CAMILA ZOGBI NOGUEIRA

*Caracterização morfológica e molecular da
regeneração cardíaca em ratos neonatos submetidos à
resseccção apical*

São Paulo

2016

CAMILA ZOGBI NOGUEIRA

***Caracterização morfológica e molecular da regeneração cardíaca
em ratos neonatos submetidos à ressecção apical***

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

Programa de Ciências Médicas

**Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo**

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Camila Zogbi

Caracterização morfológica e molecular da regeneração cardíaca em ratos neonatos submetidos à ressecção apical/Camila Zogbi Nogueira. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Recém-nascido 2.Miócitos cardíacos 3.Regeneração 4.Inflamação 5.Macrófagos 6.Imagem por ressonância magnética 7.Ratos

USP/FM/DBD-274/16

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2012/10107-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [404733-2012-3], CAPES PROBITEC [23038-4156-2012-80], Ministério da Saúde do Brasil [MS-DECIT-PROADI_SUS – Hospital Samaritano] e Fundação Zerbini.

***Dedico esta tese aos meus queridos pais,
Nilton e Tininha, minha base, meu alicerce,
meu maior orgulho.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pelas bênçãos, saúde, por ter sempre me guiado e iluminado meus passos nos momentos mais difíceis e por ter colocado pessoas tão maravilhosas na minha vida.

A meus pais, Nilton e Tininha, e a meu irmão, Murilo. Agradeço por ajudarem a me tornar quem sou. Obrigada pelos ensinamentos de valores, de caráter, pelo incentivo e conforto, sempre. Vocês são a parte mais difícil de sair de casa.

A meu marido, Fábio. Minha vida não teria sentido nenhum se você não estivesse comigo. *You are my everything*. Obrigada por tudo!

A toda a minha grande família Perez e Nogueira, e aos meus queridos amigos, por todo o incentivo e por proporcionarem o que eu chamo de *living life to the fullest*.

A meu mentor Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, além de incentivar minha maturidade científica e acreditar no meu potencial.

To Marco Harmsen, for all the mentoring, long discussions and will to help me every time. Thank you for showing me the other good side of inflammation.

A querida amiga Helena, pela amizade sincera, por participar de cada etapa da minha vida e da minha carreira científica, com entusiasmo, paciência e com contribuições sempre muito valiosas. Você é a melhor parte da faculdade.

As amigas que fizeram da pesquisa, mesmo com todas as dificuldades, valer a pena todos os dias. Graça, obrigada por tudo! Nada na vida é por acaso, e você é parte fundamental da construção da minha história, dentro e fora do laboratório. Tenho certeza que nossa amizade será de “além-mar”. Nathália, obrigada pela

amizade, em tão pouco tempo, e por participar de tudo com tanta dedicação, entusiasmo e carinho. *Great times are coming!*

A Cíntia, pela amizade, discussões e ensinamentos científicos, além da grande contribuição no desenvolvimento e conclusão dessa etapa tão importante.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, em especial à Élide, por toda a disposição, suporte e boas energias.

Aos colegas do laboratório experimental do Instituto do Coração, por todo o cuidado e atenção com os animais.

A todos os colegas dos diversos LIMs do Hospital das Clínicas, que foram determinantes à conclusão deste trabalho.

A todos os colegas do ICB-USP. Em especial à Amanda Crisma, pelas discussões e auxílio essenciais.

A FAPESP pelo crédito e apoio financeiro.

E *last but not least*, aos membros da banca, pela participação e contribuições que serão de grande valia não só neste trabalho.

Muito obrigada.

“Afinal, aquilo que amamos sempre será parte de nós”

Harry Potter

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 As doenças cardiovasculares e as terapias atuais	1
1.2 Evidências de proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal.....	3
1.2.1 Evidência de regeneração cardíaca em roedores.....	6
1.3 A resposta inflamatória no neonato – a transição do nascimento e a maturação do sistema inflamatório	8
1.3.1. Os leucócitos neonatais	10
1.3.2. O papel dos macrófagos na lesão cardíaca	12
1.3.3. Os macrófagos na regeneração cardíaca	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Cirurgia de ressecção apical cardíaca	17
3.2. Ressonância magnética	18
3.3. Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)	19
3.4. Análises hemodinâmicas cardíacas	19
3.5. Análise histológica	20
3.5.1. Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).....	21
3.5.2. Método de polarização por coloração de Picrosírius-Red (PR).....	21
3.5.3. Ensaio de imunofluorescência	22
3.5.4. Ensaio de imunohistoquímica	22
3.5.5. Análise e quantificação das imagens	23
3.6. Ferramenta exploratória de espectrometria de massas por <i>MALDI imaging</i> ..	23
3.7. Extração de RNA	24
3.7.1. Transcrição do DNA complementar	25
3.7.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)	25
3.8. Sequenciamento de RNA – <i>Illumina</i>	26
3.9. Ingenuity	27
3.10. Extração de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos	27

