaz de expandir com uma taxa de aproximadamente 40% até o quinto dia de vida. Já no dia 7 após o nascimento a atividade proliferativa decaiu e a maior parte da multinucleação dos cardiomiócitos aconteceu, sendo que a proliferação atingiu um platô a partir do dia 11 após o nascimento [37]. Experimentos *in vitro* também mostraram que cardiomiócitos isolados de corações de ratos de um dia de vida aumentam em número por até seis dias em resposta a 10% de soro fetal bovino [38].

De forma inovadora, Hattori e colaboradores foram capazes de isolar uma população homogênea de cardiomiócitos de ratos por meio da marcação das mitocôndrias dessas células [39]. Eles demonstraram que do dia 11 do período embrionário até o oitavo dia na vida neonatal, o conteúdo mitocondrial dos cardiomiócitos aumentou quase 20 vezes, sendo que o aumento mais expressivo ocorreu no primeiro dia após o nascimento. Os pesquisadores sugeriram que a indução da biogênese mitocondrial aumenta antes do nascimento devido à necessidade dos cardiomiócitos de contraírem. Isto indica uma estreita relação entre a cardiomiogênese pós-natal e a biogênese mitocondrial [39].

As mitocôndrias são organelas de membranas duplas que ocupam cerca de 30% do volume total de um cardiomiócito adulto [40]. Elas fornecem energia para a contração celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa [41]. O metabolismo mitocondrial é a principal fonte de energia para as células cardíacas adultas,

sendo que diariamente o coração sintetiza aproximadamente 30 Kg de ATP [42]. Entretanto, adaptações no metabolismo energético acompanham as alterações que ocorrem nas diferentes fases da vida de mamíferos.

O coração fetal funciona em um ambiente de hipóxia e nessa condição, o tecido cardíaco usa a glicólise anaeróbia para a produção de energia, com participação da oxidação de lactato. Apesar dos níveis circulantes de glicose serem semelhantes no feto e no adulto, os níveis de ácidos graxos são muito baixos na circulação fetal [43].

Durante o período neonatal ocorrem alterações adaptativas no metabolismo energético das células cardíacas que estão estreitamente relacionadas à função destas células [44]. A demanda energética dos cardiomiócitos aumenta exponencialmente devido à crescente necessidade contrátil desses para suprir o aumento da demanda de fluxo sanguíneo e oxigênio nos tecidos em desenvolvimento [45]. Em corações neonatais de coelhos, nas primeiras 24 horas após o nascimento o metabolismo predominante no coração usa glicólise e oxidação de lactato como fontes de ATP [46], com pequena contribuição da β -oxidação e da fosforilação oxidativa. Com 7 dias após o nascimento, a glicólise e a oxidação de lactato diminuem a níveis semelhantes aos do coração adulto, e o metabolismo predominante passa a ser a β -oxidação, principalmente de ácidos graxos, que são o substrato preferencial dos cardiomiócitos para a geração de energia na vida adulta [47]. A preferência pelo substrato energético passa de carboidratos, principalmente lactato e glicose, para ácidos graxos logo após a primeira semana de vida. Essa alteração da preferência do substrato energético e no perfil do metabolismo energético é acompanhada por alterações na expressão gênica [44] e na quantificação de proteínas [29], com hipo-expressão de enzimas glicolíticas e hiper-expressão de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico e da β -oxidação, entre os corações de 1 e 7 dias de vida.

Em corações de ratos saudáveis, ocorre naturalmente um aumento crescente na expressão de quase 1/3 dos genes mitocondriais durante os primeiros 10 dias de vida, sendo estes envolvidos principalmente na biogênese mitocondrial, fosforilação oxidativa e β -oxidação, e relacionados ao aumento da massa mitocondrial e da capacidade oxidativa das células cardíacas [48]. Entretanto, de maneira elegante, O'Meara e colaboradores evidenciaram que a hiper-expressão de genes mitocondriais durante a maturação pós-natal ocorreu principalmente na comparação entre corações de camundongos recém-nascidos (dia 0) e corações de adultos, sendo que a expressão foi semelhante entre camundongos de 0 e 7 dias de vida [49].

A glicólise consiste em uma sequência de reações catalisadas por enzimas livres no citosol celular, na qual uma molécula de glicose é degradada para liberar duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas de cofator NADH reduzido. O piruvato pode entrar na mitocôndria através do complexo piruvato desidrogenase, que catalisa a formação de acetil-coenzima A (acetil-CoA) que entra no ciclo do ácido tricarboxílico, caracterizando a oxidação da molécula de glicose. A β -oxidação de ácidos graxos ocorre na matriz mitocondrial e gera acetil-CoA que entra no ciclo do ácido tricarboxílico. Os cofatores FADH_2 e NADH reduzidos são gerados pela β -oxidação e pelo ciclo do ácido tricarboxílico, e entram na cadeia transportadora de elétrons. A cadeia de transporte de elétrons, ou cadeia respiratória mitocondrial, consiste em uma série sequencial de complexos proteicos ancorados na membrana mitocondrial interna, com capacidade de transferência de elétrons. A transferência de elétrons, associada ao bombeamento de prótons, produz um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial, que promove a síntese de ATP na presença de oxigênio [50, 51]. Como a oxidação gera uma quantidade maior de moléculas de ATP, essa passa a ser a via de preferência dos cardiomiócitos adultos para obtenção de

energia, sendo assim crucial a relação entre a função mitocondrial e a função do miocárdio [52].

A regulação do metabolismo energético está estreitamente ligada à função cardíaca. Dessa forma, a maioria dos estudos relacionam alterações do metabolismo mitocondrial com doenças cardíacas como a hipertrofia e a insuficiência cardíaca [42, 50, 51]. O estresse oxidativo em cardiomiócitos de ratos pela excessiva produção de EROs mitocondriais foi relacionado com a perda da estrutura do citoesqueleto das células e da estrutura mitocondrial, além de dano mitocondrial relacionados com sobrecarga cardíaca e progressão da falência cardíaca [53]. Gomes e colaboradores demonstraram que a insuficiência cardíaca estabelecida é acompanhada de disfunção mitocondrial, sendo que a ativação seletiva da isoforma mitocondrial da enzima aldeído desidrogenase 2 foi suficiente para melhorar a função cardíaca desses animais, pela redução dos efeitos do acúmulo de aldeídos tóxicos e geração de EROs no miocárdio [54].

Os trabalhos acima citados demonstram a importância da biogênese/função mitocondrial e do metabolismo energético na cardiomiogênese. Essa importância está atrelada num primeiro momento à necessidade de energia para a proliferação celular e ao aumento da demanda energética pelos cardiomiócitos terminalmente diferenciados após o nascimento. É razoável sugerir que a proliferação celular requer uma resposta adaptativa do metabolismo energético porque, para proliferar, a célula precisa de um aumento substancial na produção de energia [55]. Normalmente, o metabolismo de células proliferativas, como as células cancerígenas, por exemplo, é caracterizado por altas taxas de glicólise, produção de lactato e biosíntese de macromoléculas [56]. Entretanto, apenas o aumento da glicólise parece ser pouco eficiente na produção de ATP em comparação à fosforilação oxidativa para células com alta demanda energética.

Recentemente, Manesia e colaboradores mostraram que células-tronco hematopoéticas do fígado fetal de camundongos possuem uma aumentada fosforilação oxidativa e conteúdo mitocondrial em comparação a células-tronco hematopoéticas da medula óssea de animais adultos. Ainda, a respiração mitocondrial foi maior nas células do fígado fetal, sugerindo que estas células usam a fosforilação oxidativa como fonte mais eficiente de energia necessária para a manutenção da proliferação celular [57].

Adicionalmente, já foi mostrado que a perda de função mitocondrial pode prejudicar a proliferação de células de mamíferos. Trabalhos mostraram que a inibição da tradução de proteínas mitocondriais e da biogênese mitocondrial pode prejudicar a proliferação celular, sendo este prejuízo atribuído a defeitos no metabolismo oxidativo e no conteúdo de mitocôndrias [58-60]. Sendo assim, apesar dos resultados acima serem baseados em células cancerígenas, hepáticas e linhagem de fibroblastos, estes colocam em questionamento o fato da proliferação celular na vida pós-natal depender principalmente da glicólise como fonte de energia [61].

A diferenciação das células cardíacas também é associada com alterações energéticas, podendo ser também um processo limitante e permissivo da cardiomiogênese. Em um estudo, pesquisadores associaram o metabolismo oxidativo mitocondrial com a diferenciação de células tronco-embrionárias [62]. Nele foi evidenciado que o metabolismo anaeróbio foi suficiente para sustentar a necessidade energética das células-tronco embrionárias, caracterizada por poucas mitocôndrias, baixo consumo de oxigênio e dependência da glicólise. Para assegurar a diferenciação dessas células em células cardíacas, este foi alterado para o metabolismo oxidativo mitocondrial. Essa observação foi corroborada por dados de expressão gênica com hiper-expressão de isoformas de enzimas específicas do músculo cardíaco e hipo-expressão de isoformas de enzimas não específicas

do músculo cardíaco. Ainda, os pesquisadores demonstraram que a utilização de inibidores da cadeia respiratória, antimicina ou rotenona, interrompe a diferenciação das células-tronco embrionárias em células cardíacas [62].

Além disso, Forni e colaboradores demonstraram recentemente que o comprometimento de células-tronco mesenquimais na diferenciação envolve mudanças na capacidade metabólica oxidativa, sendo específica para os tipos de diferenciação [63]. A diferenciação de osteócitos e adipócitos envolve capacidade respiratória aumentada, enquanto para condrócitos ocorre perda da capacidade respiratória. O bloqueio da plasticidade mitocondrial previne a diferenciação, demonstrando que as mudanças no metabolismo oxidativo são necessárias para este processo [63].

Recentemente, foi demonstrado de maneira elegante que a maturação pós-natal do coração envolve um aumento no dano oxidativo tecidual, e a prevenção deste dano por antioxidantes ou pela hipóxia, prolonga a capacidade proliferativa de cardiomiócitos neonatais. Dessa forma, foi proposto que após o nascimento, o contato com o oxigênio atmosférico promove o aumento da atividade oxidativa mitocondrial, resultando em maior produção de EROs. Essas EROs seriam responsáveis por danos ao DNA celular e consequente aprisionamento do ciclo dos cardiomiócitos [29]. Realmente, foi sugerido em outro trabalho que o aumento pós-natal do conteúdo mitocondrial e mudanças na morfologia mitocondrial são dirigidas pelo contato com o oxigênio, que acarreta na redução da sinalização de HIF logo após o nascimento [64].

De um modo geral, os estudos acima citados demonstram a importância do metabolismo energético na proliferação e na diferenciação de cardiomiócitos, e também para a função cardíaca. Por outro lado, muito pouco foi estudado sobre a relação entre o metabolismo energético mitocondrial e a capacidade intrínseca de proliferação de

cardiomiócitos após o nascimento, e a influência dessa relação no processo regenerativo.

Mesmo após décadas de avanço nos estudos *in vitro*, pré-clínicos e clínicos, a medicina regenerativa cardíaca ainda não faz parte de uma alternativa real de tratamento para pacientes [13, 65]. As aplicações de células-tronco ainda se mantêm especulativas e deverão continuar a ser estudadas no contexto experimental, devido à alta expectativa por sua potencialidade. Os dados acima descritos demonstram que em roedores e mesmo no homem, o fenômeno da renovação celular cardíaca endógena ocorre no indivíduo adulto. Contudo o processo natural não é eficiente para reparar completamente o coração lesado. Uma vez que o coração de mamíferos possui uma capacidade intrínseca de proliferação de cardiomiócitos, uma interessante possibilidade de foco terapêutico poderia ser baseada no conhecimento dos mecanismos capazes de induzir a proliferação endógena robusta de cardiomiócitos. Portanto, com base nos dados que mostram a estreita relação entre o metabolismo energético e a função cardíaca, além das possibilidades de proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal, é possível especular que o metabolismo energético mitocondrial influencie diretamente na regeneração cardíaca.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que o metabolismo energético mitocondrial influencia a capacidade regenerativa cardíaca em modelo de ressecção neonatal em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Para realizarmos o objetivo geral estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar o modelo de ressecção apical cardíaca em ratos neonatos de 1 e 7 dias de vida;
2. Avaliar de maneira funcional o perfil metabólico na vida neonatal e adulta dos ratos neonatos de 1 e 7 dias de vida submetidos à cirurgia de ressecção apical cardíaca;
3. Avaliar por técnica exploratória a existência de vias e alvos candidatos envolvidos com o metabolismo energético do coração completamente regenerado (rato neonato de 1 dia) vs. coração reparado como no adulto (rato neonato de 7 dias);
4. Testar se a modulação do metabolismo mitocondrial interfere na proliferação dos cardiomiócitos.

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Cirurgia de ressecção apical cardíaca

Ratos *Wistar* fêmeas com diferentes idades foram mantidas em caixas (dois animais/caixa) com livre acesso à água e comida sob ciclo claro-escuro de 12 horas para acasalamento. Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas em caixas individuais e o controle do momento do nascimento dos filhotes foi feito por observação de 2 a 3 vezes ao dia. A cirurgia de ressecção apical foi feita em ratos neonatos com 1 dia (P1) e 7 dias (P7) após o nascimento. Os neonatos foram anestesiados por hipotermia por 10 minutos e mantidos em inalador com isoflurano (Isoforine - Cristália). Estes animais foram submetidos à toracotomia ventrolateral realizada após uma pequena incisão na pele, seguida de dissecação dos músculos intercostais no terceiro espaço intercostal. O coração foi exposto fora da caixa torácica após remoção do pericárdio e o ápice foi ressectado com uma tesoura de iridectomia. Posteriormente, as incisões da parede torácica e da pele foram suturadas com fio de sutura não absorvível 7.0 e o pneumotórax foi revertido. Para completa recuperação, os neonatos foram mantidos em ambiente aquecido (29 °C) sob lampada de aquecimento e fluxo de oxigênio. A cirurgia nos animais *sham* foi similar, exceto pela ausência da ressecção do ápice cardíaco. Os neonatos foram mantidos até as idades de 21 e 60 dias após a cirurgia de ressecção apical quando foram anestesiados intraperitonealmente com dose ajustada de cloreto de xilazina e cloreto de ketamina (15 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente; Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil), e os corações foram coletados. Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes institucionais de cuidado e uso de animais de laboratório e foram aprovadas pela Comissão de Ética em Uso Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#285/12).

3.2 Ressonância magnética

O exame de ressonância magnética foi realizado como ferramenta de determinação da porção do ápice cardíaco ressectada nos ratos neonatos submetidos à cirurgia de ressecção. As imagens de ressonância magnética foram adquiridas em *scanner* MR de 1.5T (*Philips Achieva*, Amsterdam, Holanda), usando uma bobina de punho de quatro canais. Os ratos neonatos foram anestesiados por inalação de dose ajustada de isoflurano (*Isothane*, *Baxter Healthcare*, Guayama, Porto Rico) em aproximadamente 1 L/min de oxigênio, e foram acomodados sobre uma bolsa de salina de 250 mL, em posição de decúbito dorsal. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: aquisição em 3D *TSE* com *SENSE*; Plano: coronal; 50 cortes; *Field-ofview* (FOV): 50(FH) 9 50(RL) 9 20 mm; Matriz: 112 9 107 *pixels*; tamanho do *Voxel*: 0.45 9 0.45 9 0.45 mm ou 450 μm ; Matriz de reconstrução: 448 *pixels*; *Voxel* de reconstrução: 0.112 mm ou 112 μm ; *NSA*: 6; *TSE*: 6; Tempo de repetição: 155 ms; Tempo de eco (TE): 30 ms; Direção de fase: RL; Fator de imageamento paralelo (fator *SENSE*): 1 (FH) e 2(RL). As imagens estavam com alta densidade de prótons. O tempo de aquisição para um volume em 3D foi de 8 minutos e 51 segundos. Os ratos foram submetidos à ressonância magnética antes e imediatamente após a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco, e os que não exibiram ressecção de pelo menos 15 % da superfície apical foram eliminados.

3.3 Ensaio de imunofluorescência

Os corações coletados dos animais eutanasiados após 21 e 60 dias da cirurgia de ressecção foram lavados com solução salina para retirada do sangue, e então foram embebidos em meio O.C.T. (*Tissue-Tek*, *Sakura*, Holanda) e congelados gradualmente em isopentano no nitrogênio líquido. Os corações foram mantidos em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a preparação das lâminas por meio da criosecção dos tecidos com espessura de 6 micrômetros

(criostato -*Microm HM 505 E*). Foram realizadas colorações por Hematoxilina-Eosina (HE).

Para avaliar a deposição de colágeno no coração dos ratos neonatos operados, cortes histológicos de coração com 6 micrômetros foram submetidos a coloração pelo método Picrosirius. Primeiramente, as lâminas foram hidratadas em álcool 95 % por 5 minutos e em seguida em álcool 70 % por 3 minutos. Então, foram lavadas em água corrente e coradas em solução de 2 % de *Sirius red (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)* saturada de ácido pícrico por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente para remover excessos e qualquer marcação inespecífica do ácido pícrico. O núcleo foi corado usando Hematoxilina por 1 minuto, e após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e fixadas com meio de montagem permanente para posterior análise e quantificação.

Para o método Picrosirius-polarização, os cortes corados com Picrosirius foram analisados por microscopia de polarização. O método de Picrosirius-polarização permite a avaliação do arranjo e da agregação de fibras de colágeno devido à birefringência normal exibida pelas moléculas dispostas ordenadamente em orientação paralela nos tecidos [67].

Para imunofluorescência, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos, em solução PBS *Tween* 0,1 % e incubadas com solução de *TRITON X-100* 0,5 % por 5 minutos. Após, as lâminas foram lavadas novamente em PBS *Tween* 0,1 %, 3 vezes de 5 minutos cada e bloqueadas com solução de caseína 2 % por 1 hora (*C5890, Sigma Sigma Aldrich, EUA*). A seguir, os cortes foram incubados por 16-18 horas a 4 °C com anticorpo primário diluído na solução de bloqueio. No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS *Tween* 0,1 % por 3 vezes de 5 minutos cada e a seguir incubadas com o anticorpo secundário conjugado à uma fluoresceína por 90 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Finalmente as lâminas foram lavadas por 3 vezes com PBS *Tween* 0,1 % e logo em seguida incubadas com

DAPI (1:100) por 20 minutos. As lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS *Tween* 0,1 % e montadas com *Glicergel* ou PBS/glicerol (1:1) e mantidas protegidas da luz para as análises.

Para avaliar a neoformação de cardiomiócitos, os cortes foram marcados com anticorpos primários para troponina I cardíaca (ab19615, 1:50, *Abcam*, Cambridge, MA) e conexina 43 (ab11370, 1:50, *Abcam*, Cambridge, MA). Os anticorpos secundários utilizados foram os conjugados com *Alexa fluor* 488- e 555-(A11011 e A21428, 1:400, *Invitrogen*, *Life Technologies*, Grand Island, NY), e o *DAPI* para marcação nuclear (D3571, 1:100, *Invitrogen*, *Life Technologies*, Grand Island, NY).

3.4 Single Photon Emission Tomography (SPECT)

Ratos neonatos operados foram avaliados 21 e 60 dias após a cirurgia de ressecção apical utilizando o equipamento *PET/SPECT/CT Triumph™* (*GE Healthcare*- Waukesha, WI). Cada rato foi anestesiado com 1,5-2,5 % de isoflurano em 2 L/min de oxigênio, e injetados com aproximadamente 37 MBq [^{99m}Tc]Sestamibi pela veia caudal. O animal foi posicionado no equipamento, e as imagens de *SPECT* foram adquiridas 30 minutos após a injeção do radiofármaco. Cada cabeça de detector do equipamento foi ajustada com 5 *Pinhole* de Tungstênio de 1 mm de diâmetro. O raio de rotação foi ajustado para 4,4 cm e os dados adquiridos com 128 ângulos de projeção (180° para cada cabeça), 9 Kcts por projeção, dando uma tempo total de aquisição de aproximadamente 30 minutos. As projeções foram adquiridas em uma matriz de 60x60, com 1,15 mm de tamanho de *pixel*. As imagens foram reconstruídas com métodos OSEM com 5 interações e 8 *subsets*. Os dados foram analisados com o *software* π *PMOD 3.4002A*, com interpolação de 1,0 e 3,0 filtros Gaussianos. A orientação de eixos foi usada com e sem filtros para encontrar o eixo curto cardíaco, e os eixos longos vertical e horizontal. Foi realizada a análise semi-automática usando o *software*

Bullseye com a segmentação do coração em 17 regiões ou segmentos, para facilitar a compreensão dos resultados, sendo que 5 segmentos são representativos da região do ápice cardíaco, e 12 segmentos são representativos das outras regiões do coração [68]. Os mesmos foram normalizados individualmente em relação ao segmento cardíaco com maior captação. Um profissional treinado analisou e quantificou os dados de forma “cega”.

3.5 Estudos Hemodinâmicos

Estudos hemodinâmicos invasivos foram realizados para avaliar o desempenho cardíaco em ratos P1 e P7, 60 dias após a cirurgia de ressecção e *sham*. Cada rato foi anestesiado intraperitonealmente com dose ajustada de cloridrato de uretana (1,5 g/kg; *Sigma-Aldrich*, EUA). A veia femoral esquerda foi canulada para anestesia suplementar, injeção de drogas e salina. Um cateter de pressão-volume *MicroTip* (modelo 1.4 French SPR 839; *Millar Instruments*, Houston, TX) foi inserido na artéria carótida direita e posicionado imediatamente acima da válvula aórtica para monitorar a pressão sanguínea cardíaca. Após 5 minutos de medição da pressão sanguínea arterial, o cateter foi introduzido na cavidade do ventrículo esquerdo para medidas simultâneas e contínuas de pressão e volume. A veia jugular direita também foi canulada, e 10 μ L de solução salina 15 % foram injetados para medir a condutância paralela. A calibração para volume foi realizada usando uma regressão linear da condutância do volume de sangue total (4 câmaras cilíndricas contendo um volume especificado de sangue de rato recém heparinizado) *versus* o sinal adquirido pelo cateter de condutância. Os dados foram adquiridos usando o *LabChart 7 Software System* (*PowerLab*, *ADInstruments*, Bella Vista, NSW, Austrália). Os seguintes dados foram obtidos: frequência cardíaca, média da pressão arterial sistólica (MAP), pressão diastólica final (LVEDP) e pressão sistólica final (LVESP) no ventrículo esquerdo, elevação máxima da pressão do ventrículo

esquerdo ($+dP/dt_{max}$) e declínio ($-dP/dt_{max}$), constante de decaimento da pressão do ventrículo esquerdo (τ), volume sistólico, débito cardíaco, e trabalho cardíaco. Os parâmetros hemodinâmicos foram determinados sob condições basais e durante uma sobrecarga de pressão com a injeção do vasoconstritor fenilefrina (PHE; *Sigma-Aldrich*) (25–75 mg/kg peso corporal) na veia femoral esquerda após vagotomia, que foi realizada para prevenir alterações nos valores de frequência cardíaca pelo baroreflexo. As doses de PHE foram ajustadas para cada animal para produzir elevações comparáveis de pressão sanguínea (60 % a 80 % maior que na condição basal). A inclinação da relação linear entre a pressão e o volume sistólico final (ESPVR) foi obtida durante a oclusão transiente da veia cava inferior nos grupos de animais, para medir os resultados médios de desempenho cardíaco. Após as medidas, os corações foram rapidamente coletados e pesados.

3.6 Isolamento de mitocôndria cardíaca

Logo após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados, os ventrículos esquerdos separados e as mitocôndrias isoladas conforme descrito por Tahara e colaboradores [69]. Os ventrículos esquerdos foram colocados em tampão de lise (Sacarose 300 mM, HEPES 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2, 4 °C), e triturados na presença de 0,1 mg/mL de protease do tipo I (pâncreas bovino, *Sigma Aldrich*) para liberação das mitocôndrias das fibras musculares cardíacas. Após esse procedimento, a suspensão foi lavada no mesmo tampão, na presença de 0,1 mg/mL de BSA e homogeneizada em um homogenizador de tecido de 40 mL. O homogenato foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos (4 °C). O sobrenadante resultante foi centrifugado a 9500 x g por 10 minutos (4 °C). O botão mitocondrial resultante foi lavado e ressuspendido em tampão de experimento.

3.7 Consumo de oxigênio pela mitocôndria cardíaca isolada e pelo coração neonato

A medida do consumo de oxigênio foi realizada utilizando-se um eletrodo específico de oxigênio (do tipo *Clark*) acoplado a um registrador como previamente descrito por Campos e colaboradores [70]. O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Para os ensaios com mitocôndrias isoladas foi utilizado o equipamento *Oxygraph System* (Hansatech). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes, 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01 % BSA, pH 7,2) numa concentração final de proteína de 0,250 mg/mL. Os registros de consumo de oxigênio foram feitos na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM) e ADP (adenosina difosfato, 1 mM), que estimula o consumo de oxigênio. Um inibidor do complexo V (oligomicina, 1 µg/mL) foi adicionado para inibir sua atividade durante esse ensaio. Além disso, foi utilizado um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (CCCP – *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone*, 1 µM). Os valores foram expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína. Para os ensaios de consumo de oxigênio nos corações dos neonatos foi utilizado o equipamento *Oroboros O2k* (*Oroboros Instruments, Bioblast, Áustria*). Cada coração de rato neonato foi adicionado à cuba do equipamento contendo 2 mL de tampão de Krebs (pH 7,5) sem glicose. Após a obtenção do traçado basal, foram adicionados glicose para concentração final de 5 mM (*Sigma Aldrich*) ou ácido oleico para concentração final de 100 µM (*Sigma Aldrich*), e a taxa de consumo de oxigênio foi medida por mais 5 minutos. O coração e o tampão condicionados foram coletados e armazenados no término do ensaio. Os valores foram expressos em picomoles por miligrama de proteína.

3.8 Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria cardíaca isolada e pelo coração neonato

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mitocondrial foi avaliada por espectrofluorimetria conforme descrito por Campos e colaboradores [70]. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes, 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 0,01 % BSA, pH 7,2) numa concentração final de proteína de 0,250 mg/mL. A produção de H_2O_2 foi determinada pela geração de resorufina, fruto da oxidação do *Amplex Red* (25 μ M) na presença de *horseradish peroxidase* (HRP) (0,5 U/mL), identificada pelos comprimentos de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. O ensaio foi realizado na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM), ADP (1 mM), oligomicina (1 μ g/mL), e CCCP (1 μ M). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com quantidades conhecidas de H_2O_2 , expressos em picomoles por minuto por miligrama de proteína. A produção de peróxido de hidrogênio em fragmentos de tecido cardíaco também foi avaliada por espectrofluorimetria. Cada amostra de fragmento de tecido cardíaco foi adicionada a 2 mL de tampão Krebs (pH 7,5), adicionado de 5 mM de glicose (*Sigma Aldrich*), contendo 5 μ L de *Amplex Red* (20 mM) e 10 μ L de HRP (200 U/mL). O princípio para detecção da produção de peróxido de hidrogênio foi o mesmo citado anteriormente, e os valores foram expressos em micromolar por minuto por miligrama de proteína.

3.9 Quantificação de ATP

As amostras de ventrículo esquerdo de corações foram pesadas e acondicionadas em tubo com 1 mL de ácido tricloroacético a 1 %, para que ocorra a precipitação das proteínas e preservação do ATP, e congeladas em freezer -80 °C. Quando do dia da quantificação, as

amostras foram homogeneizadas, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado. O pH de todas as amostras foi ajustado para 7,0. As concentrações de ATP foram determinadas pelo *ATP Determination Kit (Invitrogen A22066)*, e os valores foram expressos em nanomoles por micrograma de proteína. O ensaio baseia-se na clivagem da luciferina (substrato) pela luciferase (enzima recombinante), na presença de ATP e oxigênio, emitindo luz.

3.10 Atividade da enzima hexoquinase

A atividade da enzima hexoquinase foi medida em amostras de ventrículo esquerdo de corações adultos e tecido cardíaco de corações neonatais utilizando um ensaio de cinética enzimática. As amostras foram homogeneizadas em tampão contendo 50 mM de Trietanolamina, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 2 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, e 30 mM de β -mercaptoetanol (pH 7,5), centrifugadas e o sobrenadante coletado. Na placa de reação foram adicionados uma mistura de ensaio contendo 75 mM de Tris-HCl, 0,8 mM de EDTA, 7,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1,5 mM de KCl, e 4 mM de β -mercaptoetanol (pH 7,5), complementada com 0,4 mM de $NADP^+$, 1,8 mM ATP, 1,8 U creatina fosfoquinase, 0,4 mM fosfocreatina, 1 % *TRITON-X 100* e glicose 6-fosfato desidrogenase. Foram adicionadas as amostras em duplicata e aguardou-se 5 minutos para estabilização da reação. Após esse período foi adicionado o substrato de glicose, e a atividade da enzima foi estimada por mudanças na absorbância, no comprimento de onda a 340 nm, por um período de 10 minutos, e foi expressa em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

3.11 Extração de proteína

As amostras de tecido cardíaco foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. As amostras foram transferidas para tubos de 2 mL com esferas de cerâmica

de 2,8 mm (*CK28, Bertin, Montigny Le Bretonneux, França*) e trituradas utilizando o homogeneizador *Precellys 24 (Lysis & Homogenization, Bertin, Montigny Le Bretonneux, França)* por 2 vezes de aproximadamente 20 segundos cada, com tampão contendo 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, adicionado de inibidores de protease e fosfatase no momento de uso (PMSF 1:1000, Coquetel inibidor de fosfatase 1 e 2 1:300, Inibidor total de protease 1:300 -*Sigma Aldrich*), e *TRITON X-100*. A proporção de tampão adicionada foi 10:1, ou seja, 1 mL de tampão de extração de proteínas para cada 100 mg de tecido. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado em novo tubo de 1,5 mL. As amostras de proteínas foram dosadas por meio do método de *Bradford* e foram alíquotadas e mantidas a -80 °C.

3.12 Western Blot

As amostras foram preparadas para uma concentração de 20 µg de proteína, adicionadas de 5 µL de tampão de amostra, e levadas à temperatura de 100 °C por 5 minutos para desnaturação. Estas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15 %, e a eletroforese foi realizada com voltagem fixa de 100 Volts e amperagem variável. As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com auxílio do equipamento de transferência (*BioRad*). As membranas foram bloqueadas com solução de albumina 5 % e lavadas entre os procedimentos com tampão de lavagem PBS *Tween* 0,1 %. Foram posteriormente incubadas com anticorpo primário por 18 horas a 4 °C. Em seguida foram lavadas com PBS *Tween* 0,1 % e incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP. A revelação das membranas foi realizada com auxílio do analisador de imagem *ImageQuant LAS 4000 mini* com prévia adição de solução reveladora contendo H₂O₂.

3.13 Atividade da enzima citrato sintase

A atividade da enzima citrato sintase foi medida em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de corações utilizando um ensaio de cinética enzimática. Na placa de reação foram adicionados uma mistura de ensaio contendo 200 mM de Tris-Base e 1 mM de DNTB (pH 8,1), complementada com 0,2 % *TRITON-X 100* e 10 mM de Acetil-coA. Foram adicionadas 0,2 µg de amostras em duplicata e foi feita a leitura em 412 nm por 3 minutos. Após isto, foi adicionado o substrato de 10 mM de ácido oxaloacético, e a atividade da enzima foi estimada por mudanças na absorbância, no comprimento de onde a 412 nm, por um período de 3 minutos, e foi expressa em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

3.14 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica foram coletados fragmentos de tecido cardíaco do ventrículo esquerdo (três amostras por grupo). Estes cortes foram imediatamente fixados em glutaraldeído a 2 % em tampão de fosfato 0,15 M (pH 7,2) durante 1 hora, seguido de etapa de pós fixação em 1 % de tetróxido de ósmio em cloreto de sódio a 0,9 % durante 1 hora. O material fixado foi corado em blocos em 0,5 % acetato de uranila aquoso durante a noite. Após, as amostras foram desidratadas em uma série graduada de acetona, e embutidas em resina araldite. Foram obtidos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura utilizando um ultramicrótomo LKB, equipado com uma lâmina de diamante. Os cortes foram colocados em telas de níquel de malha 200, e foram duplamente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As telas foram analisadas e foto-micrografadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1210, operando a 80 kV.

