

Fernanda Gallinaro Pessoa

Papel da eritropoetina na atenuação da fibrose miocárdica

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

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pessoa, Fernanda Gallinaro

Papel da eritropoetina na atenuação da fibrose miocárdica / Fernanda
Gallinaro Pessoa. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Felix José Alvarez Ramires.

Descritores: 1.Eritropoetina 2.Fibrose 3.Remodelação ventricular 4.Infarto
do miocárdio 5.Ratos Wistar 6.Inflamação 7.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-102/14

DEDICATÓRIA

Ao meu primo, José Fabrício Deleo Pessoa, pela inspiração para a
realização deste trabalho.#DNA

AGRADECIMENTOS

“Senhor, tu me sondas e me conheces...

De longe entendes o meu pensamento”

Salmo 139

Ao Prof. Dr. Charles Mady, um líder nato, pelo caráter, ética e honestidade, valores que sempre levarei comigo, como pessoa e como profissional. Obrigada por ter me recebido na Família Miocardiopatias, pelas constantes palavras de incentivo durante todos esses anos. Meu eterno respeito e admiração.

Ao meu orientador, cardiologista e amigo, Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires, por ter me recebido de braços abertos e acreditado numa idéia que se tornou esta tese. Minha admiração, gratidão e respeito, por toda sua paciência, incentivo, zelo, carinho e atenção, em todos os momentos, desde os mais simples até os mais complexos. Sem seu apoio, seria impossível a realização deste trabalho.

À minha grande amiga Keila Fonseca, nossa amizade foi e é um grande presente. Durante a realização deste trabalho foi você que esteve ao meu lado para enfrentar todos os obstáculos, me apoiando durante minha ausência – enfim, você é e sempre será meu braço direito e muito mais do que uma colega de laboratório, saiba que sem a sua ajuda tudo seria muito mais difícil.

Ao amigo Orlando Ribeiro pelo cuidado mais que especial com os animais e pela dedicação ímpar na realização de todos os processos experimentais envolvidos neste projeto. Seu auxílio foi fundamental para o sucesso dessa tese.

À amiga Adriana Morgan por ter me apresentado ao Laboratório de Miocardiopatias - minha gratidão.

À Dra. Paula Buck, pela acolhida afetuosa, agradeço pelo carinho, dedicação, conselhos e ombro amigo, seu jeito meigo nos momentos felizes e sua palavra firme, quando se fez necessário, foram de fundamental importância para meu amadurecimento pessoal e profissional.

À família Cardio Geral, Profa. Dra. Bárbara Maria Ianni, Prof. Dr. Edmundo Arteaga Fernandez, Prof. Dr. Fábio Fernandes, Dr. André Luiz Dabarian, Dr. Ricardo Ribeiro Dias, Dr. Luciano Nastari, Roseli Chaves e Dra. Isabel Furquim pelo apoio e incentivos constantes.

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

À amiga Lúcia Maria de Oliveira pelo empenho e trabalho essencial na disposição final desta tese.

Aos amigos Dr. Maurício Rodrigues Jordão e Leandro Eziquiel de Souza pela ajuda na realização do modelo de infarto.

Ao Laboratório de Lípidos gerido pelo Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão e todas as suas colaboradoras, em especial à Priscila (pela contribuição efetiva nos ensinamentos de biologia molecular) e todos os alunos, pelo apoio.

Ao Laboratório de Patologia Cardíaca gerido pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi e suas colaboradoras: Joyce, Marcia, Renata e Sueli, pela experiência e ajuda inestimável na realização da imunohistoquímica. Meu agradecimento mais que especial à Renata e também à amiga Joyce por todo apoio não só durante a realização dos experimentos como também pela amizade, companheirismo e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular gerido pelo Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, Victor Debbas, Ana Lochabel Soares Moretti, Leonardo Tanaka e todos os colaboradores, pelo auxílio na realização das técnicas de estresse oxidativo, meu sinceros agradecimentos.

À Dra. Hiro Goto e funcionários do Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e cuidado com os animais.

Aos professores Prof. Dr. Renato Delascio Lopes, Dr. Richard Clinton Becker e Dr. Thomas Lee Ortel, que me acolheram na Duke University e proporcionaram a oportunidade de estagiar em um centro de excelência.

A todos os amigos com quem convivi durante minha permanência em Durham: Adriano, Alice, Amir, Andréa, Andressa, Ângelo, Clarissa, Claudio, Dani Casagrande, Danizinha, Fantine, Flávio, Hannah, João, Katia, Lyssandra, Mark, Nana, Parazinho, Ricardo, Roberto, Steve e Thaís.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro deste projeto, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado-sanduíche realizado na Duke University, que possibilitaram a execução dessa tese.

À Roberta de Souza pela grande ajuda na análise estatística.

À Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação, pelo apoio e dedicação.

À minha tia Wilma Deleo Pessoa, pela torcida e apoio constantes, pelas sugestões e correção da tese.

A todos os meus familiares, tios, primos e afilhado, pelo apoio constante durante essa jornada. Saiba que vocês são muito importantes para mim e fazem parte da minha história. Amo vocês.

Ao meu irmão Ricardo, meu grande amigo, por toda torcida, pela ajuda infinita, pelas conversas e desabafos, pelo carinho imenso e por tornar minha vida mais completa. Te amo!

Aos meus pais David e Elenira que me deram a vida e me apoiam incondicionalmente, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis, que não foram raros neste último ano, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso, pelo esforço, carinho, broncas e, principalmente, paciência, para ajudar a tornar meu sonho realidade, por me encorajar e me dar segurança para não desistir dos meus sonhos, pelo orgulho que vocês têm da filha que faz doutorado no InCor. Meu amor por vocês é imensurável. Saibam que essa conquista também é de vocês.

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmo, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade e nossa vida e a prova evidente que nada é ao acaso”

Antoine de Saint Exupéry

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	11
2.1.	Objetivo geral	12
2.2.	Objetivos específicos.....	12
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1.	Modelo experimental	14
3.1.1.	Tratamento	16
3.2.	Análise morfométrica	16
3.3.	Área de infarto	17
3.4.	Ecocardiograma	18
3.5.	Análise da inflamação, apoptose e sobrecarga ventricular	19
3.5.1.	Extração de RNA.....	19
3.5.2.	Tratamento do RNA total com <i>DNase free</i>	20
3.5.3.	Transcrição reversa (síntese de cDNA)	21
3.5.4.	Reação de qRT-PCR.....	21
3.6.	Estresse oxidativo	23
3.6.1.	ADMA.....	23
3.6.2.	Glutationa	25
3.7.	Angiogênese - VEGF	26
3.7.1.	Imunohistoquímica	26
3.8.	Análise hematológica.....	28
3.8.1.	Dosagem de hemoglobina.....	28
3.8.2.	Dosagem do hematócrito.....	29
3.9.	Análise estatística.....	30
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Análise morfométrica	32
4.2.	Área de infarto	34
4.3.	Ecocardiograma	35
4.4.	Estresse oxidativo	37
4.4.1.	ADMA.....	37
4.4.2.	Glutationa	38
4.5.	Expressão gênica: sobrecarga ventricular, apoptose e inflamação.....	39
4.6.	Angiogênese - VEGF	43
4.7.	Análise hematológica.....	44
4.8.	Limitações do estudo.....	46
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÕES	55
7.	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
ADMA	<i>asymmetric dimethylarginine</i> / dimetilarginina assimétrica
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i> / gene do peptídeo natriurético cerebral
C	citossina
°C	grau Celsius
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i> / ligante de quimiocina
CCr	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i> / receptor de quimiocina
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico complementar
DDVE	diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
dL	decilitro
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	desvio padrão
DTT	ditiotretol
ELISA	ensaio imunoenzimático
EPO	eritropoetina
EPO-R	receptor da eritropoetina
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> / e outros
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FE	fração de encurtamento
FEVE	fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
G	guanina
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> / <i>gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GSHP _x	<i>glutathione peroxidase</i> / glutatona peroxidase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hb	hemoglobina
Ht	hematócrito
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	insuficiência cardíaca
KCl	cloreto de potássio

kDA	kilodalton
kg	kilograma
M	molar
MDA	malondialdeído
mg	miligrama
MMP	metaloproteinase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> / ácido ribonucléico mensageiro
ng	nanograma
nm	nanômetro
NO	<i>nitric oxide</i> / óxido nítrico
O ₂ ⁻	superóxido
OH ⁻	hidroxila
ONOO ⁻	peróxido nítrico
p53	<i>tumor protein p53 gene</i> / proteína tumoral p53
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / reação da polimerase em cadeia
qRT-PCR	reação da polimerase em cadeia semi-quantitativa em tempo real
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / ácido ribonucleico
Rnase	ribonuclease
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
SOD	superóxido dismutase
SSA	ácido sulfosalicílico
T	timina
TGF-β1	<i>transforming growth factor, beta 1</i> / fator de transformação do crescimento beta 1
TNF-α	<i>tumor necrosis factor, alpha</i> / fator de necrose tumoral alfa
U	unidades
μL	microlitro
μm	micrometro
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> / fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fluxo de trabalho	15
Figura 2:	Quantificação da fração do volume de colágeno intersticial	17
Figura 3:	Medida da área de infarto	18
Figura 4:	Fórmula para cálculo da área de infarto	18
Figura 5:	Fotomicrografia do miocárdio do VE corado com <i>picrosirius red</i>	32
Figura 6:	Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo	32
Figura 7:	Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito	33
Figura 8:	Fração do volume de colágeno perivascular do ventrículo esquerdo	33
Figura 9:	Fração do volume de colágeno perivascular do ventrículo direito	34
Figura 10:	Área de infarto	35
Figura 11:	Ecocardiograma dos animais do grupo controle e infartado	36
Figura 12:	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo	36
Figura 13:	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo	37
Figura 14:	Concentração de ADMA	38
Figura 15:	Concentração de glutathiona total	39
Figura 16:	Expressão absoluta do gene BNP	40
Figura 17:	Expressão absoluta do gene Bcl-2	40
Figura 18:	Expressão absoluta do gene p53	41
Figura 19:	Expressão absoluta do gene TGF- β 1	42
Figura 20:	Expressão absoluta do gene TNF- α	42
Figura 21:	Expressão absoluta do gene Ccr-5	43
Figura 22:	Micrografia da marcação de VEGF no miocárdio do VE	43
Figura 23:	Análise semiquantitativa do VEGF:	44
Figura 24:	Dosagem de hemoglobina	45
Figura 25:	Dosagem de hematócrito	45

RESUMO

Pessoa FG. *Papel da eritropoetina na atenuação da fibrose miocárdica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: No processo de remodelamento miocárdico ocorre hipertrofia de miócitos e deposição exacerbada de colágeno no interstício, promovendo alteração na geometria e na função do coração. A eritropoetina (EPO) tem sido amplamente estudada nesse cenário, pois exerce efeitos cardioprotetores.

Objetivo: Avaliar o papel da EPO na atenuação do remodelamento estrutural, geométrico e funcional do coração, em modelo experimental de infarto do miocárdio.

Materiais e Métodos: Estudados 60 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos (Controle; Controle+EPO; Infartado; Infartado+EPO). A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo (FVCI-VE) e do ventrículo direito (FVCI-VD) foi determinada em cortes histológicos, corados com *picrosirus red* utilizando-se o programa *QWIN Image Processing and Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltd.)*. Essas mesmas lâminas e o software foram utilizados para a medida do tamanho da área de infarto. A análise anatômica e funcional foi realizada por ecocardiograma, avaliando-se a fração de encurtamento do VE (FE) e o diâmetro diastólico do VE (DDVE). Para o estresse oxidativo, dois kits comerciais foram utilizados na determinação da glutathiona e do ADMA. A sobrecarga ventricular, apoptose e inflamação foram realizadas por PCR, em tempo real. Na avaliação da angiogênese, utilizamos a técnica de imunohistoquímica. A análise hematológica foi realizada por exames laboratoriais para dosagem de hemoglobina e hematócrito. **Resultados:** A FVCI-VE (%) foi maior nos grupos infartados em relação aos grupos controles ($p < 0,001$), e atenuada pela EPO ($p < 0,001$, IAM vs IAM+EPO) (CT = $0,76 \pm 0,21$; CT+EPO = $0,63 \pm 0,15$; IAM+EPO = $1,43 \pm 0,92$; IAM = $3,47 \pm 2,5$). A FVCI-VD (%) também foi maior nos infartados em relação aos grupos controles (CT = $0,60 \pm 0,2$; CT+EPO = $0,83 \pm 0,3$; IAM+EPO = $1,01 \pm 0,55$; IAM = $1,60 \pm 1,15$) ($p < 0,001$), mas sem diferença estatística quando comparados os grupos IAM vs IAM+EPO. A EPO não influenciou o tamanho do IAM. Os grupos infartados tiveram piora na fração de encurtamento em relação aos controles (CT = $45,65\% \pm 6,4$; CT+EPO = $40,81\% \pm 4,44$; IAM+EPO = $17,32\% \pm 6,01$ e IAM = $20,11\% \pm 9,49$) ($p < 0,001$), mas sem proteção da EPO. Os grupos

infartados também tiveram maior dilatação do VE ($p < 0,001$) (CT = $0,73 \pm 0,06$; CT+EPO = $0,74 \pm 0,05$; IAM+EPO = $0,81 \pm 0,09$; IAM = $0,87 \pm 0,11$) sem atenuação da EPO. Os marcadores de estresse oxidativo, ADMA e glutathione, não evidenciaram ação da EPO nessa via. No que se refere à sobrecarga ventricular, o gene BNP apresentou maior expressão nos grupos infartados, em relação aos controles, porém não foi atenuado pela EPO ($p = 0,103$). Com relação à apoptose, os genes Bcl-2 e p53 mostraram-se mais expressos nos grupos infartados em comparação aos controles ($p < 0,05$), mas o Bcl-2 não foi ativado e nem o p53 inibido pela EPO. Os genes estudados na avaliação da inflamação foram TNF- α , TGF- β 1 e Ccr-5, também não demonstraram efeito anti-inflamatório da EPO. A semiquantificação da angiogênese pela marcação do VEGF também não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,95$). A análise da hemoglobina e do hematócrito apresentou diferença significativa em relação aos grupos tratados ou não com EPO ($p = 0,003$ e $p = 0,001$), respectivamente.

Conclusões: EPO atenuou significativamente o acúmulo de colágeno intersticial, mas não protegeu o coração quanto à dilatação, à disfunção e à sobrecarga ventricular neste modelo. Na fase crônica do infarto, avaliada neste estudo, a EPO não modulou as vias da apoptose, estresse oxidativo e inflamação.

Auxílio FAPESP: 2010/06834-2

Descritores: 1.Eritropoetina; 2.Fibrose; 3.Remodelação ventricular; 4.Infarto do miocárdio; 5.Ratos wistar; 6.Inflamação; 7.Estresse oxidativo

ABSTRACT

Pessoa FG. *The role of erythropoietin upon myocardial fibrosis* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Introduction: The process of myocardial remodeling include inappropriate collagen deposition in the interstitium developing an overall process of structural and geometric remodeling of the heart. Erythropoietin (EPO) may have a cardioprotective effects including inflammatory and oxidative stress modulation.

Objective: The aim of this study was to assess the role of EPO upon structural, geometric and functional remodeling at the heart. **Materials and Methods:** 60

Wistar rats were divided into 4 groups: Control, Control+EPO, Infarcted, Infarcted+EPO. Interstitial collagen volume fraction in the left (LV-ICVF) and right ventricle (RV-ICVF) was quantified by videomorphometry using a *QWIN Image Processing and Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltd.)*. These same slides and software were also used to measure the size of the infarct area.