3.11. Extração, cultivo e polarização de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos.....	28
3.11.1. Diferenciação da cultura em macrófagos	29
3.11.2. Polarização da cultura de macrófagos	29
3.12. Proliferação e quantificação celular de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos	30
3.13. Ensaio de HCS (High-Content Screening)	31
3.14. Expressão de citocinas por membrana <i>array</i>	32
3.14.1. Análise da expressão das citocinas <i>array</i>	32
3.15. Análises estatísticas.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Cirurgia e quantificação da ressecção apical	34
4.2. Ratos P1 apresentam cardiomiócitos na região ressectada, após 21 dias .	35
4.3. Hipoperfusão apical nos animais P1 e P7.....	39
4.4. A função cardíaca é preservada nos ratos P1 sob estresse hemodinâmico	40
4.5. Análise exploratória por espectrometria de massas por <i>MALDI imaging</i>	48
4.6. Sequenciamento de RNA de alta geração – RNA-seq.....	49
4.6.1. Análise por expressão diferencial	53
4.6.2. Análise de enriquecimento	56
4.7. Infiltrado de células CD68 positivas no tecido cardíaco	59
4.8. Diferenciação e polarização de macrófagos para o perfil M2	61
4.9. O perfil M2 de macrófagos eleva a taxa de proliferação de cardiomiócitos submetidos a estresse	61
4.10. O perfil M2 de macrófagos previne a diferenciação em fibroblastos TGF- β -induzidos	66
4.10. Membrana <i>array</i> para citocinas.....	68
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. APÊNDICES	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da polarização de macrófagos para o perfil M1, inflamatório e para o perfil M2, anti-inflamatório.....	14
Figura 2: Cirurgia de ressecção apical em ratos neonatos	18
Figura 3: Ressonância magnética e quantificação da área cardíaca ressectada.	35
Figura 4: Quantificação de Troponina I cardíaca (u.a./mm ²) e marcação positiva de Conexina 43 no tecido neoformado.....	37
Figura 5: Quantificação de fibras de colágeno através da marcação de Picrossírius Red (porcentagem de área).....	38
Figura 6: Perfusão miocárdica através do exame de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) dos segmentos cardíacos dos ratos P1 e P7.	40
Figura 7: Resposta cardíaca após o estresse da sobrecarga.	43
Figura 8: Curvas de regressão linear do trabalho cardíaco correlacionando-se ao aumento da pressão sistólica.	45
Figura 9: Quantificação de fibras de colágeno intersticiais nas secções coronais cardíacas dos ratos dos grupos P1 e P7, com 60 dias, de acordo com o método de Picrossírius.....	47
Figura 10: Imagens moleculares para as proteínas cardíacas.	49
Figura 11: Esquema do desenho experimental da aquisição das amostras utilizadas no sequenciamento de alta geração do RNA total.	50
Figura 12: Controle de qualidade dos <i>reads</i> gerados pelo sequenciamento do RNA total.	51
Figura 13: Diagrama de PCA.	52
Figura 14: Diagrama de distância de Poisson.	53
Figura 15: Análise da expressão diferencial realizada em comparações pareadas.	54
Figura 16: Análises de vias inflamatórias por <i>Gene Set</i> . Vias inflamatórias dos genes inflamatórios e anti-inflamatórios.	55