3.15 Extração de RNA

As amostras de coração de ratos neonatos foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. Apenas um terço do coração, do ápice para a base, foi coletado, para garantir homogeneidade e ausência dos átrios. As amostras foram transferidas para tubos de 2 mL com esferas de cerâmica de 2,8 mm (*CK28, Bertin, Montigny Le Bretonneux, França*) e homogeneizadas com 1 mL de *TRIZOL*[®] (*Gibco/BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA*) utilizando o homogeneizador *Precellys 24 (Lysis & Homogenization, Bertin, Montigny Le Bretonneux, França)* por 2 vezes de aproximadamente 20 segundos cada. Após, as amostras permaneceram por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida receberam 200 µL de clorofórmio para que o RNA total fosse separado do DNA e das proteínas. Os tubos foram agitados por alguns segundos e incubados a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa superior que continha o RNA total foi retirada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL previamente identificado. Para a precipitação do RNA foi adicionado a cada tubo 500 µL de isopropanol, e em seguida, estes foram invertidos suavemente e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo em seguida centrifugados a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 75 % gelado diluído em água isenta de RNase e homogeneizadas, sendo novamente centrifugadas a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente desprezado e os tubos foram invertidos e colocados para secar a 4 °C por aproximadamente 1 hora. Depois de seco, o precipitado de RNA foi ressuscitado em 100-150 µL de água livre de RNase, sendo sua concentração determinada a partir da medida de absorvância a 260 nm em espectrofotômetro (*ND-1000 spectrophotometer - NanoDrop Technologies, Inc.*). As soluções de RNA foram aliqüotadas e armazenadas a -80

°C até o uso. A integridade das amostras para o sequenciamento de RNA foi verificada por meio do *Bioanalyzer RNA* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e foi satisfatória para todas as amostras. A integridade das demais amostras de RNA foi verificada por gel de agarose a 0,8 %.

3.16 Sequenciamento de RNA – Illumina

As amostras de corações foram coletadas 1 e 5 dias após a cirurgia de ressecção apical cardíaca ou procedimento *sham* em ratos neonatos de 1 e 7 dias de vida. A preparação das bibliotecas e a técnica de sequenciamento de última geração - RNASeq (também conhecida como WTSS - *Whole transcriptoma Shotgun Sequencing*) foram realizadas no "Laboratório de Sequenciamento de Larga Escala", localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP. Os RNA totais a partir das amostras foram purificados (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) e analisados no *Agilent Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). As amostras com RIN superiores a 9,0 e razão A260 /280 superior a 1,8 foram consideradas adequadas para a preparação da biblioteca com *TruSeq Stranded Total RNA with "Ribo-Zero" Gold kit* (Illumina). As bibliotecas foram quantificadas individualmente por meio de PCR em tempo real (qRT-PCR) e sequenciadas no equipamento HiSeq 2500 (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante, com *pair-end reads* (2x100 ciclos). Foram utilizados como valores de referência o p-valor $\leq 0,05$, z-score $\leq \pm 1,96$, *fold-change* $\leq \pm 1,3$. Os dados gerados pelo sequenciamento foram analisados usando ferramentas de bioinformática. As *reads* foram filtradas com um *Perl script* e mapeadas com *Bowtie2 v2.1.0 software* [71] usando o genoma do rato (*Rattus norvegicus RN5*, NCBI) e o banco de dados *biodbnet* [72]. As *reads* mapeadas foram classificadas pelo *SAMTools v0.1.18 software* [73] e a contagem de *reads* foi feita conforme *HTSeq-counting v0.5.4p2*. A análise de expressão

diferencial foi obtida com o pacote *DESeq v1.12.1* [74] usando *R-Bioconductor* [75], com o padrão descrito [76]. As anotações dos genes foram feitas no software *Biomart (R-Bioconductor)* [77].

3.17 Transcrição do DNA complementar

Tendo extraído o RNA total dos corações dos ratos neonatos, o passo seguinte foi a preparação do cDNA. Para isso, foi utilizado o *Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies)*. Para obter-se 250 ng/μL de cDNA no final da reação, foi necessário 5 μg de RNA total de cada amostra. Dessa forma, sabendo-se a concentração das amostras de RNA total, calculou-se o volume necessário da solução de RNA de forma a se obter os 5 μg. Acrescentou-se 1 μL de Oligo dT a 50 μM, 1 μL de dNTP a 10 mM e, em seguida, o volume de cada amostra foi completado com água livre de RNase até atingir 13 μL. Estas foram incubadas por 5 minutos a 65 °C, para desnaturação das fitas, seguidos por uma incubação a 4 °C, para anelamento do *Oligo dT*, em termociclador *T100™ Thermal Cycler (BioRad)*. As amostras permaneceram a 4 °C até receberem a *mix* contendo os demais componentes da reação. A *mix* continha 4,0 μL de *5X First Strand Buffer*, 1,0 μL de DTT a 0,1M, 1 μL de *RNAout* a 40 U/μL e 1,0 μL de *super transcriptase reversa SSIII* a 200 U/μL para cada amostra. Após adição da *mix*, as amostras foram incubadas a 50 °C por 60 minutos, seguidas por um aquecimento a 70 °C por 15 minutos. Ao final da reação obtivemos um estoque de cDNA na concentração de 250 ng/μL que foi armazenado a -20 °C até o uso.

3.18 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A reação de qRT-PCR foi realizada no equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time*

PCR System em placas de 384 poços (*MicroAmp® Optical 384-well Reaction Plate*). A quantificação da expressão dos genes foi realizada individualmente em corações de ratos neonatos P1 e P7 (6 amostras para cada grupo).

Os primers utilizados estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1. Primers utilizados para o qRT-PCR.

Gene	Primer sense (Forward) – 5'-3'	Primer anti-sense (Reverse) – 5'-3'
PPARD	GAGCACACCCTTCCTCCAG	GATCCGATCGCACTTCTCGT
UCP2	CTTGATCTTGGAGGCCTCAGC	TCTGACTTCCTGCTACCTCCC
LRRK2	AGCTGTCCTACTCTGGGAGG	ACCCCAAACCAGCATGACA
NDUFV3	TCTCGAGGCAAAGGTGTTCC	GTAGGTGGTGGTGTCACTCG
LDHA	GCCACTGTCGCCGATCTC	GGGCTGCCATCTTGGACTTT
HK1	GGTGCGTCTACTGCAGATGT	TAACACACTTCACACGGGGG
ALDOC	GAATGGTATCGTGCCCATCG	GCGGATCTCTTCTGGGCTAT

Nas reações foi utilizado o reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*, Foster City, CA) em placas ópticas de 384 amostras (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). O protocolo consistiu de reações contendo 1 µL de cDNA *template* (com concentração previamente definida), 0,32 µL de cada *primer sense* e *antisense* específicos (200 nM final), 10 µL do *2X SYBR Green PCR Master Mix* e 8,36 µL de água livre de RNase, totalizando um volume final de 20 µL. O *2X SYBR Green PCR Master Mix* contém a *AmpliAq DNA Polymerase*, o *SYBR Green Buffer*, *dNTPs* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *SYBR Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX. A amplificação consistiu em: 95 °C por 10 minutos para a ativação da *AmpliAq DNA Polymerase*, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação das fitas) e 60 °C por 60 segundos (anelamento do primer e

extensão). A coleta do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo.

O *software* quantifica a intensidade da fluorescência dada pelo *SYBr* e normaliza pelos dados de fluorescência obtidos pelo *ROX*. Este procedimento serve para corrigir possíveis erros de quantificação, resultantes da alteração nos volumes de reação que possam ocorrer ao longo do tempo de reação devido a alta temperatura aplicada à placa. Para excluir a possibilidade de contaminação, foi realizado um controle negativo para cada gene que consistiu em uma reação com ausência de cDNA (*No Template Control*). As amostras controle e experimental para um mesmo gene, incluindo seu respectivo controle negativo, foram realizadas a partir de uma mesma mistura de reagentes e na mesma placa óptica. Todas as reações foram processadas em duplicata.

No início da amplificação, ocorre apenas uma pequena variação de fluorescência, o que define a linha de base. O aumento na quantidade de fluorescência acima da linha de base indica a detecção dos produtos de amplificação gerados. Sendo assim, uma nova linha arbitrária pode ser traçada acima da original (*Threshold cycle*: limiar de detecção estabelecido como ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, ou seja, mesma quantidade de produto de PCR). O ΔRn foi determinado a partir da equação: $\Delta Rn = (Rn+) - (Rn-)$, onde $Rn+$ é o sinal de fluorescência do produto em determinado tempo e $Rn-$ é o sinal de fluorescência da linha de base entre os ciclos 3-15. O parâmetro Ct é definido como o valor do número de ciclos cuja fluorescência (ΔRn) cruza essa linha fixa, o *Threshold cycle*.

Os valores médios de Ct para cada gene de interesse foram subtraídos pelos respectivos valores médios de Ct obtidos para o gene normalizador em cada animal. Esse valor normalizado corresponde ao ΔCt . A diferença de expressão gênica dos diferentes genes nos diferentes grupos foi analisada comparando-se as médias de ΔCt obtidas em

amostras dos diferentes grupos. Foram realizadas comparações das duas médias de ΔCt por meio de teste *t de Student* para dados não pareados e em todos os casos foi adotado um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados em expressão relativa, de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimental}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$, representando quantas vezes cada gene esta mais ou menos expresso em amostras de neonatos P1 em comparação com neonatos P7.

3.19 Extração de cardiomiócitos

Cardiomiócitos foram obtidos de corações de ratos neonatos *Wistar* com 1 e 7 dias após o nascimento. Para a extração de quantidade suficiente de cardiomiócitos, foram feitos *pools* de corações, coletados de forma estéril em solução gelada de ADS (NaCl 0,1 M, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, D-glucose 0,1 %, NaH₂PO₄.H₂O 0,8 mM, Hepes 20 mM). Em fluxo laminar, sobre uma placa de *Petri*, os átrios foram separados dos ventrículos e colocados em ADS gelado. Os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para tudo de 50 mL, lavados 1 vez com ADS gelado para retirada do sangue, e foram adicionados 3 mL de tampão de digestão contendo colagenase tipo II (*Worthington Biochemical Corporation*, Lakewood, Nova Jersey, USA) e pancreatina (*Sigma Aldrich*). O tubo foi agitado em *shaker* a 37 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo de 15 mL, e a reação foi inativada pela adição de 2 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low glucose* e Meio 199 (M199), na proporção 4:1, suplementado com 10 % de *Donor Horse Serum*, 5 % de *Newborn Calf Serum (NBCS)* (meio de plaqueamento). Este tubo foi centrifugado a 220 x g por 5 minutos e o botão foi ressuspendido em cerca de 2 mL de meio de plaqueamento, transferido para um novo tubo e mantido a 37 °C até o final das digestões. Os botões de todas as digestões foram incorporados a esse mesmo tubo. Foram

realizadas cerca de 6 digestões para um *pool* de 10 corações de neonatos. Ao fim das digestões, todas as suspensões foram filtradas em filtro de 100 μm (*Cell strainer*, BD) e centrifugadas a 220 x g por 5 minutos. O botão de células foi ressuspendido em cerca de 10 mL de meio de cultura completo e colocado em uma garrafa de cultura de 25 cm^2 e mantido a 37 °C por 45 minutos.

Ao final, a suspensão de células da garrafa de 25 cm^2 foi transferida para um tubo de 50 mL e centrifugada a 225 x g por 5 minutos. Os fibroblastos que aderiram na garrafa de 25 cm^2 foram mantidos em cultura a 37 °C em meio *DMEM high glucose* suplementado com 10 % de Soro fetal bovino (SFB). O número total de células em suspensão recuperadas da garrafa de 25 cm^2 foi determinado por meio da contagem em câmara de *Neubauer*. O botão de células final foi ressuspendido em meio de plaqueamento e as células foram plaqueadas em placas tratadas com laminina por 2 horas a 37 °C, e mantidas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 a 37 °C. 48 horas após o plaqueamento, os cardiomiócitos formaram uma camada de células com batimento espontâneo, o que determinou a viabilidade da cultura. As células foram tripsinizadas e congeladas para experimentos posteriores.

3.20 Determinação da produção de lactato

A produção de lactato foi medida no tampão utilizado para o ensaio de consumo de oxigênio pelos corações neonatos, e foi determinado em 200 μL da respectiva solução por meio do equipamento *ABL 800 Flex*, segundo as recomendações do fabricante. Os valores foram expressos em milimoles por litro por miligramas de proteína.

3.21 Atividade da enzima lactato desidrogenase

A atividade da enzima lactato desidrogenase foi medida em tecido cardíaco utilizando um ensaio de cinética enzimática. As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas em um tampão contendo 77 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 2 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, e 4 mM de β -mercaptoetanol (pH 7,5), centrifugadas e o sobrenadante coletado. Na placa de reação foi adicionada uma mistura de ensaio contendo 120 mM de Tris-HCl, 3,4 mM de NADH, 1 % *TRITON X-100* (pH 7,5). Foram adicionadas as amostras em duplicata e aguardou-se 5 minutos para estabilização da reação. Após esse período foi adicionado o substrato de piruvato a 20 mM, e a atividade da enzima foi estimada por mudanças na absorbância, no comprimento de onda a 340 nm, por um período de 10 minutos, e foi expressa em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

3.22 Medidas das Taxas de consumo de oxigênio (OCR)

As taxas de consumo de oxigênio foram medidas em cardiomiócitos de P1, P7, e P1 tratados com 5 nM de rotenona usando *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (fluxo extracelular, placas de 24 poços, *Seahorse Bioscience*), como descrito previamente [78, 79]. As células foram plaqueadas em triplicata nas placas próprias do XF24, contendo 24 poços e tratadas com laminina, na concentração de 40.000 células/poço em 500 μ L de meio (*DMEM low glucose* e M199, na proporção 4:1, suplementado com 10 % de *Donor Horse Serum*, 5 % de *NBCS*, 1 % *penicillin/streptomycin*) (*Invitrogen*), e incubadas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 a 37 °C por 48 horas. Primeiramente, o meio foi removido e repostado por 500 μ L de meio de ensaio livre de bicarbonato (114 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,16 mM $MgSO_4$, 2,5 mM $CaCl_2$, pH 7,2, and 2,8 mM glicose), e as células foram pré-incubadas por 1 hora a 37 °C em estufa sem CO_2 . O consumo de oxigênio ligado à síntese de ATP e ao

vazamento de prótons foi determinado pela adição de oligomicina (4 µg/mL). Após três ciclos de medidas, 5 µM de desacoplador carbonil cianeto-p-trifluormetoxi-fenilhidrazona (CCCP) foi utilizado para determinar a capacidade respiratória máxima. Após outros três ciclos de medidas, 1 µM de rotenona foi adicionado para bloquear o complexo I em adição a 1 µM de antimicina A para inibir o complexo III, levando a eliminação do consumo de oxigênio mitocondrial. Os valores foram expressos em picomoles de oxigênio por minuto por miligrama de proteínas.

3.23 High Content Screening Assay (HCS)

Cardiomiócitos P1 e P7 foram plaqueados em duplicata em placas de 96 poços tratadas com laminina na concentração de 10.000 células/poço em meio *DMEM low glucose* e M199 (4:1) contendo 10 % *Donor Horse Serum*, 5 % *NBCS* e 1 % *penicillin/streptomycin (Invitrogen)*. As placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ a 37 °C para avaliações com 24 e 48 horas após o plaqueamento. Para a análise da modulação da função mitocondrial, cardiomiócitos P1 também foram tratados com 5 nM de rotenona. Após cada período, as células foram fixadas com 4 % de paraformaldeído, permeabilizadas com solução a 0,1 % *Triton X-100* por 15 minutos a 4 °C, e bloqueadas com solução de 5 % de albumina bovina por 1 hora a temperatura ambiente. Para marcação da imunofluorescência, anticorpos monoclonais anti-tropomiosina sarcomérica (T9283 – 1:200, *Sigma Aldrich*) e anti-vimentina (ab92547 – 1:300, *Abcam*) foram adicionados e incubados por 16-18 horas a 4 °C, seguindo de lavagens com PBS. Os anticorpos secundários (*Alexa Fluor 488* e 555–1:500, *Molecular Probes*, *Invitrogen Technologies*) foram adicionados juntamente com o marcador nuclear *DAPI* (D3571 - 1:100, *Invitrogen, Life Technologies*, Grand Island, NY), e incubados por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo de lavagens com PBS. As imagens

foram adquiridas no *IN Cell Analyzer 2200 high content imaging system* (GE Healthcare, USA) configurado com câmera padrão CMOS. As imagens foram adquiridas usando objetiva de 20x (0.45NA - 20 imagens por poço- *brightfield*, DAPI, FITC, Cy3). Os protocolos de análise foram desenvolvidos no *IN Cell Investigator™ software* (GE Healthcare, USA). O protocolo foi feito para identificar, diferenciar e quantificar cardiomiócitos e fibroblastos, usando a intensidade integrada no canal FITC para as células tropomiosina positivas, e no canal Cy3 para as células vimentina positivas. Para caracterizar a atividade do ciclo celular, as células foram analisadas para a condensação diferencial dos cromossomos por meio da marcação nuclear pelo *DAPI*.

3.24 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade da cultura de cardiomiócitos P1 foi determinada pelo ensaio de MTT. As células foram plaqueadas em duplicata na concentração de 20.000 células/poço, em placas de 96 poços, em meio sem adição de coro, conforme descrito. Após 45 horas do tratamento com 5 nM de rotenona, foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma Aldrich*) a 5 mg/mL em PBS, a cada poço. A placa foi ligeiramente agitada e novamente incubada em estufa contendo 5 % de CO₂ a 37 °C por 3 horas para metabolização do anel tetrazólio pelas células. Após esse período, o meio de cultura foi retirado, e foram adicionados 200 µL de *DMSO* para diluição dos cristais de formazana formados pela metabolização. A leitura foi realizada a 560 nm com filtro de fundo de 670 nm. A absorbância medida se relaciona diretamente com a viabilidade das células.

3.25 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. As diferenças

entre os grupos analisados foram determinadas utilizando os testes estatísticos *t-Student* não pareado para dois grupos amostrais; *ANOVA-one-way* com pós-teste de *Tukey* para mais de dois grupos e uma variável; *ANOVA-two-way* com pós-teste de Bonferroni para mais de dois grupos e duas variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Softwares Inc.*, La Jolla, CA). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo (nível de significância de 95%) entre os diferentes grupos.

4.0 Resultados

4.1 Regeneração cardíaca em ratos neonatos após ressecção do ápice cardíaco

Devido à inexistência de trabalhos descrevendo o processo de regeneração em modelo de ratos, e as inúmeras vantagens desse modelo no estudo em cardiologia, procurou-se primeiramente demonstrar o fenômeno de neoformação de tecido cardíaco em ratos neonatos após ressecção apical.

Para certificar a porcentagem de tecido ventricular cardíaco retirada na cirurgia de ressecção, foram realizadas quantificações precisas da área ventricular do coração em secção coronal pelo exame de ressonância magnética (*1.5T MR scanner - Philips Achieva*) antes e logo após a cirurgia nos neonatos de 1 (R1d) e 7 dias (R7d) de vida. A porcentagem média de área de tecido ventricular cardíaco retirada foi de aproximadamente 18% ($\pm 1,0$) e 16% ($\pm 1,3$) para os ratos de 1 e 7 dias de vida, respectivamente (Fig. 1A). A Figura 1B mostra uma imagem representativa de um rato neonato de 1 dia de vida antes da cirurgia de ressecção (esquerda) e logo após a mesma, evidenciando uma porção apical claramente ausente. É importante salientar que a taxa de sobrevivência após a cirurgia de ressecção foi de 63 % para R1d (n: 331) e 53 % para R7d (n: 265), sendo a maioria das perdas ocorridas imediatamente após o procedimento. O canibalismo materno dos neonatos operados aconteceu principalmente nos primeiros procedimentos, mas foi reduzido pela utilização de boas práticas de manejo com os animais, tais como, o uso de luvas sem sangue na reintrodução dos neonatos com a fêmea, minimização dos barulhos externos no momento das cirurgias, e realização exclusiva do procedimento cirúrgico na sala de experimentação animal.

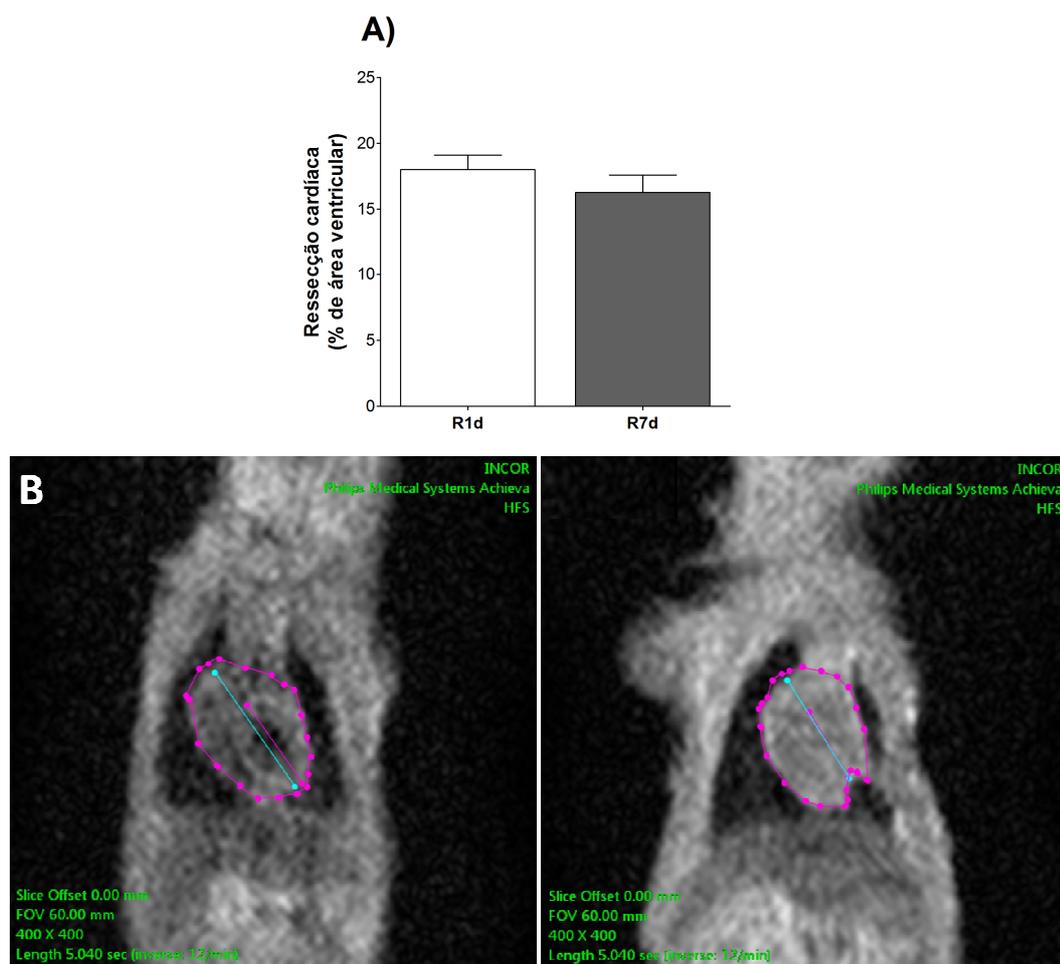
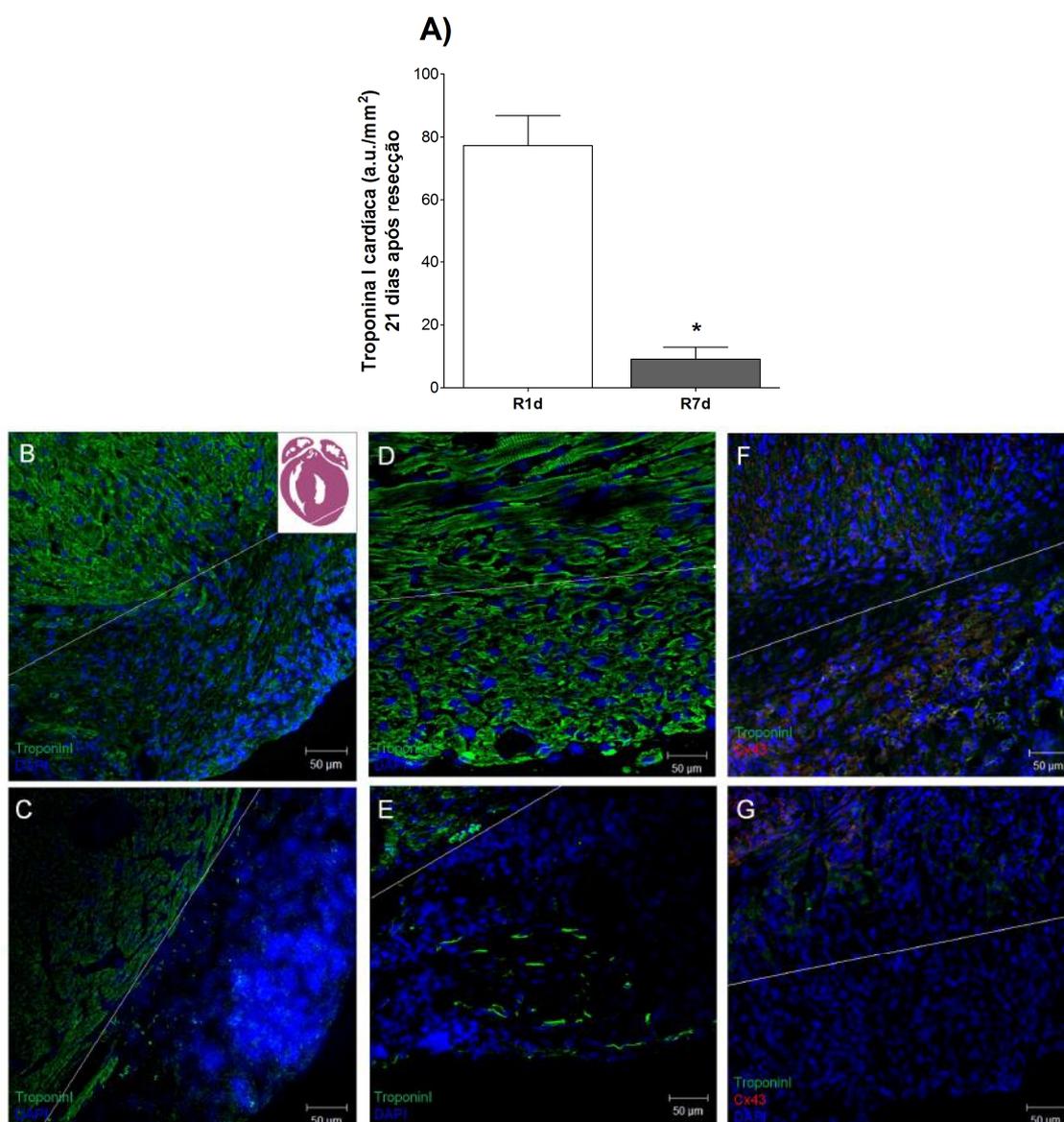


Figura 1. Porcentagem de ressecção logo após cirurgia.

Porcentagem (média \pm SEM) de tecido ventricular ressectado (A) em R1d e R7d (n= 12 para ambos); (B) Imagens de ressonância magnética obtidas antes e imediatamente após a cirurgia de ressecção. As linhas pontilhadas mostram a área cardíaca usada para a quantificação da ressecção.

Para observar a capacidade regenerativa dos neonatos, os mesmos foram mantidos por 21 dias após a cirurgia de ressecção, quando foram sacrificados e os corações foram coletados para análises histológicas (Fig. 2). Os resultados mostram que a área neoformada nos ratos R1d apresenta 8,5 vezes mais marcação para troponina I cardíaca do que a área neoformada nos ratos R7d (R1d: $77,3 \pm 9,5$ a.u./mm²; R7d: $9,0 \pm 3,9$ a.u./mm²; $p < 0,05$; Fig. 2A), além de uma distribuição uniforme da marcação comparada com a presença dispersa de troponina I cardíaca nos ratos R7d (Fig. 2B-C). Em adição, as células neoformadas nos neonatos R1d também expressam conexina 43 sugerindo a presença de cardiomiócitos

maduros com capacidade de estabelecer junções celulares (Fig. 2F). De forma contrária, as poucas células troponina I positivas nos neonatos R7d praticamente não expressam conexina 43 (Fig. 2B-G). A marcação nuclear mostrou a predominância de outras células que não cardiomiócitos (troponina I negativa) na região apical reparada nos neonatos R7d comparados aos R1d (Fig. 2B-E). A quantificação de colágeno mostrou que os neonatos R1d, em ambos ápice e área remota do coração, apresentaram menor deposição de fibras de colágeno comparado aos neonatos R7d (R1d: $6,2 \pm 1,4$ % vs. R7d: $12,4 \pm 1,0$ %; colágeno apical; R1d: $4,4 \pm 0,4$ % vs. R7d: $7,3 \pm 0,6$ %; colágeno na área remota; Fig. 2H-J; $p \leq 0,05$).



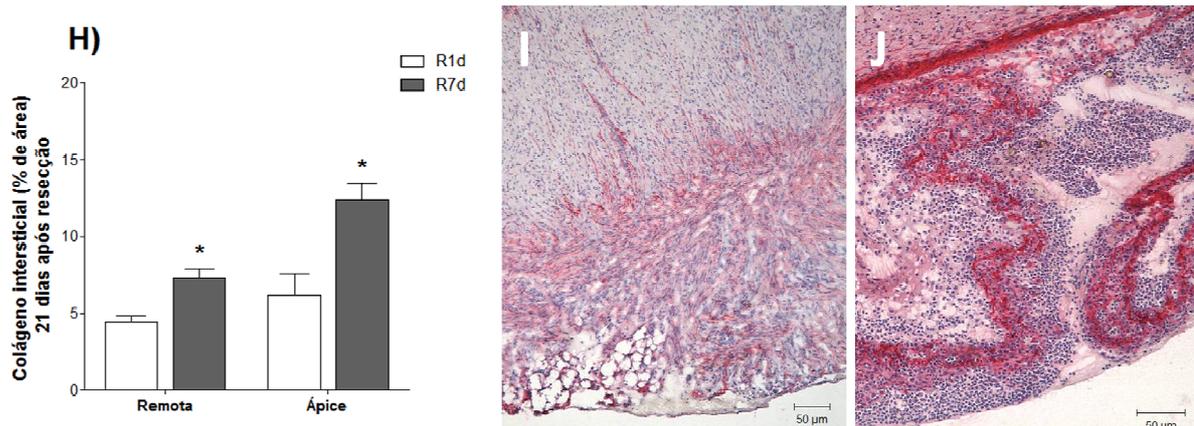


Figura 2. Quantificação de troponina I cardíaca (a.u./mm²), deposição de fibras de colágeno de acordo com Picrosirius (porcentagem de área) e marcação de conexina 43 no tecido cardíaco neoformado.

(A) As barras indicam a quantificação de troponina I cardíaca por área (média \pm SEM) no tecido neoformado em R1d (n=6) e R7d (n=7) 21 dias após a cirurgia de ressecção, *t-Student*, * $p < 0,05$ vs. R1d. As imagens indicam a marcação para troponina I cardíaca em verde em (B) R1d (20x), (C) R7d (20x), (D) R1d (40x), (E) R7d (40x). As imagens indicam a marcação de conexina 43 em (F) R1d (20x), (G) R7d (20x). (H) As barras indicam a porcentagem de fibras de colágeno na região apical e remota do coração (média \pm SEM) em R1d (n= 8 e 5, respectivamente) e R7d (n= 10 e 7, respectivamente) 21 dias após a cirurgia de ressecção, *ANOVA-two-way*, * $p < 0,05$ vs. R1d. As imagens indicam a marcação das fibras de colágeno em (I) R1d (20x), (J) R7d (20x).

Como mostrado, houve evidências da formação de cardiomiócitos e pouca deposição de colágeno no tecido de reparo dos neonatos R1d. Em seguida, alguns ensaios foram realizados com o intuito de observar a funcionalidade deste tecido. Foram adquiridas imagens utilizando a técnica de *SPECT* para a verificação da perfusão do tecido na região neoformada, nos dois grupos de neonatos após 21 e 60 dias da cirurgia de ressecção apical. As imagens de cada animal foram adquiridas usando [^{99m}Tc]Sestamibi, um radiofármaco que se concentra no tecido cardíaco após administração sistêmica, sendo que sua captação no miocárdio é proporcional ao fluxo sanguíneo na região, e em regiões onde há deposição de fibras de colágeno a captação é menor [80]. A Figura 3 mostra que os mesmos animais dos grupos R1d e R7d apresentaram redução na captação de [^{99m}Tc]Sestamibi no ápice cardíaco em relação ao restante do coração após 21 dias (38 \pm 12 % e 70 \pm 10 %, respectivamente) e 60 dias da ressecção (64 \pm 9,8 % e 55 \pm 14,0 %, respectivamente).