The analyzed echocardiographic parameters were the left ventricle shortening fraction (LVFS) and diastolic diameter (LVDD). For oxidative stress, two commercial *kits* were used in to quantify ADMA and glutathione. RT-PCR was used to assess ventricular overload, apoptosis and inflammatory cytokines. For angiogenesis we used immunohistochemistry and hematological analysis was performed by laboratory tests for hemoglobin and hematocrit. Non parametric analysis was performed and $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results: LV-ICVF (%) was greater in the infarcted groups compared to controls ($p < 0.001$), and attenuated by EPO ($p = 0.05$, MI vs MI+EPO) (CT = 0.76 ± 0.20 ; CT+EPO = 0.62 ± 0.16 ; MI+EPO = 1.22 ± 0.86 ; MI = 3.80 ± 2.6). The RV-ICVF (%) was also greater in the infarcted groups compared to controls (CT = 0.60 ± 0.2 ; CT+EPO = 0.82 ± 0.28 ; MI+EPO = 1.02 ± 0.58 ; IAM = 1.62 ± 1.20) ($p = 0.007$) but without statistical difference between MI vs MI+EPO. Regarding infarct size we did not observe any difference. The infarcted groups had a worsening shortening fraction compared to controls (CT = $45.65\% \pm 6.4$; CT+EPO = $40.81\% \pm 4.44$; MI+EPO = $17.32\% \pm 6.01$ and MI = $20.11\% \pm 9.41$) ($p < 0,001$), but without EPO protection. The infarcted groups also showed increased LV dilation ($p < 0.001$) (CT = 0.73 ± 0.06 ; CT+EPO = 0.74 ± 0.05 ; MI+EPO = 0.81 ± 0.08 ; MI = 0.90 ± 0.11) without EPO

attenuation. Oxidative stress markers ADMA and glutathione did not show EPO action in this pathway. The BNP that evaluate ventricular overload, presented increased expression in infarcted groups ($p = 0.04$), but not attenuated by EPO ($p = 0.103$). The genes of apoptosis Bcl-2 and p53 were more expressed in infarcted groups when compared to controls ($p < 0.05$), but Bcl-2 was not activated and p53 inhibited by EPO. For Inflammation just 3 genes exhibit expression with statistical differences between groups (TGF- β 1, TNF- α , and CCr-5), but it did not show the EPO anti-inflammatory effect. The semi-quantification of angiogenesis by VEGF expression also did not show statistically significant differences between groups ($p = 0.95$). The analysis of hemoglobin and hematocrit presented significant differences compared to groups treated or not with EPO ($p = 0.003$ and $p = 0.001$), respectively. **Conclusions:** EPO significantly attenuated the accumulation of interstitial collagen, but it did not reflected in the protection of the heart dilation or dysfunction and oxidative stress, ventricular overload, apoptosis and inflammation of gene expression in this model.

Grant FAPESP: 2010/06834-2

Descriptors: 1.Erythropoietin; 2.Ventricular remodeling; 3.Fibrosis;
4.Myocardial infarction; 5.Wistar, rats; 6.Inflammation;
7.Oxidative stress

1. INTRODUÇÃO

Hochman e Bulkley utilizaram o termo remodelação, remodelamento ou remodelagem, pela primeira vez, em 1982, em trabalho sobre a substituição do tecido necrótico infartado por tecido fibrótico. Este termo foi utilizado, em um contexto mais amplo, em 1985, por Janice Pfeffer para caracterizar o aumento do ventrículo esquerdo após infarto experimental em ratos¹⁻³.

Atualmente, o remodelamento cardíaco pode ser definido como a modificação na expressão do genoma, alterações moleculares, celulares e intersticiais que seguem a lesão cardíaca, sendo manifestadas clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração. O processo de remodelamento cardíaco é influenciado, entre outros, pela carga hemodinâmica, ativação neuro-hormonal, modulação inflamatória e diferentes formas de perda celular. O miócito é a maior célula cardíaca envolvida neste processo. Outras estruturas envolvidas são o interstício, incluindo as proteínas pertencentes a este compartimento, as células não miocíticas como os fibroblastos, miofibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais pertencentes à vasculatura coronária. O remodelamento cardíaco é reconhecido como um aspecto importante da progressão da disfunção ventricular e é, portanto, um alvo terapêutico na insuficiência cardíaca de todas as etiologias⁴.

A agressão ao miocárdio é naturalmente seguida de formação de tecido fibrótico que altera a morfologia, a geometria, o comportamento elétrico e a função contrátil do músculo cardíaco. Tais mudanças ocorrem, em parte, devido à interrupção do sincício estrutural típico do miocárdio, sendo a fibrose um componente fundamental do remodelamento cardíaco⁵. Essa deposição inadequada de colágeno dá-se de forma reativa, em resposta a variados estímulos e mediadores, e de forma reparativa, frente à perda da unidade contrátil

por necrose ou apoptose. Tal mudança da estrutura miocárdica ocorre em graus variados, por diferentes vias ou estímulos, mas independe da etiologia da agressão⁶. No processo de remodelamento, secundário ao infarto agudo do miocárdio, por exemplo, ocorre afinamento da parede ventricular da área infartada, hipertrofia da área remota e fibrose em ambas as áreas⁵, mostrando um processo global de remodelamento estrutural e geométrico do coração.

Como resposta à agressão miocárdica, uma intensa ativação neuro-hormonal local e sistêmica ocorre, com efeitos endócrinos, autócrinos e parácrinos. Esta resposta promove a ativação e a liberação de uma complexa cascata de mediadores e sinalizadores, que por fim irão perpetuar e amplificar o processo de perda de miócitos, fibrose, dilatação, além de perda de força no miocárdio^{5, 6}.

Entre o complexo mecanismo ativado, a resposta inflamatória figura como um importante fator no estímulo ao remodelamento estrutural, geométrico e funcional do coração. Sabe-se que a via do TGF β -1 e do TNF- α , dentre outras, estimulam a síntese e o aumento de colágeno Tipo I e III, sendo, portanto, mediadoras fundamentais da fibrogênese. Além disso, a interação entre essas citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo é bem conhecida, fechando um ciclo complexo. A síntese dessas citocinas é estimulada pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) no miocárdio agredido e na área remota a ele. E de forma recíproca, as citocinas inflamatórias estimulam e perpetuam esse estresse oxidativo⁷.

A resposta inflamatória no miocárdio está relacionada com a ativação coordenada de uma série de genes de citocinas e de moléculas de adesão. Um elemento crítico, na regulação desses genes, envolve o NF- κ B, um fator de

transcrição redox-sensível. Quando o tecido é lesado, o NF- κ B é ativado por diversas substâncias locais, incluindo as ROS. No miocárdio infartado, a NADPH oxidase, que é uma das maiores fontes de O₂⁻ (superóxido), está co-localizada com o NF- κ B ativado e com o aumento da expressão do TNF- α em células inflamatórias^{7, 8}. Após a sua ativação, o NF- κ B estimula a resposta inflamatória e imune além do crescimento celular e a expressão de genes específicos^{7, 8}. Ele também desencadeia a expressão de genes das citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , interleucinas e outras, iniciando a resposta inflamatória^{7, 9}. Além da via do NF- κ B, estudos recentes sugerem que H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) pode interferir diretamente na produção cardíaca do TNF- α via p38 MAPK e, por sua vez, mediar a inflamação no miocárdio^{7, 10}.

Em modelos de infarto agudo do miocárdio em roedores, a expressão do TNF- α é significativamente aumentada no miocárdio infartado, bem como no miocárdio não infartado^{7, 11}. Este evento demonstra a importância das mais variadas vias de sinalização que levam ao estímulo da agressão miocárdica para áreas distantes a ela^{7, 12}. Além das citocinas, as quimiocinas são parte fundamental na resposta inflamatória e na captação de células não miocíticas para o interstício. As quimiocinas constituem uma superfamília de pequenas proteínas, com pesos moleculares que variam de 8-14 kDA¹³. Podemos dividi-las, de maneira geral, em duas categorias: as quimiocinas homeostáticas que são constitutivamente expressas em certos tecidos e podem ser responsáveis pela locomoção de leucócitos e formação basal da arquitetura fundamental de órgãos linfóides, e as induzidas que são fortemente reguladas por estímulos inflamatórios ou imunes, e participam ativamente nas reações inflamatórias, por induzirem o recrutamento de leucócitos¹³. São, inicialmente, descritas como reguladoras da

locomoção de leucócitos pela sua capacidade de estimular a migração dos mesmos durante os processos inflamatórios¹⁴. CCL-3, CCL-5, CCL-21 e seus receptores CCR-5 e CCR-7 são exemplos de quimiocinas com papel importante na inflamação, durante o remodelamento miocárdico, agindo na angiogênese, fibrose e infiltração leucocitária. Já, o CCL-21 e o seu receptor CCR-7 atuam na inflamação vascular e proliferação celular¹⁵.

As ROS são moléculas simples, caracterizadas pela presença de elétrons desemparelhados. São elas: superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peróxido nítrico ($ONOO^-$). Essas moléculas podem ser produzidas dentro da célula, por meio da ligação de elétrons mitocondriais durante a fosforilação oxidativa e por meio da ativação de diversas enzimas celulares incluindo NADPH oxidase, xantina oxidase e óxido nítrico sintase^{7, 16-18}. O radical O_2^- pode, rapidamente, reagir com o óxido nítrico (NO) para formar $ONOO^-$, ou converter o peróxido na forma OH^- ¹⁶. As ROS, em baixa concentração, agem como moléculas de sinalização, entretanto, quando produzidas em excesso, provocam efeitos nocivos^{16, 19}. A toxicidade associada à produção excessiva desses componentes é prevenida pelo sistema de defesa dos antioxidantes. As células vivas têm ambos os mecanismos de defesa, o enzimático e o não enzimático, para balancear os múltiplos eventos oxidativos a que são submetidas. O subgrupo enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutatona peroxidase ($GSHP_x$)^{20, 21}. O grupo não enzimático inclui uma variedade biológica de moléculas, como as vitaminas E e C.²² No miocárdio normal, como em outros tecidos, os antioxidantes protegem as células mantendo O_2^- e H_2O_2 em níveis baixos⁷. A deficiência dos antioxidantes também tem um papel no estresse oxidativo no coração infartado. Logo após a agressão

miocárdica, o estresse oxidativo ocorre, quando a produção de ROS é aumentada e/ou a reserva de antioxidante é suprimida⁷. Singal e Hill²³, em 1997, mostraram evidências da diminuição progressiva dos níveis de catalase, da atividade da GSHP_x bem como da vitamina E no coração infartado e na área não infartada. Estudo realizado por Yao Sun, em 2008, revelou também uma expressão reduzida do gene e da proteína SOD no miocárdio infartado⁷. Além disso, os níveis cardíacos da glutatona também estão diminuídos em pacientes com infarto agudo do miocárdio²⁴. Entretanto, a expressão da malondialdeído (MDA), da dimetilarginina assimétrica (ADMA) e da 3-nitrotirosina, marcadores do estresse oxidativo, estão significativamente aumentados no miocárdio infartado²⁵.

Na área remota à agressão isquêmica, muitos fatores contribuem para o estresse oxidativo. O aumento da produção mitocondrial de ROS tem sido sugerido como fator importante, além da sua relação com o aumento da atividade dos complexos da oxidase intracelular^{26, 27}. Além disso, a redução dos níveis de SOD é observada na insuficiência cardíaca pós-infarto²⁸. Estas observações indicam que o desequilíbrio, entre a produção de ROS e a capacidade de defesa dos antioxidantes, leva ao estresse oxidativo também no miocárdio não infartado⁷.

Assim, observa-se uma complexa cascata de interações entre mediadores inflamatórios e estresse oxidativo. Ambos, juntos ou separadamente, promovem a ativação celular, com estímulo à síntese de colágeno e alteração de sua degradação, além da perda de miócitos por uma ação tóxica direta e necrose ou por estímulo à apoptose, levando à reposição deste tecido perdido por colágeno, promovendo extensa fibrose do miocárdio⁷.

A eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína de 30,4 kDA que é produzida principalmente no rim e é mais conhecida por sua capacidade de regular a

produção de glóbulos vermelhos. Há evidências crescentes de que a EPO exerce efeitos protetores em vários tecidos, tais como cérebro, rins e coração, além do seu papel tradicional na hematopoiese²⁹⁻³¹.

No coração foi demonstrado que a EPO é protetora em modelos de infarto do miocárdio, isquemia e reperfusão e miocardiopatia^{32, 33}. Os mecanismos atribuídos são anti-apoptótico³¹, anti-inflamatório^{34, 35} e pró-angiogênico^{32, 33, 36}.

Burger *et al.*³¹ mostraram que o tratamento com EPO melhora a regulação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOs), aumentando a sua fosforilação e expressão nos cardiomiócito e elevando os níveis de NO. Os efeitos antiapoptóticos do NO são mediados por meio da inibição da NADPH oxidase, modulando a expressão de genes de proteção, tais como Bcl-2, pela inibição da caspase-3/caspase-8 e ativação por meio de S-nitrosilação. O efeito antiapoptótico da EPO ocorre, também, quando esta se liga a um receptor transmembrana específico: o EPO-receptor (EPO-R). Após a ligação, várias vias de sinalização são ativadas simultaneamente, incluindo a MAPK p42/44, JAK2-STAT5 e as proteínas da PI-3-AKT. Estudos realizados em linhagens de células humanas imortalizadas sugerem que a proliferação celular é regulada principalmente pela ativação de MAPK p42/44 ou JAK2-STAT5 e que a inibição de apoptose ocorre, principalmente, pela ativação do eixo PI-3K ou JAK2-AKT-STAT5³². Neste último caso, JAK2 fosforilada desencadeia a ativação da proteína STAT5. Essa, por sua vez, é translocada para o núcleo, onde se liga a elementos de resposta específicos de DNA e induz uma cascata de respostas celulares, incluindo o aumento da expressão dos genes antiapoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-XL. Este mecanismo antiapoptótico é importante, não só na eritropoiese, mas também parece desempenhar um papel importante em outros

processos com alto processo de apoptose, por exemplo, acidente vascular cerebral, doenças da retina e, eventualmente, infarto do miocárdio e cardiomiopatias³².

As células inflamatórias estão aumentadas na fase imediatamente pós-infarto do miocárdio e produzem metaloproteinases (MMPs) que modulam o remodelamento da matriz extracelular principalmente do colágeno. Nishia *et al.*³³, em 2006, demonstraram que a quantidade de MMP-2 no miocárdio não infartado cinco dias após o IAM, foi significativamente reduzida nos grupos tratados com EPO em comparação com o grupo com IAM não tratado, sugerindo assim outro efeito cardioprotetor da EPO.

Em estudo publicado em 2006, Li *et al.*³⁴ não somente confirmaram que a EPO aumenta a densidade capilar, mas também reduz a inflamação e a produção de citocinas. Vários estudos têm demonstrado que em ambos, animais e humanos, com corações danificados, os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) são aumentadas no plasma^{37, 38} e em leucócitos circulantes³⁹, bem como no próprio miocárdio. A elevação dessas citocinas inflamatórias é clara e diretamente relacionada ao grau de insuficiência cardíaca e inversamente relacionada à sobrevivência^{34, 40, 41, 42}. Embora seja especulativo, é concebível que a redução de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito benéfico da EPO no coração danificado³⁴.

Um mecanismo muito importante no remodelamento cardíaco pós-infarto é a angiogênese. Além da mobilização de células progenitoras do endotélio para a região isquêmica, o aumento da expressão do VEGF pode ocorrer pela estimulação direta da EPO em células endoteliais. O estudo publicado em 2012 por Kawachi *et al.*⁴³ mostraram claramente aceleração da angiogênese após a

administração de EPO no modelo de IAM em suínos. Os dados desse estudo mostraram que os níveis séricos de VEGF estiveram inicialmente aumentados, atingindo o pico máximo um dia após a indução do IAM e retornando a níveis basais em 4 dias. Porém quando foi analisada a expressão do mRNA do VEGF na área infartadas e na adjacente do grupo tratado com EPO, os níveis estavam significativamente maiores 28 dias após o IAM, em comparação com o grupo controle⁴³.

Em 2007, Westenbrink *et al.*⁴⁴ com modelo de IAM em ratos, demonstraram pela primeira vez, que células progenitoras derivadas da medula óssea estão envolvidas com o mecanismo sistêmico de reparação cardíaca, no tratamento com EPO. A neovascularização, induzida pela EPO, está associada com maior mobilização de células precursoras do endotélio vascular do miocárdio, as quais compreendem 30% do endotélio recém-formado. A expressão de VEGF está fortemente correlacionada com o crescimento capilar e a expressão local aparentemente desempenha um papel muito importante na indução da angiogênese no miocárdio isquêmico. A neovascularização aumentada mediada pelas células precursoras do endotélio resulta em uma melhora acentuada da microvascularização do miocárdio e também é associada a uma diminuição da dilatação do ventrículo esquerdo⁴⁴.

A deposição inadequada de colágeno no interstício miocárdico é de extrema importância, no que diz respeito à estrutura, geometria e função do coração. A fibrose resultante deste processo está relacionada com a perda de miócito, com a inflamação e com o estresse oxidativo, estando todos inter-relacionados. Sabe-se que a EPO pode interferir nesses mecanismos direta e indiretamente. Assim, a EPO poderia ter ação na prevenção da fibrose intersticial

e perivascular do miocárdio, com a atenuação de alterações na geometria e função do coração, o que justifica o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da eritropoetina na atenuação do remodelamento estrutural, funcional e geométrico do coração.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o papel da eritropoetina em modelo experimental de IAM:

- I. na prevenção do acúmulo de colágeno intersticial e perivascular;
- II. na prevenção do remodelamento geométrico e funcional;
- III. na redução da inflamação, do estresse oxidativo e da apoptose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo experimental

Foram estudados 60 ratos machos Wistar, pesando de 250 a 300 g, obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para a realização do modelo. Esses animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, com 3 animais em cada uma, com ração e água *ad libitum* e identificados com *chip* subcutâneo.