Figura 17: Análise de enriquecimento pelo Ingenuity.....	58
Figura 18: Infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco pós-lesão.	60
Figura 19: Diferenciação e polarização de macrófagos derivados da medula óssea.....	61
Figura 20: Perfil da cultura de CM nos tratamentos controle.....	63
Figura 21: Aumento da taxa de proliferação dos CM submetidos ao tratamento dos meios condicionados M1 e M2.	64
Figura 22: Aumento da taxa de proliferação de CM quando submetidos ao tratamento com meio condicionado e à hipóxia.	65
Figura 23: Aumento da taxa de proliferação e prevenção da diferenciação de fibroblastos submetidos ao tratamento com meio condicionado M2.	67
Figura 24: Membrana <i>array</i> para citocinas.....	68
Figura 25: Análise de comparação das citocinas expressas para cada condição.....	69
Figura 26: Citocinas expressas nos dois grupos comparativos.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados no qRT-PCR.	26
Tabela 2: Taxa de sobrevivência após a cirurgia de ressecção apical cardíaca em ratos neonatos.....	34
Tabela 3: Biometria e parâmetros Hemodinâmicos dos ratos sham-operados, P7 e P1 em condições basais.	42
Tabela 4: Parâmetros hemodinâmicos dos animais sham-operados, P7 e P1 sob condições de estresse.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADS** – tampão ABS
- **APC** – do inglês, *Antigen-Presenting Cells* ou células apresentadoras de antígeno
- **BMDMØ** – do inglês, *Bone Marrow-Derived Macrophages* ou macrófagos derivados da medula óssea
- **BrdU** – do inglês, *BromodeoxyUridine*
- **BSA** – do inglês, *Bovine Serum Albumin*
- **cDNA** – DNA complementar
- **CD8** – do inglês, *Cluster of Differentiation molecule 8*
- **CD11b** – do inglês, *Cluster of Differentiation molecule 11b*
- **CD14** – do inglês, *Cluster of Differentiation molecule 14*
- **CINC-1** – do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant -1*
- **CINC-2 α/β** – do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant -2 α/β*
- **CINC-3** - do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant -3*
- **CNTF** – do inglês, *Ciliary neurotrophic factor*
- **CR3** – do inglês, *Complement Receptor 3* ou receptor do complemento 3
- **Ct** – do inglês, *Threshold cycle*
- **DAPI** - do inglês, *4',6-Dimidino-2-Phenylindole nuclear staining*
- **DC** – débito cardíaco
- **DMEM H** – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's High*
- **DMEM L** – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Low Glicose*
- **DNA** - do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*
- **dNTP** - desoxirribonucleotídeos
- **dT** – do inglês, *deoxy-thymine*
- **DTT** - ditioneitol
- **EGF** – do inglês, *Endothelial Growth Factor*
- **FBS** – do inglês, *Fetal Bovine Serum*

- **FC** – frequência cardíaca
- **FDPVR** – do inglês, *Final Diastole Pressure-Volume Relation* ou pressão e volume finais da diástole
- **FE** – fração de ejeção
- **FGF-1** – do inglês, *Fibroblast Growth Factor -1* ou fator de crescimento de fibroblasto
- **FSPVR**- do inglês, *Final Sistole Pressure-Volume Relation* ou pressão e volume finais da sístole
- **GM-CSF** – do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- **GSEA** – do inglês, *Gene Set Enrichment Analysis*
- **HCS** – do inglês, *High Content Screening*
- **HRS** – do inglês, *Horse Serum*
- **IdU** – do inglês, *IododeoxiUridine*
- **IFN- γ** – do inglês, *Interferon - γ*
- **IL-1 β** – Interleucina -1 β
- **IL-2** – Interleucina -2
- **IL-4** – Interleucina -4
- **IL-6** – Interleucina -6
- **IL-8** – Interleucina -8
- **IL-12** – Interleucina -12
- **iNOS** – do inglês, *inducible Nitric Oxide Synthase*
- **LPS** – Liposacarídeo
- **LVEDP** – do inglês, *Left Ventricle End-Diastolic Pressure* ou pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
- **LVESP** – do inglês, *Left Ventricle End-Systolic Pressure* ou pressão sistólica final do ventrículo esquerdo
- **M1** – macrófagos classicamente ativados, pró-inflamatórios
- **M2** – macrófagos alternativamente ativados, anti-inflamatórios
- **MAP** – do inglês, *Mean Arterial Pressure* ou média da pressão arterial sistólica

- **MALDI *imaging*** - do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*
- **MBq Tc** – radiofármaco Sestamibi-99mTc
- **M-CSF** – do inglês, *Macrophage-Colony Stimulation Factor*
- **MCP-1** – do inglês, *Macrophage Chemoattractive Protein -1*
- **MHC II** – do inglês, *Major Histocompatibility Complex II*
- **MIP-1 α** – do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein -1 α*
- **MIP-1 β** – do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein -1 β*
- **mRNA** – do inglês *messenger Ribonucleic Acid* ou RNAm
- **MS/MS** – espectometria de massas em tandem, relação massa/carga
- **NBCS** – do inglês, *Newborn Calf Serum*
- **NR** – rato neonato não ressectado
- **NRG1** – do inglês, *Neuregulin -1* ou neuroregulina
- **ns** – não significante
- **P1** – neonatos com um dia de vida (um dia após o nascimento)
- **P1+21** – neonatos ressectados com um dia de vida e coleta após 21 dias da cirurgia
- **P7** – neonatos com sete dias de vida (sete dias após o nascimento)
- **P7+21** – neonatos ressectados com sete dias de vida e coleta após 21 dias da cirurgia
- **PBS** – do inglês, *Phosphate-Buffered Saline* ou tampão PBS
- **PDGF** – do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*
- **PFA** - paraformaldeído
- **PHE** – do inglês, *Phenylephrine* ou fenilefrina
- **PR** – do inglês, *Picrosirius-Red* ou solução de Picrosíríus
- **Potsn** – do ing, *Periostin* ou periostina
- **qRT-PCR** – do inglês, *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*
- **PRRs** – do inglês, *Pattern of Recognition Receptors*
- **R1** – rato ressectado com um dia de vida
- **R1D1** – rato ressectado com um dia de vida e coleta após 1 dia de cirurgia