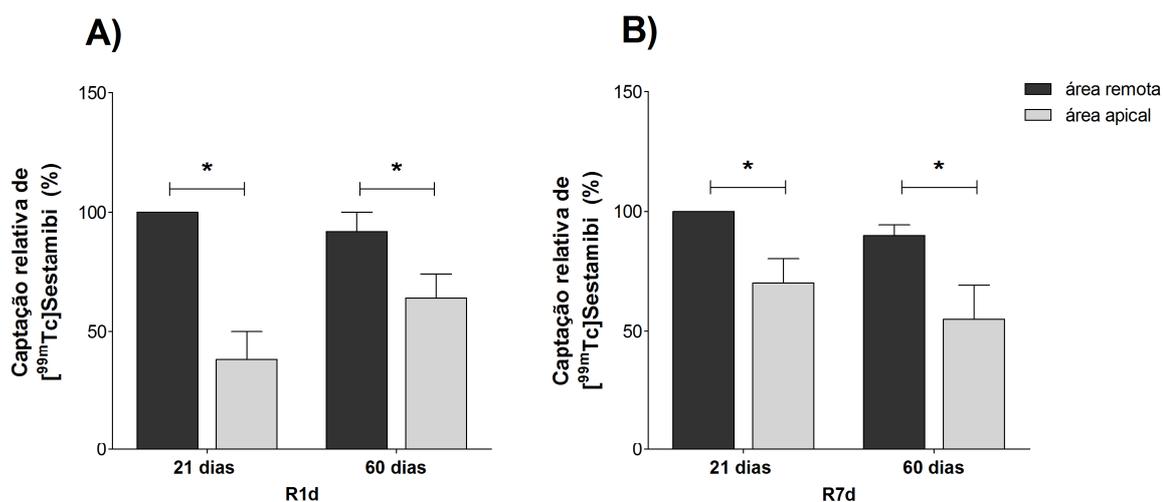


Figura 3. Perfusão do miocárdio mensurada por *Single Photon Emission Tomography* (SPECT) dos segmentos do coração de animais R1d e R7d.

As barras indicam a porcentagem relativa de captação de [^{99m}Tc]Sestamibi na área apical (5 segmentos) e nas outras porções do coração (12 segmentos) de (A) R1d (n=6) e (B) R7d (n= 5). ANOVA-*two-way*, *p < 0,05 vs. área remota.

Considerando as características do reparo tecidual e hipoperfusão nos animais R1d, foi essencial avaliar a função cardíaca global desses animais na fase adulta, especialmente sob estresse hemodinâmico para se observar a efetividade em longo prazo do reparo do miocárdio. O desempenho cardíaco foi medido diretamente em condições basais e em condições de pós-carga (estresse farmacológico devido à injeção de um potente vasoconstritor, a fenilefrina) e pré-carga (oclusão da veia cava). De forma interessante, em condições basais a função cardíaca geral foi preservada nos grupos de animais ressectados tanto com 1 quanto com 7 dias de vida comparados aos animais *sham* (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biométricos e hemodinâmicos dos grupos *sham*, R7d e R1d em condições basais.

	<i>SHAM</i>	R7d	R1d	ANOVA (p-valor)
Biometria				
Peso corporal, g	327 ± 53	306 ± 64	337 ± 28	0,45
Coração/PC, mg·g ⁻¹	0,0039 ± 0,0003	0,0040 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0004	0,23
Hemodinâmica				
HR, batimentos·min ⁻¹	370 ± 12,4	378 ± 15,4	341 ± 20,1	0,29
MAP, mmHg	85 ± 3,07	89 ± 5,8	98 ± 8,6	0,37
LVSP, mmHg	113 ± 5,8	119 ± 4,8	122 ± 9,01	0,48
LVEDP, mmHg	9 ± 1,7	13 ± 4,3	10 ± 0,9	0,58
CO, µl·min ⁻¹	40600 ± 3489	35771 ± 6619	41100 ± 9339	0,80
EF, %	75 ± 7,8	65 ± 3,3	69 ± 14,06	0,47
SW, mmHg·ml ⁻¹	11439 ± 940	10383 ± 2265	13391 ± 2852	0,082
+dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	10229 ± 961	10123 ± 1044	10674 ± 2233	0,99
-dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	-6057 ± 567	-6061 ± 520	-5496 ± 456	0,80
SV, µL	110,5 ± 5,3	89,63 ± 12,02	111,4 ± 16,2	0,27
EDV, µL	151 ± 12,5	147 ± 25,5	177 ± 16	0,87

Valores apresentados como média ± SEM. Frequência cardíaca = HR, *heart rate*; Média da pressão arterial= MAP, *mean arterial pressure*; Pressão sistólica do ventrículo esquerdo= LVSP, *left ventricular systolic pressure*; Pressão sistólica final do ventrículo esquerdo= LVEDP, *left ventricular end-diastolic pressure*; Débito cardíaco= CO, *cardiac output*; Fração de ejeção= EF, *ejection fraction*; Trabalho cardíaco= SW, *stroke work*; Razão máxima do aumento e redução da pressão do ventrículo esquerdo= +dP/dtmax and -dP/dtmax, *maximal rate of LV pressure increment and decrement*, respectivamente; Volume sistólico= SV, *stroke volume*; Volume diastólico final= EDV, *end-diastolic volume*.

Entretanto, foram identificadas alterações importantes nos principais parâmetros hemodinâmicos relacionados ao desempenho cardíaco em resposta à sobrecarga farmacológica nos ratos R7d (Fig. 4). Com o estresse farmacológico, as alterações na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) em relação aos níveis basais (mmHg) foram significativamente maiores no grupo R7d, enquanto os animais dos grupos R1d e *sham*

responderam de forma similar, sugerindo um déficit de ejeção nos R7d (R7d: $5,6 \pm 1,8$ mmHg vs. *sham*: $1,3 \pm 0,4$ mmHg e R1d: $0,6 \pm 0,6$ mmHg; $p \leq 0,05$, Fig. 4A). Também as alterações no volume sistólico (SV) em relação aos níveis basais em resposta à pós-carga mostrou comportamento semelhante, com uma importante redução no grupo R7d comparado com o grupo R1d e *sham* (R7d: $-40,3 \pm 4,9$ % vs. *sham*: $-27,1 \pm 4,1$ %; R1d e $-6,9 \pm 11,4$ % de alteração; $p \leq 0,05$, Fig. 4B).

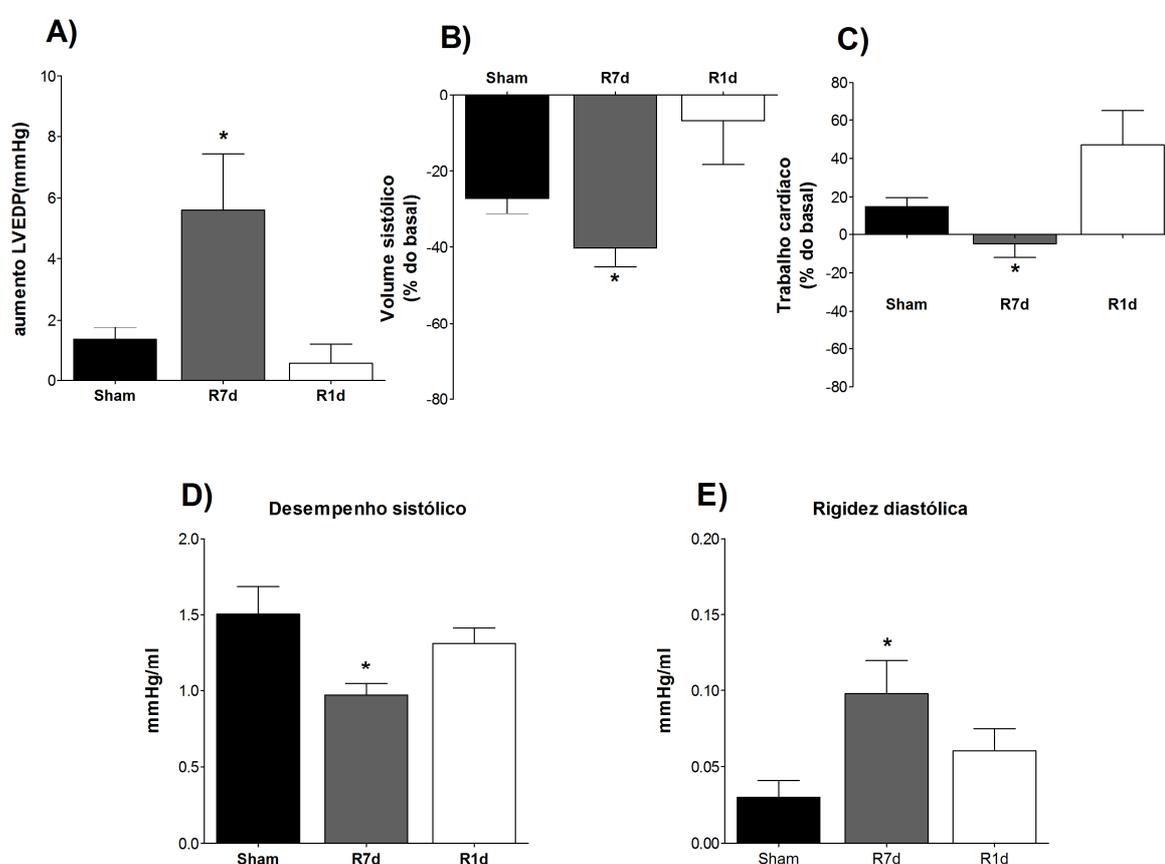


Figura 4. Resposta cardíaca à pós-carga.

As barras representam a repercussão cardíaca da injeção de fenilefrina nos grupos, porcentagem de alteração do basal (exceto para LVEDP, que expressa o aumento em mmHg do basal), do (A) LVEDP, (B) SV, (C) SW dos grupos *sham* (n=6), R7d (n=6) e R1d (n=5). Os valores positivos e negativos resultam do aumento ou redução do parâmetro avaliado, respectivamente. Os valores de inclinação de ESPVR como um índice (D) de desempenho sistólico e EDPVR como um índice (E) de rigidez diastólica. ANOVA-one-way, * $p < 0,05$ vs. *sham* e R1d.

Alterações no trabalho cardíaco dos níveis basais, que representam o índice global do

desempenho cardíaco e que dependem da geração de pressão e capacidade de ejeção durante cada batimento, mostraram perfis comparáveis entre os grupos *sham* e R1d e diminuição nos animais R7d (R7d: $-4,8 \pm 7,2$ % vs. *sham*: $15 \pm 4,7$ % e R1d: $47 \pm 17,8$ % de alteração; $p \leq 0,05$, Fig. 4C). A inclinação da relação linear entre pressão e volume no final da sístole (ESPVR) esteve reduzida no grupo R7d comparado aos grupos *sham* e R1d, e isso foi consistente com a redução no desempenho sistólico em R7d (R7d: $0,97 \pm 0,07$ mmHg vs. *sham*: $1,5 \pm 0,17$ mmHg e R1d: $1,3 \pm 0,1$ mmHg; $p \leq 0,05$, Fig. 4D). Finalmente, a inclinação da relação linear entre pressão e volume no final da diástole (EDPVR) aumentou no grupo R7d comparado com aos grupos *sham* e R1d, sugerindo um aumento na rigidez diastólica em R7d (R7d: $0,1 \pm 0,02$ mmHg vs. *sham*: $0,03 \pm 0,01$ mmHg e R1d: $0,06 \pm 0,01$ mmHg; $p \leq 0,05$, Fig. 4E). Em adição, a relação entre as alterações na geração do SW e os incrementos de pressão sistólica (Fig. 5) resultou em correlações positivas similares nos grupos *sham* e R1d (r de Pearson: 0,5; inclinação média: $0,66 \pm 0,07$, e r de Pearson: 0,57; inclinação média: $0,64 \pm 0,04$, para *sham* e R1d, respectivamente), enquanto a correlação no grupo R7d gerou uma inclinação praticamente plana (r de Pearson: 0,13; inclinação média: $0,14 \pm 0,05$). Estes resultados corroboram com a diminuição do desempenho sistólico em R7d comparado com os animais dos grupos *sham* e R1d.

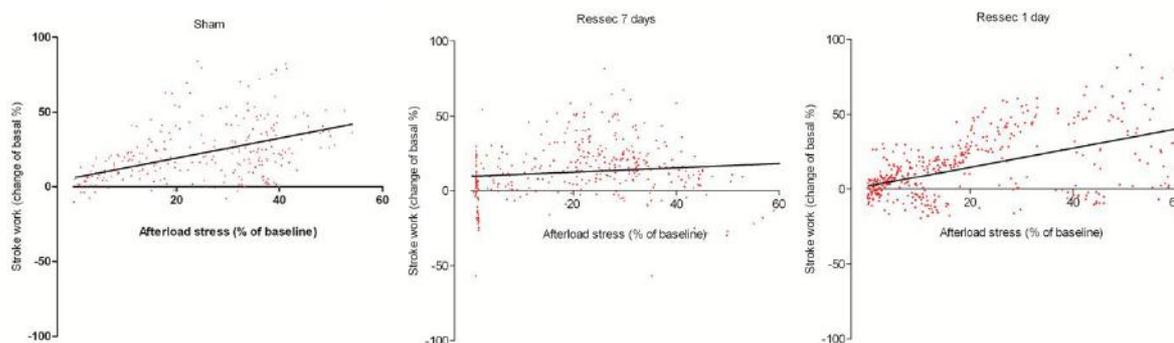


Figura 5. Retas de regressão linear do trabalho cardíaco em função do incremento de pressão sistólica.

Os dados são expressos com porcentagem média de alteração do basal para todos os grupos *sham*, R7d e R1d.

Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos dos grupos *sham*, R7d e R1d em condições de estresse.

	<i>SHAM</i>	R7d	R1d	ANOVA (p-valor)
Hemodinâmica				
HR, batimentos·min ⁻¹	-2,21 ± 0,28	-4,13 ± 0,77	7,0 ± 7,3	0,24
LVSP, mmHg	47,2 ± 1,3	53,7 ± 2,2	53 ± 1,3	0,28
CO, µl·min ⁻¹	-17,5 ± 12,5	-58,9 ± 9,8	-25,8 ± 11,6	0,06
EF, %	-35,72 ± 6,6	-51,33 ± 6,8	-30,44 ± 9,5	0,17
+dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	51,9 ± 8,7	42,6 ± 5,3	45,1 ± 6,4	0,62
-dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	81,2 ± 11,5	92 ± 12,5	92,7 ± 17,6	0,79

Outros parâmetros hemodinâmicos não apresentaram diferenças entre os grupos quando submetidos ao estresse em relação aos valores basais apresentados na Tabela 3. Estes dados são consistentes com a deposição aumentada de fibras de colágeno intersticial (fibrose) observada nos corações adultos de R7d comparados com *sham* e R1d (R7d: 11,4 ± 0,64 % vs. *sham*: 5,1 ± 0,37 % e R1d: 6,9 ± 0,6 %; $p \leq 0,05$, Fig. 6G). Vale salientar que esses resultados são consistentes com os resultados observados 21 dias após a ressecção mostrados na Figura 2H-J. A análise de Picrosirius por polarização mostrou que os cardiomiócitos dos grupos *sham* e R1d, após 60 dias da ressecção, foram circundados por fibras de colágeno finas e pálidas (fracamente birefringentes), com coloração esverdeada (Fig. 6A–D). No grupo R1d, poucos cardiomiócitos foram circundados com fibras mais grossas e amareladas de colágeno que possuíam birefringência aumentada (Fig. 6D). Por outro lado, o tecido cardíaco do grupo de animais R7d exibiram vários cardiomiócitos circundados com fibras de colágeno grossas, brilhantes (fortemente birefringentes), amareladas ou vermelhas (Fig. 6E-F).

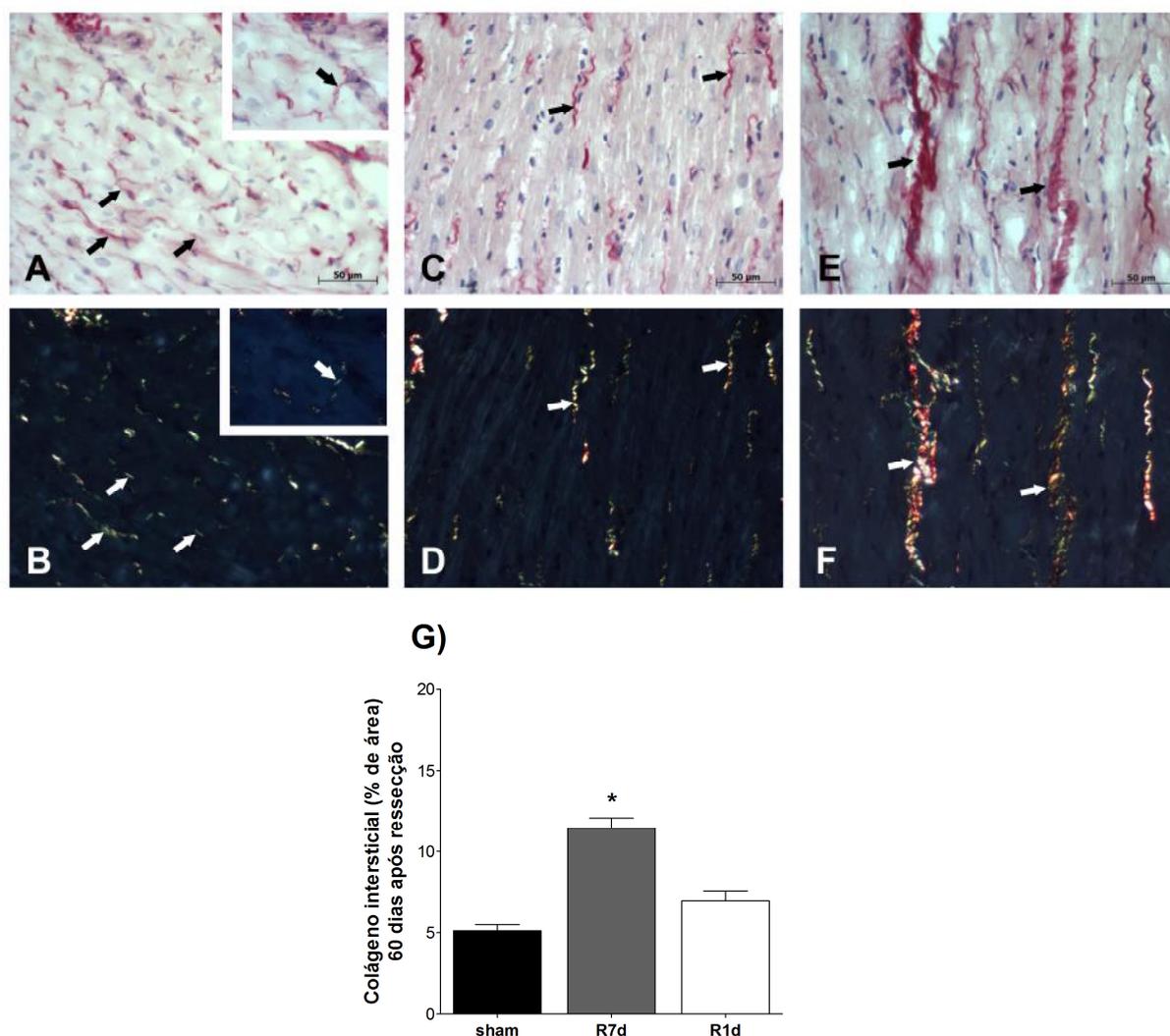


Figura 6. Quantificação de colágeno intersticial em cortes histológicos coronais de coração de animais *sham*, R7d e R1d após 60 dias da cirurgia de ressecção pelo ensaio de Picrosirius.

As imagens indicam a coloração Picrosirius-hematoxilina [A (*sham*), C (R1d) e E (R7d)] e Picrosirius-hematoxilina sob luz polarizada [B (*sham*), D (R1d) e F (R7d)]. As barras indicam a porcentagem média de fibras de colágeno (média \pm SEM) do *sham* (n= 6), R7d (n= 6) e R1d (n= 5). ANOVA-one-way, *p < 0,05 vs. *sham* e R1d.

4.2 Dano metabólico tardio após ressecção do ápice cardíaco

Como mencionado anteriormente, o bom funcionamento das mitocôndrias cardíacas garante a manutenção da função cardíaca na vida adulta. Diante da resposta de reparo diferencial entre os neonatos R1d e R7d, e suas consequências na função cardíaca, alguns experimentos foram realizados para a avaliação dos desdobramentos da cirurgia de ressecção apical na função mitocondrial dos animais na vida adulta (60 dias após ressecção).

A função mitocondrial na vida adulta dos animais pode ser avaliada em mitocôndrias isoladas do tecido cardíaco mediante análise do consumo de oxigênio no Estado 2 (respiração basal), consumo de oxigênio no Estado 3 (respiração estimulada após adição de ADP), consumo de oxigênio no estado 4 (respiração inibida após adição de oligomicina, uma droga que bloqueia a ATP sintase) e consumo de oxigênio no estado desacoplado (após adição do desacoplador CCCP, que desacopla o consumo de oxigênio pela cadeia de transporte de elétrons da produção de ATP pela ATP sintase e indica a respiração máxima).

O consumo de oxigênio mede a respiração mitocondrial. A Figura 7 demonstra que as mitocôndrias isoladas dos corações de ambos os grupos R1d e R7d apresentaram um déficit na respiração mitocondrial quando comparadas às isoladas de animais *sham*. Nota-se redução do consumo basal de oxigênio (Estado 2- *sham*: $48,6 \pm 5$ nmol.mg prot⁻¹.min¹, R1d: $33,3 \pm 5$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: $29,2 \pm 1,8$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 7A), menor incremento no consumo de oxigênio devido à adição de ADP (Estado 3- *sham*: $111 \pm 7,2$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R1d: $78,1 \pm 9,7$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: 79 ± 6 nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 7B), e reduzido consumo de oxigênio devido à adição de oligomicina (Estado 4- *sham*: $54,8 \pm 3,7$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R1d: $30,5 \pm 3,4$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: $31,8 \pm 2$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 7C). A respiração mitocondrial máxima, estimulada pela adição de CCCP, também foi reduzida em R1d e R7d comparados com os animais *sham* (CCCP- *sham*: $99 \pm 8,4$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R1d: $59,4 \pm 6,6$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: $64,8 \pm 5,8$ nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 7D).

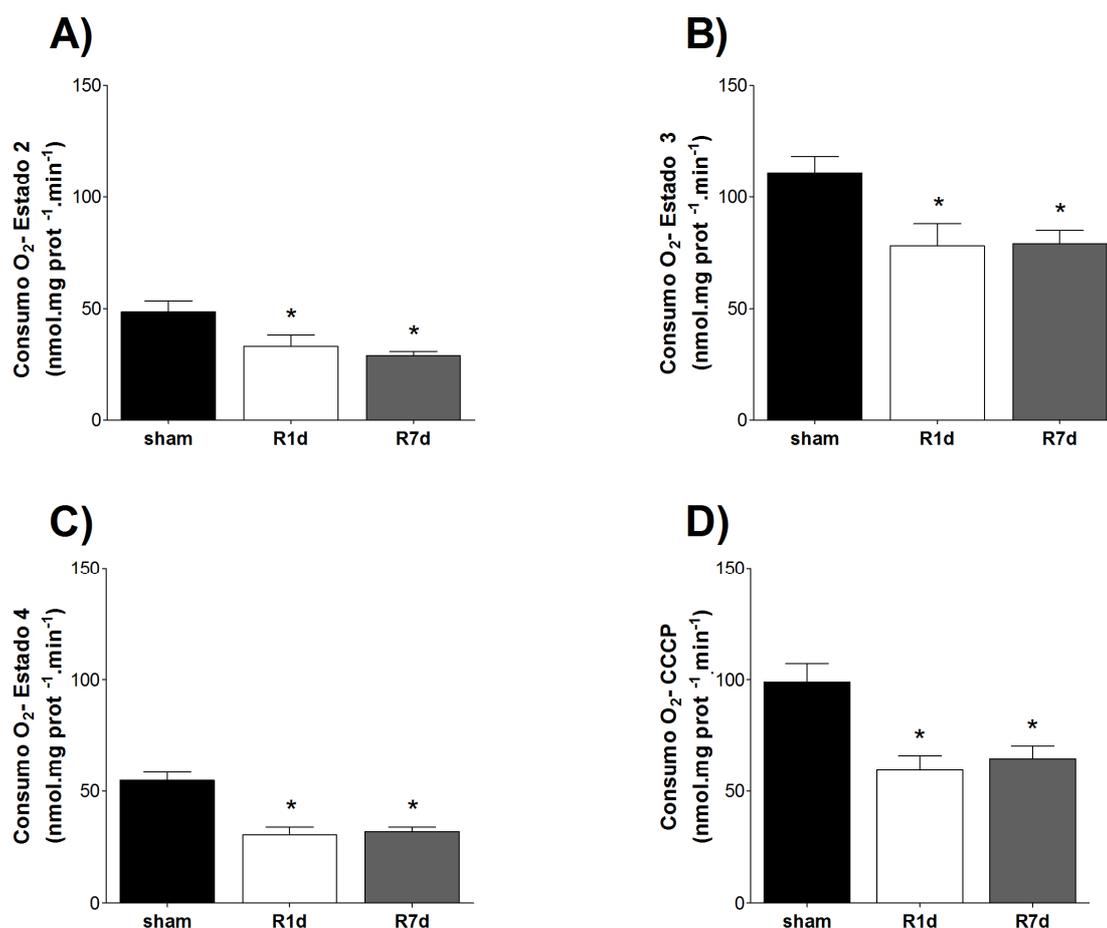


Figura 7. Consumo de oxigênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais sham, R1d e R7d após 60 dias da cirurgia de ressecção.

As barras indicam consumo médio de O₂ em nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹ (média ±SEM), no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e CCCP (D) de 0,250 mg/mL de mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais sham (n=7), R1d (n=9) e R7d (n=10) após 60 dias da cirurgia de ressecção cardíaca. ANOVA-one-way, * p<0,05 vs. sham.

Sabendo que a maioria dos danos cardíacos provocados durante a insuficiência cardíaca é devido à geração exacerbada de espécies reativas do oxigênio (EROs) [81-83], foi realizada a dosagem da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em mitocôndrias isoladas, como uma medida da produção e liberação de radicais livres. Os resultados demonstram uma exacerbada liberação de peróxido mitocondrial em R1d e R7d (Fig. 8) em relação ao consumo de oxigênio, que ocorreu tanto no estado basal (Estado 2 - sham: 14,3 ±1,4 pmol.nmol⁻¹; R1d: 41,4 ±5,2 pmol.nmol⁻¹; R7d: 49,5 ±5,6 pmol.nmol⁻¹; p<0,05, Fig. 8A)

quanto nos estados de estímulos extremos (Estado 3 - *sham*: $0,49 \pm 0,09$ pmol.nmol⁻¹; R1d: $1,1 \pm 0,14$ pmol.nmol⁻¹; R7d: $1,2 \pm 0,14$ pmol.nmol⁻¹; Estado 4 - *sham*: $2,1 \pm 0,69$ pmol.nmol⁻¹; R1d: $20 \pm 2,7$ pmol.nmol⁻¹; R7d: $30,7 \pm 4,1$ pmol.nmol⁻¹; e CCCP- *sham*: $0,67 \pm 0,16$ pmol.nmol⁻¹; R1d: $1,7 \pm 0,14$ pmol.nmol⁻¹; R7d: $1,5 \pm 0,25$ pmol.nmol⁻¹; $p < 0,05$, Figs. 8B, C e D, respectivamente). Vale ressaltar que no Estado 4, quando a fosforilação oxidativa é inibida pela inibição da ATP sintase por oligomicina, a liberação de peróxido pelos animais do grupo R1d foi menor que a dos animais R7d (Fig. 8C).

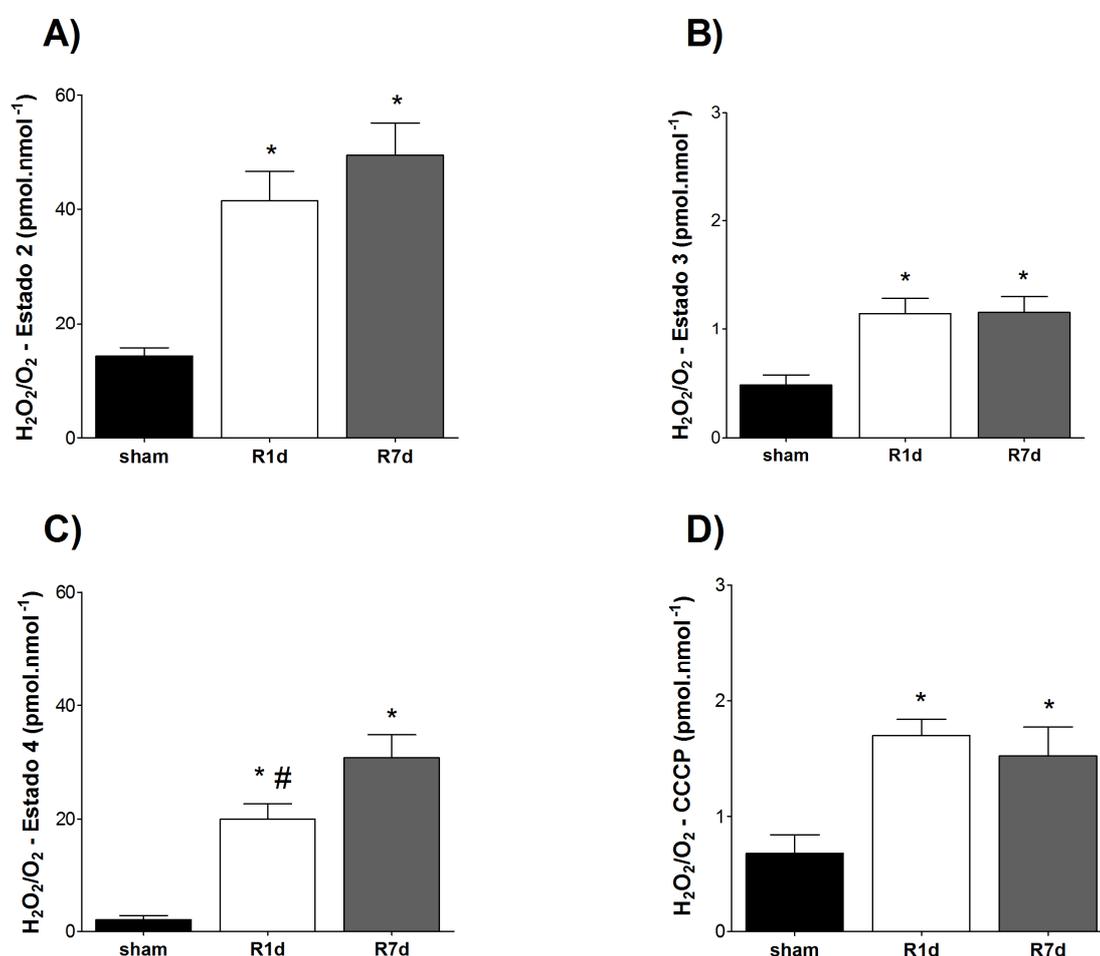


Figura 8. Liberação relativa de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais *sham*, R1d e R7d após 60 dias da cirurgia de ressecção.

As barras indicam a relação média (média \pm SEM) entre a liberação de H₂O₂ e o consumo de O₂ em pmol.nmol⁻¹, no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e CCCP (D) de 0,250 mg/mL de mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais *sham* (n=7), R1d (n=8) e R7d (n=9) após 60 dias da cirurgia de ressecção cardíaca. ANOVA-one-way, * $p < 0,05$ vs. *sham*; # $p < 0,05$ vs. R7d.

A produção absoluta de peróxido mitocondrial também foi testada frente à inibição de outros complexos da cadeia de transporte de elétrons. O uso de antimicina A, inibidor do complexo III, (*sham*: 542 ± 724 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R1d: 1347 ± 224 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: 1476 ± 286 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 9A), e de rotenona, inibidor do complexo I, (*sham*: 143 ± 2 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R1d: 433 ± 61 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; R7d: 326 ± 42 pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 9B) também acarretou no aumento significativo da liberação de peróxido mitocondrial em R1d e R7d, evidenciando escape de elétrons em todos os complexos mitocondriais nos corações ressectados.

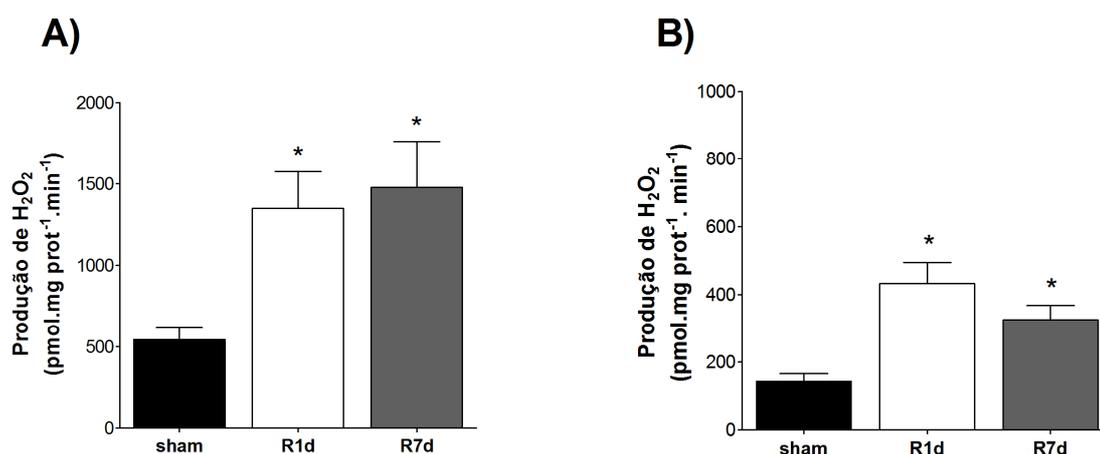


Figura 9. Liberação absoluta de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais *sham*, R1d e R7d com 60 dias da cirurgia de ressecção após adição de antimicina A (A) e rotenona (B).