O protocolo seguiu as normas de cuidados em experimento animal definidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Estudos com Animais)⁴⁵ e UFAW (*Universities Federation for Animal Welfare*)⁴⁶, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e obteve suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2010/06834-2).

Os animais foram divididos em 4 grupos:

1. Controle sem EPO - 15 animais
2. Controle com EPO - 15 animais
3. Infartado sem EPO - 15 animais
4. Infartado com EPO - 15 animais

Para a realização do modelo de IAM, os animais foram anestesiados com uma combinação de xylazina (10 mg/kg) e ketamina (50 mg/kg), submetidos à intubação oro-traqueal com jelco 14G e colocados em ventilação mecânica com frequência de 60 ciclos/minuto e volume corrente de 2,5 mL. Uma incisão transversal foi realizada sobre o hemitórax esquerdo, para exposição dos músculos peitorais, os quais foram afastados. Em seguida, a toracotomia

esquerda foi realizada ao nível do 3º espaço intercostal para visualização da parede anterolateral do ventrículo esquerdo, próximo à base do coração. Após a pericardiotomia, a artéria coronária esquerda foi localizada na região entre o átrio esquerdo e a emergência da artéria pulmonar. A ligadura da artéria foi realizada com fio de *nylon* 6.0, 1 a 2 mm após sua origem. A isquemia resultante foi verificada pelo descoramento muscular da parede livre do ventrículo esquerdo. A parede do tórax foi suturada com fio de algodão 3.0 e o ar do espaço pleural drenado. Os músculos peitorais foram reposicionados. Os animais foram submetidos à eutanasia, após 4 semanas sob anestesia, com ketamina 50 mg/kg e xylazina 10 mg/kg e sob ventilação mecânica. Foi realizada laparotomia mediana, com dissecação e punção da veia cava e administração de solução com cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80 mL + KCl 19,1% 20 mL), até a parada cardíaca.

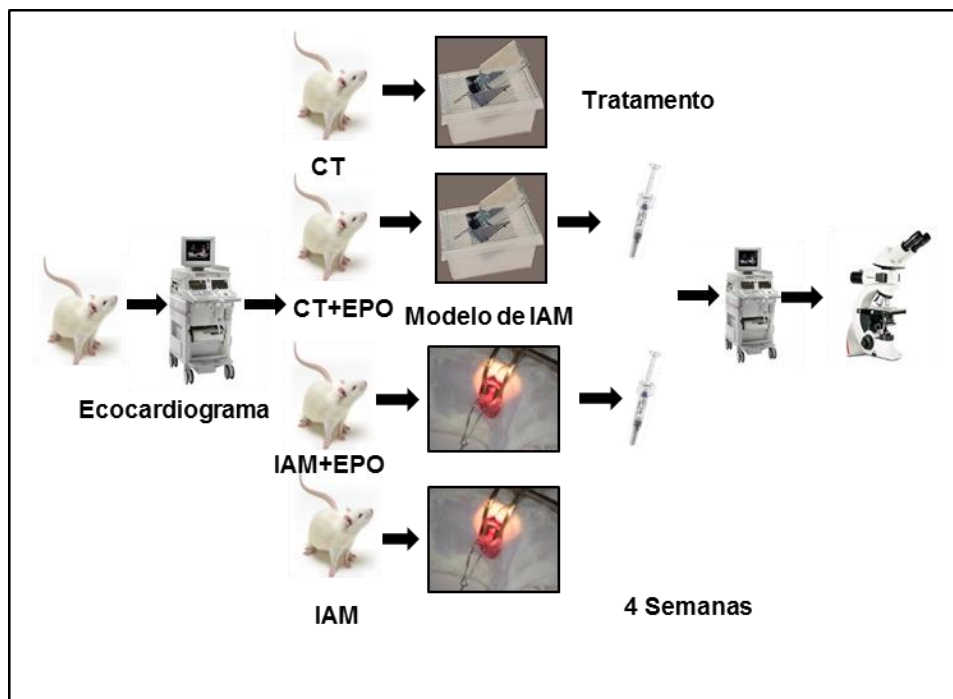


Figura 1: Fluxo de trabalho

3.1.1. Tratamento

O tratamento com EPO começou 24 horas após a indução do IAM. A dose foi de 1.000 U/kg de Eprex® 10.000 U (Janssen-Cilag), administrada por via subcutânea, 3 vezes por semana, durante 4 semanas.

3.2. Análise morfométrica

Após a remoção do coração, o mesmo foi dividido em base, 1/3 médio e ponta sendo o 1/3 médio fixado em formol 10% e emblocado em parafina, a base e ponta congeladas em nitrogênio líquido. Todo o procedimento foi conduzido utilizando-se material esterilizado.

Os corações em parafina foram submetidos a cortes transversais em secções de 4 μm , ao nível do equador, de modo a analisar ventrículo direito e esquerdo. Foram colocados em lâmina silanizada, para evitar o descolamento dos mesmos, durante os procedimentos histológicos. Os cortes do coração foram corados por *Picrosirius red*, coloração específica para o colágeno e utilizados na análise morfométrica para quantificação da fração do volume de colágeno intersticial e perivascular no miocárdio. Para isso, um corte de cada coração foi analisado pelo programa *QWIN Image Processing and Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltd.)*, acoplado à microscopia ótica. A quantificação da fração da área de colágeno intersticial foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se todos os campos de um corte, utilizando-se a objetiva de 5X. A fração da área de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo, remota a área do IAM, e do ventrículo direito, foi determinada separadamente (figura 2). O colágeno perivascular foi

determinado pela percentagem de área de colágeno perivascular sobre a área da luz do vaso, medido nos vasos que se apresentaram circulares no corte⁴⁷.

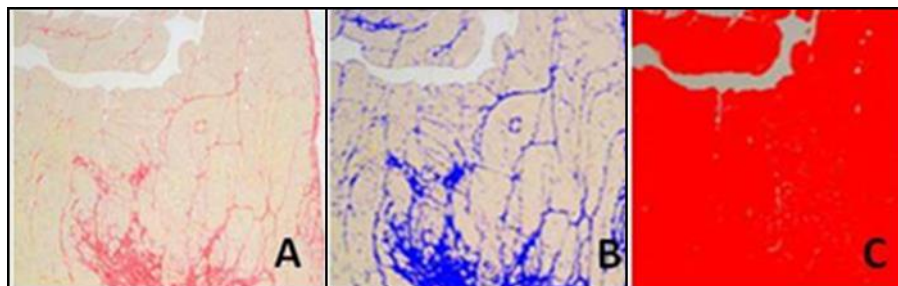


Figura 2: Quantificação da fração do volume de colágeno intersticial, onde (A) lâmina total, (B) quantificação da área de colágeno (azul) e (C) quantificação da área total do miocárdio (vermelho)

3.3. Área de infarto

Os mesmos cortes utilizados para a quantificação da fração do volume de colágeno foram utilizados nesta avaliação. Usando o processador de análise de imagem *QWIN Image Processing and Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltd.)*, os cortes ventriculares, englobando a circunferência ventricular esquerda inteira de cada amostra, foram fotografados. O IAM foi definido como correspondendo à região da parede ventricular, entre as bordas exteriores, onde foi identificado tecido de cicatrização. Foram medidas as circunferências das regiões infartadas e não infartadas. O tamanho da área infartada foi, então, calculada como a percentagem do comprimento do IAM em relação à circunferência ventricular esquerda inteira de cada secção^{2, 48} (figuras 3 e 4).

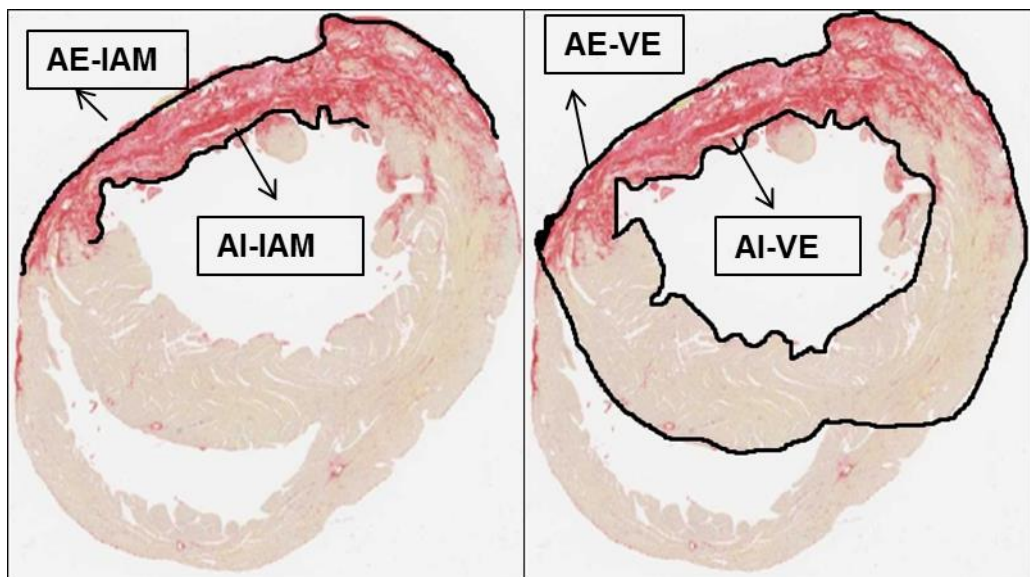


Figura 3: Medida da área de infarto: AE-IAM (área externa do infarto), AI-IAM (área interna do infarto), AE-VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI-VE (área interna do ventrículo esquerdo)

$$\text{Área de Infarto (\%)} = \frac{\frac{\text{AE-IAM} + \text{AI-IAM}}{2}}{\frac{\text{AE-VE} + \text{AI-VE}}{2}} \times 100$$

Figura 4: Fórmula para cálculo da área de infarto

3.4. Ecocardiograma

Foi realizado o ecocardiograma transtorácico modo M, bidimensional e Doppler pulsado, utilizando-se o aparelho Acuson, modelo Sequóia 512, com transdutor de 9 mm e frequência de 13 MHz. O padrão de contração regional e global foi avaliado, em tempo real, nos cortes paraesternal longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo (VE). As dimensões cardíacas sistólicas e diastólicas foram analisadas pelo modo M. A função ventricular sistólica foi calculada, utilizando-se a medida da fração de encurtamento (FE). Os animais foram submetidos a este exame no início e ao final do estudo, sendo previamente

anestesiados com uma combinação de ketamina (50 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. O exame foi realizado de acordo com a sua padronização em ratos sendo considerados, como valores normais, os ecocardiogramas de animais sadios do grupo controle⁴⁹.

3.5. Análise da inflamação, apoptose e sobrecarga ventricular

Essa análise foi realizada por meio da expressão gênica por PCR em tempo real. Os genes estudados foram: inflamação (TNF- α , TGF- β 1, CLL-3, CCL-5, CCL-21, CCr-5, CCr-7), apoptose (p53 e Bcl-2) e sobrecarga ventricular (BNP).

3.5.1. Extração de RNA

Para extração de RNA das amostras de tecido do coração foi utilizado 50-100 mg de tecido em 1,0 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™]). O material foi triturado no TRIzol[®] Reagent, até sua completa homogeneização, e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, seguiu-se o protocolo descrito na bula do reagente. Adicionando-se 0,2 mL de clorofórmio e agitando vigorosamente com as mãos, durante 15 segundos, a amostra foi colocada em incubação de 2-3 minutos na temperatura ambiente. Essa mistura foi, então, centrifugada a 4°C, a uma velocidade de 12.000 x g, durante 15 minutos. A parte aquosa foi removida e transferida para outro tubo limpo e estéril. Acrescentou-se 0,5 mL de álcool isopropanol e foi mantida em incubação na temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 x g, por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi removido e descartado, ficando apenas o precipitado, para ser lavado com 1 mL de álcool

etílico, agitando o tubo no vortex e centrifugando por 5 minutos, a uma velocidade de 7.500 x g a 4°C. O sobrenadante foi então descartado deixando o precipitado formado no fundo do tubo secar, sendo em seguida eluído com 30-50 µL de água DEPC. As concentrações das amostras foram determinadas por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 260/280 nm, utilizando-se o aparelho *nanodrop* (*Thermo Scientific*). Já, a qualidade das mesmas foi verificada por meio de corrida de eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota com 3 µg de RNA de cada amostra foi separada, para a realização do tratamento e transcrição reversa e o restante das amostras foi armazenado em *freezer* -80°C.

3.5.2. Tratamento do RNA total com DNase free

O RNA foi submetido ao tratamento com a enzima *Turbo DNA-Free*[™] da empresa *Ambion* (*The RNA Company*). O protocolo do fabricante foi seguido rigorosamente, utilizando-se a quantidade de 3 µg de RNA. Ao RNA foi adicionado 1,2 µL de *Turbo DNase Buffer* 10X e 1,0 µL de *Turbo Dnase*, as amostras foram, então, homogeneizadas vigorosamente e incubadas a 37°C, durante 20-30 minutos, no equipamento *Thermomixer Comfort* (marca *Eppendorf*). Ao final da incubação foi adicionado 1,2 µL do reagente de inativação da *DNase*, seguido de incubação por 5 minutos, em temperatura ambiente (25°C), também no *Thermomixer Comfort* (marca *Eppendorf*). Após término da incubação, seguiu-se a centrifugação da amostra a 10.000 x g por 1 minuto e meio e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo livre de *RNase*.

3.5.3. Transcrição reversa (síntese de cDNA)

Para transcrição reversa foi utilizada a enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)*. Foram utilizadas duas misturas: Mix 1 contendo: 10 µL de RNA tratado (3,0 µg); 0,5 µL de Oligo-(dT)₁₂₋₁₈ *Primer(Invitrogen™)* (0,5 µg/ µL); 0,5 µL de *random primers (Invitrogen™)* (3,0 µg/µL) e 1,0 µL de dNTP (*Invitrogen™*) (10 mM); e Mix 2 contendo: 4,0 µL de tampão da enzima (5X); 2,0 µL de DTT (0,1 M); 1,0 µL de *RNase Out™ (Recombinant Ribonuclease Inhibitor-Invitrogen™)* 1,0 µL de *SuperScript II*.

O Mix 1 (12 µL de volume) foi levado ao termociclador à temperatura de 65°C por 5 minutos. O programa foi pausado, e então, o Mix 2 (8,0 µL por amostra) foi acrescentado. O programa foi continuado com as seguintes ciclagens: 42°C por 2 minutos, 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C.

Os cDNAs foram posteriormente armazenados à temperatura de -20°C.

3.5.4. Reação de qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram feitas em placas de 96 poços, usando reagente *Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems – EUA)*, conforme descrito pelo fabricante e o equipamento utilizado foi o *Step One Plus Real-Time PCR Systems - Applied Biosystems*.

A reação foi preparada com 6 µL de *Sybr Green*; 3,0 µL de cDNA diluído 1:40 e 3,0 µL de *primer (forward e reverse)*, já diluídos na concentração determinada previamente na reação de otimização dos *primers*, necessária para uma eficiência de 100%. Essas quantidades foram utilizadas para elaboração da

reação de qRT-PCR em duplicata. O programa para a amplificação das amostras consiste em uma denaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos. (denaturação) e 60° C por 1 minuto (anelamento dos *primers* e extensão).

No final de todas as reações, as curvas de dissociação com temperaturas crescentes foram analisadas, a fim de verificar a amplificação de um único produto. As condições da reação foram idênticas às utilizadas para a construção das curvas de calibração e otimização dos *primers*. As amostras foram estudadas em duplicata, e para cada gene do estudo, foram amplificadas em paralelo as amostras controles cDNA. Todas as reações de PCR consideradas para análise apresentaram eficiência igual ou superior a 95%.

A expressão dos genes escolhidos para este estudo, foi normalizada em relação ao mRNA dos gene endógenos, GAPDH e Beta Actina, conforme descrito anteriormente por Livak *et al.* em 2001⁵⁰.