- **R1D5** – rato ressectado com um dia de vida e coleta após 5 dias de cirurgia
- **R7** – rato ressectado com sete dias de vida
- **R7D1** – rato ressectado com sete dias de vida e coleta após 1 dia de cirurgia
- **R7D5** – rato ressectado com sete dias de vida e coleta após 1 dia de cirurgia
- **RNA-seq** – do inglês, *Ribonucleic Acid sequencing* ou sequenciamento do RNA
- **ROX** - do inglês, *Rhodamine X*
- **Rn** – relação entre o sinal corante repórter fluorescente (*SYBR Green*), dividido pelo sinal do corante de referência de uma reação de qRT-PCR
- **rpm** – rotações por minuto
- **RPMI 1640** – meio de cultura RPMI
- **S1D1** – rato *sham*-operado com 1 dia de vida e coleta após 1 dia de cirurgia
- **S1D5** – rato *sham*-operado com 1 dia de vida e coleta após 5 dias de cirurgia
- **S7D1** – rato *sham*-operado com 7 dias de vida e coleta após 1 dia de cirurgia
- **S7D5** – rato *sham*-operado com 7 dias de vida e coleta após 5 dias de cirurgia
- **SPECT** – do inglês, *Single-Photon Emission Computed Tomography* ou tomografia computadorizada de emissão de fóton único
- **SYBR** – corante fluorescente utilizado nas reações de qRT-PCR
- **STAT-1** – do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*
- **SV** – do inglês, *Stroke Volume* ou volume sistólico
- **SW** – do inglês, *Stroke Work* ou trabalho sistólico/cardíaco
- **TA** – temperatura ambiente
- **Th1** – do inglês, *T Helper Cells 1*
- **Th2** – do ing, *T Helper Cells 2*
- **Tissue-Teck O.C.T.** – do inglês, *Optimum Cutting Temperature* ou meio de congelamento para tecidos
- **TLRs** – do inglês, *Toll-like Receptors*
- **TNF- α** – do inglês, *Tumor Necrosis Factor α*
- **TC** – trabalho cardíaco

- **VDF** – volume diastólico final
- **VEGF** – do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*
- **WTSS** – do inglês, *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*

LISTA DE SÍMBOLOS

- α – *alpha*
- β – *beta*
- γ – *gama*
- Δ - *delta*
- **M** - molar
- **mg** – miligramas
- **ml** – mililitros
- **mM** - milimolar
- **mm** – milímetros
- **mmHg** – milímetros de Mercúrio
- **µg** – microgramas
- **µl** – microlitros
- **µM** - micromolar
- **µm** - micrômetros
- **kg** – kilograma
- **U** - unidade
- **ua** – unidade de área
- **vs** - *versus*
- $\neq$ - diferente
- $\leq$ - menor ou igual a
- $\geq$ - maior ou igual a
- $\pm$ - mais ou menos

RESUMO

Nogueira CZ. ***Caracterização morfológica e molecular da regeneração cardíaca em ratos submetidos à ressecção apical*** [Tese]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

A substituição de cardiomiócitos na vida pós-natal tem sido um dos maiores desafios da medicina regenerativa. O conceito de que os cardiomiócitos proliferam ativamente durante o desenvolvimento, mas perdem completamente esse potencial logo após o nascimento, foi recentemente questionado quando as primeiras evidências mostraram a existência de mecanismos endógenos de regeneração cardíaca em camundongos com um dia de vida. Nós avaliamos esse fenômeno em ratos de um dia de vida (P1) e investigamos o impacto da regeneração inicial na perfusão tecidual em longo prazo e a função cardíaca global em resposta ao stress. A homogeneidade da cirurgia de ressecção apical foi comprovada através do exame de ressonância magnética (MRI) e demonstramos que os ratos P1 apresentaram evidências de neoformação de cardiomiócitos a partir da marcação de Troponina I e Conexina 43 na área da lesão 21 dias após a cirurgia de ressecção, enquanto os ratos de sete dias de idade (P7) apresentaram a substituição do tecido principalmente por deposição de colágeno. De maneira interessante, as células recém-formadas apresentaram uma aparente falta de alinhamento uniforme nos ratos P1, e a hipoperfusão do tecido cardíaco foi detectada para ambos os grupos de pós-ressecção 21 e aos 60 dias do exame de SPECT. A função cardíaca basal direta aos 60 dias apresentou-se preservada em todos os grupos, enquanto sob estresse hemodinâmico, o grau de mudança na LVDEP, Volume Sistólico e Trabalho Sistólico indicaram função cardíaca diminuída nos ratos P7. Além disso, a relação pressão-volume diastólica final e o aumento da deposição de colágeno intersticial no P7 são consistentes com o aumento da rigidez da câmara. Coletivamente, nós mostramos que o potencial regenerativo com ausência de remodelamento cardíaco adverso é restrito aos ratos P1. Em seguida, procurou-se avaliar os mecanismos moleculares que regulam esse fenômeno através da combinação de ferramentas exploratórias.