As barras indicam a média (média \pm SEM) da liberação de H₂O₂ em pmol.mg prot⁻¹.min⁻¹ após adição de antimicina A (A) e rotenona (B) em 0,250 mg/mL de mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo de corações de animais *sham* (n=10), R1d (n=9) e R7d (n=10) após 60 dias da cirurgia de ressecção cardíaca. ANOVA-one-way, * $p < 0,05$ vs. *sham*.

Com base nos resultados para mitocôndrias isoladas na vida adulta e com o intuito de observar a interferência direta da cirurgia de ressecção do ápice cardíaco no estresse oxidativo tecidual, foi realizada a dosagem da liberação de peróxido de hidrogênio em tecido cardíaco de ratos neonatos 5 dias após a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco. Os

resultados mostram aumento da liberação tecidual de peróxido nos corações de ambos os neonatos R1d e R7d já no período de 5 dias após a cirurgia de ressecção (*sham*1d: $0,18 \pm 0,02 \mu\text{M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; R1d: $0,28 \pm 0,9 \mu\text{M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; *sham*7d: $0,19 \pm 0,02 \mu\text{M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; R7d: $0,31 \pm 0,35 \mu\text{M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $p < 0,05$, Fig. 10).

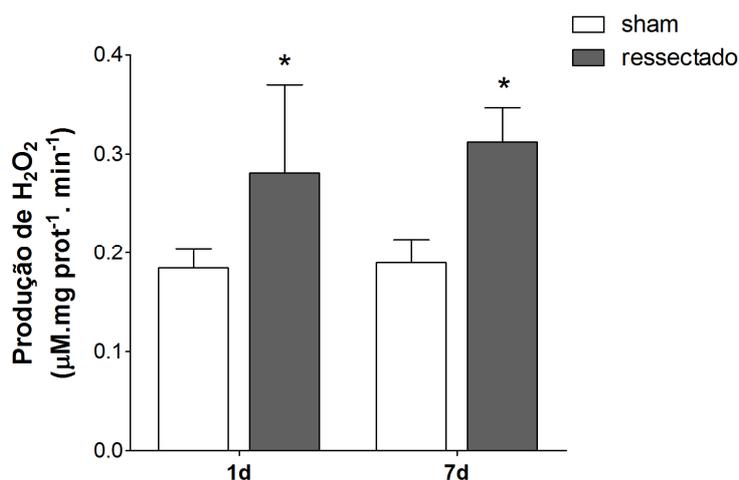


Figura 10. Liberação de peróxido de hidrogênio em tecido cardíaco de R1d, R7d e seus respectivos *sham* após 5 dias da cirurgia de ressecção.

As barras indicam a média (média \pm SEM) da liberação de H_2O_2 em $\mu\text{M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ pelo tecido cardíaco de animais R1d ($n=3$), R7d ($n=4$) e seus respectivos *sham* (S1d $n=9$, S7d $n=7$) após 5 dias da cirurgia de ressecção. ANOVA-two-way, * $p < 0,05$ vs. *sham*.

Com a observação que ambos os grupos de animais ressectados apresentaram um aparente dano metabólico, com aumento absoluto e relativo ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$) da liberação de peróxido de hidrogênio e redução do consumo de oxigênio, outros parâmetros da função mitocondrial também foram avaliados. A produção de ATP pelo miocárdio foi mantida nos animais ressectados em comparação ao *sham* (*sham*: $227,6 \pm 16,6 \text{ nmol} \cdot \mu\text{g prot}^{-1}$; R1d: $266,4 \pm 16,5 \text{ nmol} \cdot \mu\text{g prot}^{-1}$; R7d: $224 \pm 26,2 \text{ nmol} \cdot \mu\text{g prot}^{-1}$; Fig. 11A). A determinação da atividade da enzima hexoquinase, a primeira enzima da glicólise, demonstrou que tanto R1d quanto R7d apresentam elevada atividade glicolítica 60 dias após a ressecção cardíaca (*sham*: $1,6 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; R1d: $4,3 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; R7d: $4,2 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

$1.\text{min}^{-1}$; $p < 0,05$, Fig. 11B). Além disso, a manutenção da molécula de citocromo c no compartimento mitocondrial também foi igual entre os grupos, evidenciando que mesmo com o aparente dano metabólico, os animais ressectados apresentam as membranas mitocondriais íntegras e não estimulam a morte celular no miocárdio via ativação da família de proteínas apoptóticas Bcl2 (Fig. 11C) [84].

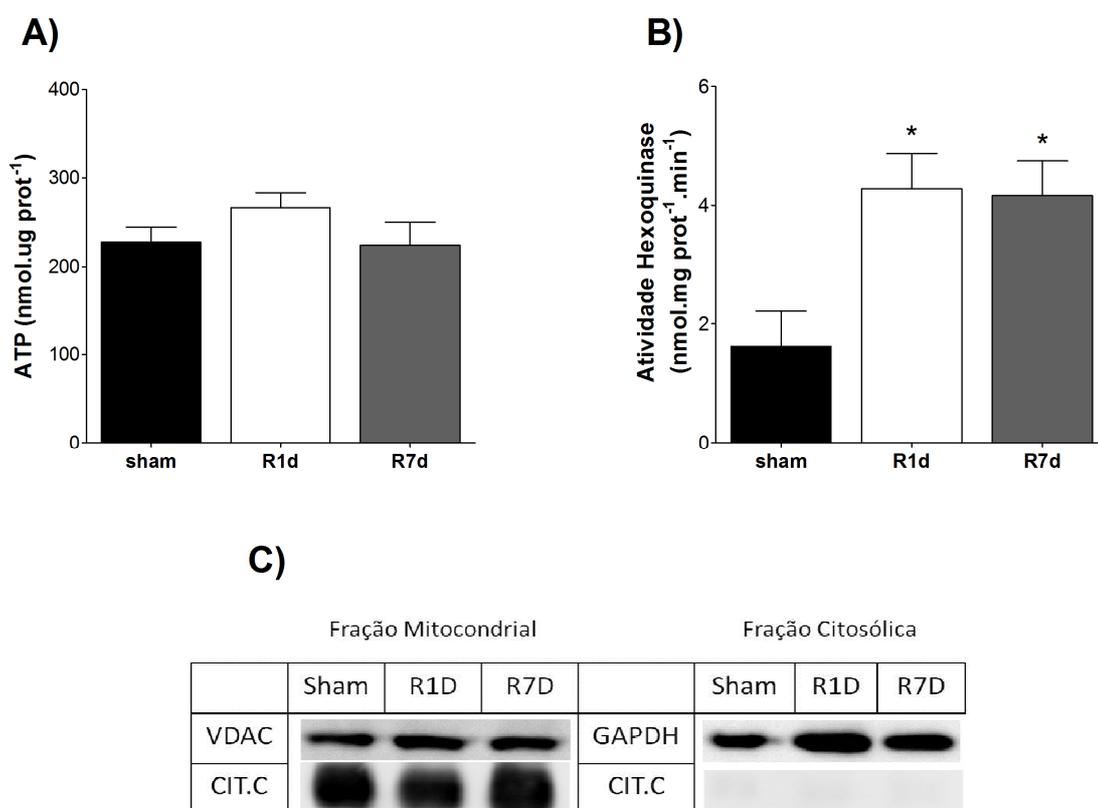


Figura 11. A) Produção de ATP (nmol.µg prot⁻¹); B) Atividade da enzima hexoquinase (nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹); e C) Western blot da fração citosólica e mitocondrial do ventrículo esquerdo de corações de animais sham, R1d e R7d, após 60 dias da cirurgia de ressecção cardíaca.

As barras indicam a média (média \pm SEM) para cada grupo analisado. ANOVA-one-way, * $p < 0,05$ vs. sham.

Para avaliar o impacto do dano metabólico na biogênese mitocondrial foram feitas análises de microscopia eletrônica do tecido cardíaco dos ratos com 60 dias de vida. As imagens apresentadas na Figura 12 são representativas das ultramicrografias obtidas para as análises. Para os animais sham (Fig. 12A) a distribuição das mitocôndrias pelo tecido foi normal, mostrando um alinhamento ordenado das mitocôndrias entre os sarcômeros e com

proximidade às miofibrilas, apesar de alguns aglomerados. Os resultados para os animais ressectados evidenciaram a perda do alinhamento das mitocôndrias entre os sarcômeros e a formação de aglomerados de mitocôndrias tanto em R1d (Fig. 12B) quanto em R7d (Fig. 12C). Ainda é possível observar uma evidente perda da arquitetura do citoesqueleto tecidual nos animais ressectados, devido à falta de uniformidade no alinhamento das miofibrilas.

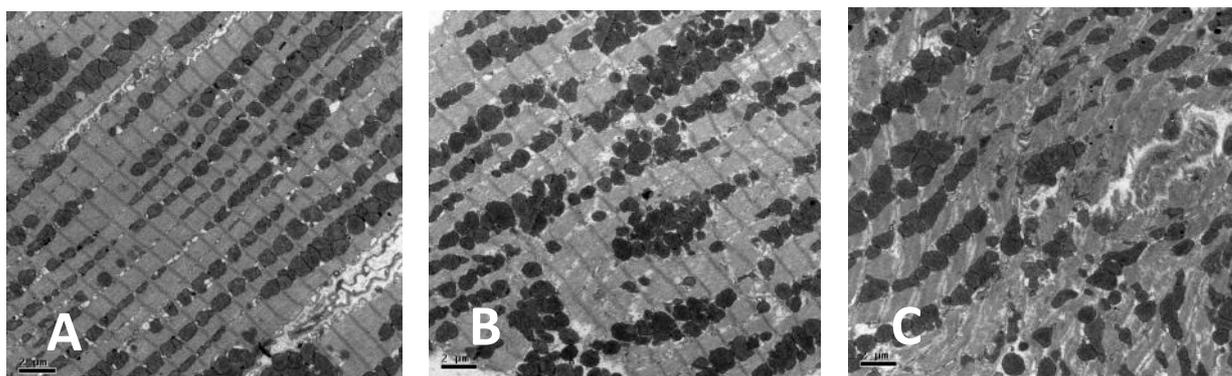


Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão do ventrículo esquerdo.

As imagens são representativas das ultramicrografias de amostras de fragmentos do ventrículo esquerdo de corações (n=3 para ambos) dos animais *sham* (A), R1d (B) e R7d (C) após 60 dias da cirurgia de ressecção.

A Figura 13A mostra que o número de mitocôndrias (por $100 \mu\text{m}^2$) foi similar entre os grupos *sham* e ressectados após 60 dias dos procedimentos (*sham*: $44,2 \pm 1,3$; R1d: $42 \pm 1,6$; R7d: $43 \pm 3,3$, Fig. 13A). Isto corrobora com a atividade da enzima citrato sintase, que também foi igual entre os grupos *sham* e ressectados (*sham*: $13,9 \pm 1,0 \text{ nmol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$; R1d: $15,7 \pm 1,7 \text{ nmol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$; R7d: $15 \pm 1,2 \text{ nmol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$, Fig 13B). Presente na matriz mitocondrial, a enzima citrato sintase é usada como um marcador do conteúdo de mitocôndrias nos tecidos e células.

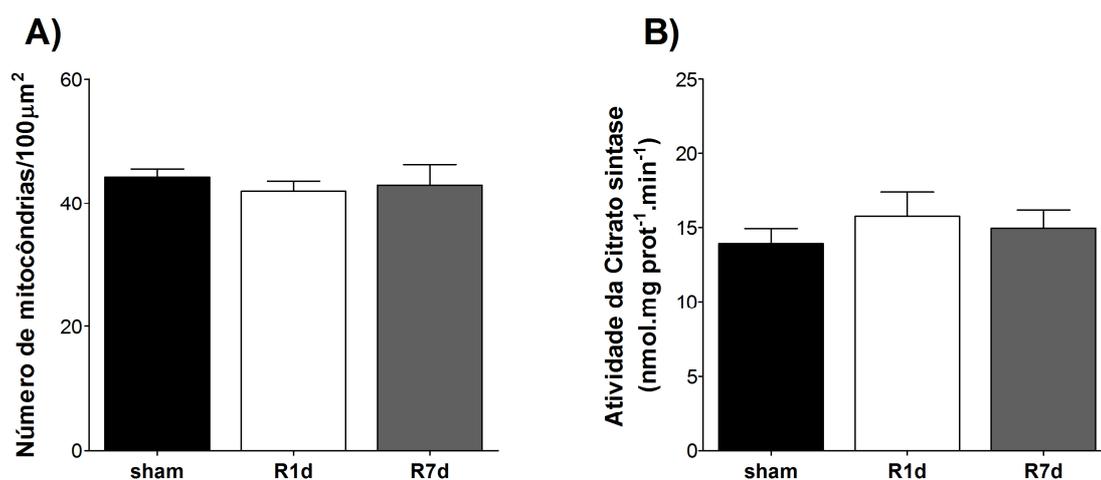


Figura 13. Número de mitocôndrias cardíacas e atividade da enzima citrato sintase.

As barras indicam a média (média \pm SEM) do número de mitocôndrias por $100\mu\text{m}^2$ (A) do tecido cardíaco (*sham*= 33 imagens, R1d= 28 imagens, R7d= 28 imagens) analisadas a partir de imagens de microscopia eletrônica, e da atividade da enzima citrato sintase (B) em mitocôndrias isoladas do tecido cardíaco ($n=6$ para ambos) após 60 dias da cirurgia de ressecção. ANOVA-one-way.

4.3 Análise do sequenciamento de RNA– *Illumina*

Com base nos resultados apresentados sobre a neoformação de cardiomiócitos após a ressecção do ápice cardíaco e as respostas diferenciais dos neonatos das idades analisadas, surgiu a necessidade de entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Como ferramenta exploratória de dados, utilizou-se o sequenciamento de RNA (RNASeq - HiSeq 2500 - *Illumina*), uma ferramenta robusta de análise do transcriptoma total que é capaz de identificar e quantificar transcritos raros, detectar isoformas e novos transcritos, observar modificações pós-traducionais e/ou mutações/SNPs, além de identificar e quantificar diferenças de expressão de transcritos, tudo isso com alta precisão. Nesse trabalho foram enfatizadas apenas as diferenças de expressão gênica nos diferentes grupos de animais.

Para o ensaio de RNASeq foi feita a incorporação na análise de animais controles *sham* de mesma idade dos animais com ressecção. As amostras de corações foram coletadas

1 e 5 dias após a cirurgia de ressecção apical cardíaca em ratos neonatos de 1 (R1D1 e R1D5, respectivamente) e 7 dias de vida (R7D1 e R7D5, respectivamente), e 1 e 5 dias após o procedimento *sham* em ratos neonatos de 1 (S1D1 e S1D5, respectivamente) e 7 dias de vida (S7D1 e S7D5, respectivamente). Assim, nesse desenho experimental foi possível explorar 3 parâmetros principais: (1) a idade em que o animal foi operado (1 vs. 7 dias de vida); o tipo de procedimento realizado (*sham* vs. ressecção); e (3) o tempo após o procedimento em que a expressão gênica foi avaliada (1 vs. 5 dias após a ressecção).

Primeiramente, foi verificada a quantidade e a qualidade de *reads* geradas no sequenciamento (Fig. 14). Como mostrado pela Figura 14A, a média global de *reads* geradas foi de 35 milhões, um número considerado adequado para o desenho experimental proposto. Além disso, os dados apresentaram qualidade satisfatória para análise, visto que 95 % dos *reads* tiveram qualidade acima de Q30 e pelos *scores* de qualidade em função do comprimento, observou-se que a maior parte está com *score* elevado em toda a extensão do *read* (Fig. 14B). Assim, foi possível realizar a análise de expressão diferencial com segurança.

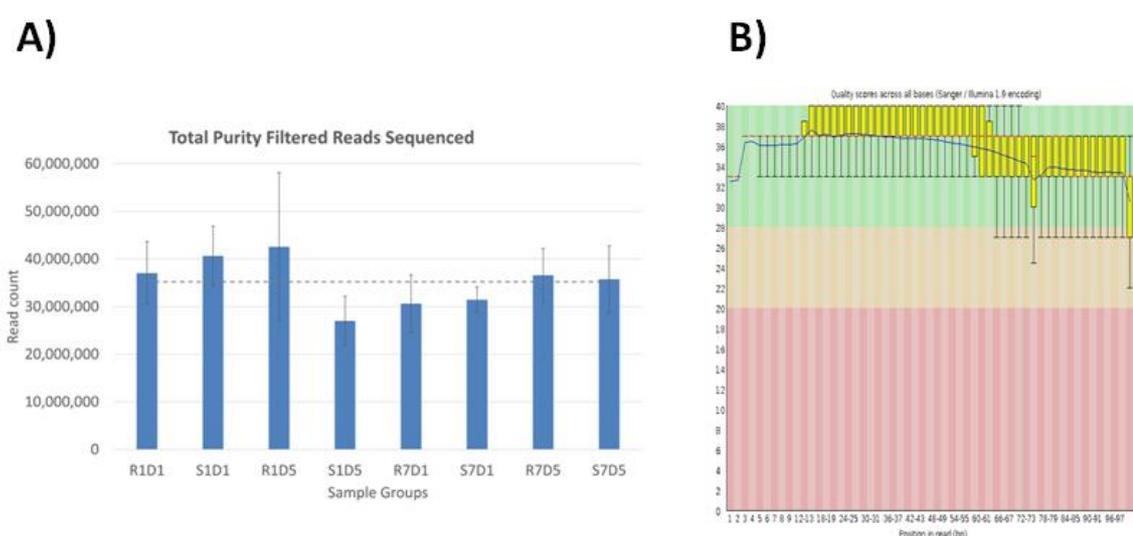


Figura 14. Controle de qualidade dos dados gerados pelo RNASeq.

(A) Total de *reads* produzidos para cada amostra. Os valores são apresentados em milhões de *reads*. (B) Imagem representativa da análise do perfil de qualidade dos arquivos FASTQ.

Realizou-se também a análise de componente principal (PCA) que permite visualizar as inter-relações entre os grupos de amostras. Conforme evidenciado na Figura 15, os agrupamentos entre as amostras foram determinados pela idade dos animais no momento da ressecção (eixo x, correspondendo a 42 % da variância) e pelo tempo após o procedimento (eixo y, contendo cerca de 19 % da variância na componente). A intervenção cirúrgica (*sham* vs. ressecção cardíaca) parece exercer uma influência pequena sobre os perfis globais de expressão, exceto nos animais ressectados de um dia e avaliados após 1 dia (R1D1), que estão com os pontos mais dispersos e com padrão de agrupamento diferente dos demais.

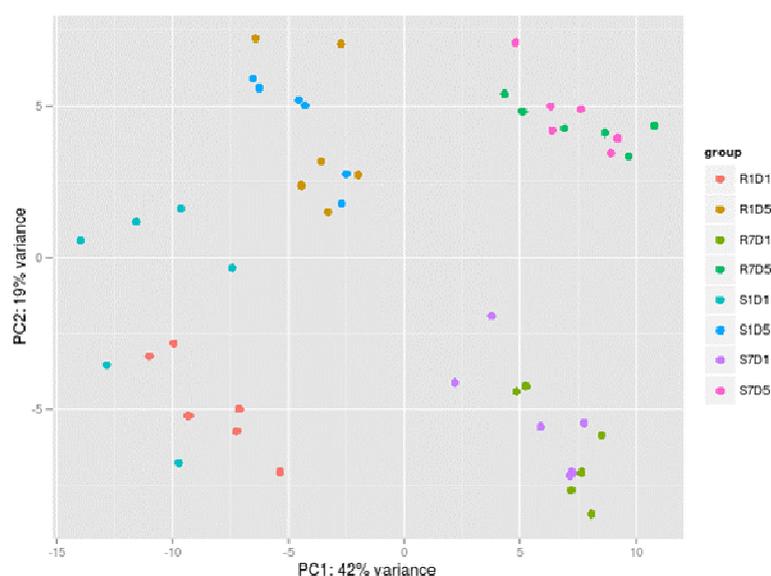


Figura 15. Análise de componente principal (PCA).

Gráfico do tipo PCA, resumindo a análise de componentes principais (PCA) entre as amostras. No eixo x e y, respectivamente estão os dois componentes principais. Os círculos evidenciam os agrupamentos formados.

As amostras se agruparam de maneira coerente também na matriz de distância de Poisson (Figura 16), que permite estimar a similaridade entre as amostras. Essa figura indica que as amostras são, de maneira geral, mais parecidas com as demais do mesmo grupo do que com as de outro grupo. Os resultados mostram o agrupamento das amostras de animais

ressectados com a mesma idade em dois grandes blocos (1 dia e 7 dias, acima e abaixo no gráfico). Notam-se também agrupamentos de animais avaliados com 1 ou 5 dias, contudo, apenas os animais R1D1 estão visivelmente separados de seus respectivos controle (canto superior direito).

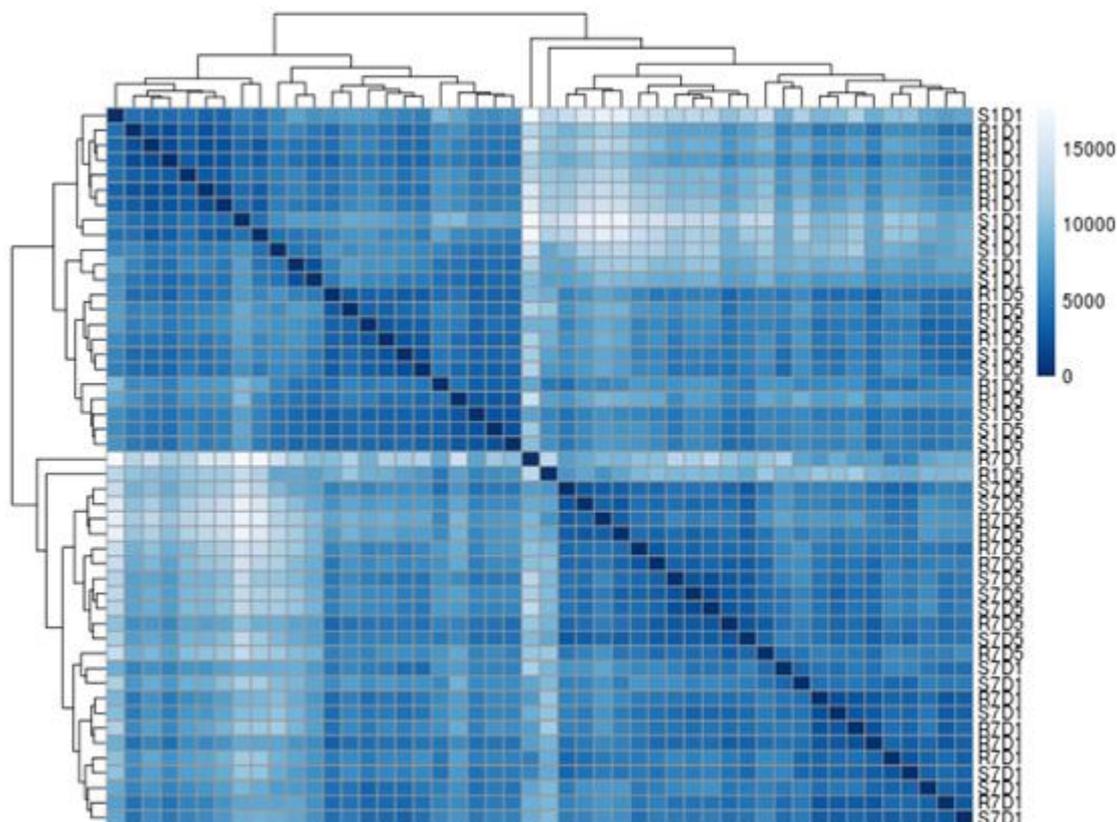


Figura 16. Matriz de Poisson.

O gráfico é uma representação da avaliação da matriz de distância entre as amostras, indicando similaridade entre as amostras.

Em seguida, foi realizada a análise de expressão diferencial das amostras por comparação dos grupos 2 a 2. Os gráficos do tipo MAPlot indicam em escala logarítmica o nível médio de expressão no eixo x e as diferenças de expressão (*fold-change*) no eixo y (Figura 17). É possível observar que o número de genes diferentemente expressos (pontos em vermelho) é maior nas comparações entre amostras com diferenças temporais (idade) do que com amostras de diferenças de procedimento (*sham vs. ressecção*). Contudo foi

possível observar genes diferentemente expressos em todas as comparações de procedimentos utilizando os critérios adotados, variando de aproximadamente 150 a 430 genes diferentemente expressos nas comparações relacionadas ao procedimento e 900 a 1900 genes nas diversas comparações relacionadas a diferenças de tempo.

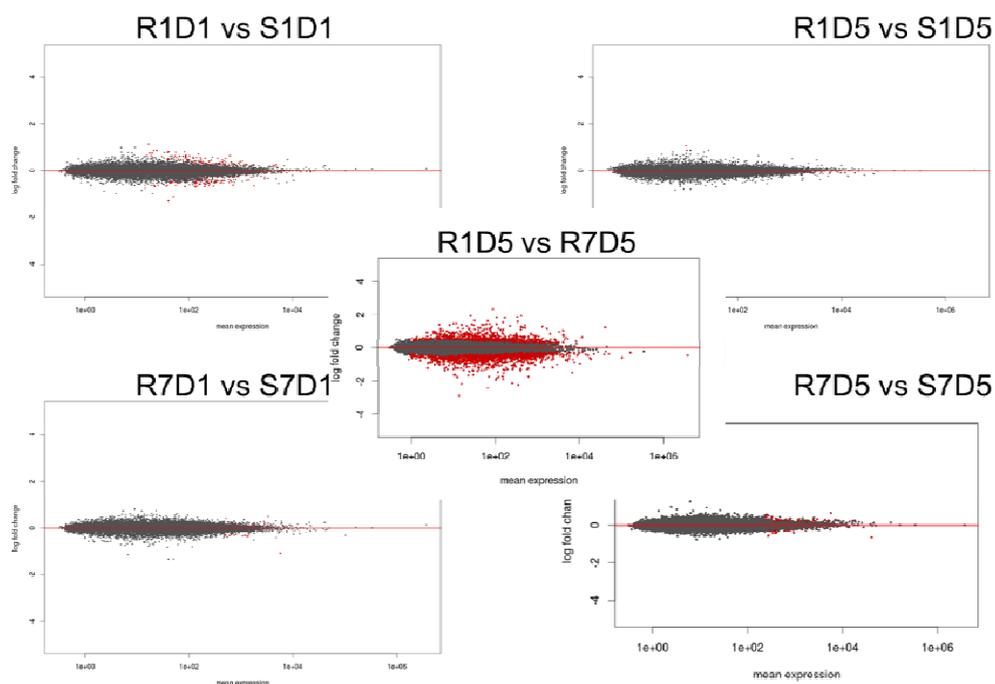


Figura 17. MAPlots.

Gráficos do tipo MAPlot apresentando genes em vermelho que são diferentemente expressos na comparação entre as amostras.

Na sequência, passou-se a observar a variação de expressão dos genes referentes a vias metabólicas, como as vias glicolítica, β -oxidação, fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs). A clusterização hierárquica dos dados em *heatmaps* evidenciou que a cirurgia de ressecção apical não alterou de maneira significativa o perfil global de expressão gênica diferencial entre os animais ressectados e aos animais *sham* de mesma idade (Fig. 18), apesar de algumas discrepâncias. Entretanto, diferenças de perfil de expressão de genes metabólicos foram observadas em relação às diferenças de idade entre os grupos.

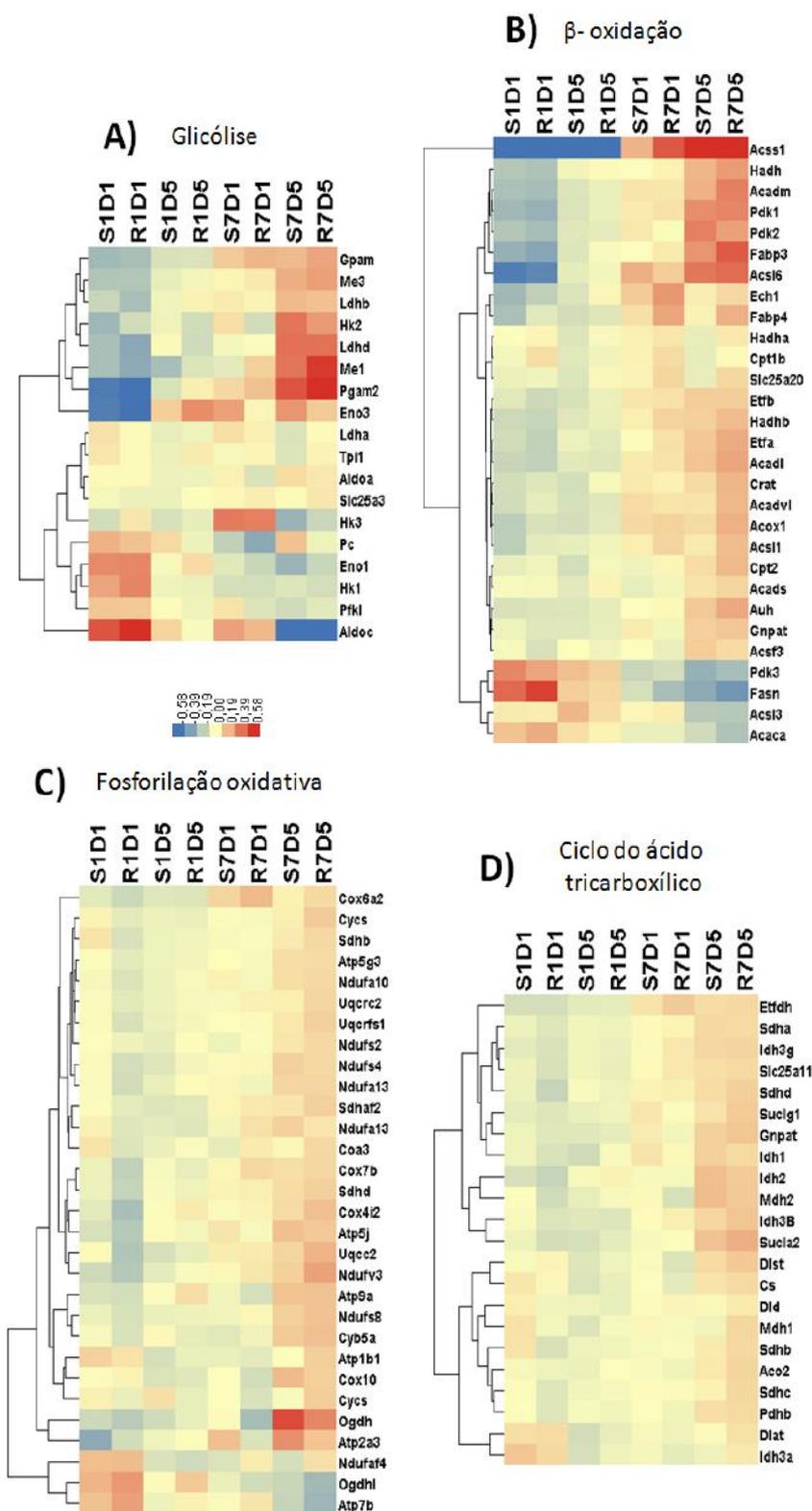


Figura 18. Heatmaps de genes relacionados a vias metabólicas detectados pelos RNASeq.

Heatmaps mostrando o perfil diferencial de expressão de genes relacionados à (A) glicólise, (B) β -oxidação, (C) fosforilação oxidativa e (D) ciclo do ácido tricarboxílico. O vermelho indica gene hiper-regulado e o azul gene hipo-regulado. S1, S7, R1 e R7 indicam respectivamente os animais sham ou ressectados de 1 ou 7 dias. D1 ou D5 indicam, respectivamente, os períodos de coleta do material (n=6).