Os *primers* utilizados na avaliação por qRT-PCR foram:

Gene	Sequência Forward e Reverse	Acesso no Gene Bank
GAPDH Endógeno	F: 5' ATGTATCCGTTGTGGATCTGAC 3' R: 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'	NM_017008
Beta actina Endógeno	F: 5' GTGCTSTGTTGCCCTSGSCTTCG 3' R: 5' TCGAATCGCACCTGATCACTA 3'	NM_031144
p53 alvo	F: 5' CAGCTTTGAGGTTTCGTGTTTGT 3' R: 5' ATGCTCTTCTTTTTTGC GGAAA 3'	NM_030989
Bcl-2 alvo	F: 5' GGAGCGTCAACAGGGAGATG 3' R: 5' GATGCCGTTTCAGGTA CTAG 3'	NM_016993
TNF- α alvo	F: 5' GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT 3' R: 5' TGCTACGACGTGGGCTACG 3'	NM_012675.3
TGF- β 1 alvo	F: 5' CAACAATTCTGGCGTTACCTT 3' R: 5' AAGCCCTGTATTCCGCTCTCCTT 3'	NM_021578.2
BNP alvo	F: ATCTGTCCGCTGGGAGGT R: TGG ATC CGG AAG GCG CTG TC	NM_031545
Ccl-3 alvo	F: 5' CCGCTGCCCTTGCTGTT 3' R: 5' CGCTGAGAAGACTTCGTTCCA 3'	NM_013025
Ccl-5 alvo	F: 5' CACAGTCTCTGCTTCAGGTACCA 3' R: 5' GCGGCTGCAACGAGGAT 3'	NM_03116.3
Ccl-21 alvo	F: 5' CCATCCAGCAATCCTGTTC 3' R: 5' TCAGGGTTTGC GCATAGCT 3'	NM_001008513.1
Ccr-5 alvo	F: 5' AAAAGCTGAAGAGCATGACTGATATC 3' R: 5' GCCCA AATGGGAGTGTGA 3'	NM_053960.3
Ccr-7 alvo	F: 5' CGGATACCTACCTGCTCAACCT 3' R: 5' GTAGGCCCGAGAAGGGAAGGA 3'	NM_199489.3

3.6. Estresse oxidativo

Para análise do estresse oxidativo foram utilizados dois *kits* comerciais, ADMA *direct (mouse/rat) ELISA kit (Enzo Life Sciences[®])*⁵¹, usado para determinação quantitativa da ADMA em plasma e soro de camundongos e ratos e o *DetectX[®] Glutathione Fluorescent Detection kit (Arbor Assays)*⁵², para quantificação da glutathiona.

3.6.1. ADMA

Para a realização da análise o protocolo do fabricante foi seguido rigorosamente. Primeiramente, foram deixados todos os reagentes e amostras em temperatura ambiente (18°C a 26°C). Foram utilizados 100 μ L de cada amostra

nas respectivas colunas filtrantes (CFD) e 300 μL do tampão de reação (DERBUF). Essa coluna sofreu centrifugação a uma temperatura de 4°C e rotação de 14.000 x g durante 20 a 30 minutos, e o filtrado, cerca de 200 μL , foi diluído com 200 μL de DERBUF. Prepararam-se frascos diferenciados com 200 μL : amostra padrão (STD), amostras controles prontas para uso (CTRL) e amostras filtradas. Adicionaram-se 50 μL de reagente de derivação (DER) recentemente preparado em cada frasco (STD, CTRL e Amostras) e, em seguida, esses frascos foram colocados sob agitação de 180 a 240 rpm, durante 45 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 250 μL de tampão de diluição (CODIL), e agitados vigorosamente, deixando-se incubar mais 45 minutos sob agitação de 180 a 240 rpm à temperatura ambiente.

A montagem da placa começou com um ciclo de lavagem, com 250 μL de tampão de lavagem, e somente depois é que foram determinados os locais de inserção dos padrões (STD), controles (CTRL) e amostras, utilizando 100 μL de cada. Cada poço recebeu 100 μL de anticorpo ADMA (AB) e, então, a placa foi incubada por um período de 15 a 20 horas a uma temperatura de 2° a 8° C.

O próximo passo foi aspirar todo líquido dos poços e seguir novo ciclo de lavagem com 250 μL de tampão de lavagem por 5 vezes. Em seguida, foram acrescentados mais 200 μL de anticorpo POD (2.AB) e seguiu-se um período de incubação de 1 hora, sob agitação e em temperatura ambiente. Passado esse tempo, o líquido novamente foi aspirado e seguiu-se novo ciclo de lavagens, com 250 μL de tampão de lavagem, durante 5 vezes. Foi adicionado substrato TMB (SUB), incubado de 6 a 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Depois, foram adicionados 100 μL de solução de parada (STOP) em cada poço e agitado. Imediatamente, foi determinada a leitura sob faixa de 450 nm como referência.

3.6.2. Glutathiona

O soro utilizado foi homogeneizado com o mesmo volume de SSA (ácido sulfosalicílico) 5% para desproteinização. A mistura foi incubada a 4°C, durante 10 minutos e, depois, centrifugada a uma velocidade de 14.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C para remover o precipitado de proteínas. Para análise imediata diluiu-se 1 volume da amostra tratada para 1,5 volumes de *Assay Buffer*. Nessa fase, a concentração do SSA era de 1%. Todas as amostras foram utilizadas em um prazo de 2 horas, conforme recomendação do *kit*, assim como a preparação dos reagentes seguiu rigorosamente as orientações do mesmo.

Os reagentes foram tirados da geladeira e permaneceram em temperatura ambiente durante 30 minutos antes do início do protocolo. Foram pipetados 50 µL de amostra tratada, reagentes padrão e controles nos poços da placa, fazendo cada um em duplicata. Em seguida foram adicionados 25 µL do reagente *ThioStar*[®], em cada poço. A placa foi, então, tampada e levada para delicada agitação e mantida em incubação durante 15 minutos. Posteriormente, foi lida a fluorescência em leitor com emissão de fluorescência a 510 nm com excitação de 370-410 nm, e com esses dados, foi possível determinar a concentração da glutathiona livre. Na sequência, adicionaram-se 25 µL do reagente *Reaction Mixture* em cada poço, a placa foi tampada, agitada delicadamente e incubada em temperatura ambiente, por 15 minutos. A próxima leitura foi realizada nas mesmas condições da leitura anterior e os dados obtidos foram referentes à determinação da concentração da glutathiona total.

3.7. Angiogênese - VEGF

3.7.1. Imunohistoquímica

Primeiramente, foi realizada a desparafinização dos cortes com 3 banhos de xilol (10 min cada), seguidos de 3 banhos em etanol 100%, 2 banhos em etanol 95% e 1 banho em etanol 70%. As lâminas foram então lavadas 5 vezes em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada com Tripsina 0,075% (Tripsina Sigma 0,075 g para 100 mL de PBS pH: 7,4 s/ *Tween20*). Colocou-se a tripsina sobre o corte e as lâminas foram incubadas, em câmara úmida, por 5 minutos a 37°C. Após os 5 minutos, os cortes foram lavados 5 vezes em água. Seguiu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio 20 vol (ou 6%). Foram realizadas duas incubações, de 8 minutos cada, nessa solução. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água, secadas e identificadas com caneta *Pap Pen* (*Invitrogen Cat: 00-8899*).

O próximo passo foi o bloqueio de proteína, com o reagente *CAS Block* (*Invitrogen, cat. 00-8120*), foi colocada uma quantidade do reagente *CAS Block* suficiente para cobrir o corte. As lâminas foram, então, colocadas em câmara úmida por 5 minutos em temperatura ambiente (25°). Após a incubação, o excesso de *CAS Block* foi retirado.

O anticorpo primário anti-VEGF (ab 46154- *abcam*[®]) foi diluído em *Antibody Diluent Reagent Solution* (*Invitrogen, Cat: 003218*), na concentração sugerida pela própria bula (1:200). Foi colocada, sobre o corte, quantidade suficiente do anticorpo diluído (aproximadamente 100 µl) e incubado em temperatura ambiente (25°C), em câmara úmida, por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão PBS 5 vezes.

A partir deste ponto foi utilizado o *kit Picture Max (Invitrogen, Cat: 87-8983)*. Seguindo o protocolo do *kit*, a solução A do polímero *Picture Max* foi colocada sobre os cortes (quantidade suficiente para cobrir o corte) e as lâminas levadas para mais uma incubação, em temperatura ambiente, por 30 minutos, mais 5 lavagens com tampão PBS. Em seguida, foi colocada sobre os cortes (quantidade suficiente para cobrir o corte) a solução B do polímero. Novamente, as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente, por 30 minutos, e lavadas em tampão PBS 5 vezes. A revelação foi feita com DAB 1:50 (*DakoCytomation - California/Code nº K3468*) e a contra coloração em hematoxilina de Harris.

As lâminas foram, então, lavadas cuidadosamente em água corrente e preparadas para montagem passando, novamente, por rápidas incubações em etanol 70%, 95% e 100% e 3 incubações de xilol para, depois serem montadas com meio de montagem permanente e lamínula.

A análise da imunohistoquímica foi realizada de forma semiquantitativa (porcentagem de área marcada e intensidade da coloração). Para tal, primeiramente as lâminas foram escaneadas pelo aparelho scan scope da empresa Aperio (*EUA-Vista, CA*). Seguiu-se quantificação no aumento de 20x, utilizando-se o *software* livre *Image Scope*, apenas para visualização das imagens scaneadas anteriormente. As análises foram realizadas por dois observadores independentes, utilizando-se os seguintes parâmetros:

Análise qualitativa	Análise semi-quantitativa
Intensidade	Área marcada
0	0
1: fraco	1: até 25%
2: moderado	2: até 50%
3: forte	3: até 75%
	4: >75%

3.8. Análise hematológica

3.8.1. Dosagem de hemoglobina

Para dosagem da hemoglobina (Hb), 20 μ L de sangue total foram coletados com anticoagulante e transferidos para o tubo contendo 6 mL de água ultra pura, observando-se o cuidado sobre a qualidade da amostra. Assim, o sangue venoso colhido não continha coágulos e o sangue capilar deveria fluir facilmente durante a pipetagem. A seguir, foi adicionada 1 gota de solução de hidróxido de amônio a 1% no tubo e o mesmo foi homogeneizado por inversão. A leitura foi feita no espectrofotômetro (*Celm E210D*) contra água, em comprimento de onda de 540 a 544 nm. A densidade ótica (absorbância) foi obtida, e assim, multiplicou-se seu valor pelo fator encontrado na curva de diluição do padrão de hemoglobina. Os padrões de hemoglobina (*Bioclin*) são encontrados no comércio, em quantidades variáveis, mas em geral contêm 11,3 g/mL de hemoglobina. O padrão fornece com precisão seu conteúdo de hemoglobina/mL. A densidade ótica obtida, dividida pela concentração de hemoglobina da solução de origem, resulta no fator que foi o mesmo para as várias determinações. No caso de haver pequenas variações, o fator final foi a média dos encontrados.

Outros cuidados adotados foram o controle periódico das curvas, com padrões de hemoglobina, preenchimento adequado das cubas do espectrofotômetro, contendo quantidade suficiente da solução de hemoglobina, especialmente na fenda por onde passa a luz do aparelho. Igualmente, as amostras foram processadas no mesmo dia da coleta, ou, na impossibilidade de serem realizadas no mesmo dia, foram armazenadas em refrigeração 4°C por até um dia.

Formulação do cálculo:

Hb = absorvância x padrão Hb (concentração)

Hb = g / dL

3.8.2. Dosagem do hematócrito

Tubos capilares, contendo sangue total até próximo a sua abertura, foram selados com cera apropriada ou selados em lamparina, observando-se o cuidado para não aquecer demasiadamente e provocar hemólise. O tubo selado forma uma pequena gota transparente denominada “pérola de vidro”. A seguir, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Fanem 211), a 10.000 rpm durante 5 minutos, após a qual se realizou a leitura em cartela padronizada, cujas divisões vão de 0 a 100, correspondendo às porcentagens. A parte inferior do tubo foi ajustada para conter as hemácias centrifugadas na linha “0” e o limite superior do soro na linha “100”, deslizando verticalmente o tubo, até chegar à junção dos dois extremos. O limite dos glóbulos vermelhos refere-se à porcentagem, indicada com a linha que coincidir com a sua altura, determinando-se, assim, a leitura da amostra.

3.9. Análise estatística

Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação das medidas entre os 4 grupos. Quando diferenças significativas entre os grupos foram observadas, as múltiplas comparações entre pares de grupos foram feitas, aplicando-se a correção de Bonferroni⁵³.

O nível de significância dos testes foi de 5%, ou seja, diferenças significativas foram consideradas, quando o nível descritivo do teste (valor de p) foi menor que 0,05. Vale verificar os casos em que o valor de p foi maior que 0,05, mas menor ou igual a 0,10. Nestes casos, as evidências de diferenças existem, porém são mais fracas e as comparações, isoladas entre pares de grupos, por testes não paramétricos de Mann-Whitney⁵³, foram observadas.

Foi utilizado o *Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 19 para as estatísticas descritivas, gráficos e testes não paramétricos.

4. RESULTADOS

4.1. Análise morfométrica

A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo FVCI-VE (%) (figura 5) foi maior nos grupos infartados em relação aos grupos controles ($p < 0,001$), e foi atenuada pela EPO ($p = 0,05$) (figura 6). A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito FVCI-VD (%) também foi maior nos infartados, em relação aos grupos controles ($p = 0,007$), mas sem diferença estatística entre IAM e IAM+EPO ($p = 0,954$) (figura 7).

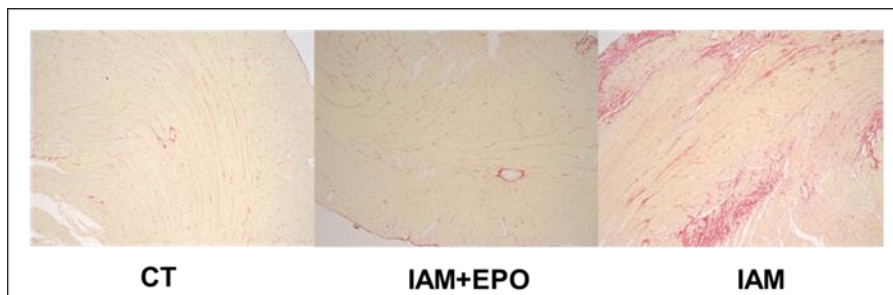


Figura 5: Fotomicrografia do miocárdio do VE corado com *picrossirius red* (em vermelho o colágeno)

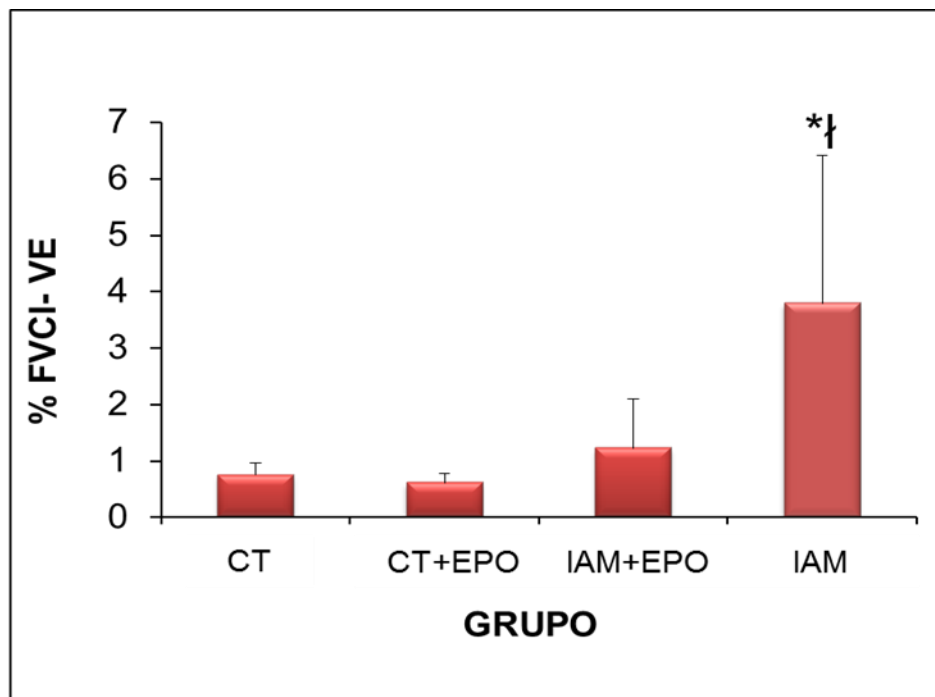


Figura 6: Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo FVCI-VE; * $p < 0,05$ (IAM vs CT e CT+EPO) e $p = 0,05$ (IAM+EPO vs IAM)

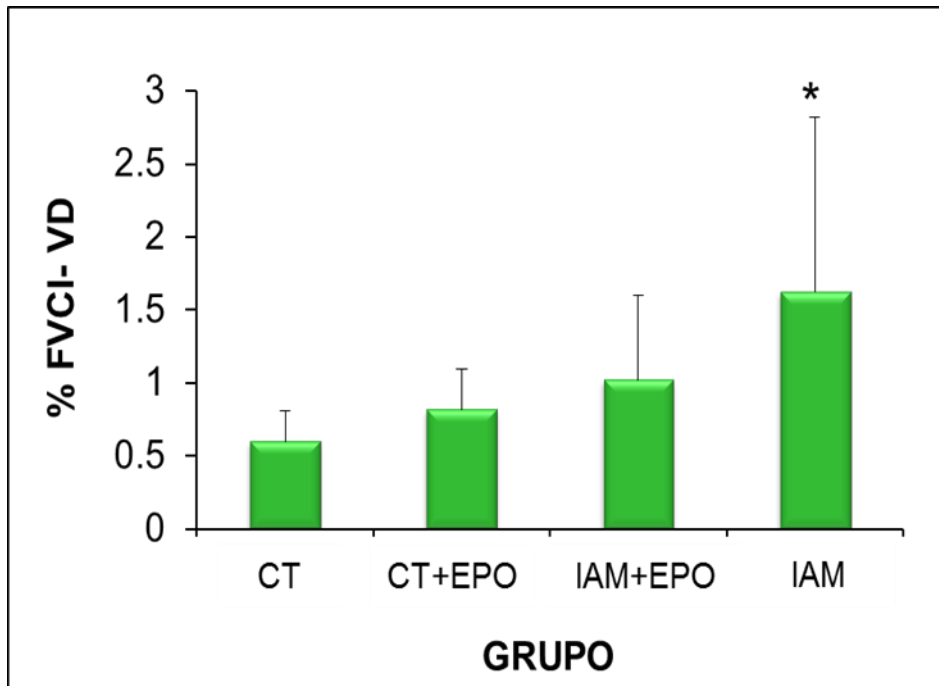


Figura 7: Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito FVCI-VD; * $p < 0,05$ (IAM vs CT)

A quantificação do volume de colágeno perivascular não apresentou diferenças significativas entre os grupos (figuras 8 e 9).