Embora tenha sido descrito anteriormente que o sistema imunológico não é totalmente maduro ao nascimento, o sequenciamento do RNA total de corações de ratos sham-operados, P1 e P7 mostrou que o procedimento cirúrgico foi suficiente para ativar algumas vias ligadas à resposta inflamatória e considerando as subpopulações de macrófagos pró (M1) e anti-inflamatórios (M2), sugerimos que o perfil de macrófagos anti-inflamatórios (M2) infiltrados no coração de ratos P1 são diferentes das células adultas pró-fibróticas regulares. Os meios condicionados M1 e M2 elevaram a taxa de proliferação de cardiomiócitos em condições de normóxia, mas somente o M2 apresentou resposta proliferativa em hipóxia e preveniu a diferenciação-induzida de fibroblastos cardíacos por menor expressão α SMA. Por membranas *array* de citocinas, 15 citocinas apresentaram-se comuns aos dois meios condicionados, mas apenas 4 citocinas, sendo elas IL-4, IL-1 β , IL-6 e Fractalkine, foram exclusivas ao meio condicionado M2, e que poderiam ser possíveis candidatos aos efeitos regenerativos encontrados. Nesse sentido, experimentos futuros fazem-se necessários a fim de explorar os efeitos dessas citocinas e desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Descritores: recém-nascido; miócitos cardíacos; regeneração; inflamação; imagem por ressonância magnética; ratos.

ABSTRACT

Nogueira CZ. ***Heart regeneration after apex resection in rats: morphologic and molecular characterization*** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016

The replacement of cardiomyocytes in postnatal life has proven to be one of the biggest challenges in regenerative medicine. The concept that cardiomyocytes proliferate actively during development but cease completely right after birth has been recently questioned when first evidences showed the existence of endogenous mechanisms of cardiac regeneration in one-day-old mice. We sought to evaluate this phenomenon in one-day-old rats (P1) and to assess the impact of the early regenerative process on long-term tissue perfusion and overall cardiac function in response to stress. We confirmed the successful apical resection surgery through magnetic resonance imaging (MRI) and that P1 heart was associated with evidence of cardiomyocytes neoformation as indicated by Troponin I and Connexin 43 expression at 21 days postresection, while in seven-day-old rats (P7) mainly scar tissue replacement ensued. Interestingly, there was an apparent lack of uniform alignment of newly formed cells in P1, and cardiac tissue hypoperfusion has been detected for both groups at 21 postresection and at 60 days through SPECT scanning. Direct basal cardiac function at 60 days, was preserved in all groups, whereas under hemodynamic stress the degree of change on LVDEP, Stroke Volume and Stroke Work indicated diminished overall cardiac function in P7. Furthermore, the End-Diastolic Pressure–Volume relationship and increased interstitial collagen deposition in P7 is consistent with increased chamber stiffness. Collectively, we showed that regenerative potential with slight collagen deposition is restricted to P1 rats. Then we sought to evaluate the molecular mechanisms that regulate this phenomenon through explorative tools. Although it has been previously described that the immune system is not fully mature at birth, total RNA sequenced from sham-operated, P1 and P7 heart rats showed that surgery is sufficient to activate inflammatory pathways, and considering pro (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages subpopulations, we

suggested that invaded macrophages in resected P1 hearts are different from the traditional pro-fibrotic M2-like adult cells. Conditioned M1 and M2 medium elevated cardiomyocytes proliferative rate under basal conditions, but only M2 produced the same effect in cardiomyocytes under hypoxia and prevented myofibroblasts-induced differentiation through α SMA intensity expression. Membrane array for cytokines showed 15 common cytokines for both M1 and M2 conditioned medium, but only 4, as IL-4, IL-1 β , IL-6 and Fractalkine, were M2 exclusive and possible candidates to the regenerative potential. Additional experiments are needed to further explore these cytokines and to maybe develop new therapeutic strategies.