Nos genes da via Glicolítica, foi possível observar uma troca da expressão de isoformas no decorrer do desenvolvimento pós-natal, como nos genes da hexoquinase e da lactato desidrogenase. Houve a hiper-regulação da expressão da isoforma Hk2 e hiporegulação da Hk1 com a maturação do tecido cardíaco no decorrer do tempo. O mesmo ocorreu para a lactato desidrogenase, com hiper-regulação da expressão das isoformas Ldhd e Ldhd e hiporegulação da Ldha. Na via da β -oxidação houve contundente hiporegulação da maioria dos genes nos primeiros dias após o nascimento com hiper-regulação desta expressão com os dias. A hiper-regulação de Acsl6 foi coerente com o aumento da participação da β -oxidação no fornecimento de energia para o coração, e hiporegulação dos genes Fasn e Pdk3, consistente com a alta síntese de lipídeos e regulação da oxidação de glicose nos primeiros dias após o nascimento. Na fosforilação oxidativa, o que chamou a atenção foi a hiper-regulação da expressão da maioria dos genes dos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial com a maturação pós-natal dos animais, evidenciando maior dependência desse perfil metabólico com o amadurecimento do tecido cardíaco. O mesmo perfil foi observado para os genes da vida do ciclo do ácido tricarboxílico.

Uma vez que há preponderância da passagem do tempo na variação da expressão, procurou-se validar a expressão relativa de alguns genes relacionados aos metabolismos glicolítico e oxidativo. Assim, foram realizados ensaios de qRT-PCR em amostras de RNA extraídas de neonatos sem intervenções cirúrgicas em P1 e P7. Os dados apresentaram a diferença de expressão entre o gene no animal em P1 em relação ao mesmo gene no animal em P7. De maneira geral, genes relacionados ao metabolismo ou estrutura mitocondrial estiveram com expressão reduzida em P1 em relação a P7, como por exemplo, Ucp2, Ndufv3, Lrrk2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: - 1,9 \pm 0,2; - 1,71 \pm 0,1; - 1,5 \pm 0,09; respectivamente, $p < 0,05$, Fig. 19). Em contraste, o gene Aldoc relacionado à glicólise apresentou expressão elevada em P1 em

relação a P7 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: + 2,9 \pm 0,8, $p < 0,05$, Fig. 19).

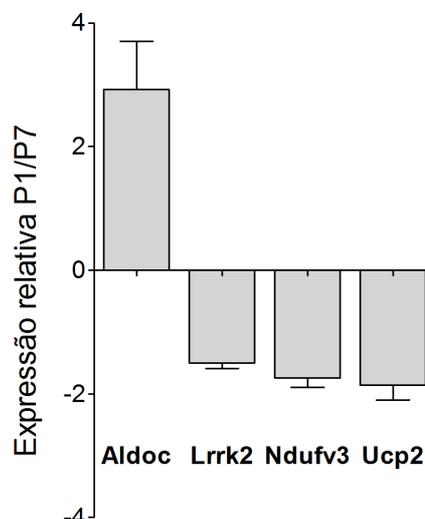


Figura 19. Expressão relativa entre P1 e P7.

As barras indicam os valores médios (média \pm SEM) de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{P1} - \Delta Ct_{P7}$, que apresentaram significância estatística com $p < 0,05$, obtidos a partir das análises do *qRT-PCR* ($n=6$ para ambos os grupos). Os valores foram normalizados pelos resultados de P7.

Entretanto, outros genes avaliados não apresentaram diferenças significativas de expressão, como *Ppard*, *Hk1* a *Ldha*. Juntos os dados do sequenciamento de RNA e expressão gênica relativa sustentam que as diferenças de expressão de genes relacionados ao metabolismo são relacionadas à diferença entre as idades dos animais analisados e não à interferência conferida pela ressecção. De qualquer maneira, os dados sugerem uma relevância do metabolismo energético na resposta fisiológica diferencial observada entre P1 (resposta regenerativa) e P7 (reparo fibrótico).

4.4 Metabolismo mitocondrial e cardiomiogênese

Em concordância com os resultados do sequenciamento de RNA, estudos anteriores já demonstraram a ocorrência de alterações de expressão gênica e proteica durante o desenvolvimento pós-natal com hiporegulação de genes envolvidos no metabolismo

glicolítico e hiper-regulação de genes envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa [48]. Entretanto, poucos trabalhos trazem resultados funcionais destas alterações. Dessa forma, foram realizados experimentos para a avaliação funcional das alterações de perfil metabólico durante o período neonatal e suas implicações na proliferação de cardiomiócitos.

Primeiramente, amostras dos ventrículos cardíacos foram coletadas de animais P1 e P7 e analisadas para o consumo de oxigênio usando respirometria de alta resolução, na presença de glicose ou ácido oleico como substratos. Os resultados mostraram que as taxas de consumo de oxigênio foram maiores em P1 em relação a P7, na presença tanto de glicose (P1: $715,8 \pm 151$ pmol.mg prot⁻¹; P7: $197,1 \pm 10$ pmol.mg prot⁻¹, $p < 0,05$, Fig. 20A) quanto de ácido oleico (P1: $374,5 \pm 61$ pmol.mg prot⁻¹; P7: 243 ± 21 pmol.mg prot⁻¹, $p < 0,05$, Fig. 20A), sendo mais evidente com glicose como substrato (Fig. 20A). Além do consumo de oxigênio, a produção de lactato também foi menor em P7 (P1: $0,15 \pm 0,02$ mmol.L.mg prot⁻¹; P7: $0,08 \pm 0,006$ mmol.L.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 20B), indicando que a oxidação e a fermentação da glicose são reduzidas durante a diferenciação pós-natal. Confirmando a redução da atividade glicolítica entre P1 e P7, as atividades das enzimas lactato desidrogenase (P1: $527,4 \pm 98$ nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: $248,3 \pm 29$ nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 20C) e hexoquinase (P1: $9,5 \pm 0,4$ mmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: $5 \pm 0,2$ mmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 20D) também foram reduzidas durante este período.

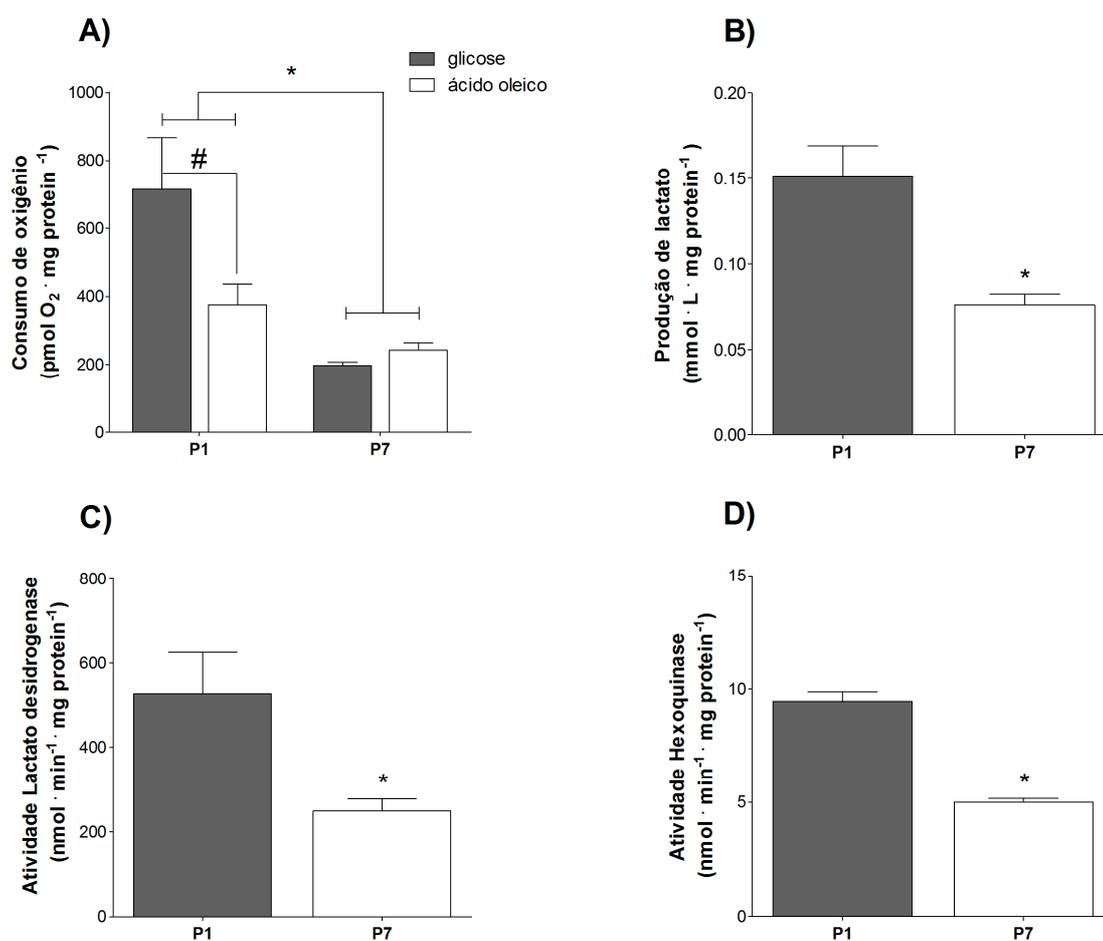


Figura 20. Consumo de oxigênio normalizado, produção de lactato e atividades enzimáticas teciduais em corações neonatais.

As barras indicam a média (média \pm SEM) do (A) consumo de oxigênio de corações de P1 e P7 na presença de glicose ou ácido oleico (P1 n=5, P7 n= 6), ANOVA-two-way, * p<0,05 vs. P1; # p<0,05 vs glicose; da produção de lactato (B) de corações de P1 e P7 frente à glicose (n=6 para ambos); e das atividades da enzimas (C) lactato desidrogenase (n=6 para ambos) e (D) hexoquinase (n=6 para ambos) de corações de P1 e P7; test-t, *p<0,05 vs. P1.

Os resultados confirmam que o tecido cardíaco, nas primeiras 24 horas de vida, apresenta grande capacidade glicolítica, que é reduzida uma semana após o nascimento, confirmando a existência de inversão metabólica da glicólise anaeróbia para a β -oxidação de ácidos graxos. Entretanto, o alto consumo de oxigênio observado em P1 (Fig. 20) pode indicar um importante uso deste oxigênio da produção de energia logo após o nascimento. Ainda, a medida de consumo de oxigênio tecidual permite avaliar a atividade oxidativa basal

com condições semelhantes às *in vivo*, mas não permite determinar a capacidade oxidativa máxima e sua relação com a produção de ATP. Dessa forma, para examinar seletivamente o metabolismo oxidativo mitocondrial foram avaliadas as taxas de consumo de oxigênio (OCR) em cardiomiócitos isolados de P1 e P7 usando *XF^e24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)*, um equipamento/técnica que avalia o consumo de oxigênio em tempo real.

A Figura 21A mostra um traçado típico obtido no experimento, confirmando que a respiração basal é maior na cultura de cardiomiócitos P1 (P1: 384 ± 15 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: 257 ± 14 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21B). A adição de um inibidor da ATP sintase, a oligomicina, permite a determinação das taxas respiratórias relacionadas à produção de ATP e ao vazamento de prótons da mitocôndria. Tanto o consumo de oxigênio ligado à produção de ATP (P1: 253 ± 11 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: $202,4 \pm 11$ pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21C) quanto ao vazamento de prótons (P1: $128 \pm 9,6$ pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: $55,4 \pm 4$ pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21D) estiveram reduzidos em cardiomiócitos P7 em relação a P1 cardiomiócitos. A subsequente adição de desacoplador CCCP repercute nas taxas respiratórias máximas, que foram maiores no cardiomiócitos derivados de animais P1 (P1: 585 ± 32 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: 489 ± 19 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21E). A capacidade de reserva (calculada pela diferença entre a respiração máxima e a basal) é frequentemente associada com a proteção contra danos, e foi semelhante nos cardiomiócitos derivados de P1 e P7 (P1: 204 ± 21 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: 231 ± 12 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21F). Finalmente, a adição em altas doses dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons, rotenona e antimicina, permite determinar a taxa de consumo de oxigênio não mitocondrial que foi ligeiramente mais baixa nos cardiomiócitos derivados de P7 (P1: $135,3 \pm 6$ pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; P7: $107 \pm 5,6$ pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 21G), mas contribui pouco para o consumo de oxigênio.

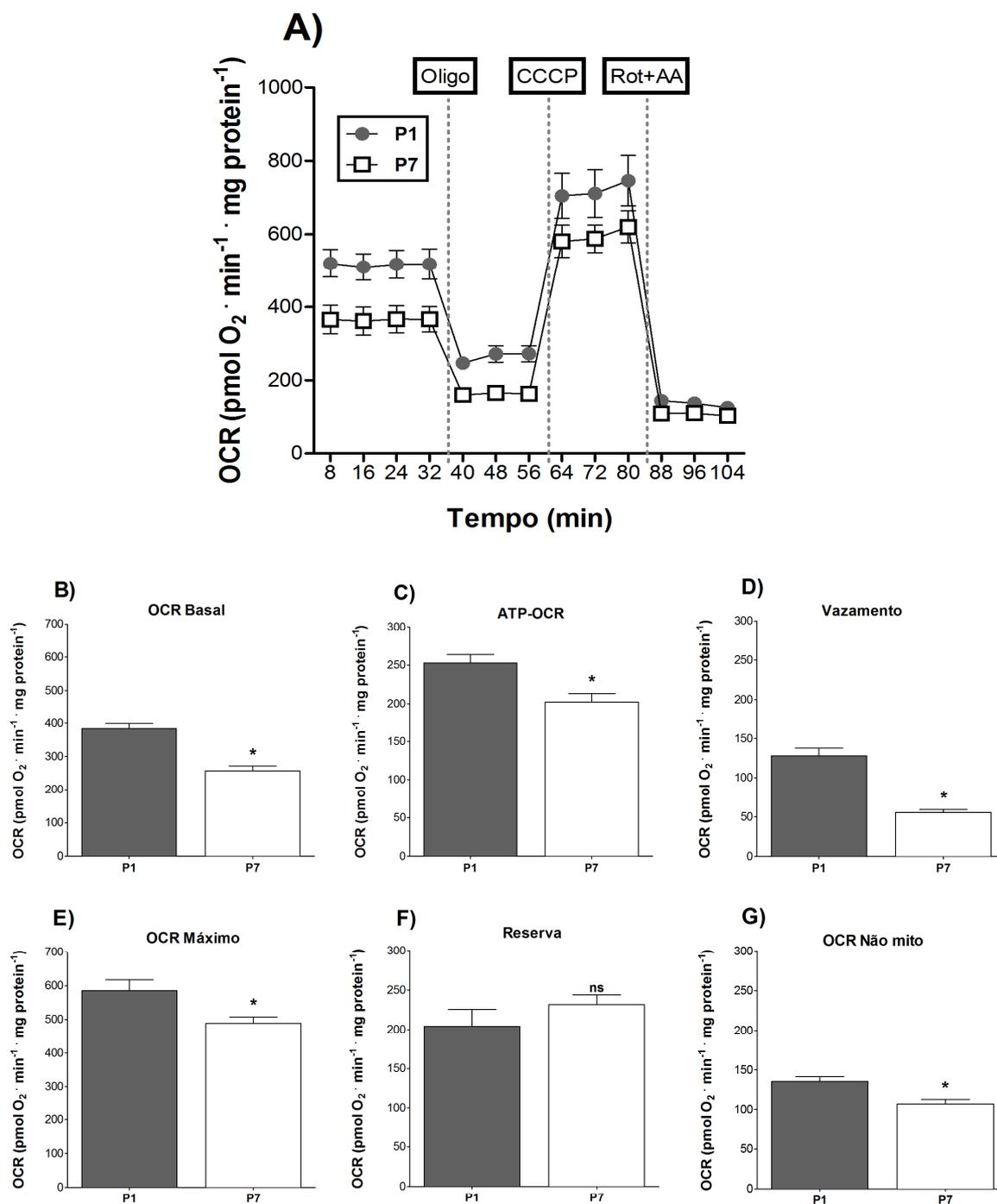


Figura 21. Taxas de consumo de oxigênio em cultura de cardiomiócitos.

(A) indica o traçado típico do ensaio para cultura de cardiomiócitos P1 e P7. As barras indicam a média (média \pm SEM) das taxas de consumo de oxigênio (B) basal; (C) ligada à produção de ATP; (D) relacionada ao vazamento de prótons; (E) máxima; (F) capacidade de reserva; (G) não mitocondrial do meio de cultura de cardiomiócitos P1 e P7 (n=3 para ambos); *test-t*, **p*<0,05 vs. P1.

Os resultados indicam que a atividade de respiração é reduzida entre o primeiro e sétimo dia após o nascimento, e que esta redução é relacionada à diminuição da produção de ATP. Tais resultados, juntamente com os apresentados para a alta atividade glicolítica (Fig. 20) indicam um alto estado metabólico em P1, com participação da glicólise e da oxidação mitocondrial para a produção de energia.

Como apresentado anteriormente nos resultados (Seção 4.1), esse trabalho demonstrou a ocorrência de regeneração tecidual após a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco em ratos neonatos em P1, com neoformação de cardiomiócitos e preservação da função cardíaca, enquanto neonatos P7 não apresentam mais essa capacidade regenerativa [26]. Usando o mesmo modelo, analisou-se a influência da ressecção cardíaca no perfil do metabolismo oxidativo em P1 e P7, 5 dias após a cirurgia. Os resultados demonstram que os ventrículos cardíacos dos animais P1 ressectados e *sham* consumiram mais oxigênio na presença de glicose mesmo 5 dias após a cirurgia quando comparados aos animais P7 ressectados e *sham* de mesma idade (S1: 315 ± 43 pmol.mg prot⁻¹; R1: 351 ± 27 pmol.mg prot⁻¹; S7: $118,2 \pm 10$ pmol.mg prot⁻¹; R7: $92,3 \pm 3,3$ pmol.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 22A). Entretanto, as taxas de consumo de oxigênio foram semelhantes entre os ventrículos cardíacos dos animais *sham* e ressectados em ambas as idades, indicando que a intervenção da ressecção apical não foi responsável pela alta taxa respiratória observada, mas que estas são características intrínsecas dos corações dos neonatos na respectiva idade. Os níveis de produção de lactato foram semelhantes em todas as amostras (S1: $0,08 \pm 0,01$ mmol.L.mg prot⁻¹; R1: $0,06 \pm 0,01$ mmol.L.mg prot⁻¹; S7: $0,05 \pm 0,003$ mmol.L.mg prot⁻¹; R7: $0,07 \pm 0,01$ mmol.L.mg prot⁻¹; $p < 0,05$, Fig. 22B), indicando que a fermentação anaeróbia não mudou no período. A razão O₂/CO₂ também foi semelhante, indicando que a proporção de lipídeo e carboidrato oxidados se manteve após a ressecção apical (S1: $2,9 \pm 0,7$ O₂. CO₂⁻¹.mg prot⁻¹;

R1: $3,7 \pm 1,8 \text{ O}_2 \cdot \text{CO}_2^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; S7: $2,6 \pm 0,6 \text{ O}_2 \cdot \text{CO}_2^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; R7: $4,2 \pm 0,3 \text{ O}_2 \cdot \text{CO}_2^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; $p < 0,05$, Fig 22C).

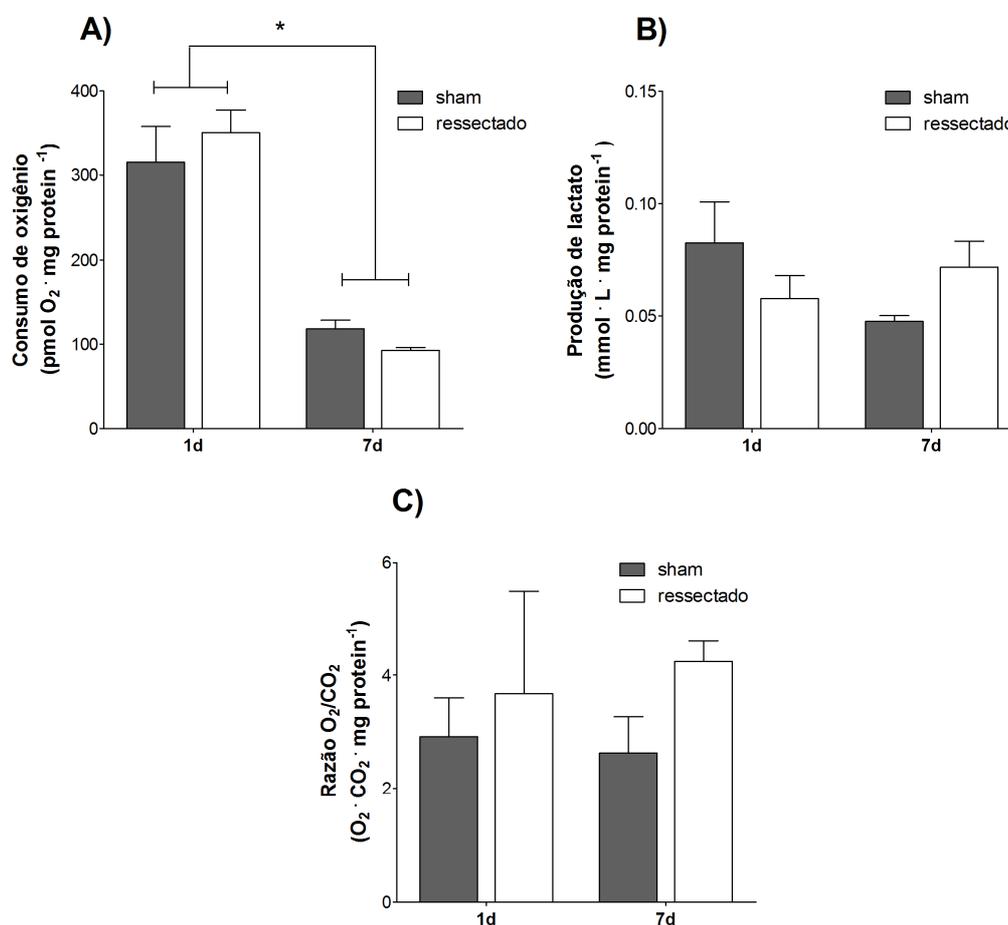


Figura 22. Consumo de oxigênio, produção de lactato e razão O_2/CO_2 em tecido cardíaco neonatal ressectado em comparação ao sham.

As barras indicam a média (média \pm SEM) do (A) consumo de oxigênio; da (B) produção de lactato; e da (C) razão O_2/CO_2 de tecido cardíaco de animais sham e ressectados no dia 1 (1d) e 7 (7d) de vida, analisados 5 dias após a cirurgia (S1 n=8, R1 n=3, S7 n=7, R7 n=4), ANOVA-two-way, * $p < 0,05$ vs. 1d.

Este resultado sugere que a regeneração cardíaca ocorre apenas durante um período restrito da vida pós-natal (P1) quando há presença de altos níveis de metabolismo oxidativo, que estaria relacionado à alta atividade proliferativa. Para testar esta hipótese, foi feita a medida da taxa de proliferação celular *in vitro* de cardiomiócitos P1 e P7 por meio de contagem de células utilizando-se o equipamento *InCell Analyzer* (ensaio de *high content*

screening). Como mostrado na Figura 23, a presença continuada de soro na cultura foi suficiente para estimular a proliferação celular e diferenças substanciais são detectáveis no número de células.

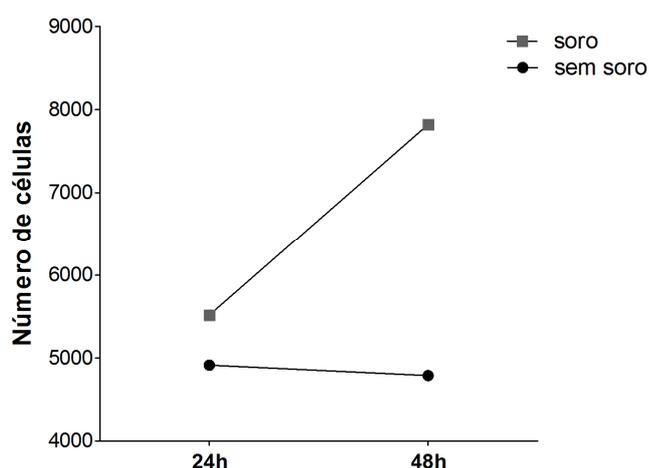


Figura 23. Proliferação celular na presença de soro.

As linhas indicam a média (média \pm SEM) do número total de células na presença e ausência de soro por 24 e 48 horas em cultura.

Por meio da utilização de anticorpos específicos para tropomiosina sarcomérica (presente em cardiomiócitos) e vimentina (presente em maior quantidade em fibroblastos), foi possível separar as duas populações de células mais abundantes do coração, como evidenciado na Figura 24A e B. A taxa de proliferação dos cardiomiócitos foi significativamente maior em P1 em relação a P7 (P1: $1,7 \pm 0,3$; P7: $1,0 \pm 0,1$; $p < 0,05$, Fig.24C), com 48 horas de cultura, confirmando a maior capacidade proliferativa dessas células derivadas de P1 (Fig. 24C). A taxa de proliferação dos fibroblastos foi semelhante nas culturas de P1 e P7 (P1: $1,5 \pm 0,1$; P7: $1,7 \pm 0,3$; $p < 0,05$, Fig.24C).

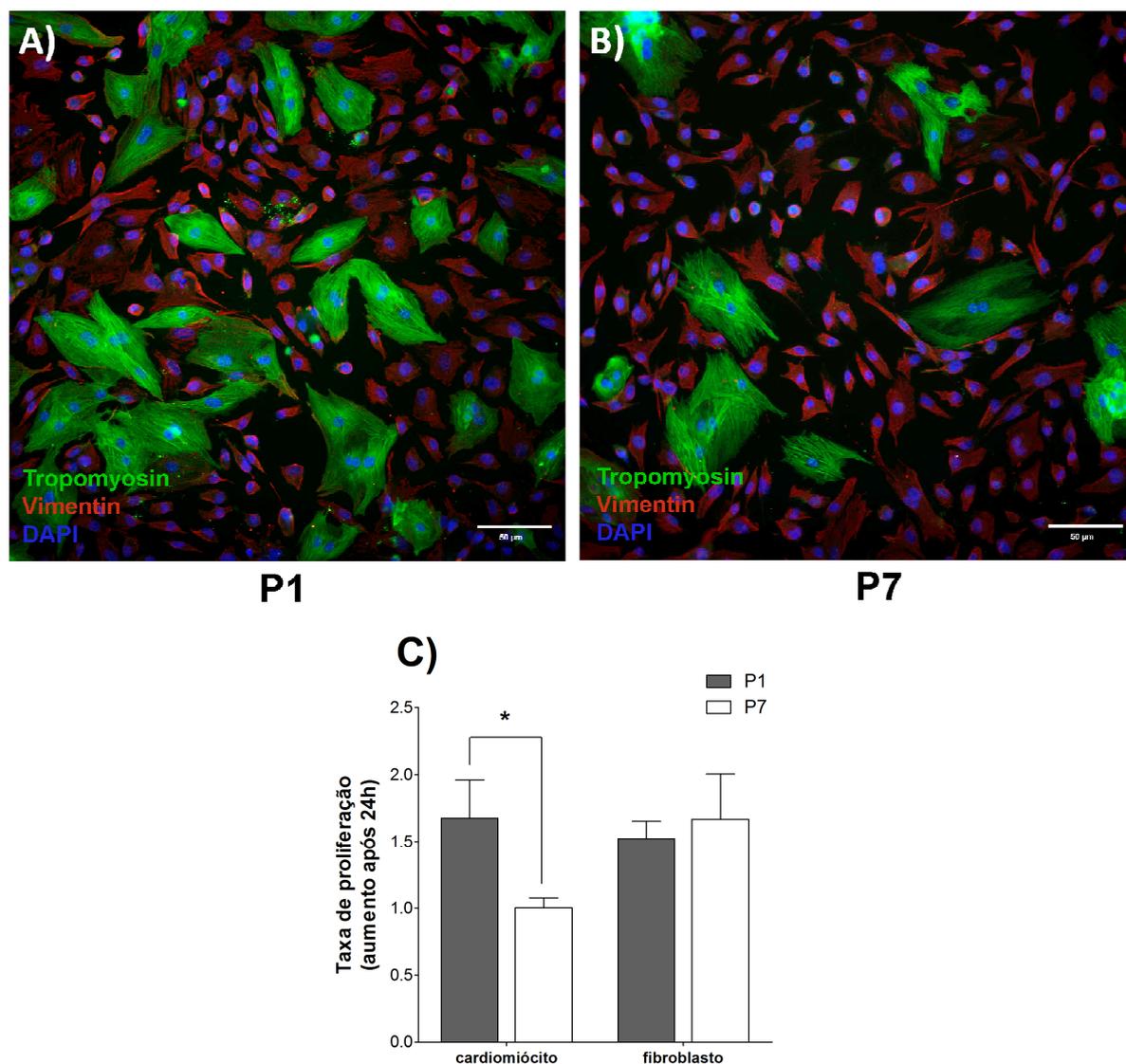


Figura 24. Proliferação de cardiomiócitos.

Imagens representativas das culturas de cardiomiócitos em (A) P1 e (B) P7, evidenciando a marcação das células tropomiosina sarcomérica positivas (cardiomiócitos – verde) e vimentina positivas (fibroblastos – vermelho). (C) As barras indicam a média (média \pm SEM) da taxa de proliferação de cardiomiócitos e fibroblastos após período de 24 horas das culturas de cardiomiócitos em P1 e P7 (n=7 e 4, respectivamente), ANOVA-two-way, * p<0,05 vs. P1.

De maneira a testar a contribuição do metabolismo oxidativo para a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos P1, foram feitos experimentos utilizando a inibição química da respiração mitocondrial com rotenona. A rotenona é uma droga conhecida por sua capacidade de inibir a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, descrita pela primeira vez em 1967 [85], e amplamente utilizada em estudos

biológicos especialmente relacionados a doenças neurológicas [86, 87]. Ela promove o acúmulo de NADH, e assim a inibição do ciclo do ácido tricarboxílico e da β -oxidação. Normalmente, altas doses de rotenona são relacionadas com inibição irreversível do complexo I, levando à morte celular. Entretanto, foi possível determinar que em baixas doses a rotenona não altera a viabilidade celular de cardiomiócitos em cultura (Fig. 25). De maneira geral, a cultura apresentou boa confluência, aderência e contração de cardiomiócitos mesmo após o tratamento com rotenona, sem aparente alteração morfológica.

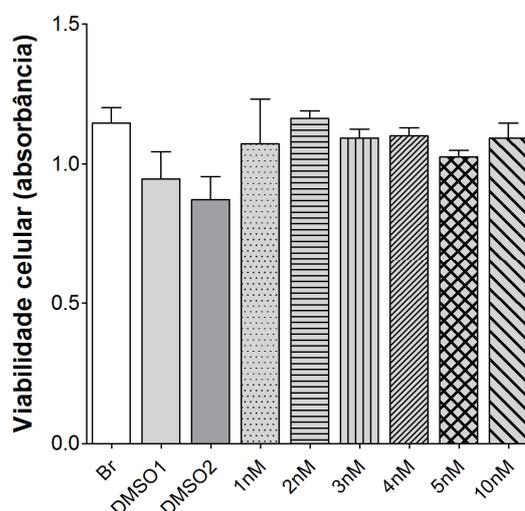


Figura 25. Viabilidade celular por MTT em cardiomiócitos tratados com diferentes doses de rotenona.

As barras em (A) indicam os valores (média \pm SEM) da absorbância do MTT de cultura de cardiomiócitos tratadas com diferentes concentrações de rotenona: Br (controle sem rotenona); DMSO 1 (0,2 μ L de DMSO); DMSO 2 (1 μ L de DMSO); 1 a 10nM de rotenona (n= 3). ANOVA-one-way.

Ainda, foi possível observar que a cultura de cardiomiócitos é suscetível a tratamentos que modulem a atividade metabólica e/ou mitocondrial. Usando a dose subletal de 5nM de rotenona, que não afeta a viabilidade celular (controle: $0,47 \pm 0,03$; rotenona: $0,44 \pm 0,02$; Fig. 26A), foi feita a análise da relação da inibição da respiração mitocondrial e a proliferação de cardiomiócitos. O tratamento com rotenona reduziu o metabolismo oxidativo mitocondrial (controle: 384 ± 15 pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹; rotenona: 120

$\pm 9 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; $p < 0,05$, Fig. 26B) com um importante efeito no consumo de oxigênio para a produção de ATP (controle: $253 \pm 11 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; rotenona: $77 \pm 7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$; $p < 0,05$, Fig. 26C). De forma surpreendente, a redução do consumo de oxigênio mitocondrial foi suficiente para inibir a capacidade proliferativa de cardiomiócitos P1 (controle: $1,7 \pm 0,3$; rotenona: $1,0 \pm 0,1$; $p < 0,05$, Fig. 26E), e alterar as características do ciclo celular dessas células em cultura (controle: G1: $24 \pm 2 \%$, S: $24 \pm 2 \%$, G2/M: $52 \pm 2,5$; rotenona: G1: 38 ± 6 , S: 21 ± 2 , G2/M $34,5 \pm 3$; $p < 0,05$, Fig. 26D). Entretanto, a redução do consumo de oxigênio mitocondrial pareceu não afetar a capacidade proliferativa dos fibroblastos em cultura (controle: $1,5 \pm 0,1$; rotenona: $1,7 \pm 0,3$; Fig. 26E). Juntos, esses resultados sugerem que a alta atividade respiratória mitocondrial nos cardiomiócitos P1 é necessária para a capacidade proliferativa destas.