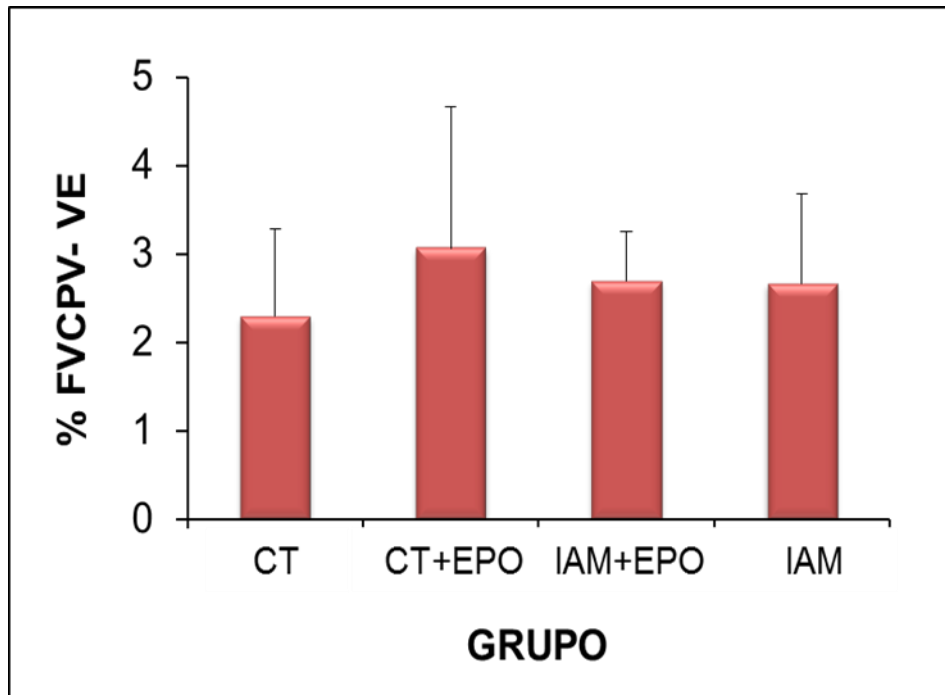


Figura 8: Fração do volume de colágeno perivascular do ventrículo esquerdo FVCPV-VE; $p = 0,763$

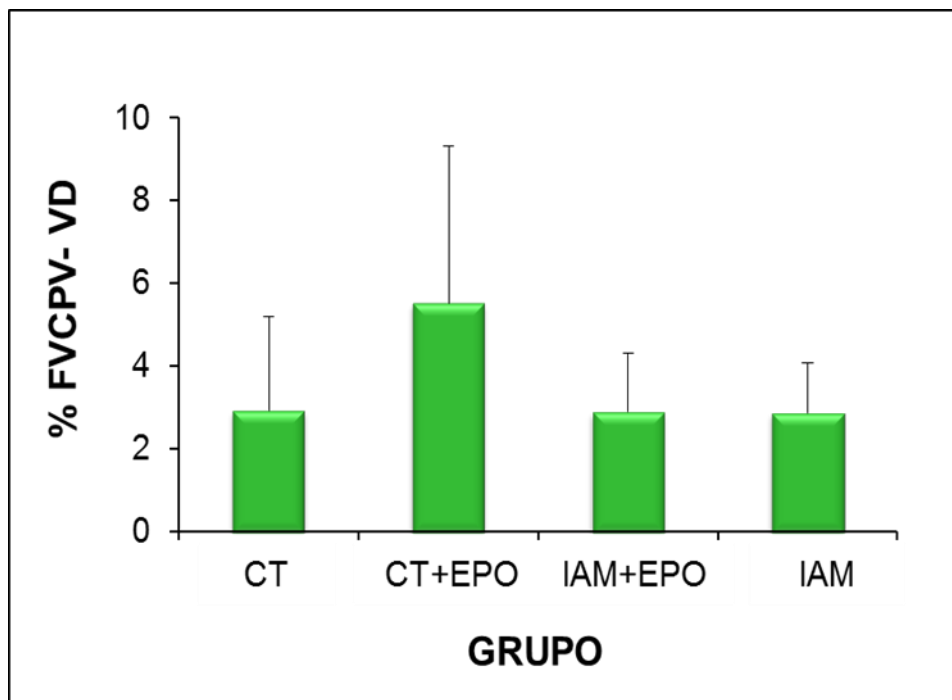


Figura 9: Fração do volume de colágeno perivascular do ventrículo direito-FVCPV-VD ($p = 0,382$)

4.2. Área de infarto

A comparação entre os grupos infartados não demonstrou influência da eritropoetina no tamanho do IAM ($p = 0,757$) (figura 10).

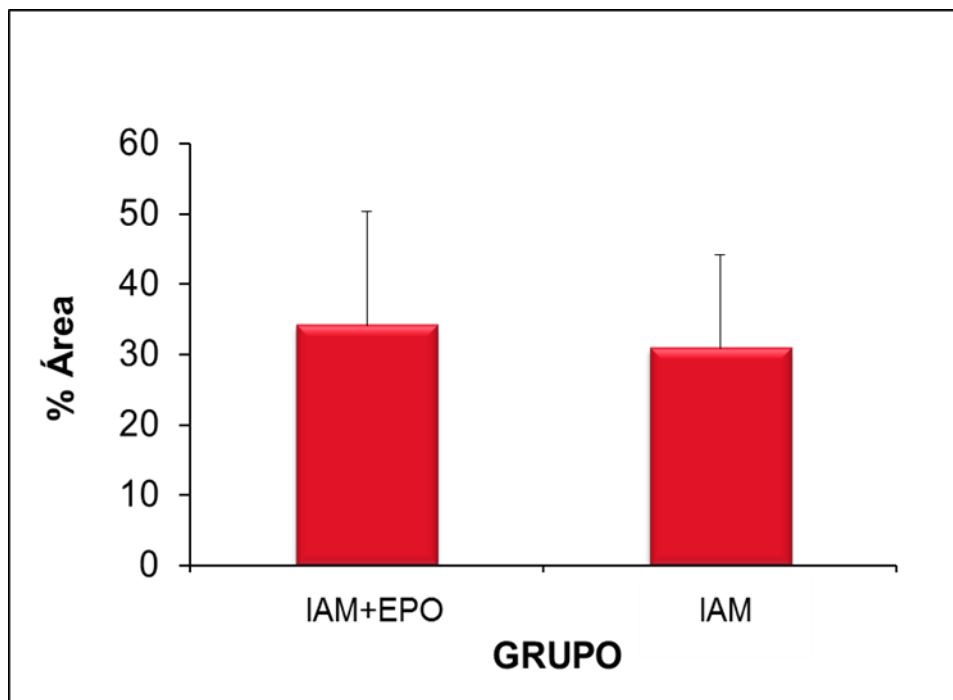


Figura 10: Área de infarto

4.3. Ecocardiograma

A EPO não apresentou efeitos protetores, quanto à dilatação e à disfunção do VE neste modelo (figura 11). No grupo IAM, o DDVE foi $0,89 \pm 0,11$ cm e no grupo IAM+EPO foi $0,81 \pm 0,088$ cm ($p = 0,79$) (figura 12). Os grupos infartados apresentaram menores valores de fração de encurtamento, em relação aos grupos controles ($p \leq 0,01$). Entretanto, mais uma vez a EPO não atenuou essa disfunção (figura 13).

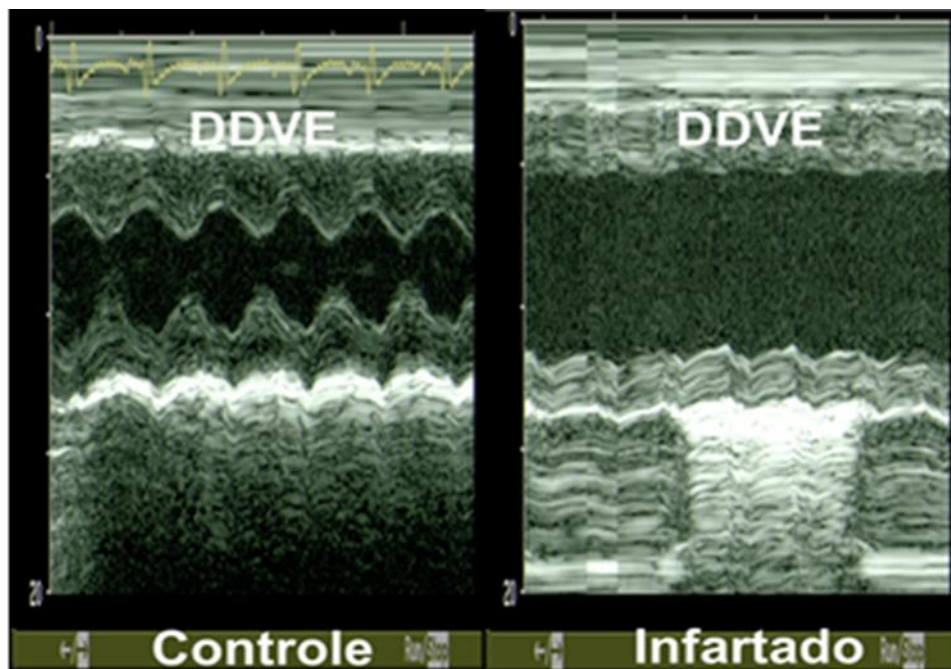


Figura 11: Ecocardiograma dos animais do grupo Controle e Infartado

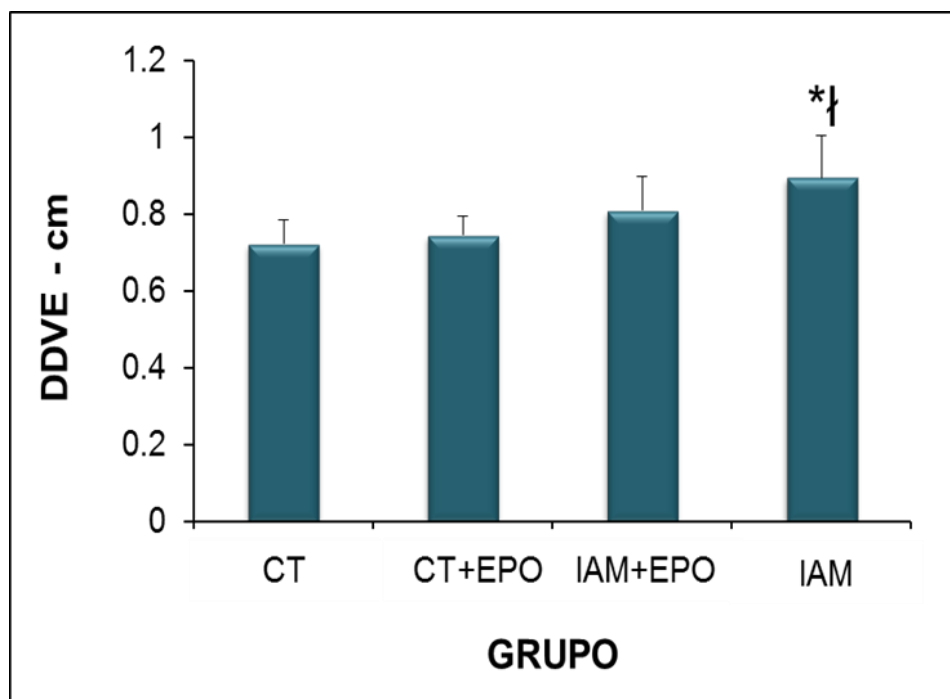


Figura 12: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE - cm);
*p = 0,0032 (CT vs IAM) e †p = 0,007 (CT+EPO vs IAM)

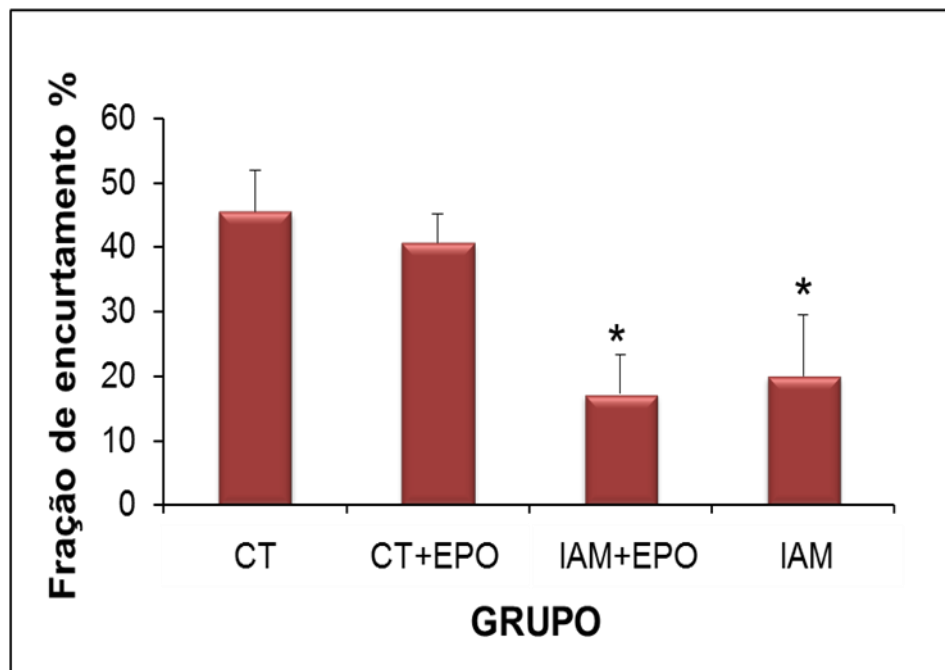


Figura 13: Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; * $p < 0,001$ (CT vs IAM e IAM+EPO); * $p < 0,001$ (CT+EPO vs IAM e IAM+EPO)

4.4. Estresse oxidativo

4.4.1. ADMA

A análise do ADMA, como marcador do estresse oxidativo, não evidenciou a ação da eritropoetina na redução desta proteína $p = 0,270$ (figura 14).