Descriptors: infant, newborn; myocytes, cardiac; regeneration; inflammation; macrophages; magnetic resonance imaging; rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 As doenças cardiovasculares e as terapias atuais

As doenças cardiovasculares são um alarmante problema de saúde mundial e estão associadas a elevadas taxas de morbimortalidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 17 milhões de óbitos anualmente, em todo o mundo. Nos Estados Unidos, por exemplo, um a cada três americanos possui um ou mais tipos de doenças cardiovasculares (1). No Brasil, a incidência dessas doenças representa 29,4% da mortalidade, atingindo mais de 300 mil pessoas todos os anos (2). A maioria das doenças cardiovasculares tem como via final comum a insuficiência cardíaca (IC), uma síndrome degenerativa multifatorial com consequente comprometimento da função cardíaca global (3). Dentre as causas, a principal delas deve-se ao fato do coração pós-natal ser um órgão com baixa capacidade regenerativa. Durante o desenvolvimento embrionário, os cardiomiócitos proliferam e dividem-se ativamente. No entanto, logo após o nascimento, essas células perdem sua capacidade proliferativa, quando passam por mais um ciclo de síntese de DNA e mitose nuclear, sem que a citocinese ocorra, resultando na binucleação da maioria dos cardiomiócitos adultos (4-8). Em decorrência de uma lesão cardíaca, com a perda de bilhões de cardiomiócitos e somada à incapacidade dos cardiomiócitos adultos em proliferar, a reparação do miocárdio se dá por tecido fibrótico (9). Ademais, outros distúrbios de sobrecarga cardíaca como a hipertensão ou a doença de válvula cardíaca também contribuem para a perda lenta dos cardiomiócitos ao longo dos anos (10). Além disso, o envelhecimento natural também contribui com a perda de aproximadamente um grama de miocárdio (em torno de 20 milhões de cardiomiócitos) por ano, mesmo com a ausência de doença cardíaca específica (11). Em longo prazo, o remodelamento cardíaco adverso em consequência da perda de massa contrátil, fatalmente progride para um quadro de insuficiência cardíaca (12). Por esses motivos, a medicina regenerativa é de extrema importância e ao longo dos últimos

vinte anos, pesquisadores direcionaram seus estudos a diversos métodos intervencionistas após a lesão do miocárdio. O principal objetivo da regeneração tecidual é a formação de novos cardiomiócitos funcionais, a fim de prevenir ou tratar a insuficiência cardíaca, na tentativa de melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes (13). Os campos interdisciplinares cruzam os avanços em diversas áreas como as de células-troncos, biologia do desenvolvimento e a de bioengenharia de tecidos, na tentativa de criar um novo miocárdio que possa ser elétrica e mecanicamente integrado ao coração (13). Entretanto, essas terapias são incapazes de reverter o quadro crônico da insuficiência cardíaca, por não atuarem especificamente na causa fundamental do problema, a perda de cardiomiócitos (14).

Ao mesmo tempo, diversas estratégias de regeneração cardíaca têm sido propostas, a fim de estimular a produção de novos cardiomiócitos. Dentre elas, as terapias celulares e gênicas, ativação de populações de células progenitoras endógenas, estímulo à reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular e a reprogramação celular direta são algumas das abordagens (14). Entretanto, as principais terapias utilizadas atualmente reduzem a morbimortalidade da insuficiência cardíaca por bloquear a ativação neuro-humoral crônica (15). Além de seu principal alvo de atuação ser através de mecanismos parácrinos, ao estimularem vias protetoras do miocárdio e também a produção de novos vasos sanguíneos (16-19).

Ao longo da última década, esforços foram investidos no desenvolvimento de terapias baseadas em células-tronco para o reparo cardíaco (19, 20). Diversos tipos de células progenitoras adultas foram injetadas no coração lesado ou na circulação coronária, tanto em ensaios pré-clínicos e clínicos, a fim de alcançar a regeneração cardíaca. Dentre os tipos celulares, estão as células não fracionadas derivadas da medula óssea, células mononucleares, células mesenquimais derivadas do estroma, células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais, mioblastos do músculo esquelético e células progenitoras cardíacas (21). O tipo ideal de célula para atuar na substituição do tecido miocárdio lesado deveria apresentar capacidade de contração, possuir propriedades

eletrofisiológicas, a habilidade de sobreviver e integrar a área isquêmica, o potencial de proliferação e a habilidade de extrair efeitos parácrinos, a fim de estimular a regeneração endógena, como por exemplo, a vascularização (22). Os efeitos parácrinos, baseados na secreção de uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, estão sendo analisados a fim de justificar os modestos, embora presentes, benefícios terapêuticos fornecidos por essas células (20).