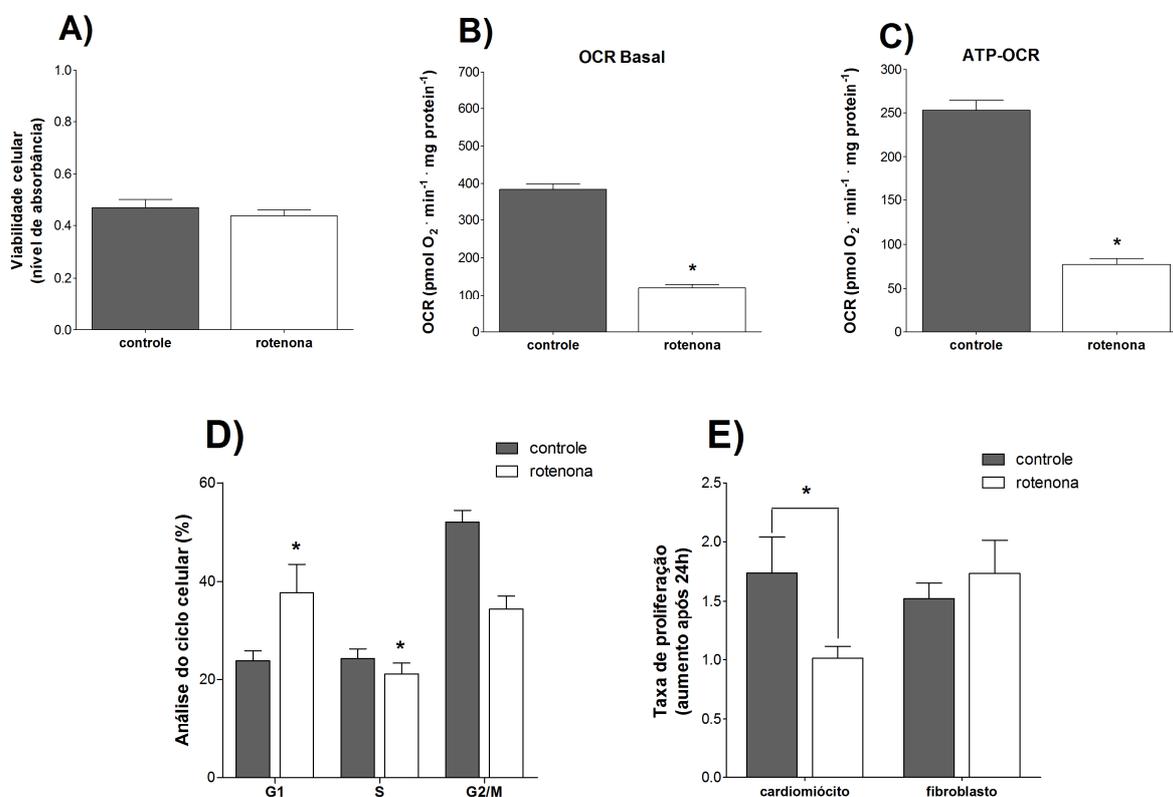


Figura 26. Redução do consumo de oxigênio diminui a taxa de proliferação de cardiomiócitos P1.

As barras em (A) indicam os valores (média \pm SEM) da absorvância do MTT ($n=3$ para ambos), do (B) consumo de oxigênio basal e relacionado à (C) produção de ATP ($n=3$ para ambos), da (D) porcentagem de células em

cada fase do ciclo celular (n=3 para ambos) e da (E) taxa de proliferação de cardiomiócitos e fibroblastos após período de 24 horas das culturas de cardiomiócitos em P1 controle ou tratadas com 5 nM de rotenona (n=7 e 6, respectivamente), *t-Student* e *ANOVA-two-way*, * $p < 0,05$ vs. controle.

5.0 Discussão

A reposição de cardiomiócitos em mamíferos ainda permanece como um dos grandes desafios da medicina regenerativa. O processo natural de reparação não é eficiente para reparar o coração danificado e muito pouco foi estudado sobre a relação entre o metabolismo energético e a capacidade intrínseca de proliferação de cardiomiócitos. No período pós-natal, já foi demonstrado que camundongos possuem uma miogênese substancial após ressecção apical e lesões isquêmicas, sendo este processo restrito à primeira semana de vida [21-23]. Também em corações neonatais de camundongos não lesionados foi demonstrado que a expansão significativa do número de cardiomiócitos só ocorre na primeira semana de vida, após o qual se observa multinucleação e poliploidia das células [37]. Assim, devido à inexistência de dados de regeneração cardíaca em ratos e a importância deste modelo animal no estudo em cardiologia, propusemos investigar no presente trabalho o fenômeno de neoformação de tecido cardíaco em ratos neonatos de 1 e 7 dias de vida após ressecção apical e o perfil metabólico envolvido nesse processo.

Os resultados obtidos indicam que ratos neonatos também possuem capacidade transitória de regeneração do tecido cardíaco após o procedimento de ressecção apical. Após 21 dias da ressecção apical, células troponina I positivas foram predominantes na região apical dos animais R1d. Apesar disto, pequenas e pouco evidentes fibras de colágeno foram observadas na região regenerada, demonstrando que o processo regenerativo não é completo (Fig. 2). Entretanto, quando a lesão apical foi realizada poucos dias depois, nos animais R7d, o processo reparativo foi caracterizado pela massiva deposição de fibras de colágeno e formação de cicatriz, mesmo com pequenos nichos de células troponina I positivas (Fig. 2).

Os resultados indicam que a reposição tecidual não é completa após a ressecção apical, porém é mais expressiva em R1d do que em R7d. Além disso, existe um aparente

desarranjo na arquitetura tecidual em R1d como indicado pela falta de uniformidade no alinhamento das células positivas para troponina I e conexina 43 (Fig. 2, e dado não mostrado). Estes achados parecem menos robustos que os apresentados originalmente por Porrelo e colaboradores usando ressecção de 15% do ápice cardíaco em camundongos [21], e mais consistentes do que a perda completa do reparo cardíaco reportado por Andersen e colaboradores em camundongos submetidos à ressecção de 10% do ápice cardíaco [88]. Entretanto, Bryant e colaboradores também demonstraram recentemente que apesar da evidente formação de novos cardiomiócitos após 21 dias da ressecção apical, esta é acompanhada por alguma deposição de colágeno [89]. Os autores ainda evidenciaram que a porcentagem de miocárdio ventricular ressectado influencia diretamente na capacidade regenerativa, levando a diferentes respostas [89]. Tais trabalhos reforçam a robustez dos dados apresentados demonstrando respostas diferenciais entre os animais R1d (reposição por tecido cardíaco, denominada resposta regenerativa) e R7d (reposição por tecido fibrótico, denominada resposta reparativa) (Fig. 2) mediante a mesma porcentagem de ressecção (Fig. 1A).

De maneira geral, a neoformação de cardiomiócitos pode ser incompleta também em R1d devido à maioria destas células já estarem com o ciclo celular aprisionado após o nascimento [32, 90, 91]. Apesar da comprovada capacidade proliferativa na vida pós-natal, a quantidade de cardiomiócitos remanescentes com ciclo celular ainda ativo não seriam suficientes para promover o reparo completo do tecido ressectado, apesar deste reparo ser superior ao apresentado por R7d. Como citado anteriormente, a proliferação de cardiomiócitos pré-existentes é a principal fonte de novos cardiomiócitos no coração de mamíferos, tanto no miocárdio sadio quanto submetido a uma lesão [30, 31]. Entretanto, a capacidade de divisão dos cardiomiócitos na vida pós-natal no miocárdio sadio parece

restrita a taxas muito baixas, e é sistematicamente reduzida com o envelhecimento [19, 30, 31].

Apesar da concordância com relação à baixa, mas existente, capacidade proliferativa dos cardiomiócitos no miocárdio sadio, alguns trabalhos discordam com relação à formação significativa de cardiomiócitos após lesão cardíaca na vida adulta. Ali e colaboradores não evidenciaram aumento da cardiomiogênese após 4 semanas do infarto do miocárdio em camundongos adultos [31]. De maneira oposta, Senyo e colaboradores foram capazes de detectar a formação de novos cardiomiócitos na zona de borda meses após o infarto do miocárdio em camundongos adultos [30]. Esses resultados contraditórios evidenciam as dificuldades envolvidas na determinação experimental da proliferação de cardiomiócitos em mamíferos [92]. Apesar de não dispormos dos dados referentes à proliferação de cardiomiócitos nos animais R1d como responsáveis pela regeneração tecidual, acreditamos que este seja o mecanismo envolvido no fenômeno de regeneração observado. Dessa forma, a sequência do estudo baseou-se no entendimento dos mecanismos envolvidos na proliferação pós-natal dos cardiomiócitos.

As constatações dos tipos de reparo cardíaco diferencial entre R1d e R7d nos levaram a explorar a condição vascular deste tecido e a influência do tipo de reparo na função cardíaca global em fases tardias. Vale ressaltar que a área da lesão provocada pela ressecção apical passa a ser irrelevante em animais com 60 dias de idade, devido à grande alteração no tamanho do coração entre neonatos e animais adultos. Assim, as consequências em longo prazo observadas refletem as diferenças nos processos de reparação desencadeados em R1d e R7d, e como esses eventos contribuíram ao longo do tempo para minimizar o dano inicial, enquanto o órgão estava em fase de hipertrofia.

A perfusão sanguínea foi avaliada por meio da técnica de *SPECT* pela captação do

radiofármaco [^{99m}Tc]Sestamibi, amplamente utilizado para estudos experimentais [93, 94] e clinicamente por estimar o tamanho de regiões infartadas, visto que a região fibrótica rica em colágeno perde a captação do radiofármaco por não ter perfusão sanguínea consistente [80]. O déficit na captação do radiofármaco na região apical revelou um desbalanço no suprimento vascular em ambos os grupos R1d e R7d após 21 e 60 dias da cirurgia de ressecção (Fig. 3). No grupo R7d, a perda de cardiomiócitos e a potencial neoangiogênese inadequada na região ressectada foi consistente com a redução da captação do radiofármaco. Entretanto, a hipoperfusão em R1d foi mais surpreendente devido ao reparo por células troponina I na região ressectada e a escassa deposição de fibras de colágeno.

Utilizando o modelo de infarto do miocárdio em camundongos neonatos de um dia de vida, pesquisadores foram capazes de observar a formação de vasos colaterais na região regenerada do miocárdio [23]. Apesar de este dado sugerir uma resposta angiogênica atrelada à regeneração do músculo cardíaco, no infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda não ocorre remoção de vasos sanguíneos juntamente com músculo cardíaco, assim como ocorre na ressecção apical cardíaca. Dessa forma, a hipoperfusão sustentada na região apical de ambos os grupos de animais ressectados, sugere que o processo de regeneração do tecido muscular cardíaco pode não ser completamente acompanhado pela formação de novos vasos e de rede vascular funcional. Pode-se ainda especular que o suprimento inadequado de sangue para a região apical nestes animais poderia acarretar em anormalidades metabólicas funcionais.

Em nosso laboratório já foi previamente demonstrado que ratos infartados apresentaram parâmetros hemodinâmicos normais em condições basais, mas com comprometimento da função cardíaca quando submetidos a condições de estresse [5, 7, 95,

96]. Os resultados do presente trabalho também demonstraram que em condições basais, os parâmetros globais cardíacos foram preservados em todos os grupos (Tabela 2). Entretanto, sob estresse farmacológico a resposta cardíaca foi comprometida em R7d e preservada em R1d (Figs. 4, e 5). A preservação da função cardíaca em R1d, apesar da hipoperfusão apical, pode ser devido à combinação favorável entre a reposição funcional de cardiomiócitos e a ausência significativa de tecido fibrótico, e consequente ausência de remodelamento compensatório do coração. Por outro lado, a perda de cardiomiócitos e a deposição contundente de fibras de colágeno em R7d possivelmente conduziram ao comprometimento da função cardíaca sob estresse como pelo aumento de LVEDP, revelando um déficit de ejeção, diminuição em ESPVR, indicando decréscimo no desempenho sistólico, e aumento na relação entre pressão e volume no final da diástole, sugerindo aumento na rigidez ventricular, correlacionada com o aumento da deposição intersticial de fibras de colágeno (Fig. 6).

De maneira geral, os dados demonstraram que ratos possuem capacidade transitória de repor células cardíacas, quando submetidos à ressecção do ápice cardíaco nas primeiras 24 horas de vida. Apesar desta regeneração do tecido cardíaco ser aparentemente incompleta e acompanhada de hipoperfusão, a neoformação de cardiomiócitos pode contribuir para a manutenção e estabilização da função cardíaca na vida adulta. Estes resultados não são diretamente translacionais para as estratégias terapêuticas de reparo cardíaco em humanos adultos, principal foco dos estudos em cardiologia. Entretanto, sublinham a complexidade dos eventos iniciais associados com o reparo do tecido cardíaco, e indicam a utilidade do modelo de ressecção apical como forma de entendimento dos mecanismos pós-natais de reparo cardíaco e seus possíveis desdobramentos terapêuticos.

A manutenção da função cardíaca na vida adulta de mamíferos tem sido atrelada ao

bom funcionamento das mitocôndrias cardíacas, que são a principal fonte de energia para a contração do miocárdio. Além do papel essencial da mitocôndria na bioenergética, elas estão envolvidas em processos como a homeostase redox, homeostase de cálcio, morte celular e outros. Nesse sentido, a disfunção mitocondrial é considerada um fator crítico na patogênese e progressão de algumas doenças cardíacas [51]. Baseados nas respostas de reparo diferencial e suas consequências na função cardíaca nos neonatos R1d (regeneração - manutenção da função cardíaca) e R7d (reparo fibrotico - comprometimento da função cardíaca) foram realizados experimentos para a avaliação da influência da cirurgia de ressecção apical cardíaca na função mitocondrial dos animais na vida adulta (60 dias).

Os resultados apresentados indicam que a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco nos neonatos provocou um dano metabólico mitocondrial nestes animais na vida adulta, independente do tipo de reparo tecidual ocorrido após a cirurgia, se por células cardíacas (troponina I positivas, R1d) ou por tecido fibroso (deposição de colágeno, R7d). Isto foi evidenciado em ambos os grupos ressectados pela redução sustentada da respiração mitocondrial (Fig. 7) e pela exacerbada produção de peróxido de hidrogênio (Figs. 8, 9), tanto em condições basais como em resposta a estímulos extremos.

Mitocôndrias com características disfuncionais são as principais fontes de EROs, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, que são gerados principalmente pelos complexos mitocondriais I e III [83]. Essas EROs são relacionadas à progressão de diversas doenças cardíacas. O aumento da produção de peróxido logo após a cirurgia de ressecção em ambos os grupos R1d e R7d sugere que esse tipo de lesão estimule o aumento da resposta oxidativa independente da resposta reparativa (Fig. 10). Além disso, a hipoperfusão observada em ambos os grupos de animais ressectados (Fig. 3) poderia contribuir como umas das causas do dano metabólico mitocondrial. Por outro lado, a preservação da

produção de ATP em ambos os grupos pode ser em decorrência do aumento do metabolismo glicolítico, sugerido pelo aumento da atividade da enzima hexoquinase (Fig. 11).

Atualmente tem se demonstrado a importância das EROs como estimuladores da diferenciação de cardiomiócitos, das vias de sinalização hipertróficas no coração, e da homeostase do batimento cardíaco [97]. As EROs podem ter uma importância fisiológica durante o período de desenvolvimento do músculo cardíaco. Essa importância no período neonatal foi sugerida pelo aumento tardio da expressão de enzimas antioxidantes, após o 10^o dia de vida de ratos, particularmente da superóxido dismutase mitocondrial 2 (SOD2), que foi expressa em níveis altos apenas na vida adulta [48]. Dessa forma, a ausência de defesas antioxidantes permitiria a atuação fisiológica das EROs em animais saudáveis, entretanto, seria prejudicial frente a uma lesão como a ressecção apical cardíaca, onde há produção excessiva dessas moléculas.

Recentemente, foram apresentados resultados sugerindo uma conexão entre a produção de EROs mitocondriais e a degradação do citoesqueleto de cardiomiócitos e dano mitocondrial [53]. A sobrecarga de volume em modelo de fístula aortocaval causou aumento da produção de EROs e redução do potencial de membrana mitocondrial em cardiomiócitos. Foi observada a completa degradação da estrutura organizada das mitocôndrias, com perda da linearidade e da proximidade com os sarcômeros, evidenciando grandes espaços entre as mitocôndrias e as unidades sarcoméricas [53]. As mitocôndrias formaram grandes aglomerados, e apresentaram perda de densidade e degradação das cristas. Os resultados ainda mostraram que a desorganização mitocondrial foi diretamente relacionada com a degradação da estrutura do citoesqueleto, evidenciada pela perda de desmina e β -tubulina no tecido cardíaco [53]. O tratamento com o antioxidante mitocondrial mitoubiquinona

atenuou os efeitos da degradação do citoesqueleto e da desorganização mitocondrial, sugerindo que o estresse oxidativo estimula mecanismos de remodelamento cardíaco [53].

Os resultados de microscopia eletrônica do ventrículo esquerdo dos animais na vida adulta no presente estudo evidenciaram que houve a perda do alinhamento das mitocôndrias entre os sarcômeros e a formação de aglomerados de mitocôndrias em ambos os grupos de animais ressectados (Fig. 12B-C). Ainda é possível observar uma evidente degradação da arquitetura do citoesqueleto tecidual nos animais ressectados, devido à falta de uniformidade no alinhamento das miofibrilas. Apesar disto, a quantidade de mitocôndrias no tecido cardíaco não foi alterada (Fig. 13). Este desarranjo na arquitetura tecidual também foi indicado 21 dias após a cirurgia de ressecção apical, devido à falta de uniformidade no alinhamento das células positivas para troponina I e conexina 43 (Fig. 2) no miocárdio regenerado dos animais R1d.

Juntos, os resultados sugerem que independente do tipo de reparo tecidual ocorrido após a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco, a lesão cardíaca na vida neonatal dispara os mecanismos de estresse oxidativo que acarretam na disfunção mitocondrial e degradação da arquitetura do miocárdio. Na avaliação feita neste trabalho, este cenário não influenciou diferenças na função cardíaca entre R1d e R7d na vida adulta. Entretanto, não foi possível sugerir se a disfunção mitocondrial poderia acarretar em comprometimento da função cardíaca com o envelhecimento ou em nova situação de estresse.

Apesar da disfunção mitocondrial após a cirurgia de ressecção, as diferenças nas respostas de reparo do tecido cardíaco indicam a utilidade do modelo de ressecção apical como forma de entendimento dos mecanismos pós-natais de reparo cardíaco. Nesse sentido, para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, utilizou-se o sequenciamento de RNA (RNASeq - HiSeq 2500 - *Illumina*), para análise

diferencial do transcriptoma total dos corações dos animais R1d e R7d, com seus respectivos controles de idade. A análise global dos dados evidenciou que a cirurgia de ressecção do ápice cardíaco não foi responsável por alterações nos perfis de expressão gênica entre os grupos. Entretanto, as diferenças de expressão se concentraram nas comparações entre os grupos de idades diferentes.

O enriquecimento dos dados para os genes referentes a vias metabólicas, como as vias glicolítica, β -oxidação, fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarboxílico (Fig. 18), evidenciou que as diferenças de perfil de expressão de genes metabólicos foram observadas em relação às diferenças de idade entre os grupos. Nos genes da via glicolítica, foi possível observar uma troca da expressão de isoformas no decorrer do desenvolvimento pós-natal, como nos genes das enzimas hexoquinase e lactato desidrogenase. Esse tipo de reestruturação da expressão de enzimas glicolíticas já foi demonstrado durante a diferenciação *in vitro* de cardiomiócitos para adequação ao perfil metabólico [98].

Com a maturação pós-natal houve hiper-regulação da expressão dos genes das vias da β -oxidação, fosforilação oxidativa, e ciclo do ácido tricarboxílico, como indicado pela maior expressão relativa de genes mitocondriais em P7 em relação à P1 (Fig. 19). Esse dado é consistente com a maior dependência do metabolismo mitocondrial para a geração de energia que ocorre com o amadurecimento do tecido cardíaco [43]. Trabalhos anteriores já demonstraram um aumento crescente da expressão de genes e proteínas mitocondriais durante os primeiros dias da vida pós-natal [29, 48]. Em corações de ratos foi detectado um aumento crescente da expressão de quase um terço dos genes mitocondriais durante os primeiros 10 dias de vida de ratos, sendo estes envolvidos principalmente na biogênese mitocondrial, fosforilação oxidativa e β -oxidação [48]. Apesar de concordar com a hiper-expressão de genes mitocondriais durante a maturação pós-natal, O'Meara e colaboradores

evidenciaram que essa hiper-expressão ocorreu principalmente na comparação entre corações de camundongos recém-nascidos (dia 0) e corações de adultos, sendo que a expressão foi semelhante entre camundongos de 0 e 7 dias de vida [49].

Dessa forma, os dados de expressão gênica apresentados no presente estudo mostram o aumento da expressão de todas as vias do metabolismo energético que requerem o oxigênio para seu funcionamento, enfatizando a troca do metabolismo fermentativo para o metabolismo mais oxidativo com a maturação pós-natal. Entretanto, sabendo que o perfil de expressão gênica pode não se correlacionar totalmente com a atividade metabólica final, devido às modificações pós-translacionais, por exemplo [66, 99, 100], foram realizados experimentos para a avaliação funcional das alterações de perfil metabólico durante o período neonatal.

Os dados funcionais da atividade metabólica dos corações neonatais apresentados neste trabalho, usando tecido cardíaco (Fig. 20) e cultura de cardiomiócitos (Fig. 21), mostraram que tanto a glicólise anaeróbia quanto o consumo de oxigênio relacionado à oxidação mitocondrial estiveram elevados em P1. Em contrapartida, houve redução do metabolismo oxidativo e da glicólise anaeróbia durante o desenvolvimento cardíaco pós-natal entre 1 e 7 dias de vida. Isso foi evidenciado pela redução do consumo de oxigênio, da produção de lactato e das atividades das enzimas lactato desidrogenase e hexoquinase (Fig. 20). Essas observações foram inicialmente contrárias aos dados de expressão da literatura [49] e os apresentados no presente trabalho, que supõe um perfil de consumo justamente oposto ao observado. Por outro lado, ao que sabemos este é o primeiro trabalho a investigar de maneira funcional o metabolismo de ratos neonatos, estando nesse período as células cardíacas passando por um momento de transição. De maneira a corroborar essas observações, foi examinado seletivamente o metabolismo mitocondrial *in vitro*, mediante

medida das taxas de consumo de oxigênio em culturas primárias de cardiomiócitos P1 e P7. E novamente, os resultados indicaram que a redução no metabolismo oxidativo observada entre P1 e P7 foi principalmente relacionada com menores taxas de respiração mitocondrial para a produção de ATP (Fig. 21). Assim sendo, as análises de expressão gênica sozinhas pareceram ser indicadores parciais do estado funcional do metabolismo, sendo que a atividade metabólica deve ser avaliada diretamente sempre que possível. Isto pode ser especialmente importante em células em diferenciação e proliferação, em que mudanças significativas ocorrem.

As mudanças metabólicas que ocorrem durante o processo de diferenciação têm sido avaliadas em outros tecidos e mostram resultados variados. A diferenciação neuronal também envolve redução do metabolismo oxidativo, mas, diferentemente dos resultados deste trabalho, com concomitante aumento da fermentação [101]. Já a diferenciação de células-tronco mesenquimais para adipócitos e osteócitos envolve aumento nas taxas de consumo de oxigênio, mas a diferenciação para condrócitos envolve uma grande redução da atividade respiratória [63]. Na diferenciação *in vitro* de células tronco-embriônicas para cardiomiócitos, a indução das vias cardiogênicas foi relacionada com o aumento da demanda por energia e necessidade de um padrão metabólico mais eficiente, a fosforilação oxidativa [62]. A integração das mitocôndrias com a rede eletromecânica dos sarcômeros conferiu competência funcional para o desenvolvimento de fenótipo cardíaco [62]. Pode-se sugerir que as taxas de metabolismo oxidativo são determinadas pela necessidade energética, que são variáveis durante as fases da diferenciação celular.

Os mecanismos envolvidos na mudança de alta taxa de metabolismo oxidativo para baixa taxa de oxidação nos cardiomiócitos neonatais não foram investigados e permanecem a serem definidos. Recentemente, Puente e colaboradores demonstraram que o

aprisionamento do ciclo celular de cardiomiócitos foi atenuado pela manutenção das condições de hipóxia fetais e prevenido por antioxidantes mitocondriais [29]. Com o acúmulo significativo de marcadores de dano oxidativo, os autores concluíram que o aprisionamento do ciclo celular pela sinalização redox é desencadeado pelo oxigênio atmosférico [29]. Estes achados levantam a possibilidade que a sinalização redox também possa ser responsável pela diminuição no consumo de oxigênio entre P1 e P7 (Fig. 20, 21).

Independentemente do mecanismo pelo qual o metabolismo oxidativo é reduzido dias após o nascimento, foi possível estabelecer que a manutenção de altas taxas de transferência de elétrons é essencial para a capacidade proliferativa pós-natal de cardiomiócitos P1 (Fig. 26), sendo possivelmente importante para o processo regenerativo. Isto é, muito provavelmente, relacionado com o elevado gasto de energia necessário para a proliferação de cardiomiócitos. Recentemente, foi demonstrado que em condições de isquemia *in vitro*, com hipóxia e privação de nutrientes, a produção de ATP decai tanto em cardiomiócitos derivados de células iPS quanto em cardiomiócitos neonatais isolados [102].

A hipótese de que a manutenção do metabolismo glicolítico facilite o estado mais proliferativo de cardiomiócitos parece ser corroborada por modelos em que células-tronco são induzidas a diferenciar *in vitro* em cardiomiócitos [62, 103]. Os resultados deste trabalho apontam que a capacidade oxidativa mitocondrial é necessária para o estado mais proliferativo *in vivo* e *in vitro* de cardiomiócitos no período pós-natal (Fig. 22, 24). De maneira interessante, a proliferação de fibroblastos cardíacos parece não ser afetada pelo perfil metabólico tecidual. Recentemente, Manesia e colaboradores demonstraram que células-tronco hematopoéticas primitivas de fígado fetal usam a fosforilação oxidativa como uma fonte mais eficiente de energia para proliferação [57].

De maneira geral, os dados sugerem que o primeiro dia após o nascimento abrange

uma alta demanda energética tanto para a diferenciação terminal das células cardíacas quanto para a última fase robusta de proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal. Devido à rápida adaptação metabólica à tensão de oxigênio, o metabolismo mitocondrial torna-se importante como fonte de energia. Recentemente foi demonstrado que corações de camundongos neonatos sem lesão apresentaram robusta formação de cardiomiócitos até a primeira semana de vida [37], sendo que a capacidade de expansão foi mais elevada até o quinto dia de vida pós-natal. Já no dia 7 após o nascimento a atividade proliferativa dos cardiomiócitos decaiu e a maior parte da multinucleação ocorreu [37]. Esse trabalho corrobora os achados deste estudo em que a presença de oxigênio, e consequente metabolismo oxidativo, foram necessários para a última fase robusta de proliferação na vida pós-natal. Entretanto, é importante considerar que o aumento do oxigênio e da produção de EROs mitocondriais desencadeiam o aprisionamento do ciclo celular dos cardiomiócitos por meio da resposta de dano ao DNA [29], que é consistente com a redução da taxa proliferativa em P7.

Finalmente, os resultados evidenciam que a capacidade proliferativa pós-natal de cardiomiócitos correlaciona com o metabolismo oxidativo e não-oxidativo (glicolítico). A demanda de energia decai quando a proliferação cessa nos dias após o nascimento e ambos o metabolismo oxidativo e a glicólise anaeróbia são reduzidas. Assim, a oxidação passa a predominar como a principal fonte de energia para o tecido cardíaco. É possível especular que intervenções para aumentar a o período regenerativo pós-natal devam incluir estímulos coadjuvantes relacionados ao metabolismo mitocondrial. Ou ainda que com o monitoramento do consumo de oxigênio pelo tecido cardíaco seja possível estimar a sua capacidade regenerativa.

6.0 Conclusões

Nesta tese foi testada a hipótese de que o metabolismo energético mitocondrial de ratos neonatos influencia a capacidade regenerativa cardíaca. Conseguiu-se estabelecer, pela primeira vez em ratos, que neonatos de 1 dia de vida apresentam capacidade regenerativa transitória após a ressecção apical, que é perdida após 7 dias. A resposta regenerativa está associada com a manutenção da função cardíaca na vida adulta, mesmo quando os animais são submetidos a estresse, apesar de o reparo ser incompleto e de haver hipoperfusão miocárdica. A intervenção cirúrgica no neonato desencadeia um dano metabólico tardio que independe da resposta regenerativa ou reparativa e, que aparentemente acarreta em desorganização da arquitetura do miocárdio e mitocôndrias, porém sem relação direta com prejuízos na função cardíaca. Por fim, pode-se concluir que os cardiomiócitos de neonatos de 1 dia de vida possuem uma alta demanda por energia, evidenciada pelas altas taxas de atividade glicolítica e oxidativa juntas, que são reduzidas durante o desenvolvimento pós-natal. A presença do metabolismo energético mitocondrial em cardiomiócitos derivados de neonatos de 1 dia de vida parece essencial para a capacidade proliferativa destes na vida pós-natal. Curiosamente fibroblastos parecem não ter a mesma necessidade. Assim, as presentes observações contribuem para um melhor entendimento do perfil metabólico do tecido cardíaco neonatal e podem ser utilizadas futuramente, de maneira estratégica para a busca de células ou de condições capazes de reparar um tecido cardíaco comprometido.

7.0 Referências

1. Soonpaa, M., Field, L.J., *Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 2): p. H220-6.
2. Beltrami, A., Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1750-7.
3. Walsh, S., Ponten, A, Fleischmann, BK, Jovinge, S., *Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—an analysis based on cardiomyocyte nuclei*. Cardiovascular Research, 2010. **86**: p. 365–373.
4. Mummery, C., Davis RP, Krieger JE., *Challenges in using stem cells for cardiac repair*. Sci Transl Med, 2010. **2-27ps17**(27): p. 1-5.
5. Nakamuta, J., Danoviz, ME, Marques, FL, dos Santos, L, Becker, C, Goncalves, GA, Vassallo, PF, Schettert, IT, Tucci, PJ, Krieger, JE., *Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold*. PLoS ONE, 2009. **4**(6): p. e6005.
6. Tomita, S., Li, RK, Weisel, RD, Mickle, DA, Kim, EJ, Sakai, T, Jia, ZQ., *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II247-56.
7. Danoviz, M., Nakamuta, JS, Marques, FLN, dos Santos, L, Alvarenga, EC, dos Santos, AA, Antonio, EL, Schettert, IT, Tucci, PJ, Krieger, JE., *Rat Adipose Tissue-Derived Stem Cells Transplantation Attenuates Cardiac Dysfunction Post Infarction and Biopolymers Enhance Cell Retention*. PLoS ONE, 2010. **5**(8): p. 9.
8. Hamdi, H., Planat-Benard, V, Bel, A, Puymirat, E, Geha, R, Pidial, L, Nematalla, H, Bellamy, V, Bouaziz, P, Peyrard, S, Casteilla, L, Bruneval, P, Hagege, AA, Agbulut, O, Menasche, P., *Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections*. Cardiovasc Res, 2011. **91**(3): p. 483-91.
9. van der Bogt, S.S., Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC., *Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart*. Transplantation, 2009. **87**(5): p. 642-52.
10. Cho, H., Lee, N, Lee, J Y, Choi, YJ, Li, M, Wecker, A, Jeong, JO, Curry, C, Qin, G, Yoon, YS., *Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3257-69.
11. Kawamoto, A., Gwon, HC, Iwaguro, H, Yamaguchi, JI, Uchida, S, Masuda, H, Silver, M, Ma, H, Kearney, M, Isner, JM, Asahara, T., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 634-7.
12. Takahashi, K., Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
13. Laflamme, M., & Murry, CE., *Heart regeneration*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 326-35.
14. Jopling, C., Sleep, E, Raya, M, Marti, M, Raya, A, Izpisua Belmonte, JC., *Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 606-9.