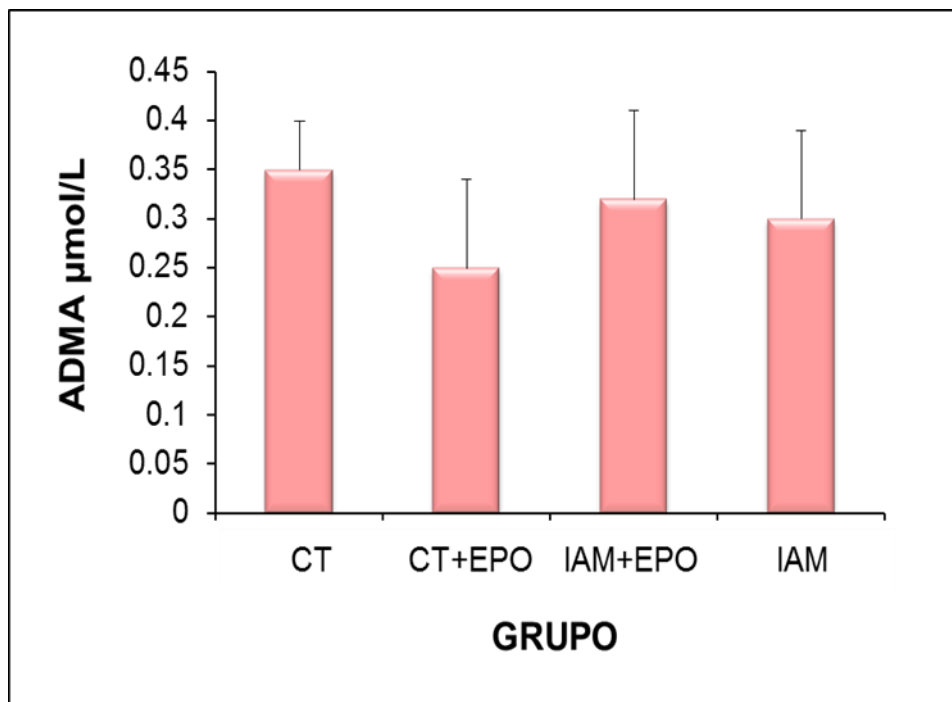


Figura 14: Concentração de ADMA

4.4.2. Glutathiona

A concentração de glutathiona total no soro foi menor nos grupos infartados ($p < 0,01$). A EPO não modificou o padrão de resposta da glutathiona.

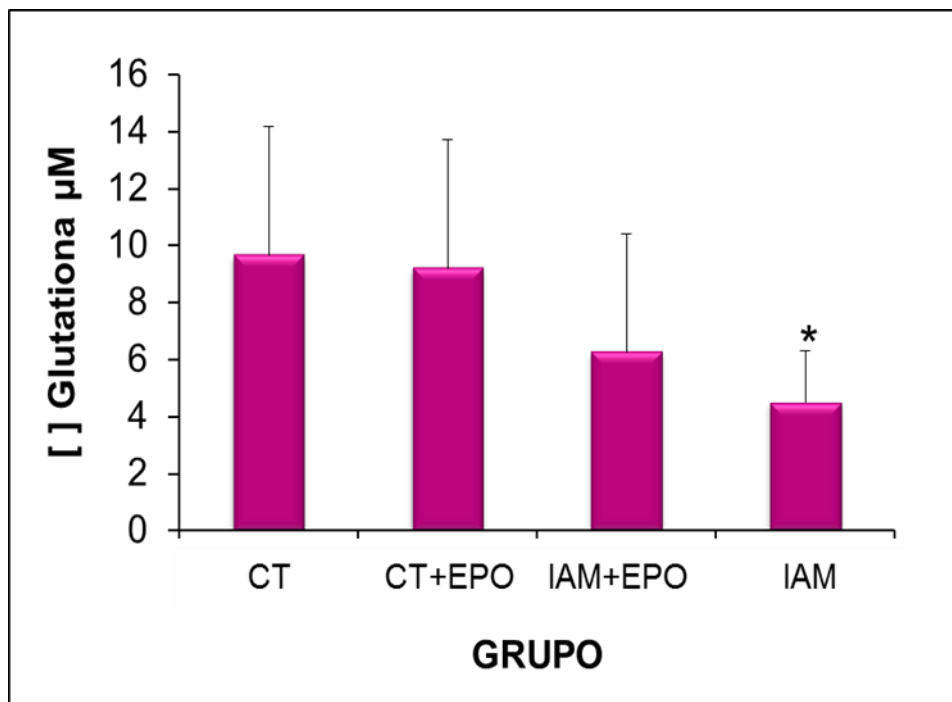


Figura 15: Concentração de glutathiona total no soro; * $p < 0,05$ (CT vs IAM)

4.5. Expressão gênica: sobrecarga ventricular, apoptose e inflamação

O BNP, que avalia a sobrecarga ventricular, apresentou maior expressão nos grupos infartados ($p = 0,04$), porém não foi atenuado pela EPO $p = 0,103$ (figura 16).

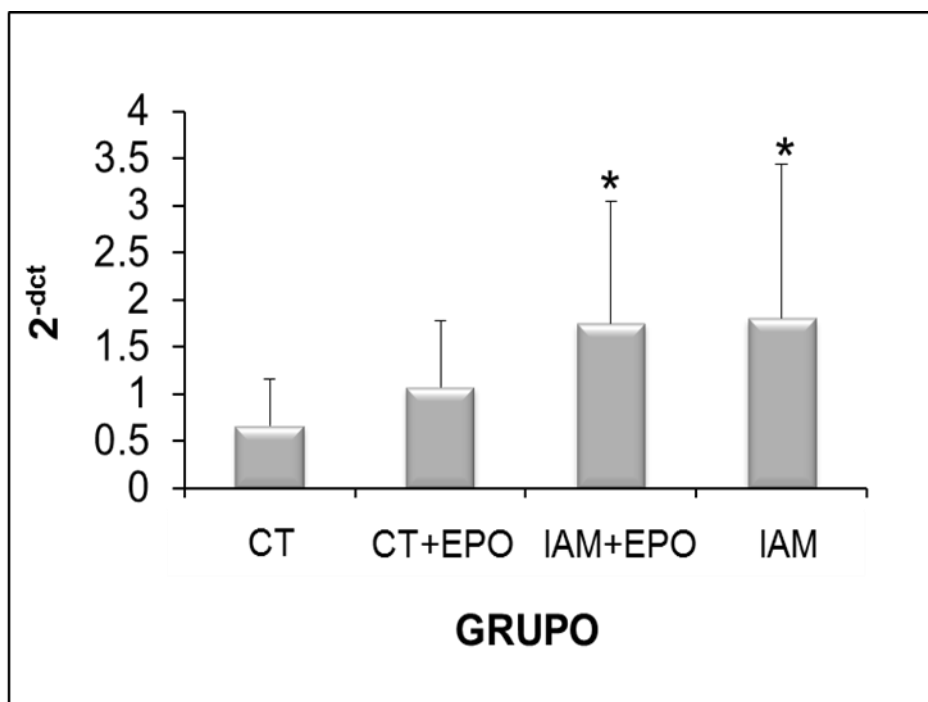


Figura 16: Expressão absoluta do gene BNP (*p = 0,04 CT vs IAM) e (*p = 0,045 CT vs IAM+EPO)

Na avaliação da apoptose os genes Bcl-2 e p53 mostraram-se mais expressos nos grupos infartados, em comparação aos controles ($p < 0,05$), não sendo o Bcl-2 ativado e nem o p53 inibido pela EPO (figuras 17 e 18).

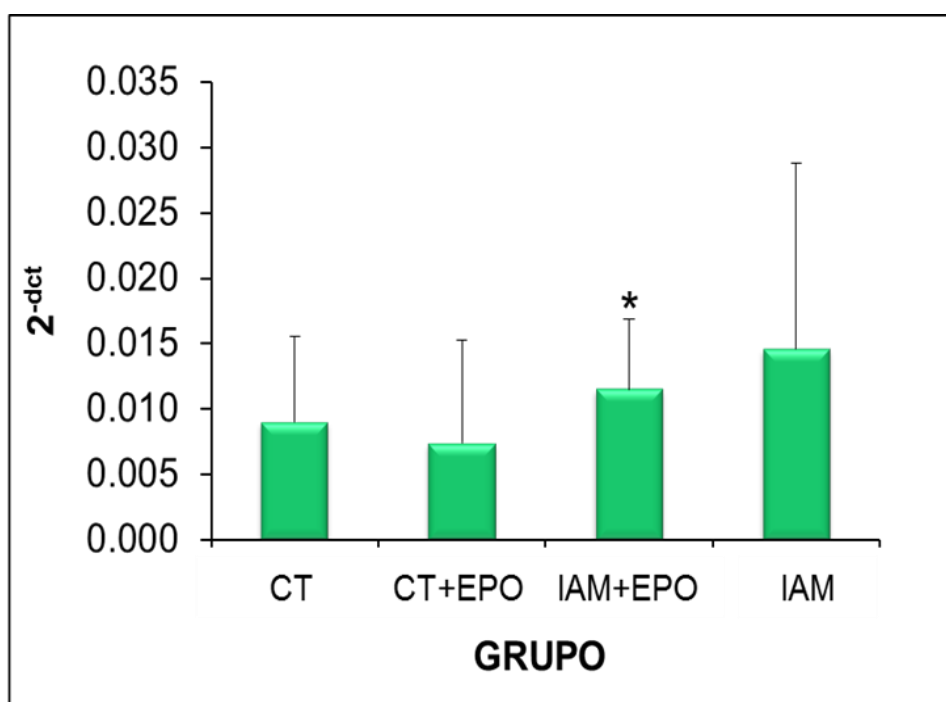


Figura 17: Expressão absoluta do gene Bcl-2; *p = 0,031 (CT+EPO vs IAM+EPO)

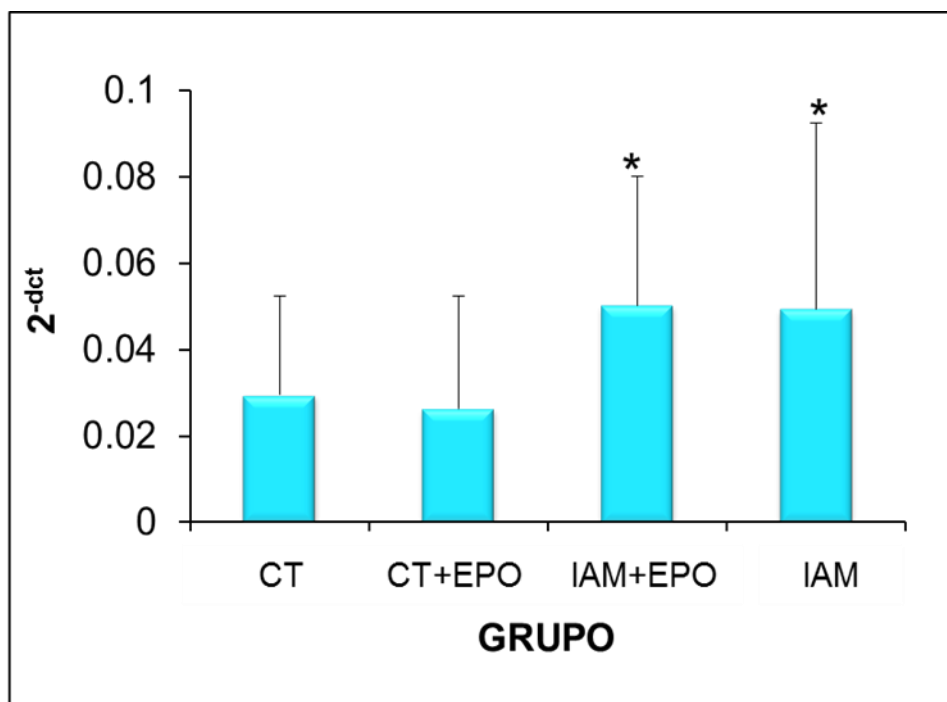


Figura 18: Expressão absoluta do gene p53; * $p = 0,022$ (CT+EPO vs IAM+EPO) e * $p = 0,048$ (CT vs IAM+EPO)

No que se refere à inflamação, apenas três genes apresentaram expressão com diferenças significativas, ao nível de 5%, entre os grupos (TGF- β 1, TNF- α e CCr-5), sendo mais expressos nos grupos infartados, mas também não demonstrando efeito anti-inflamatório da EPO (figuras 19, 20 e 21).

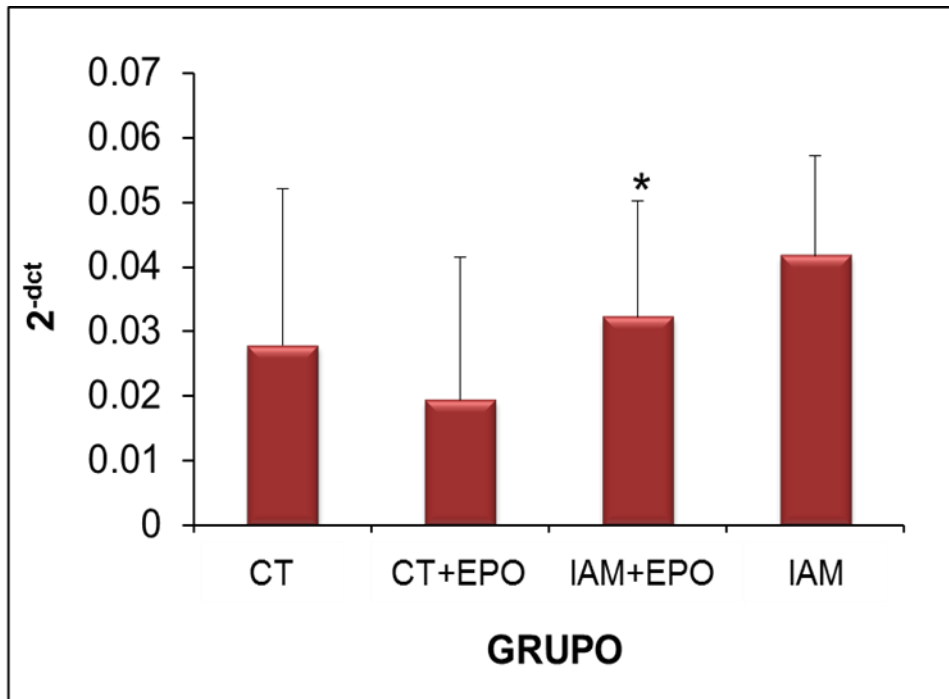


Figura 19: Expressão absoluta do gene TGF- β 1; *p = 0,011(CT+EPO vs IAM)

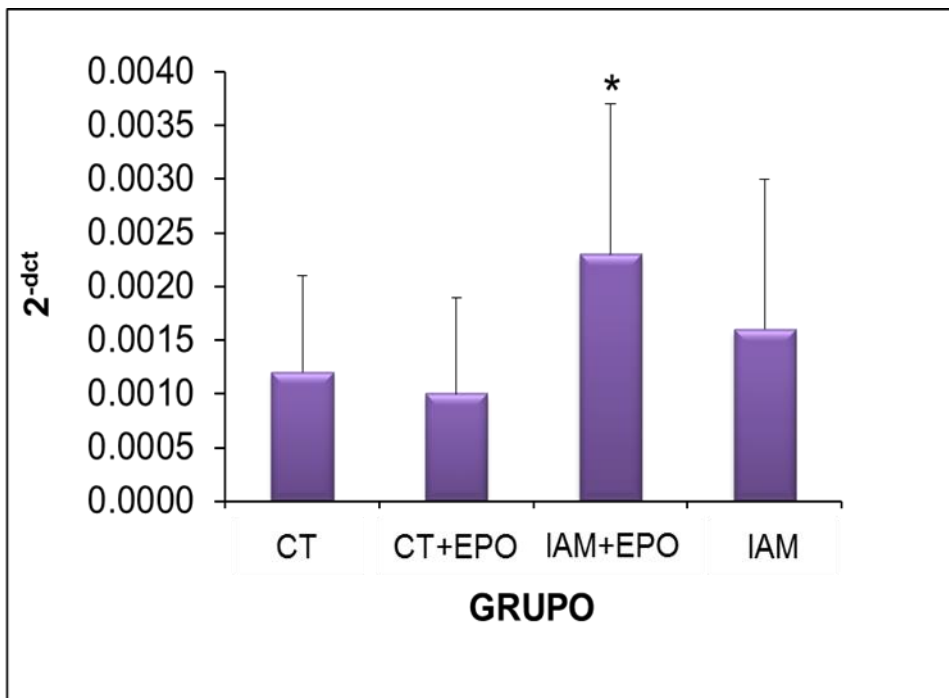


Figura 20: Expressão absoluta do gene TNF- α ; *p = 0,005 (CT+EPO vs IAM+EPO)

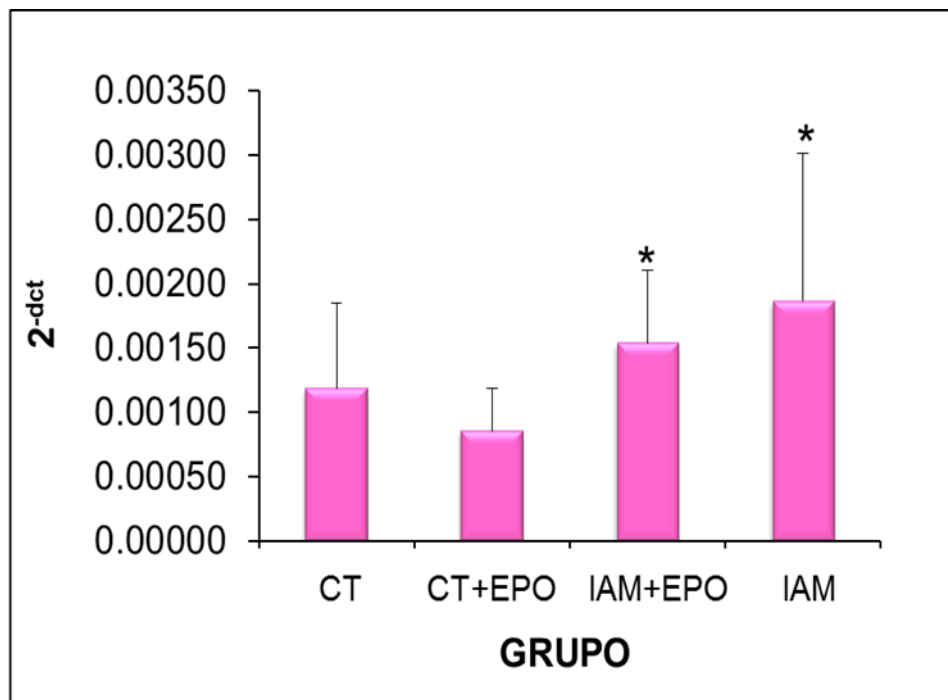


Figura 21: Expressão absoluta do gene Ccr-5; * $p = 0,021$ (CT+EPO vs IAM+EPO) e * $p = 0,015$ (CT+EPO vs IAM)

4.6. Angiogênese - VEGF

A semiquantificação do VEGF não apresentou diferenças entre os grupos $p = 0,95$ (figuras 22 e 23).