De modo geral, essas abordagens tem fornecido uma melhora modesta na função cardíaca, enquanto que a capacidade das células implantadas em se diferenciar em cardiomiócitos continua a ser questionada (23, 24). Apesar disso, enquanto a maioria dos ensaios apresenta uma possibilidade de melhora no quadro e na qualidade de vida dos pacientes, ainda existem limitações e barreiras clínicas translacionais (25). Uma alternativa e também uma abordagem complementar é explorar e por fim, tentar recapitular mecanismos inatos da regeneração cardíaca como os que evoluíram em organismos com alta capacidade de regeneração (26).

1.2 Evidências de proliferação de cardiomiócitos na vida pós-natal

Como referido anteriormente, a regeneração cardíaca vem sendo intensamente investigada e tem se mostrado extremamente controversa, há mais de 150 anos (27). Havia um consenso na medicina de que o coração adulto de mamíferos era um órgão terminantemente diferenciado e que as células cardíacas não apresentavam capacidade proliferativa na vida adulta. No entanto, essa tradicional visão de que o coração não apresenta qualquer capacidade de renovação das células cardíacas tem sido recentemente questionada, por um crescente número de estudos realizados em humanos (26). Através da avaliação histológica de corações infartados, pesquisadores encontraram 4% de cardiomiócitos em atividade mitótica na região adjacente à lesão, e aproximadamente, 1% na região da lesão (28). Em outro trabalho, foi avaliada a

neoformação de cardiomiócitos, no coração pós-natal ao longo da vida adulta, por incorporação de carbono 14 no DNA celular. Bergmann e colaboradores (29) estimaram que 0,5-2,0% de cardiomiócitos são formados ao ano, ao longo da vida, sendo que os valores mais altos estão na 1ª-2ª décadas de vida e que, a partir da 4ª década, as taxas são menores, aproximando-se de 0,5% ao ano. Seguindo esse raciocínio, a integração desses valores ao longo de sete décadas de vida resultaria na renovação de quase 50% das células do coração. Somado a isso, foi avaliada a síntese de DNA em células de corações humanos *post-mortem*, tratadas com iododeoxiuridina (IdU), e verificou-se que, em média de 22% de cardiomiócitos, 20% de fibroblastos e 13% de células endoteliais são gerados por ano (30), porém sem evento de lesão. De maneira semelhante, a proliferação de cardiomiócitos em corações de camundongos jovens adultos, foi demonstrada através da combinação de duas técnicas, a marcação genética de cardiomiócitos preexistentes e o imageamento de multi-isótopos por espectrometria de massas (31). O estudo mostrou que, aproximadamente, 0,76% de novos cardiomiócitos são formados a partir de cardiomiócitos preexistentes. Além disso, após infarto do miocárdio, a proliferação dos cardiomiócitos aumenta, quando cerca de 3% de novas células, na borda do infarto, apresentaram atividade de divisão celular, em um período de oito semanas de acompanhamento. Por mais que os mecanismos atuais de avaliação da regeneração cardíaca ainda causem muitas controvérsias, o grau de neoformação celular seria insuficiente para repovoar o grande número de cardiomiócitos perdidos após lesão isquêmica do miocárdio, sendo que nessa fase de vida, os níveis de proliferação são os menores encontrados. Por esse motivo, a regeneração cardíaca tornou-se o maior objetivo da pesquisa contemporânea no ramo. Devido às muitas dificuldades, uma promissora alternativa seria explorar e recapitular os mecanismos endógenos encontrados nos organismos altamente regenerativos, como por exemplo, os *zebrafishs* e os que apresentam uma “janela de oportunidades”(26).

O *zebrafish* tornou-se um modelo de estudo muito favorável, por apresentar robusto potencial regenerativo e maneabilidade para a manipulação genética. Além disso, esse peixe é capaz de regenerar o miocárdio, na fase adulta, mesmo