15. Poss, K., Wilson, LG, Keating, MT., *Heart regeneration in zebrafish*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2188-90.
16. Gonzalez-Rosa, J.M., Martin, V., Peralta, M., Torres, M., Mercader, N., *Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish*. Development, 2011. **138**(9): p. 1663-74.
17. Wang, J., Panakova, D., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Gemberling, M., Burris, J. S., Singh, S. P., Dickson, A. L., Lin, Y. F., Sabeh, M. K., Werdich, A. A., Yelon, D., Macrae, C. A., Poss, K. D., *The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion*. Development, 2011. **138**(16): p. 3421-30.
18. Soonpaa, M., Field, L.J., *Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 15-26.
19. Bergmann, O., Bhardwaj, RD, Bernard, S, Zdunek, S, Barnabe-Heider, F, Walsh, S, Zupicich, J, Alkass, K, Buchholz, BA, Druid, H, Jovinge, S, Frisen, J., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
20. Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L. T., Park, S. Y., Silberstein, L. E., Dos Remedios, C. G., Graham, D., Colan, S., Kuhn, B., *Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1446-51.
21. Porrello, E., Mahmoud, AI, Simpson, E, Hill, JA, Richardson, JA, Olson, EN, Sadek, HA., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
22. Haubner, B., Adamowicz-Brice, M, Khadayate, S, Tiefenthaler, V, Metzler, B, Aitman, T, Penninger, J. M., *Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(12): p. 966-77.
23. Porrello, E., Mahmoud, AI, Simpson, E, Johnson, BA, Grinsfelder, D, Canseco, D, Mammen, PP, Rothermel, BA, Olson, EN, Sadek, HA., *Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. 187-92.
24. van Amerongen MJ, H.M., Petersen AH, Popa ER, van Luyn MJ., *Cryoinjury: a model of myocardial regeneration*. Cardiovasc Pathol, 2008. **17**(1): p. 23-31.
25. Jesty, S.A., Steffey, M. A., Lee, F. K., Breitbach, M., Hesse, M., Reining, S., Lee, J. C., Doran, R. M., Nikitin, A. Y., Fleischmann, B. K., Kotlikoff, M. I., *c-kit+ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): p. 13380-5.
26. Zogbi, C., Satri de Carvalho, AE, Nakamuta, JS, Caceres VM, Prando, S, Giorgi, MC, Rochitte, CE, Meneghetti, JC, Krieger, JE., *Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion*. Physiol Rep, 2014. **2**(8).
27. Mahmoud, A., Kocabas, F, Muralidhar, SA, Kimura, W, Koura, AS, Thet, S, Porrello, ER, Sadek, HA., *Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 249-53.
28. Porrello, E., Johnson, BA, Aurora, AB, Simpson, E, Nam, YJ, Matkovich, SJ, Dorn, GW 2nd, van Rooij, E, Olson, EN., *MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes*.

- Circ Res, 2011. **109**(6): p. 670-9.
29. Puente, B., Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA., *The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response*. Cell, 2014. **157**(3): p. 565-79.
 30. Senyo, S., Steinhauser, ML, Pizzimenti, CL, Yang, VK, Cai, L, Wang, M, Wu, TD, Guerquin-Kern, J-L, Lechene, CP & Lee, RT., *Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes*. Nature, 2013. **493**: p. 433-437.
 31. Ali, S.R., Hippenmeyer, S., Saadat, L. V., Luo, L., Weissman, I. L., Ardehali, R., *Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(24): p. 8850-5.
 32. Pasumarthi, K., Field, L.J., *Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation*. Circulation Research, 2002. **90**: p. 1044-1054.
 33. Sedmera, D., Thompson, RP., *Myocyte proliferation in the developing heart*. Dev Dyn, 2011. **240**(6): p. 1322-34.
 34. Buja, L., Vela, D., *Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart*. Cardiovasc Pathol, 2008. **17**(6): p. 349-74.
 35. Jeter, J., Jr. & Cameron, IL., *Cell proliferation patterns during cytodifferentiation in embryonic chick tissues: liver, heart and erythrocytes*. J Embryol Exp Morphol, 1971. **25**(3): p. 405-22.
 36. Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Yoshitome, S., Tane, S., Nakamura, K., Obayashi, T., Hayashi, T., Takeuchi, T., *Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(8): p. 731-8.
 37. Alkass K, P.J., Westman M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Bergmann O., *No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice*. Cell, 2015. **163**(4): p. 1026-1036.
 38. Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Anversa, P., *The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro*. Exp Cell Res, 1994. **215**(2): p. 273-83.
 39. Hattori, F., Chen, H, Yamashita, H, Tohyama, S, Satoh, YS, Yuasa, S, Li, W, Yamakawa, H, Tanaka, T, Onitsuka, T, Shimoji, K, Ohno, Y, Egashira, T, Kaneda, R, Murata, M, Hidaka, K, Morisaki, T, Sasaki, E, Suzuki, T, Sano, M, Makino, S, Oikawa, S, Fukuda, K., *Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes*. Nat Methods, 2010. **7**(1): p. 61-6.
 40. Barth, E., Stammler, G., Speiser, B., Schaper, J., *Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(7): p. 669-81.
 41. Ong, S., & Gustafsson, AB., *New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 190-6.
 42. Lemieux, H., Hoppel, CL., *Mitochondria in the human heart*. J Bioenerg Biomembr, 2009. **41**(2): p. 99-106.
 43. Lopaschuk, G., & Jaswal, JS., *Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during*

- development, differentiation, and postnatal maturation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(2): p. 130-40.
44. Lopaschuk, G., Collins-Nakai, RL, Itoi, T., *Developmental changes in energy substrate use by the heart*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(12): p. 1172-80.
45. Gao, Y.R., JU., *Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1291-335.
46. Lopaschuk, G., Spafford, MA, Marsh, DR., *Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth*. Am J Physiol, 1991. **261**(6 Pt 2): p. H1698-705.
47. Lopaschuk, G.S., MA., *Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 2): p. H1274-80.
48. Pohjoismaki, J., Boettger, T, Liu, Z, Goffart, S, Szibor, M, Braun, T., *Oxidative stress during mitochondrial biogenesis compromises mtDNA integrity in growing hearts and induces a global DNA repair response*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6595-607.
49. O'Meara, C.C., et al., *Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration*. Circ Res, 2015. **116**(5): p. 804-15.
50. Huss, J.K., DP., *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 547-55.
51. Palaniyandi, S., Qi, X, Yogalingam, G, Ferreira, JC, Mochly-Rosen, D., *Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure*. Drug Discov Today Dis Mech, 2010. **7**(2): p. e95-e102.
52. Kolwicz, S., Jr., Purohit, S, Tian, R., *Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes*. Circ Res, 2013. **113**(5): p. 603-16.
53. Yancey, D.M., Guichard, J. L., Ahmed, M. I., Zhou, L., Murphy, M. P., Johnson, M. S., Benavides, G. A., Collawn, J., Darley-Usmar, V., Dell'Italia, L. J., *Cardiomyocyte mitochondrial oxidative stress and cytoskeletal breakdown in the heart with a primary volume overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(6): p. H651-63.
54. Gomes, K., Campos, JC, Bechara, LR, Queliconi, B, Lima, VM, Disatnik, MH, Magno, P, Chen, CH, Brum, PC, Kowaltowski, AJ, Mochly-Rosen, D, Ferreira, JC. , *Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(4): p. 498-508.
55. Aguilar, V. and L. Fajas, *Cycling through metabolism*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(9): p. 338-48.
56. DeBerardinis, R.J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C. B., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
57. Manesia, J.K., et al., *Highly proliferative primitive fetal liver hematopoietic stem cells are fueled by oxidative metabolic pathways*. Stem Cell Res, 2015. **15**(3): p. 715-21.
58. Escobar-Alvarez, S., Gardner, J., Sheth, A., Manfredi, G., Yang, G., Ouerfelli, O., Heaney, M. L., Scheinberg, D. A., *Inhibition of human peptide deformylase disrupts mitochondrial function*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(21): p. 5099-109.
59. Richter, U., Lahtinen, T., Marttinen, P., Myohanen, M., Greco, D., Cannino, G., Jacobs, H. T., Lietzen, N., Nyman, T. A., Battersby, B. J., *A mitochondrial ribosomal and RNA decay*

- pathway blocks cell proliferation*. *Curr Biol*, 2013. **23**(6): p. 535-41.
60. Skrtic, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., Lai, C. K., Eberhard, Y., Bartoszko, J., Spagnuolo, P., Rutledge, A. C., Datti, A., Ketela, T., Moffat, J., Robinson, B. H., Cameron, J. H., Wrana, J., Eaves, C. J., Minden, M. D., Wang, J. C., Dick, J. E., Humphries, K., Nislow, C., Giaever, G., Schimmer, A. D., *Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(5): p. 674-88.
61. Battersby, B.J. and U. Richter, *Why translation counts for mitochondria - retrograde signalling links mitochondrial protein synthesis to mitochondrial biogenesis and cell proliferation*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 19): p. 4331-8.
62. Chung, S., Dzeja, PP, Faustino, RS, Perez-Terzic, C, Behfar, A, Terzic, A., *Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. **4 Suppl 1**: p. S60-7.
63. Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, Shirihai O, Kowaltowski AJ, *Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation is Regulated by Mitochondrial Dynamics*. *Stem Cells*, 2015.
64. Neary, M.T., Ng, K. E., Ludtmann, M. H., Hall, A. R., Piotrowska, I., Ong, S. B., Hausenloy, D. J., Mohun, T. J., Abramov, A. Y., Breckenridge, R. A., *Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **74**: p. 340-52.
65. Anversa, P., Leri, A., *Innate regeneration in the aging heart: healing from within*. *Mayo Clin Proc*, 2013. **88**(8): p. 13.
66. Lai, L., et al., *Energy metabolic reprogramming in the hypertrophied and early stage failing heart: a multisystems approach*. *Circ Heart Fail*, 2014. **7**(6): p. 1022-31.
67. Borges, L., Jaldin RG, Dias RR, Stolf NAG, Michel JB, Gutierrez PS., *Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta*. *Human Pathol*, 2008. **39**: p. 437-43.
68. Nuyts, J., Mortelmans, L, Suetens, P, Oosterlinck, A, de Rou, M., *Model-based quantification of myocardial perfusion images from SPECT*. *J Nucl Med*, 1989. **30**(12): p. 1992-2001.
69. Tahara, E.B., F.D. Navarete, and A.J. Kowaltowski, *Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **46**(9): p. 1283-97.
70. Campos, J.C., Queliconi, B. B., Dourado, P. M., Cunha, T. F., Zambelli, V. O., Bechara, L. R., Kowaltowski, A. J., Brum, P. C., Mochly-Rosen, D., Ferreira, J. C., *Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(12): p. e52764.
71. Langmead, B., Salzberg, SL., *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nat Methods*, 2012. **9**(4): p. 357-9.
72. Mudunuri, U., Che, A., Yi, M., Stephens, R. M., *bioDBnet: the biological database network*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(4): p. 555-6.
73. Li, H., Handsaker, B, Wysoker, A, Fennell, T, Ruan, J, Homer, N, Marth, G, Abecasis, G, Durbin, R., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(16):

- p. 2078-9.
74. Anders, S., Huber, W., *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biol, 2010. **11**(10): p. R106.
 75. Gentleman, R., Carey, VJ, Bates, DM, Bolstad, B, Dettling, M, Dudoit, S, Ellis, B, Gautier, L, Ge, Y, Gentry, J, Hornik, K, Hothorn, T, Huber, W, Iacus, S, Irizarry, R, Leisch, F, Li, C, Maechler, M, Rossini, AJ, Sawitzki, G, Smith, C, Smyth, G, Tierney, L, Yang, JY, Zhang, J., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
 76. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
 77. Durinck S, Spellman, PT Birney E, Huber W, *Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt*. Nat Protoc, 2009. **4**(8): p. 1184-91.
 78. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. Biochem J, 2011. **435**(2): p. 297-312.
 79. Nicholls DG, D.-U.V., Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA., *Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells*. Journal of visualized experiments - JoVE, 2010. **6**.
 80. Gibbons, R., *Tc-99m SPECT sestamibi for the measurement of infarct size*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 321-31.
 81. Campos, J., Gomes, KM, Ferreira, JC., *Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases*. Food Chem Toxicol, 2013. **62**: p. 107-19.
 82. Escobales, N., Nunez, RE, Jang, S, Parodi-Rullan, R, Ayala-Pena, S, Sacher, JR, Skoda, EM, Wipf, P, Frontera, W, Javadov, S., *Mitochondria-targeted ROS scavenger improves post-ischemic recovery of cardiac function and attenuates mitochondrial abnormalities in aged rats*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **77**: p. 136-46.
 83. Ide, T., Tsutsui, H, Hayashidani, S, Kang, D, Suematsu, N, Nakamura, K, Utsumi, H, Hamasaki, N, Takeshita, A., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
 84. Luo, X., Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C, Wang, X., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
 85. Fukami, J., Yamamoto, I, Casida, JE., *Metabolism of rotenone in vitro by tissue homogenates from mammals and insects*. Science, 1967. **155**(3763): p. 713-6.
 86. Scola, G., Kim, HK, Young, LT, Salvador, M, Andrezza, AC., *Lithium reduces the effects of rotenone-induced complex I dysfunction on DNA methylation and hydroxymethylation in rat cortical primary neurons*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(21): p. 4189-98.
 87. Zhang, Q., Zhang, J, Jiang, C., Qin, J, Ke, K, Ding, F., *Involvement of ERK1/2 pathway in neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone-induced SH-SY5Y cell injury*. Neuroscience, 2014. **270**: p. 183-91.
 88. Andersen, D., Ganesalingam, S, Jensen, CH e Sheikh, SP., *Do Neonatal Mouse Hearts Regenerate following Heart Apex Resection?* Stem Cell Reports, 2014. **2**: p. 406-413.

89. Bryant, D., O'Meara, CC, Ho, NN, Gannon, J, Cai, L, Lee, RT., *A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection*. J Mol Cell Cardiol., 2015. **79** p. 315-8.
90. Ahuja, P., Sdek, P, MacLellan, WR., *Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 521-44.
91. Li, F., Wang, X, Capasso, JM, Gerdes, AM., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1737-46.
92. Zebrowski, D.C., R. Becker, and F.B. Engel, *Towards regenerating the mammalian heart: challenges in evaluating experimentally induced adult mammalian cardiomyocyte proliferation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016: p. ajpheart 00697 2015.
93. Acton, P.D., D. Thomas, and R. Zhou, *Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT*. Int J Cardiovasc Imaging, 2006. **22**(3-4): p. 429-34.
94. de Oliveira, L.F., Mejia, J., de Carvalho, E. E., Lataro, R. M., Frassetto, S. N., Fazan, R., Jr., Salgado, H. C., Galvis-Alonso, O. Y., Simoes, M. V., *Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats*. Arq Bras Cardiol, 2013. **101**(1): p. 59-67.
95. dos Santos, L., Antonio, EL, Souza, AFM, Tucci, PJF. , *Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure*. Can J Physiol Pharmacol., 2010. **88**(7): p. 724-32.
96. Goncalves, G., Vassallo, PF, dos Santos, L, Schettert, IT, Nakamuta, JS, Becker, C, Tucci, PJ, Krieger, JE., *Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction*. Gene Ther, 2010. **17**(3): p. 305-14.
97. Santos, C., Anilkumar, N, Zhang, M, Brewer, AC, Shah, AM., *Redox signaling in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(7): p. 777-93.
98. Chung, S., et al., *Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(4): p. 725-34.
99. Mendler, L., T. Braun, and S. Muller, *The Ubiquitin-Like SUMO System and Heart Function: From Development to Disease*. Circ Res, 2016. **118**(1): p. 132-44.
100. Wadosky, K.M. and M.S. Willis, *The story so far: post-translational regulation of peroxisome proliferator-activated receptors by ubiquitination and SUMOylation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H515-26.
101. Fornazari, M., et al., *Neuronal differentiation involves a shift from glucose oxidation to fermentation*. J Bioenerg Biomembr, 2011. **43**(5): p. 531-9.
102. Brodarac, A., Saric, T., Oberwallner, B., Mahmoodzadeh, S., Neef, K., Albrecht, J., Burkert, K., Oliverio, M., Nguemo, F., Choi, Y. H., Neiss, W. F., Morano, I., Hescheler, J., Stamm, C., *Susceptibility of murine induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to hypoxia and nutrient deprivation*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 83.
103. St John, J.C., et al., *The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells*. Cloning Stem Cells, 2005.**7**(3):p.141-53.

8.0 Apêndices

Cópias dos pareceres da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/09/2012, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **285/12** intitulado: **“METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E CARDIOMIOGÊNESE PARA REGENERAÇÃO CARDÍACA”** que utilizará **50** animais da espécie **ratos Wistar**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Pesquisador (a) Executante: Msc Ana Elisa Teófilo Saturi de Carvalho

CEP-FMUSP, 10 de Setembro de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
11/09/12
Cecine



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 11 de Outubro de 2012, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **285/12**, intitulado: "**METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E CARDIOMIOGÊNESE PARA REGENERAÇÃO CARDÍACA**" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

• Adendo apresentado através do documento nº Comissão Científica **379212048**

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**

Pesquisador (a) Executante: **Msc Ana Elisa Teófilo Saturi de Carvalho**

CEP-FMUSP, 11 de Outubro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
15/10/12
Coaine

Cópia do parecer da aprovação da inclusão do Dr. Vinícius Bassaneze como coorientador ao projeto.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/02/15, **ANALISOU** e **APROVOU** a **nova versão** para o protocolo de pesquisa nº **285/12**, intitulado “Metabolismo Energético Mitocondrial e Cardiomiogênese para Regeneração Cardíaca”, a **inclusão do Dr. Vinícius Bassaneze como co-orientador** da aluna Ana Elisa Teófilo Saturi de Carvalho e o **relatório parcial** do projeto, apresentado pela Comissão Científica do INCOR.

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger

CEUA-FMUSP, 25 de Fevereiro de 2015



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Manuscrito publicado durante o doutorado.

Physiological Reports

Open Access

Physiological Reports ISSN 2051-817X

ORIGINAL RESEARCH

Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion

Camila Zogbi*, Ana E. T. Saturi de Carvalho*, Juliana S. Nakamuta, Viviane de M. Caceres, Silvana Prando, Maria C. P. Giorgi, Carlos E. Rochitte, Jose C. Meneghetti & Jose E. Krieger

Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Keywords

Apex resection, cardiomyocytes neoformation, hemodynamic overload, rats, tissue perfusion.

Correspondence

Jose E. Krieger, Genetics and Molecular Cardiology/LIM 13, Heart Institute, University of Sao Paulo Medical School, Av. Dr. Eneas C. Aguiar 44, 05403-000 Sao Paulo, SP, Brazil.
Tel: 55-11-3069-5068
Fax: 55-11-3069-5022
E-mail: krieger@incor.usp.br
<http://www.incor.usp.br/genetica>

Funding Information

The work was supported by grants to JEK Lab from Fundacao Zerbini, São Paulo Research Foundation (FAPESP 2013/17368-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Ministerio da Saude do Brasil (MS-DECIT). C.Z.N and A.E.T.S.C are recipients of doctoral fellowships (FAPESP #2012/10107-4 and #2012/10109-7, respectively), and J.S.N is the recipient of a postdoctoral fellowship (FAPESP #2010/52516-2).

Received: 18 July 2014; Accepted: 21 July 2014

doi: 10.14814/phy2.12115

Physiol Rep, 2 (8), 2014, e12115,
doi: 10.14814/phy2.12115

*These investigators contributed equally to this work.

Introduction

The limited postnatal cardiac regenerative capacity in mammalian hearts is one of the major challenges in cardiovascular medicine (Laflamme and Murry 2011; Anversa

Abstract

One-day-old mice display a brief capacity for heart regeneration after apex resection. We sought to examine this response in a different model and to determine the impact of this early process on long-term tissue perfusion and overall cardiac function in response to stress. Apical resection of postnatal rats at day 1 (P1) and 7 (P7) rendered $18 \pm 1.0\%$ and $16 \pm 1.3\%$ loss of cardiac area estimated by magnetic resonance imaging (MRI), respectively ($P > 0.05$). P1 was associated with evidence of cardiac neoformation as indicated by Troponin I and Connexin 43 expression at 21 days postresection, while in the P7 group mainly scar tissue replacement ensued. Interestingly, there was an apparent lack of uniform alignment of newly formed cells in P1, and we detected cardiac tissue hypoperfusion for both groups at 21 and 60 days postresection using SPECT scanning. Direct basal cardiac function at 60 days, when the early lesion is undetectable, was preserved in all groups, whereas under hemodynamic stress the degree of change on LVDEP, Stroke Volume and Stroke Work indicated diminished overall cardiac function in P7 ($P < 0.05$). Furthermore, the End-Diastolic Pressure–Volume relationship and increased interstitial collagen deposition in P7 is consistent with increased chamber stiffness. Taken together, we provide evidence that early cardiac repair response to apex resection in rats also leads to cardiomyocyte neoformation and is associated to long-term preservation of cardiac function despite tissue hypoperfusion.

and Leri 2013; Andersen et al. 2014). Fibrotic scar formation is the predominant repair mechanism as billions of cardiomyocytes are lost during an acute myocardial infarction or other cardiovascular injuries, which is associated with long-term unfavorable outcomes. In the last decade,

several gene/cell-based approaches were explored to improve the post myocardial infarction (post-MI) repair response showing promising results in preclinical models. Unfortunately, thus far, no therapeutic scheme has been shown effective in clinical settings. One may speculate that clinical failure is due, at least in part, to the lack of cardiomyocyte replacement, and to the fact that the potentially beneficial effects are restricted to processes such as neoangiogenesis and inhibition of inflammation and collagen deposition, which might be clinically relevant only for specific scenarios (Mummery et al. 2010). The development of strategies to reprogram adult cells into cardiomyocytes ex- or in-vivo together with data showing that the adult heart displays some degree of cardiomyocyte proliferation (Bergmann et al. 2009; Kajstura et al. 2010a,b, 2012; Senyo et al. 2013) and that local cardiac stem cells undergo differentiation (Hsieh et al. 2007; Gonzalez et al. 2008), raise the possibility that targeting these processes may lead or add to more efficient cardiac repair in the adult organ. The latter is consistent with recent data suggesting that neonatal mice hearts retain a robust but transient cardiac regenerative capacity immediately after birth in response to apex resection or ischemic injury (Porrello et al. 2011a,b, 2013; Haubner et al. 2012). The investigation of the underlying healing mechanisms in these models of early heart injury may give insights for novel approaches on effective strategies in adult cardiac repair, which depends on the extracellular matrix remodeling, establishment of adequate tissue vascular supply, and newly formed cardiomyocytes acting as a syncytium.

In the present study, we have two major goals. First, to extend this observation to another species, the rat model, where a great body of functional knowledge is available regarding acute and chronic consequences of cardiac injury; second, we sought to assess the hitherto unknown long-term efficacy of cardiac repair through development, specifically to cope with hemodynamic stress during adulthood. The rat is a suitable model for investigating these issues, because there are standard methods to assess quantitatively direct hemodynamics and cardiac tissue perfusion. Our data show that the rat indeed displays a robust early postnatal cardiomyocyte neof ormation in response to 18% apex resection, leading to maintenance of overall adult cardiac function under hemodynamic stress despite documented tissue hypoperfusion.

Materials and Methods

Apical resection surgery

One-day-old (P1) and 7-day-old (P7) rats (Wistar strain) underwent heart apex resection. Newborns were

anesthetized by hypothermia for 10 min. Following a small skin incision, ventrolateral thoracotomy was cautiously performed at the third intercostal space by dissection of the intercostal muscles. The heart was exposed and the apex of P1 and P7 rats was resected using iridectomy scissors. The thoracic wall incision was closed with 7.0 nonabsorbable silk sutures. For recovery, the neonates were placed on a warmed plate (37°C) under a heat lamp with oxygen flow until fully conscious. Sham surgery was similar, except that resection was omitted. P1 and P7 rats at 21 and 60 days after apical resection surgery were anesthetized intraperitoneally with adjusted dose of xylazine chloride and ketamine chloride (15 mg/kg and 60 mg/kg, respectively; Sespo Industria e Comercio Ltda, Paulinia, SP, Brazil) and hearts were quickly harvested.

Experimental procedures followed the US National Institutes of Health and institutional guidelines for care and use of laboratory animals and were approved by the Institutional Review Board of the University of São Paulo Medical School, Brazil (#285/12).

Magnetic resonance imaging

Magnetic resonance imaging was performed in a 1.5T MR scanner (Philips Achieva, Amsterdam, the Netherlands), using a four-channel sense wrist coil. Newborn rats were anesthetized by inhalation with adjusted dose of isoflurane (Isothane, Baxter Healthcare, Guayama, Puerto Rico) in approximately 1 L/min oxygen, and were placed over a 250-mL saline bag, feet first and in a dorsal decubitus position. A 3-plane localizer 2-dimensional fast field echo pulse sequence (2D FFE) provided scout images for heart location and prescription of the next image pulse sequence. Image pulse sequence for acquiring the images used for analysis of the heart and its apex was a high-resolution 3-dimensional Turbo Spin-Echo (TSE) with parallel imaging (SENSE). Parameters were the following: 3D acquisition TSE with SENSE; Prescription plane: coronal; 50 slices; Field-of-view (FOV): 50(FH) × 50(RL) × 20(AP) mm; Matrix: 112 × 107 pixels; Voxel size: 0.45 × 0.45 × 0.45 mm or 450 μm; Reconstruction matrix: 448 pixels; Reconstruction voxel: 0.112 mm or 112 μm; Number of Averages (NSA): 6; Turbo factor (TSE): 6; Repetition time (Kajstura et al. 2010a): 155 ms; Echo time (TE): 30 ms; Phase direction: RL; Parallel imaging factor (SENSE factor): 1 (FH) and 2(RL). The images were strongly proton-density weighted. Acquisition time for one 3D volume was 8 min and 51 sec. The rats were scanned before and immediately after surgery, and the ones that did not exhibit a resection of at least 15% of apical area were eliminated.

Histological analysis

Heart tissues of the euthanized animals, 21 days and 60 days after surgery, were harvested and washed with saline to withdraw blood, and then were embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura, NL) and frozen in liquid nitrogen. Frozen hearts were maintained at -80°C until they were cryosectioned. For histological analysis the organ was cryosectioned on $6\ \mu\text{m}$.

To perform general histopathological analysis, hearts were cryosectioned at $6\text{-}\mu\text{m}$ and stained with Hematoxylin–Eosin (HE). Other sections were stained using the Picosirius method in a 0.1% Sirius Red solution (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) in saturated picric acid, followed by rapid washing in running tap water, without any counterstaining for histological evaluation of collagen fibers.

Picosirius-polarization method

Picosirius-stained sections were evaluated by polarization microscopy. The Picosirius-polarization method (PSP) is a method that allows study of the arrangement and aggregation of collagen fibers due to a normal birefringence exhibited by their molecules disposed in an orderly parallel orientation in the tissues (Borges et al. 2008).

Immunofluorescence

To assess the formation of new cardiomyocytes, sections were labeled with Troponin I. Slides were labeled for cardiac Troponin I (ab19615, 1:50, Abcam, Cambridge, MA) and Connexin 43 (ab11370, 1:50, Abcam, Cambridge, MA). Alexa fluor 488- and 555-(A11011 and A21428, 1:400, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY) conjugated secondary antibodies were used for double staining, and DAPI (D3571, 1:100, Invitrogen, Life Technologies) for nuclei staining.

Single photon emission tomography/computed tomography

P1, P7 were scanned 21 and 60 days after apical resection surgery in a fully integrated trimodality single photon emission tomography/computed tomography (SPECT/CT) Triumph™ scanner manufactured by GE Healthcare (Waukesha, WI). Each rat was anesthetized with 1.5–2.5% isoflurane in 2 L/min oxygen, and injected with approximately 37 MBq [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Sestamibi in the tail vein. The animal was positioned in the scanner, and SPECT images were acquired 30 min after injection. Each detector head was fit with a 5-tungsten pinhole 1 mm in diameter. The radius of rotation was set to 4.4 cm, and data were

acquired over 128 projection angles (180° for each head), 9Kcts per projection, giving a total acquisition time of approximately 30 min. Projection data were acquired into a 60×60 matrix, with pixel size 1.15 mm. Images were reconstructed using OSEM methods with five iterations and eight subsets. Data were analyzed with π PMOD 3.4002A software, with interpolation of 1.0 and 3D Gaussian filters. Guided shafts were used with and without a filter to find the cardiac short-axis, and vertical and horizontal long axis. The semi-automatic mode was used to guide Bull's-eye segments, shared it in 17 segments, where five represent the apex area and 12 represent remote area. Data obtained were normalized as a percentage of the cardiac segment of higher activity. A skilled professional was the blinded analyzer of the Bull's-eye quantification.

Hemodynamic measurements

Invasive hemodynamic studies were performed to evaluate cardiac performance 60 days after surgery in P1, P7, and sham rats. Each rat was anesthetized intraperitoneally with adjusted dose of urethane chloride (1.5 g/kg; Sigma-Aldrich). The left femoral vein was accessed to supplement anesthesia, drugs, or saline. A MicroTip pressure–volume catheter (model 1.4 French SPR 839; Millar Instruments, Houston, TX) was then inserted into the right carotid artery and positioned immediately above the aortic valves to monitor aortic blood pressure. After 5 min of arterial blood pressure recording, the catheter was advanced into the left ventricle (LV) cavity for simultaneous and continuous pressure and volume measurements. The right jugular vein was also cannulated, and a $10\text{-}\mu\text{L}$ bolus of 15% saline was injected to measure parallel conductance. Volume calibration was accomplished by using linear volume conductance regression of the absolute blood volume (four cylindrical chambers containing a specified volume of fresh heparinized rat blood) versus the corresponding signal acquired by the conductance catheter. Data were acquired for computer analysis (PVAN Software, Millar Instruments, Houston, TX) using LabChart 7 Software System (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The following parameters were obtained: heart rate (Senyo et al. 2013), mean arterial pressure (MAP), LV end-systolic and end-diastolic pressures (LVESP and LVEDP, respectively), maximal rate of LV pressure rise ($+dP/dt_{\text{max}}$) and decline ($-dP/dt_{\text{max}}$), stroke volume (SV), cardiac output, and stroke work (SW). Hemodynamic parameters were determined under basal conditions and during a sudden pressure overload with a vasoconstrictive phenylephrine hydrochloride (PHE; Sigma-Aldrich) bolus injection (25–75 mg/kg body weight) into the left femoral vein after bilateral vagotomy

to prevent changes in heart rate values induced by the baroreflex. PHE doses were adjusted for individual animals to produce comparable elevations in blood pressure (60–80% greater than baseline). The slope of the linear relation between the end-systolic volumes and pressures (ESPVR) was obtained during transient occlusions of the inferior vena cava in the experimental groups. After measurements, the hearts were quickly harvested and weighed.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The unpaired Student's *t* test was used to compare Troponin I and collagen fiber content in the resected area from P1, P7, and sham groups after 21 and 60 days of apex resection. One-way ANOVA with post hoc Tukey's test was used to compare interstitial collagen fiber deposition and hemodynamic measurements in the resected groups. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test for repeated measures was used to compare the heart perfusion of resected groups after 21 and 60 days of apical resection surgery. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Softwares Inc., La Jolla, CA). A value of $P \leq 0.05$ was considered to indicate statistically significant differences between tested groups.

Results

Quantification of apex resection in neonatal rats by MRI

The resected area in 1- and 7-day-old animals (P1 and P7, respectively) was determined by magnetic resonance imaging (MRI) via the acquisition of a 3-plane localizer

2-dimensional fast field echo pulse sequence before and immediately after heart apex resection in neonatal rats (Fig. 1). The average ventricle resection area was similar between P1 and P7 groups [$18 \pm 1.0\%$ and $16 \pm 1.3\%$, $P > 0.05$, respectively (Fig. 1A)]. Figure 1B displays a representative image of MRI in P1 before and immediately after surgery illustrating the resected portion of the apex area. It is important to emphasize that the survival rate after resection reached 63% and 53% for P1 ($N = 331$) and P7 ($N = 265$), respectively, with most of the losses occurring immediately after the procedure.

Repaired tissue in P1 is rich in cardiac Troponin I and Connexin 43 expression

To verify whether cardiomyocytes were in the repaired tissue, cardiac Troponin I labeling was performed in samples from both P1 and P7 groups 21 days after apex resection (Fig. 2). Cardiac Troponin I labeling was predominant in P1 versus P7 (8.5-fold increase), and the labeling was uniformly distributed in P1 compared to a scattered and patched distribution in P7 (P1: 77.3 ± 9.5 a.u./mm² vs. P7: 9.0 ± 3.9 a.u./mm²; $P \leq 0.05$, Fig. 2A). In addition, the newly formed cells in P1 also expressed Connexin 43 suggesting the presence of mature cardiomyocytes with transmembrane proteins that assemble to form gap junctions (Fig. 2F). Conversely, the patchy Troponin I-positive scattered cells in P7 hardly expressed Connexin 43 (Fig. 2B–G). Nuclei staining (DAPI) showed predominantly noncardiomyocyte cells (Troponin I negative cells) in repaired apex of P7 compared to P1 (Fig. 2B–E). Fibrosis assay showed that in P1 both the apex and remote areas displayed lower amounts of collagen compared to P7 (P1: 6.2 ± 1.4 vs. P7: 12.4 ± 1.0 ; apex collagen; P1: 4.4 ± 0.4 vs. P7: 7.3 ± 0.6 remote collagen; Fig. 2H–J; $P \leq 0.05$).