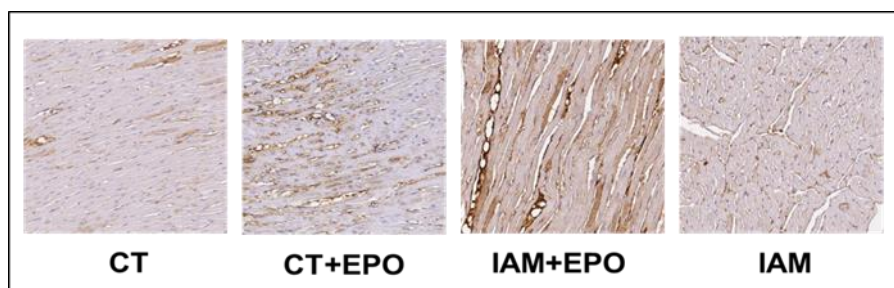


Figura 22: Micrografia da marcação de VEGF no miocárdio do VE (em marron o VEGF)

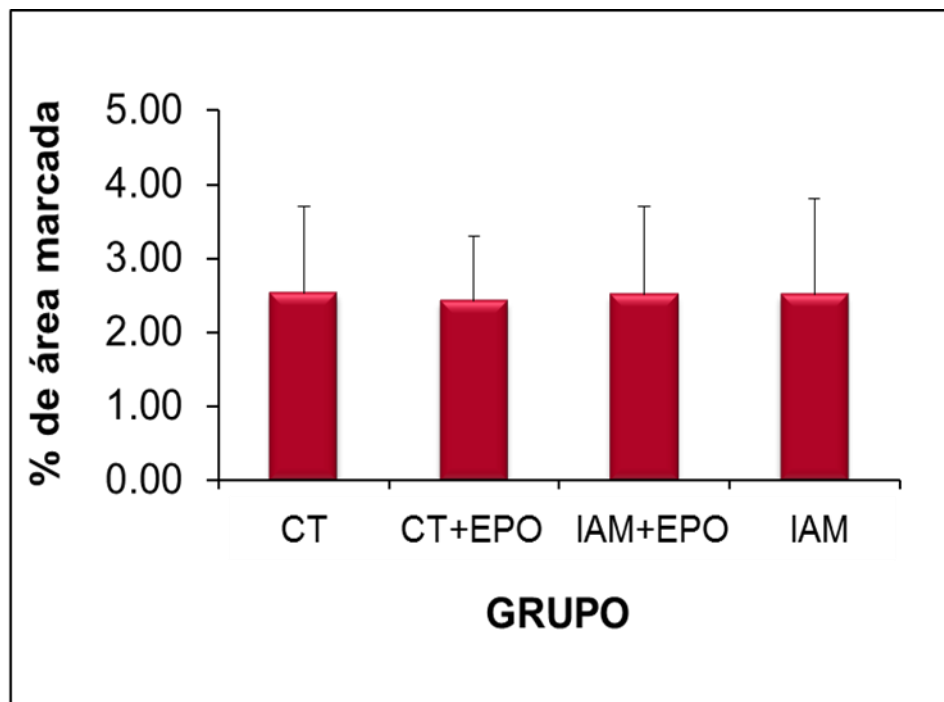


Figura 23: Análise semiquantitativa do VEGF (% de área marcada)

4.7. Análise hematológica

A análise da hemoglobina e do hematócrito demonstrou níveis significativamente mais elevados nos grupos tratados com EPO (figuras 24 e 25).

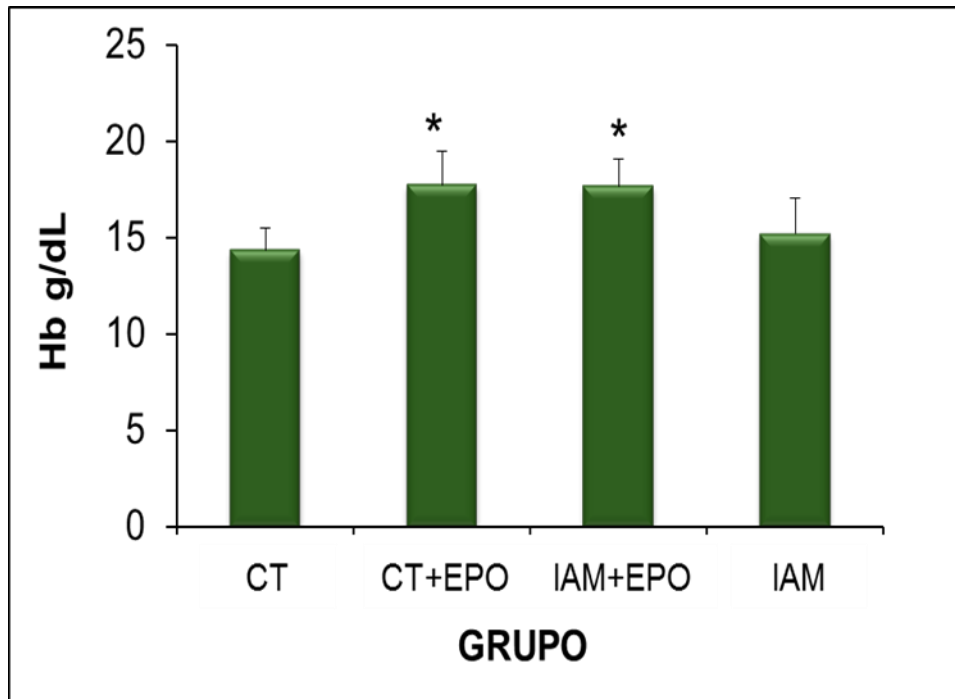


Figura 24: Dosagem de hemoglobina g/dL; * $p < 0,05$ (CT vs CT+EPO e CT vs IAM+EPO)

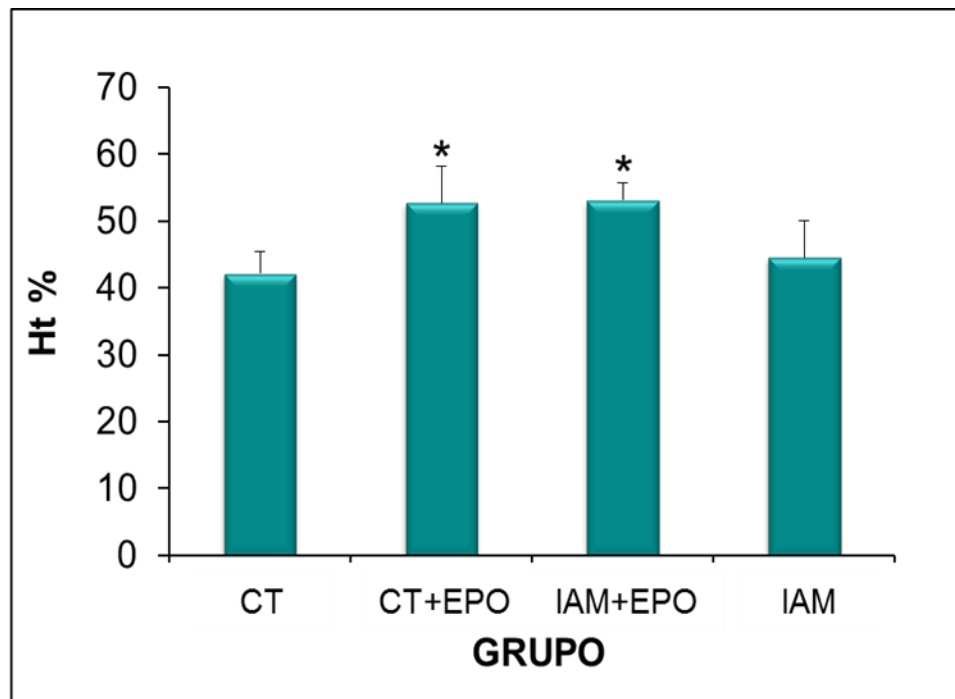


Figura 25: Dosagem de hematócrito (%); * $p < 0,05$ (CT vs CT+EPO, CT vs IAM+EPO e IAM vs IAM+EPO)

4.8. Limitações do estudo

As avaliações foram realizadas na fase crônica do IAM (4 semanas), portanto, é possível que uma avaliação precoce apresentasse maior impacto da proteção da EPO na inflamação, estresse oxidativo e apoptose.

Algumas variáveis apresentaram grande desvio padrão, não definindo significância estatística. Portanto, é possível que, com um número maior de animais, algumas variáveis possam apresentar significância.

5. DISCUSSÃO

O efeito cardioprotetor da EPO ainda é muito controverso pois, enquanto trabalhos experimentais relatam diminuição do tamanho do infarto, da inflamação^{34, 35}, da apoptose³¹, do estresse oxidativo³¹, além de tantas outras vias envolvidas no remodelamento miocárdico pós-infarto, os trabalhos clínicos não descrevem os mesmos achados⁵⁴. Em 2010, Ahmet *et al.*⁵⁵ sugeriram que o estímulo na eritropoiese poderia ser a explicação para esta falha terapêutica, visto que a EPO leva ao aumento de trombose e risco cardiovascular em pacientes já debilitados. Dados da literatura são, portanto, escassos em relação à proteção da EPO no remodelamento miocárdico, mais especificamente, na fibrose miocárdica. O presente estudo avaliou diferentes aspectos desse remodelamento, incluindo a geometria, a função e, especialmente, a deposição de colágeno no miocárdio.

É bem descrita a fundamental importância do colágeno, presente no interstício miocárdico, na manutenção da arquitetura e da função do músculo cardíaco. Essa proteína promove o perfeito alinhamento dos miócitos, a transmissão de força entre as unidades contráteis, além da transferência de sinais célula à célula^{5, 56}. A deposição inadequada deste importante elemento leva, portanto, a uma desorganização da estrutura miocárdica que, em dois sentidos, ocasiona uma alteração da ultraestrutura celular, por meio de vias de sinalização, e, macroscopicamente, a uma alteração da geometria e função do coração^{6, 56}. Logo, intervenções que possam modular a deposição desorganizada do colágeno no interstício miocárdico, ou seja, a fibrose, poderiam promover uma proteção das alterações da geometria e culminando com a proteção da função cardíaca^{56, 57}.

A eritropoetina tem seu efeito mais conhecido e, com extensa aplicabilidade clínica, na eritropoese. Seu estímulo, por diversos mecanismos na produção de glóbulos vermelhos, é vastamente estudado na literatura^{29, 30, 58}.

Pudemos confirmar esta ação da EPO, e dessa forma, garantir a sua ação em nosso modelo experimental, observando o aumento significativo do hematócrito e da hemoglobina nos animais que receberam tratamento. Outros efeitos da EPO também são descritos na literatura, tais como a sua modulação nas vias de apoptose, inflamação e estresse oxidativo^{31, 34, 35, 59}, vias estas que fazem parte de uma cascata de sinalizadores que promovem a perda dos cardiomiócitos e a sua reposição por fibrose, assim chamada de fibrose reparativa.

Um modelo experimental, bem estabelecido, de injúria miocárdica e fibrose intersticial é o infarto agudo do miocárdio^{1, 2, 60, 61}. Esta agressão isquêmica ativa uma sequência de vias de sinalização que promovem a modulação da dinâmica do colágeno, tanto por estímulo da sua síntese quanto da sua degradação e, portanto, promove a desorganização da estrutura miocárdica. Tal remodelamento ocorre na área infartada, predominantemente pela necrose de miócitos enquanto, na área remota ao infarto, a perda da unidade contrátil ocorre tanto por necrose quanto por apoptose^{5, 62, 63}. O controle desse remodelamento na área remota ao infarto e a contenção da extensão da área infartada representam uma importante estratégia para a manutenção da função ventricular⁶⁵. Neste cenário de fato, semelhante aos estudos de Burger *et al.*³¹ e de Van deer Meer *et al.*³² também não encontramos prevenção na extensão da injúria miocárdica, na área infartada, visto que o tamanho das áreas de infarto foram muito semelhantes no grupo tratado ou não com a EPO^{32,37}. Porém, outra pesquisa de Van deer Meer *et al.*⁶⁴ evidenciou que o tratamento com a EPO, quando iniciado imediatamente após o infarto, minimizou o tamanho da área infartada. Podemos, então, especular que a utilização precoce da EPO poderia modular as vias de sinalização de uma cascata de agressão muito mais inicial, seja ela interferindo na necrose, apoptose,

inflamação ou estresse oxidativo nessa fase super aguda. Outros estudos que evidenciaram uma redução da área infartada, com a utilização da EPO, foram modelos de isquemia/reperfusão com injeção intramiocárdica, diferente do modelo e da via de administração utilizados nesta pesquisa. Todavia, esses estudos puderam confirmar que de alguma forma a EPO, de fato, pode interferir na perda de cardiomiócitos^{36, 65}. Já, uma metanálise que incluiu 1564 pacientes após IAM, não mostrou essa ação da EPO na atenuação do tamanho da área de infarto medida pela ressonância magnética⁶⁶. Esses dados são mais coerentes com nossos achados neste estudo experimental.

Entretanto, pudemos observar uma importante atenuação da deposição de colágeno no interstício do VE, sendo que o grupo tratado com EPO teve menos da metade da FVCI, quando comparado com o grupo não tratado. O mesmo pode ser observado no VD com uma redução importante da fibrose nessa área. Vale lembrar, que tanto no VE como no VD, esta análise foi feita na área remota ao infarto, portanto, apesar de não ter sido capaz de minimizar a agressão na área agredida, a EPO foi de fundamental importância na atenuação do remodelamento da área remota. Esses achados assemelham-se aos de Li *et al.*³⁴, que entretanto, iniciaram a utilização da EPO numa fase mais avançada da miocardiopatia, ou seja, 6 semanas após a indução do IAM, quando os animais já apresentavam sinais de insuficiência cardíaca (IC). Talvez, pela intensidade do estímulo local, pela isquemia com a hipóxia celular severa e intensa necrose na área infartada, isso tenha limitado a ação da EPO no sentido de conter o aumento da lesão. Neste modelo, outro mecanismo descrito como possível protetor da isquemia, seria a neovascularização o que, entretanto, não ficou demonstrado em nosso estudo, quando observamos uma não ação da EPO no estímulo ao VEGF no

miocárdio. Por outro lado, a complexa rede de sinalização que se propaga pelo sincício intersticial e célula a célula até a área remota, foi modulada de alguma forma pela EPO atenuando, assim, a deposição desorganizada do colágeno no compartimento intersticial.

Reavaliando os dados de Van deer Meer *et al.*⁶⁴ que mostraram maior proteção do miocárdio com o tratamento mais precoce, e considerando os dados da literatura que evidenciam ação da EPO, na cascata de inflamação, desde a via do NFkB e Stat 5, poderíamos imaginar que essa proteção inicial, além da proteção tardia na área remota, estaria relacionada a resposta inflamatória inata de defesa na fase aguda e a uma resposta de sinalização de citocinas e quimiocinas, além do infiltrado de células inflamatórias na área remota ao infarto⁵¹. Nosso estudo não confirmou, na fase crônica, uma modulação da EPO na cascata inflamatória, pelo menos nas citocinas estudadas (TGF- β 1, TNF- α e CCr-5). Já, o estudo de Li *et al.*³⁴ mostraram significativa redução dessas mesmas citocinas. Entretanto, como já comentado anteriormente, esse trabalho iniciou o tratamento após 6 semanas do IAM, portanto esses animais, já apresentavam quadro de insuficiência cardíaca. Sabemos que esse modelo é bastante utilizado nos estudos de IC, que por si só eleva as citocinas inflamatórias. Dessa forma, a redução encontrada por estes pesquisadores, talvez esteja relacionada à redução das citocinas muito aumentadas pela IC, e não pela injúria miocárdica per se. Outra possível explicação para encontrarmos essa diferença entre os estudos, reside na metodologia. Analisamos por RT-PCR a expressão gênica e Li *et al.*³⁴ quantificaram a proteína. Portanto, a EPO poderia ser modulador em alguma fase da tradução do mRNA para proteína. De qualquer maneira, no presente estudo,

com o modelo utilizado, a via inflamatória estudada não parece ter sido uma moduladora da proteção da deposição de colágeno na área remota do IAM.

A interação direta dos mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo e, mais especificamente, a liberação das ROS, já é bem definida na literatura. Sabemos, também, o quanto lesivo para a célula miocárdica o acúmulo e a permanência dessas moléculas podem ser. Já discutimos, anteriormente que, em nosso estudo, a EPO não regulou a expressão de citocinas inflamatórias, as quais estavam significativamente aumentadas nos grupos infartados tratados ou não. Contudo, sabemos que não só a inflamação pode modular o estresse oxidativo, várias são as vias pelas quais esse sistema pode estar ativado. A EPO, independentemente da inflamação, pode regular a expressão da eNos e inibir a NADPHoxidase e, portanto, interferir no estresse oxidativo o que consequentemente, diminuiria a lesão celular por esse sistema^{30, 31}. Burger *et al.*³⁰, em um estudo de cultura de cardiomiócitos, mostraram aumento da eNOS pela EPO, promovendo uma proteção da perda celular por apoptose, devido ao aumento do NO. Em nosso estudo in vivo, optamos por analisar outras vias do estresse oxidativo, uma antioxidante que é a glutathione⁶⁷ e o ADMA, um antagonista da NOS^{68, 69}. Avaliando essas vias não conseguimos uma ação da EPO, no que diz respeito ao estresse oxidativo na fase estudada. É possível que, por termos estudado o que se considera uma fase crônica, neste modelo experimental, esse controle não tenha sido eficaz. Podemos especular que talvez a proteção que Van deer Meer *et al.*⁶⁴ encontraram, com o tratamento precoce, pudesse ter tido alguma ação nessa via. Se considerarmos a complexa interação entre inflamação e estresse oxidativo, nosso estudo apresentou resultados coerentes, em que a EPO não interferiu na via inflamatória nem no estresse

oxidativo. Mais ainda: a interação da inflamação e do estresse oxidativo como agentes promotores da perda celular por apoptose é vastamente estudada na literatura⁵⁶. Esta perda de cardiomiócitos, gerada pelo estímulo à apoptose, pode ser responsável por uma reposição por fibrose reparativa no miocárdio⁵. Burger *et al.*³¹ também mostraram, no seu estudo em cultura de célula, um efeito protetor da EPO em relação à apoptose interrelacionando, mais ainda, este mecanismo de morte celular com o estresse oxidativo. Nosso estudo *in vivo* não reproduziu esses resultados *in vitro*, pois a EPO não conseguiu prevenir a apoptose causada pela injúria isquêmica na área infartada e nem na área remota. Mais uma vez, este fato pode ter ocorrido, pelo início do tratamento 24 horas após o IAM, fase em que é mais predominante a morte celular por essa via⁶². Entretanto, de novo, as vias sinalizadoras e efetoras comportam-se de maneira coerente onde ocorre um aumento da inflamação, do estresse oxidativo e da apoptose nos grupos infartados, mas nenhuma dessas variáveis foram atenuadas pela EPO.

Independentemente de não ficarem muito claras as vias exatas pelas quais a EPO atuou, na proteção miocárdica, ela consistentemente reduziu a fibrose miocárdica. Todavia, apesar desta proteção, à área remota da injúria isquêmica, com uma significativa redução da desorganização do interstício miocárdico, a EPO não protegeu o coração dos animais estudados, quanto ao remodelamento geométrico (DDVE) e, menos ainda, no remodelamento funcional avaliado pela fração de encurtamento. Neste cenário, este estudo experimental foi reproduzido nos estudos clínicos em que a função ventricular não foi protegida pela EPO^{70, 71}. A explicação, dada anteriormente por Ahmet *et al.*⁵⁵, da ação trombogênica e do aumento da eritropoiese, poderia minimizar o efeito protetor na função ventricular. Também, é possível que apesar de atenuar a fibrose intersticial, os níveis de

ativação da cascata inflamatória e do estresse oxidativo, não atenuados pela EPO, possam ter uma ação molecular nos miócitos remanescentes, reduzindo o seu desempenho contrátil, sendo bem definido tal efeito nocivo das citocinas e do estresse oxidativo, na função contrátil celular⁵⁶.

Ficou clara, portanto, a ação protetora da EPO no remodelamento estrutural do coração, sem, porém, um esclarecimento maior das vias por onde isto ocorreu nem a falha na proteção da disfunção ventricular. É possível que, se analisando outras vias inflamatórias e se avaliando tempos diferentes de tratamento e de ativação das vias sinalizadoras, poderemos esclarecer melhor essa complexa cadeia de eventos. Novos estudos sugerem uma modificação da estrutura da EPO, retirando seu efeito eritropoiético e, assim, portanto, com base nas especulações de Ahmet, teríamos uma maior proteção funcional do coração^{55, 72}. Logo, essa linha de investigação deve ser explorada.

6. CONCLUSÕES

Neste modelo de infarto agudo no miocárdio em ratos:

1. a EPO atenuou a fibrose miocárdica intersticial na área remota ao infarto;
2. apesar da significativa atenuação da fibrose miocárdica isso não se refletiu na redução da dilatação do VE, na perda da função sistólica nem na sobrecarga do coração dos animais tratados com EPO;
3. na fase crônica do infarto, avaliada neste estudo, a EPO não modulou a via de estresse oxidativo, a via inflamatória, nem a apoptose.

7. REFERÊNCIAS

1. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982;65(7):1446-50.
2. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.*1985;57(1):84-95.
3. Zornoff LA, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: Conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol.* 1997;92(2):150-64.
4. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
5. Weber KT, Sun Y, Díez J. Fibrosis: A living tissue and the infarcted heart. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(24):2029-31.
6. Soufen HN, Salemi VMC, Aneas IMS, Ramires FJA, Benício AMD, Benvenuti LA, Krieger JE, Mady C. Collagen content, but not the ratios of collagen type III/I mRNAs, differs among hypertensive , alcoholic, and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(12):1098-104.
7. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):482-90.
8. Lu L, Chen SS, Zhang JQ, Ramires FJ, Sun Y. Activation of nuclear factor kappaB and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Comm.* 2004;321(4):879-85.

-
9. Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1075-83.
 10. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC Jr, Cain BS, Shames BD, Meng X, Harken AH. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by P38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Surgery.* 1998;124(2):291-6.
 11. Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, Meuter K, Brandstatter K, Hafner M, Ertl G, Schorb W. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(11):1949-59.
 12. Ceconi C, Curello S, Bachetti T, Corti A, Ferrari R. Tumor necrosis factor in congestive heart failure: a mechanism of disease for the new millennium? *Prog Cardiovasc Dis.* 1998;41(1Suppl 1):25-30.
 13. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res.* 2004;53(11):585-95.
 14. Lin S, Wan S, Sun L, Hu J, Fang D, Zhao R, Yuan S, Zhang L. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-c motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. *Cancer Sci.* 2012;103(5):904-12.

-
15. Yndestad A, Finsen AV, Ueland T, Husberg C, Dahl CP, Øie E, Vinge LE, Sjaastad I, Sandanger Ø, Ranheim T, Dickstein K, Kjekshus J, Damås JK, Fiane AE, Hilfiker-Kleiner D, Lipp M, Gullestad L, Christensen G, Aukrust P. The homeostatic chemokine CCL21 predicts mortality and may play a pathogenic role in heart failure. *Plos One*. 2012;7(3):e33038.
 16. Sorescu D, Griendling K. Reactive oxygen species, mitochondria, and NADPH oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail*. 2002;8(3):132-40.
 17. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
 18. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol*. 1999;65(3):337-40.
 19. Dhalla AK, Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig heart. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 2):H1280-5.
 20. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001;4(3):176-186.
 21. Vaziri ND, Lin C, Farmand F, Sindhu K. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Internat*. 2003;63(1):186-94.

-
22. Gasparetto C, Malinverno A, Gulacciati D, Gritti D, Prosperini PG, Specchia G, Ricevuti G. Antioxidant vitamins reduce oxidative stress and ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005;18(3):487-96.
 23. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96(7):2414-20.
 24. Usal A, Acarturk E, Yuregir GT, Unlukurt I, Demirci C, Kurt HI, Birand A. Decreased glutathione levels in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J.* 1996;37:177-82.
 25. Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(3):943-51.
 26. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura Ki, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999;85(4):357-63.
 27. Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart, Lung Circ.* 2004;13(2):132-8.
 28. Khaper N, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2003;251(1-2):9-15.

-
29. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(1):1-14.
 30. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2006;72(1):51-9.
 31. Burger DE, Xiang FL, Hammoud L, Jones DL, Feng Q. Erythropoietin protects the heart from ventricular arrhythmia during ischemia and reperfusion via neuronal nitric-oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(3):900-7.
 32. Van deer Meer P, Voors AA, Lipsic E, Van Gilst WH, Veldhuise DJV. Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur Heart J*. 2004;25(4):285-91.
 33. Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci*. 2006;101(1):31-9.
 34. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*. 2006;71(4):684-94.
 35. Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/ reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):719-27.

-
36. Gäbel R, Klopsch C, Furlani D, Yerebakan C, Li W, Ugurlucan M, Ma N, Steinhoff G. Single high-dose intramyocardial administration of erythropoietin promotes early intracardiac proliferation, proves safety and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats. *Interac Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;9(1):20-5.
 37. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(4):964-71.
 38. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Pro-inflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201-6.
 39. Damås JK, Gullestad L, Aass H, Simonsen S, Fjeld J, Wikeby L, Ueland T, Eiken HG, Frøland SS, Aukrust P. Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure modulatory effects of intravenous immunoglobulin. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(1):187-93.
 40. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation.* 1998;98(2):149-56.

-
41. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation*. 2001;103(16):2055-9.
 42. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002;91(11):988-98.
 43. Kawachi K, Iso Y, Sato T, Wakabayashi K, Kobayashi Y, Takeyama Y, Suzuki H. Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine. *Heart Vessels*. 2012;27(1):79-88.
 44. Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, van der Harst P, Oeseburg H, Du Marchie Sarvaas GJ, Koster J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur Heart J*. 2007;28(16):2018-27.
 45. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php>.
 46. Science in the Service of animal Welfare. Disponível em: <http://www.ufaw.org.uk/>
 47. Fernandes F, Ramires FJ, Ianni BM, Salemi VM, Oliveira AM, Pessoa FG, Canzian M, Mady C. Effect of colchicine on myocardial injury induced by *Trypanosoma cruzi* in experimental Chagas' disease. *J Card Fail*. 2012;18(8):654-9.

-
48. Koike MK, Frimm CC, Cúri M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(4):279-90.
 49. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr.* 2005;6(1):41-6.
 50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 51. Potenza MA, Gagliardi S, De Benedictis L, Zigrino A, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Lorusso L, Benagiano V, Quon MJ, Montagnani M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via antioxidant mechanisms in the vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(3):E685-94.
 52. Lee WH, Kumar A, Rani A, Foster TC. Role of antioxidant enzymes in redox regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function and memory in middle-aged rats. *Neurobiol Aging.* 2013;S0197-4580(13)00627-1.
 53. Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric statistics for the behavioral science. New York, NY: McGraw-Hill, 2nd ed.1988.
 54. Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, Romagnoli M, Perez-Quilis, Lippi G. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective. *Int J Cardiol.* 2014;171(2):116-25.

-
55. Ahmet I, Tae HJ, Juhaszova M, Riordon DR, Boheler KR, Sollott SJ, Brines M, Cerami A, Lakatta EG, Talan MI. A small nonerythropoietic helix B surface peptide based upon erythropoietin structure is cardioprotective against ischemic myocardial damage. *Mol Med*. 2011;17(3-4):194-200.
 56. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19(2):173-82.
 57. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):474-81.
 58. Lapierre A, Souquet PJ. Use of erythropoiesis stimulating agents. *Rev Mal Respir*. 2014;31(2):162-72.
 59. Lee Y, McGinn AN, Olsen CD, Nam K, Lee M, Shin SK, Kim SW. Human erythropoietin gene delivery for cardiac remodeling of myocardial infarction in rats. *J Control Release*. 2013;171(1):24-32.
 60. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima AR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SA, Zornoff LA. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol*. 2011;151(2):242-3.
 61. Ardisson LP, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, Santos PP, Assalin HB, Novo R, Novelli EL, Sant'ana LS, Paiva SA, Zornoff LA. Influence of AIN-93 diet on mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2012;156(3):265-9.

-
62. Schwarz K, Simonis G, Yu X, Wiedemann S, Strasser RH. Apoptosis at distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2006;28(1-2):45-54.
 63. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role of inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;S0022-2828(13):00347-7.
 64. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(1):125-33.
 65. Furlani D, Klopsch C, Gäbel R, Ugurlucan M, Pittermann E, Klee D, Wagner K, Li W, Wang W, Ong LL, Nizze H, Titze U, Lützow K, Lendlein A, Steinhoff G, Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals anti-inflammatory potential and improved cardiac functions detected by forced swim test. *Transplant Proc.* 2008;40(4):962-6.
 66. Gao D, Ning N, Niu X, Dang Y, Dong X, Wei J, Zhu C. Erythropoietin treatment in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J.* 2012;164(5):715-727.
 67. Sudha M, Rajkumar D, Felix JW. Protective effect of glutathione against isoproterenol induced myocardial injury rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2013;57(2):132-7.

-
68. Sen N, Ozlu MF, Akgul EO, Kanat S, Cayci T, Turak O, Yaman H, Sokmen E, Ozcan F, Maden O, Demir AD, Covic A, Kanbay M. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine level in acute myocardial infarction patients as a predictor of poor prognosis and angiographic impaired reperfusion. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):304-10.
 69. Thomazella MC, Góes MF, Andrade CR, Debbas V, Barbeiro DF, Correia RL, Marie SK, Cardounel AJ, daLuz PL, Laurindo FR. Effects of high adherence to mediterranean or low-fat diets in medicated secondary prevention patients. *Am J Cardiol*. 2011;108(11):1523-9
 70. Belonje AM, Voors AA, van Gilst WH, Anker SD, Slart RH, Tio RA, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ, HEBE III investigators. Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction: Rationale and study design of a prospective, randomized, clinical trial (HEBE III). *Am Heart J*. 2008;155(5):817-22.
 71. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, Barsness GW, Prather K, Heitner JF, Kilaru R, Gruberg L, Hasselblad V, Greebaum AB, Patel M, Kim RJ, Talam M, Ferrucci L, Longo D, Lakatta EG, Harrington RA. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. REVEAL: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;305(18):1863-72.
 72. Ahmet I, Tae HJ, Brines M, Cerami A, Lakatta EG, Talan MI. Chronic administration of small nonerythropoietic peptide sequence of erythropoietin effectively ameliorates the progression of postmyocardial infarction-dilated cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;345(3):446-56.