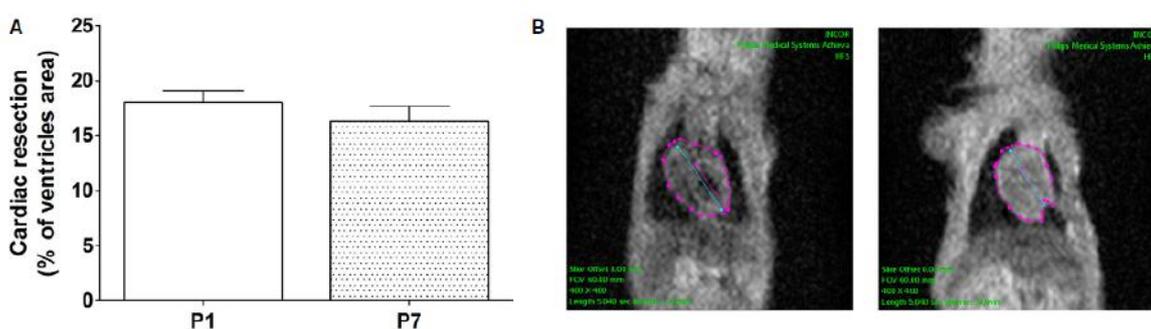


Figure 1. Percentages (mean \pm SEM) of ventricles resected (A) in P1 and P7 ($n = 12$ for both); (B) Magnetic resonance images obtained before and immediately after surgery. Dotted lines show the heart area used for resection quantification.

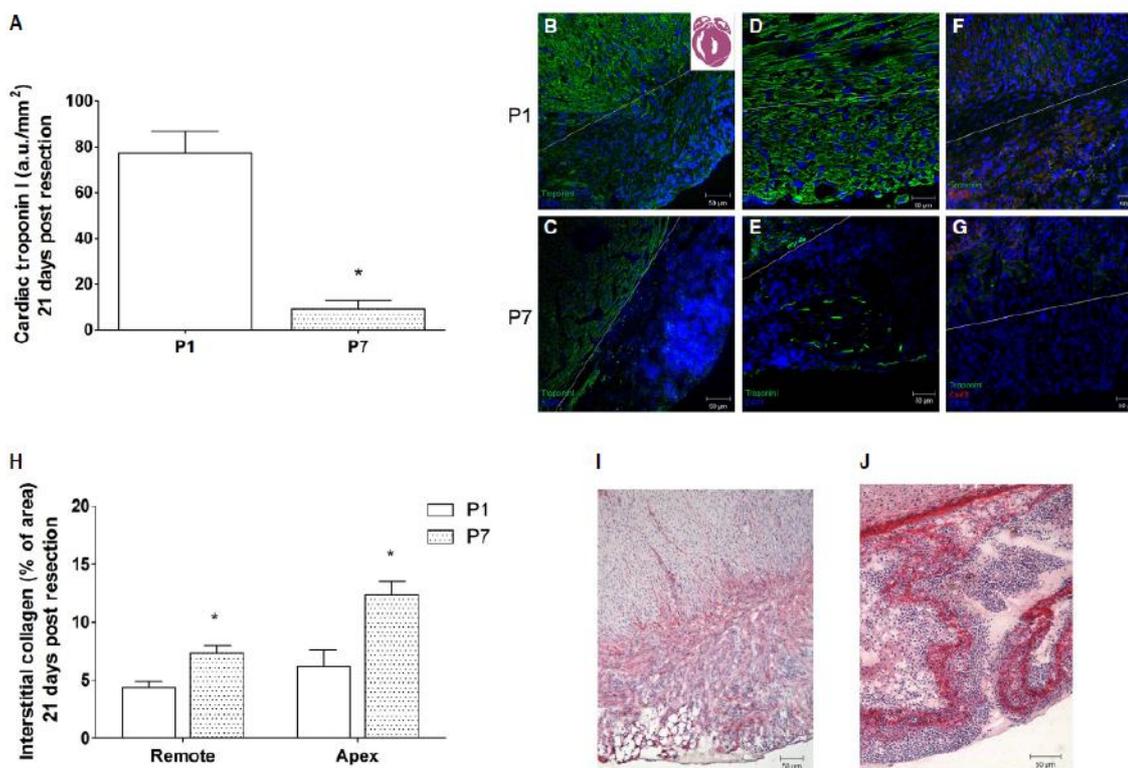


Figure 2. Cardiac Troponin I quantification (a.u./mm²), collagen fiber quantification according to Picrosirius red staining (percentage of area) and Connexin 43 labeling into neoformed tissue. (A) Bars indicate labeling of cardiac Troponin I in green per area (mean ± SEM) of P1 (*N* = 5) and P7 (*N* = 7) 21 days after resection surgery. Images indicate the labeling of cardiac Troponin I of (B) P1 (20 ×), (C) P7 (20 ×), (D) P1 (40 ×), (E) P7 (40 ×). Images indicate labeling of Connexin 43 of (F) P1 (20 ×), (G) P7 (20 ×). (H) Bars indicate percentage of apical and remote collagen fibers (mean ± SEM) of P1 (*n* = 8 and 5, respectively) and P7 (*n* = 10 and 7, respectively) 21 days after resection surgery. Images indicate labeling of collagen fibers of (I) P1 (20 ×), (J) P7 (20 ×). **P* < 0.05.

Repaired tissues in P1 and P7 display hypoperfusion at 21 and 60 days post apex resection

As shown above, at 21 days postresection, there was poor fibrosis deposition and cardiomyocyte formation in the repaired tissue of P1 animals, even though the tissue architecture and the alignment of the cardiac Troponin I- and Connexin 43-positive cells did not appear well preserved (Fig. 2 and data not shown). We then performed SPECT scanning using [^{99m}Tc]Sestamibi as a radiopharmaceutical to verify the blood perfusion of the repaired apical tissue. The radiotracer concentrates in the myocardium after systemic administration and the perfusion is proportional to regional blood flow. Figure 3 shows that the same animals from both P1 and P7 displayed reduced uptake of [^{99m}Tc] Sestamibi on apex versus the remaining areas of the heart at 21 days (38 ± 12% and 70 ± 10%, respectively) and

60 days postresection (64 ± 9.8% and 55 ± 14.0%, respectively).

Long-term overall cardiac function is preserved in the P1 group under hemodynamic stress

Considering the characteristics of the repaired tissue and the hypoperfusion in the P1 group, it became essential to assess the overall cardiac function in the adult animals, especially under hemodynamic stress to evaluate the long-term effectiveness of the repaired myocardium. Cardiac performance was measured directly under basal and pharmacological stress conditions 60 days after the surgical procedure. Interestingly, under basal conditions, overall cardiac function was preserved in adult P1 and P7 apex resected groups compared to sham (Table 1). In contrast, main hemodynamic parameters related to cardiac perfor-

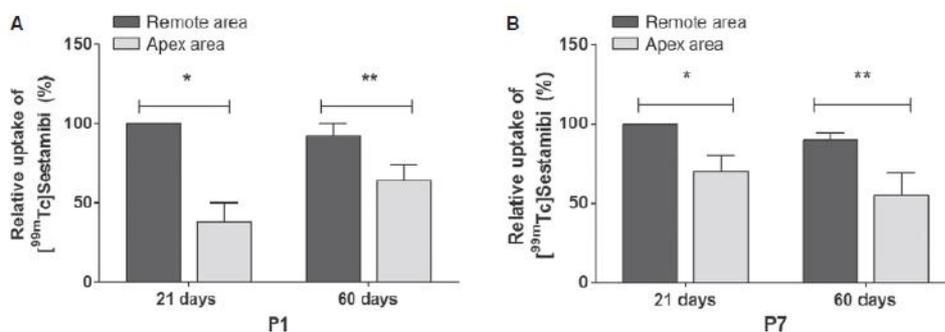


Figure 3. Myocardial perfusion performed by Single Photon Emission Tomography (SPECT) scanning of the heart segments of P1 and P7. Bars indicate relative up take of $[^{99m}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$ in the apex area (5 segments) and in the other portions of heart (12 segments) of (A) P1 ($n = 6$) and (B) P7 ($n = 5$). * $P < 0.05$.

Table 1. Biometric and hemodynamic parameters of sham animals, P7 and P1 under basal conditions.

	SHAM	P7	P1	ANOVA (P value)
<i>Biometry</i>				
Body weight, g	327 ± 53	306 ± 64	337 ± 28	0.45
Heart/BW, mg/g	0.0039 ± 0.0003	0.0040 ± 0.0004	0.0036 ± 0.0004	0.23
<i>Hemodynamics</i>				
HR, beats·min ⁻¹	370 ± 12.4	378 ± 15.4	341 ± 20.1	0.29
MAP, mmHg	85 ± 3.07	89 ± 5.8	98 ± 8.6	0.37
LVSP, mmHg	113 ± 5.8	119 ± 4.8	122 ± 9.01	0.48
LVEDP, mmHg	9 ± 1.7	13 ± 4.3	10 ± 0.9	0.58
CO, $\mu\text{L}/\text{min}$	40,600 ± 3489	35,771 ± 6619	41,100 ± 9339	0.80
EF, %	75 ± 7.8	65 ± 3.3	69 ± 14.06	0.47
SW, mmHg/mL	11,439 ± 940	10,383 ± 2265	13,391 ± 2852	0.082
+dP/dtmax, mmHg/sec	10,229 ± 961	10,123 ± 1044	10,674 ± 2233	0.99
-dP/dtmax, mmHg/sec	-6057 ± 567	-6061 ± 520	-5496 ± 456	0.80
SV, μL	110.5 ± 5.3	89.63 ± 12.02	111.4 ± 16.2	0.27
EDV, μL	151 ± 12.5	147 ± 25.5	177 ± 16	0.87

BW, body weight; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; LVSP, left ventricular (LV) systolic pressure; LVEDP, LV end-diastolic pressure; CO, cardiac output; EF, ejection fraction; SW, stroke work; +dP/dtmax and -dP/dtmax, maximal rate of LV pressure increment and decrement, respectively; SV, stroke volume; EDV, end-diastolic volume. Values are means ± SEM.

mance in response to afterload stress were compromised in P7 compared to P1 and sham groups (Fig. 4). Upon pharmacologic stress, changes in LVEDP from basal levels (mmHg) were significantly higher in the P7 group, whereas P1 and shams responded similarly suggesting an ejection deficit in P7 (P7: 5.6 ± 1.8 vs. sham: 1.3 ± 0.4 and P1: 0.6 ± 0.6 mmHg; $P \leq 0.05$, Fig. 4A). Also, the degree of change on SV from basal levels in response to pressure overload displayed similar behavior, with P7 showing the largest reduction in SV changes compared with P1 and sham (P7: -40.3 ± 4.9 vs. sham: -27.1 ± 4.1 ; P1 and $-6.9 \pm 11.4\%$ of change; $P \leq 0.05$;

Fig. 4B). The changes in SW from basal levels, which represents a global index of cardiac performance that depends on both pressure generation and ejection capability during each beat, displayed comparable profile between sham and P1 and diminished in P7 (P7: -4.8 ± 7.2 vs. sham: 15 ± 4.7 and P1: $47 \pm 17.8\%$ of change; $P \leq 0.05$; Fig. 4C). The slope of the linear relation between the End-Systolic Volume and Pressure (ES-PVR) decreased in the P7 group compared to shams and P1 consistent with a decreased systolic performance in P7 (P7: 0.97 ± 0.07 vs. sham: 1.5 ± 0.17 and P1: 1.3 ± 0.1 mmHg; $P \leq 0.05$; Fig. 4D). Finally, the slope of

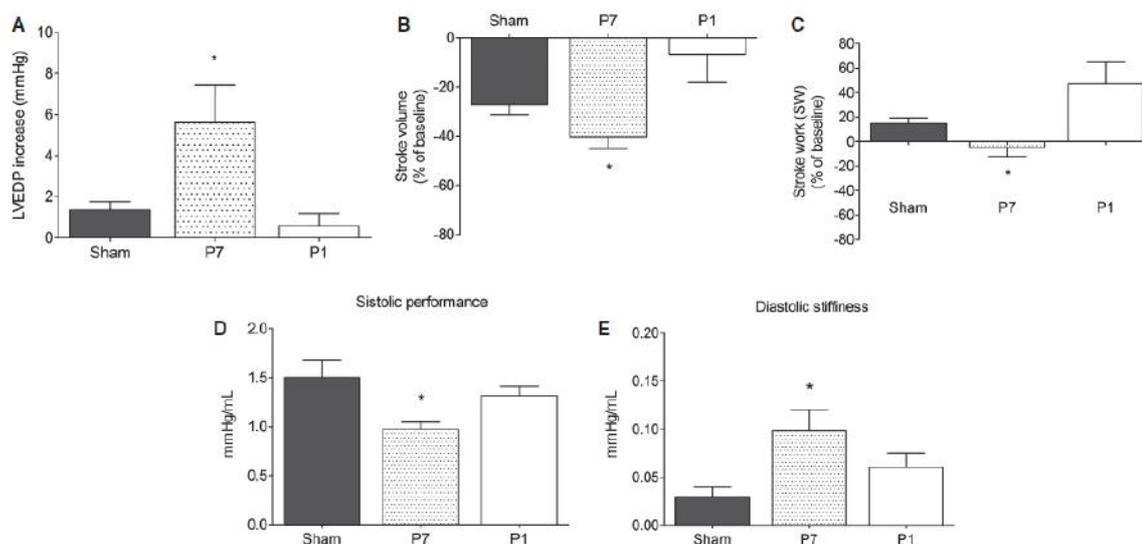


Figure 4. Cardiac response to afterload stress. Bars represent repercussions induced by phenylephrine injection, expressed as % of change from baseline (except for LVEDP, expressed as mmHg elevation over baseline), on the LV end-diastolic pressure (A) (LVEDP), (B) Stroke Volume, and (C) Stroke Work of sham ($n = 6$), P7 ($n = 6$) and P1 ($n = 5$) groups. Positive or negative values resulted from increase or decrease in the evaluated parameter, respectively. Overall slope values of the ESPVR as an index of (D) systolic performance and EDPVR as an index of (E) diastolic stiffness. * $P < 0.05$ versus P7.

the end-diastolic P–V relationship (EDPVR) increased in P7 compared to sham and P1 suggesting increased diastolic stiffness in the P7 group (P7: 0.1 ± 0.02 vs. sham: 0.03 ± 0.01 and P1: 0.06 ± 0.01 mmHg; $P \leq 0.05$; Fig. 4E).

In addition, the relationship between the changes in stroke work generation and the increments in systolic pressure (Fig 5) resulted in similar positive correlations in the sham and P1 groups (Pearson's r : 0.5; mean slope: 0.66 ± 0.07 and Pearson's r : 0.57; mean slope: 0.64 ± 0.04 , respectively), whereas the correlation in P7 group was almost flat (Pearson's r : 0.13; mean slope: 0.14 ± 0.05). This is in agreement with diminished systolic performance in P7 compared to sham and P1 groups. Other hemodynamic parameters showed no differences between groups under stress in relation to the baseline are shown in Table 2.

These findings were consistent with increased interstitial collagen fiber deposition (fibrosis) found in adult hearts from P7 compared to P1 and sham groups (P7: 11.4 ± 0.64 vs. sham: 5.1 ± 0.37 and P1: 6.9 ± 0.6 ; $P \leq 0.05$; Fig. 6G). Note that these findings are consistent with the results observed at 21-days postresection shown in Fig. 2H–J. The analysis with the Picosirius-polarization method showed that cardiomyocytes from sham and P1 groups at 60 days postresection were surrounded by thin, pale (weakly birefringent), greenish collagen fibers

(Fig. 6A–D). In the P1 group, few cardiomyocytes were surrounded by thick yellow fibers with increased birefringence (Fig. 6D). On the other hand, the ventricular muscle tissue in the P7 group exhibited many cardiomyocytes surrounded by thick, bright (strongly birefringent) yellow, or red collagen fibers (Fig. 6E and F).

Discussion

The main findings of the present work are that 1. early neonatal rat heart injury (P1) is associated with Troponin I- and Connexin 43-positive cells, and similarly to mice (Porrello et al. 2011b) this response is time-restricted, since it is lost in 7-day-old rats, and 2. this type of repair may provide long-term preservation of cardiac function, even under hemodynamic stress, despite the fact that the repair response is accompanied by tissue hypoperfusion. We used a reliable method to estimate the percentage of apex resection via magnetic resonance image scanning as an excluding criterion to avoid differences that might compromise comparisons and the claimed conclusions. Only rats exhibiting 15% or more of apical resected area were included in the study. Twenty-one days postresection, Troponin I-positive cells were the predominant cells in the repaired area of the apex in the P1 group due to the small, but noticeable, collagen fibers along the repaired area, demonstrating that this is not a complete

Table 2. Biometric and hemodynamic parameters of sham animals, P7 and P1 under stress.

	SHAM	P7	P1	ANOVA (<i>P</i> value)
<i>Hemodynamics</i>				
HR	-2.21 ± 0.28	-4.13 ± 0.77	7.0 ± 7.3	0.24
LVSP	47.2 ± 1.3	53.7 ± 2.2	53 ± 1.3	0.28
CO	-17.5 ± 12.5	-58.9 ± 9.8	-25.8 ± 11.6	0.06
EF	-35.72 ± 6.6	-51.33 ± 6.8	-30.44 ± 9.5	0.17
+dP/dtmax	51.9 ± 8.7	42.6 ± 5.3	45.1 ± 6.4	0.62
-dP/dtmax	81.2 ± 11.5	92 ± 12.5	92.7 ± 17.6	0.79

HR, heart rate; LVSP, left ventricular (LV) systolic pressure; CO, cardiac output; EF, ejection fraction; +dP/dtmax and -dP/dtmax, maximal rate of LV pressure increment and decrement, respectively. Values are means ± SEM and indicate the percentage of change from baseline.

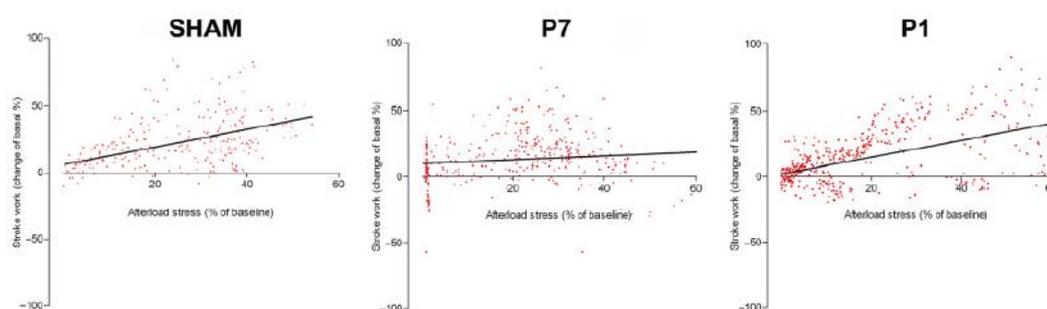


Figure 5. Linear regression curves of the stroke work as a function of increment in systolic pressure. Data are expressed as percentage average change of baseline values for all experimental groups.

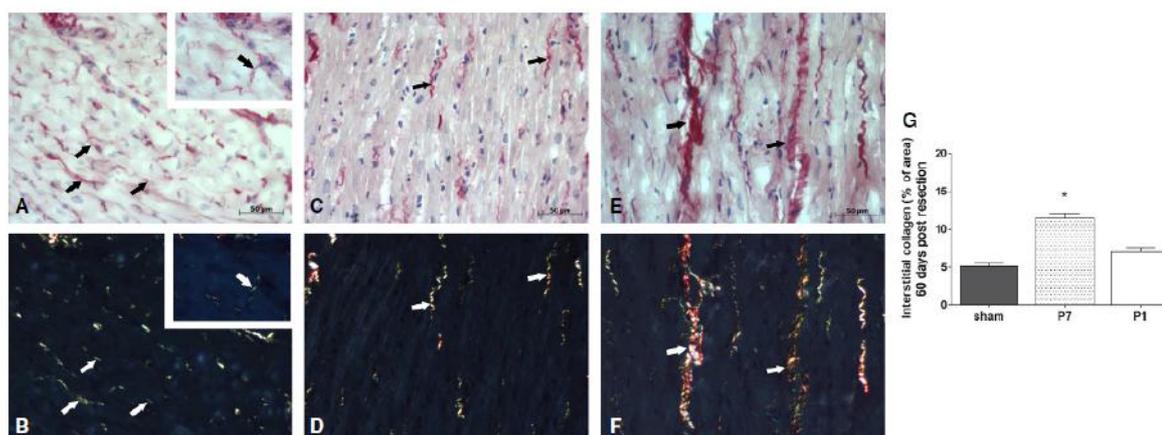


Figure 6. Interstitial collagen fiber quantification into heart coronal sections from P1 and P7 60 days of resection surgery according the Picosirius method. Images indicate Picosirius-hematoxylin (A, C, and E) and Picosirius-hematoxylin under polarized light (B, D, and F). (G) Bars indicate mean percentage of collagen fibers (mean ± SEM) of sham (*n* = 6), P1 (*n* = 5) and P7 (*n* = 6). **P* < 0.05 versus P7.

regenerative process. In contrast, when the injury was produced a few days later, in P7 animals, the reparative process was primarily via collagen fiber deposition and scar formation, even though small clusters of cardiac Troponin I-positive cells were seen in the repaired apex (Fig. 2). Our findings indicate that tissue restoration is not complete, but it is more comprehensive in 1- versus 7-day-old rats. In addition, there is apparent gross tissue architecture disarrangement in the P1 group as indicated by the lack of uniform alignment of the cardiac Troponin I- and Connexin 43-positive cells (Figs. 2, 6). These findings appear less robust than the ones reported in the original publication using 15% apex resection in mice (Porrello et al. 2011b) and contrast with the complete lack of cardiac repair reported by Andersen et al. in mice submitted to 10% apex resection (Andersen et al. 2014). One may speculate that the neoformation process is incomplete, because the majority of cardiomyocytes exit from the cell cycle early after birth (Li et al. 1996; Pasumarthi and Field 2002; Ahuja et al. 2007), and the remaining ones that hold this potential for the first few hours after birth might not be sufficient in number to provide complete restoration of the injured tissue. These observations prompted us to explore whether the vascular supply was compromised and the influence of the early repair on later overall cardiac function during adulthood. It is important to bear in mind that the relative injured area (between 16–18%) at the beginning of the protocol is significant, but at 60-day-old animals, it is most likely irrelevant due to the large change in heart size between newborns and adult animals. Thus, the long-term consequences observed may reflect differences in the initial reparative processes triggered in 1- or 7-day-old rats, and how these events contributed over time to minimize the initial damage while the organ was still growing. In this regard, the data from the tissue perfusion assessments, performed twice in each animal at 21 and 60 days post injury, are presented in relation to the viable remote tissue at each data point in all groups to minimize bias associated with the significant differences in heart weight at 21- and 60-day-old animals. This method of analysis is used to evaluate global perfusion in myocardial infarction both in experimental and clinical studies (Acton et al. 2006; de Oliveira et al. 2013). Since fibrosis replaces viable muscle tissue, SPECT imaging with [^{99m}Tc]Sestamibi is used clinically to estimate the infarct size, because the collagen area lacks tracer uptake (Gibbons 2011). The data analysis was performed blinded using 17 segments of the whole heart by Bulls-eye imaging (Nuyts et al. 1989) from the apex area (five segments) and from remote area (12 segments) of the same animals at 21 and 60 days after surgery. Indeed, SPECT scanning revealed an imbalance in the vascular supply in the healed tissue of both P1 and

P7 groups at 21 and 60 days after surgery. In P7 group, the lack of cardiomyocytes and potential inadequate neo-angiogenesis are consistent with the lower tracer uptake. In contrast, the hypoperfusion in P1 was not anticipated despite scarce collagen deposition in the regenerated area. One may speculate that in addition to inadequate blood supply, the neoformed cardiomyocytes may also display functional metabolic abnormalities.

The echocardiographic analysis under basal hemodynamic conditions has traditionally been the method of choice to evaluate cardiac function outcomes in gene/cell therapy approaches post-MI. However, we have previously demonstrated that rats that undergo experimental MI affecting a large (35–45%) area of the left ventricle indeed display normal hemodynamic parameters assessed by both noninvasive as well as direct intracardiac pressure/volume determination values. Under these conditions, the rodent, unlike humans, will display compromised cardiac function only under pharmacologic stress (Nakamuta et al. 2009; Danoviz et al. 2010; Goncalves et al. 2010; dos Santos et al. 2010). Indeed, the results show that under basal conditions, cardiac global parameters in adult animals were unchanged in all groups using direct hemodynamic assessment (Table 1). In contrast, upon pharmacologic afterload stress the cardiac response was compromised in the P7 and preserved in the P1 group (Figs. 4, 5). The preservation of cardiac function in P1, despite apex hypoperfusion, may occur due to a favorable combination of the replacement of functional cardiomyocytes and the absence of significant and rigid fibrotic tissue in repaired apex with no significant compensatory remodeling of the heart. On the other hand, lack of early cardiomyocyte formation and fibrosis scar in P7 led to unfavorable outcomes after phenylephrine administration, such as increased LVEDP, revealing ejection deficit, as commonly shown in myocardial infarction accompanied by elevated LVEDP (Iskandrian et al. 1981). This is consistent with the diminished ESPVR, indicating decreased systolic performance in the P7 group, which also displayed an increased slope in the end-diastolic P–V relationship, suggesting increased chamber stiffness, correlated with increased interstitial collagen fibers in P7 after 60 days.

The findings of the present study give support to the idea that cardiac repair occurs transiently after birth. The repair response, albeit not complete and accompanied by tissue hypoperfusion, rendered the tissue functional even during stress in adult rats, long after the initial events took place. These results are not readily translated to adult cardiac repair strategies, but indicate the usefulness of the model to gain insight into postnatal mechanisms of cardiac repair. Magnetic resonance imaging was performed immediately before and after injury to ensure that

16–18% of the LV from minute newborn rats indeed is excised despite the fact that the interior of the LV chamber is exposed. If the chamber is not properly sealed, as occurs in few animals, immediate death ensues due to large blood losses in the first few heartbeats after injury and this specific issues may be further explored to reconcile inconsistent findings using variations of this model.

Taken together, we provide, for the first time to rat, evidence that one-day-old animals display early repair capacity after apex resection and this response is lost in one-week-old animals similarly described for mice. The repair response is associated with long-term preservation of overall cardiac function, despite the fact that repair is incomplete and there is tissue hypoperfusion at 21 and 60 day post injury. These findings underscore the complexity of the early events associated with the cardiac healing and long-term impact that they may have on preservation cardiac function.

Acknowledgments

We thank Monica Nunes, Simone Fernandes, Julio Soares, Prof. Carlos Buschpiegel, Dr. Luciano de Figueiredo Borges, Dr. Fábio N Marques, Josefina Silva, Dr. Marco Antônio de Oliveira, and Dr. Vinicius Bassaneze for the assistance in animal manipulation, MRI performance, PSP analysis, SPECT scanning, and data and image analysis.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Acton, P. D., D. Thomas, and R. Zhou. 2006. Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 22:429–434.
- Ahuja, P., P. Sdek, and W. R. MacLellan. 2007. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 87:521–544.
- Andersen, D., S. Ganesalingam, C. H. Jensen, and S. P. Sheikh. 2014. Do neonatal mouse hearts regenerate following heart apex resection? *Stem Cell Rep.* 2:406–413.
- Anversa, P., and A. Leri. 2013. Innate regeneration in the aging heart: healing from within. *Mayo Clin. Proc.* 88:13.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, et al. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98–102.
- Borges, L. F. J. R., R. R. Dias, N. A. G. Stolf, J. B. Michel, and P. S. Gutierrez. 2008. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Human Pathol.* 39:437–443.
- Danoviz, M. E., J. S. Nakamuta, F. L. Marques, L. dos Santos, E. C. Alvarenga, A. A. dos Santos, et al. 2010. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One* 5:9.
- Gibbons, R. J. 2011. Tc-99 m SPECT sestamibi for the measurement of infarct size. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 16:321–331.
- Goncalves, G. A., P. F. Vassallo, L. dos Santos, I. T. Schettert, J. S. Nakamuta, C. Becker, et al. 2010. Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. *Gene Ther.* 17:305–314.
- Gonzalez, A., M. Rota, D. Nurzynska, Y. Misao, J. Tillmanns, C. Ojaimi, et al. 2008. Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ. Res.* 102:597–606.
- Haubner, B. J., M. Adamowicz-Brice, S. Khadayate, V. Tiefenthaler, B. Metzler, T. Aitman, et al. 2012. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging (Albany NY)* 4:966–977.
- Hsieh, P. C., V. F. Segers, M. E. Davis, C. MacGillivray, J. Gannon, J. D. Molkentin, et al. 2007. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat. Med.* 13:970–974.
- Iskandrian, A. S., B. L. Segal, and A. H. Hakki. 1981. Left ventricular end-diastolic pressure in evaluating left ventricular function. *Clin. Cardiol.* 4:28–33.
- Kajstura, J., N. Gurusamy, B. Ogorek, P. Goichberg, C. Clavo-Rondon, T. Hosoda, et al. 2010a. Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ. Res.* 107:1374–1386.
- Kajstura, J., K. Urbanek, S. Perl, T. Hosoda, H. Zheng, B. Ogorek, et al. 2010b. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ. Res.* 107:305–315.
- Kajstura, J., M. Rota, D. Cappetta, B. Ogorek, C. Arranto, Y. Bai, et al. 2012. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation* 126:1869–1881.
- Laflamme, M. A., and C. E. Murry. 2011. Heart regeneration. *Nature* 473:326–335.
- Li, F., X. Wang, J. M. Capasso, and A. M. Gerdes. 1996. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:1737–1746.
- Mummery, C. L., R. P. Davis, and J. E. Krieger. 2010. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci. Transl. Med.* 2: 27 ps17: 1–5.
- Nakamuta, J. S., M. E. Danoviz, F. L. Marques, L. dos Santos, C. Becker, G. A. Goncalves, et al. 2009. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One* 4:e6005.
- Nuyts, J., L. Mortelmans, P. Suetens, A. Oosterlinck, and M. de Rou. 1989. Model-based quantification of

C. Zogbi et al.

Rat Ventricle Resection and Cardiac Function

- myocardial perfusion images from SPECT. *J. Nucl. Med.* 30:1992–2001.
- de Oliveira, L. F., J. Mejía, E. E. de Carvalho, R. M. Lataro, S. N. Frassetto, R. Jr Fazan, et al. 2013. Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. *Arq. Bras. Cardiol.* 101:59–67.
- Porrello, E. R., B. A. Johnson, A. B. Aurora, E. Simpson, Y. J. Nam, S. J. Matkovich, et al. 2011a. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ. Res.* 109:670–679.
- Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, E. Simpson, J. A. Hill, J. A. Richardson, E. N. Olson, et al. 2011b. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331:1078–1080.
- Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, E. Simpson, B. A. Johnson, D. Grinsfelder, D. Canseco, et al. 2013. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110:187–192.
- Pasumarthi, K. B. S., and L. J. Field. 2002. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circulat. Res.* 90:1044–1054.
- dos Santos, L., E. L. Antonio, A. F. M. Souza, and P. J. F. Tucci. 2010. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88: 724–732.
- Senyo, S. E., M. L. Steinhauser, C. L. Pizzimenti, V. K. Yang, L. Cai, M. Wang, et al. 2013. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493:433–437.

Manuscrito submetido.

Saturi de Carvalho AET, Bassaneze V, Forni MF, Keuseyan AA, Kowaltowski AJ, Krieger JE. **Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative and Non-oxidative Energy Metabolism.** Submetido à revista *Cardiovascular Research*.

Manuscritos publicados em colaboração.

Damous LL, Nakamuta JS, Saturi de Carvalho AE, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Simões M de J, Krieger JE, Baracat EC. **Scaffold-based delivery of adipose tissue-derived stem cells in rat frozen-thawed ovarian autografts: preliminary studies in a rat model.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2015 Aug;32(8):1285-94. doi: 10.1007/s10815-015-0527-x.

Damous LL, Nakamuta JS, Saturi de Carvalho AE, Soares-Jr JM, de Jesus Simões M, Krieger JE, Baracat EC. **Adipose tissue-derived stem cell therapy in rat cryopreserved ovarian grafts.** *Stem Cell Research and Therapy.* 2015 Apr 15;6:57. doi: 10.1186/s13287-015-0068-3.