quando submetido a diferentes tipos de lesão cardíaca: ressecção ventricular, criolesão ou ablação genética de cardiomiócitos (32-34). O coração de baixa pressão do *zebrafish* regenera-se completamente quando submetido à cirurgia de ressecção de aproximadamente 20% da massa total ventricular (33). Tal processo se inicia com a formação de um coágulo de fibrina, que será gradualmente substituído por cardiomiócitos *de novo*, os quais regeneram o tecido e evitam a formação de uma escara madura de colágeno (33, 35-37). Esse evento envolve uma grande quantidade de cardiomiócitos em proliferação, porém até mesmo em níveis basais, os cardiomiócitos do *zebrafish* apresentam uma atividade proliferativa maior que as mesmas células de mamíferos. Um estudo mostrou que cerca de 3% dos cardiomiócitos no miocárdio não lesado de corações de *zebrafishs* adultos, incorporam BrdU (*Bromodeoxyuridine*), durante um experimento de marcação pulsada, por um período de sete dias. Duas semanas após a ressecção do ápice cardíaco, a fração de cardiomiócitos positivos para BrdU aumentou dez vezes, e tal parâmetro permaneceu alto mesmo após um mês da lesão (33). Além disso, alguns estudos iniciais sugeriram que as células progenitoras indiferenciadas também participam da população de cardiomiócitos com potencial regenerativo, no coração do *zebrafish* (35). No entanto, estudos mais recentes utilizando-se de uma identidade genética no desenvolvimento, demonstraram que os próprios cardiomiócitos pré-existentes são os que participam da cardíaca (36, 37), uma vez que são capazes de se dediferenciar e originar novas células funcionais. Em resumo, a regeneração cardíaca do *zebrafish* é mediada principalmente pela proliferação de cardiomiócitos pré-existentes, ao invés da geração de novos cardiomiócitos a partir de células-tronco (13). Embora não apresentem alta capacidade regenerativa como visto em *zebrafish*, os corações pós-natais de mamíferos adultos apresentam certo nível de renovação de cardiomiócitos durante o período normal do envelhecimento e em razão de doenças.

1.2.1 Evidência de regeneração cardíaca em roedores

Mesmo com toda a recente atenção nessa área, esse não é um conceito novo. Níveis extremamente baixos, porém detectáveis de atividade proliferativa de cardiomiócitos já foram reportados desde antes dos anos 60 (13, 38). Capturar o raro evento da divisão de cardiomiócitos nos corações de mamíferos é tecnicamente desafiador, mas avanços foram feitos com a técnica de modelos transgênicos de camundongos (13). Estudos realizados por Soonpaa e Field (38, 39), demonstraram a evidências da atividade de cardiomiócitos, em coração de camundongos adultos, com indícios de 0,0006% no coração sadio e, aproximadamente, 0,0083% na borda dos que sofreram algum tipo de lesão, a partir da criação de camundongos transgênicos para a marcação cardiomiócito-específica da cadeia pesada de α -miosina (α -MHC), pela expressão nuclear de β -galactosidade (39). Embora os índices de proliferação de cardiomiócitos fossem baixos, havia a possibilidade da manipulação terapêutica, a fim de potencializar tais fenômenos. A utilização de camundongos transgênicos para superexpressão cardiomiócitos-restrita de ativadores do ciclo celular, como ciclina D2, sugeriu melhora da função mecânica cardíaca e diminuição da cicatriz de tecido conectivo, após indução experimental de infarto do miocárdio (40). A reativação da proliferação de cardiomiócitos através da administração de fármacos tornou-se uma abordagem mais prática do que a terapia gênica, e alguns trabalhos demonstraram que moléculas de sinalização periostina (Postn), fator-1 de crescimento de fibroblasto (FGF-1) e neuregulina 1 (NRG1) estimularam ações mitóticas em cardiomiócitos ventriculares de adultos e apresentaram efeitos benéficos na estrutura e função cardíacas após indução experimental do infarto do miocárdio (41). No geral, a maioria dos estudos se concentrou na reativação da proliferação de cardiomiócitos pré-existent, porém pesquisadores desenvolveram um modelo para registrar a identidade genética no desenvolvimento, a fim de determinar o papel de células progenitoras na regeneração cardíaca, utilizando-se de camundongos transgênicos (42), seguindo a mesma linha dos modelos de *zebrafish*. Nesse modelo, os cardiomiócitos eram

marcados por um pulso de tamoxifeno, permitindo a distinção de renovação a partir de cardiomiócitos pré-existentes (os que se apresentariam marcados positivamente) ou derivados de células progenitoras cardíacas (que se apresentariam por cardiomiócitos não-marcados). De maneira interessante, os autores mostraram uma contribuição pouco significativa das células progenitoras durante o envelhecimento natural, depois de mais de um ano do tratamento com tamoxifeno. No entanto, após o infarto do miocárdio, os resultados sugeriram uma maior atuação da população das células progenitoras no pós-lesão (42). Quando combinados com a baixa taxa de proliferação de cardiomiócitos em corações de camundongos adultos, tanto no coração normal, quanto no pós-lesão, esses dados sugerem que os mecanismos limitados de reparação endógena no coração de mamíferos adultos operam de maneira diferente ao *zebrafish*. (13). No entanto, mais recentemente, o modelo de lesão cardíaca por ressecção apical, previamente desenvolvido em *zebrafish*, foi aplicado a camundongos neonatos, os quais apresentaram um mecanismo de regeneração semelhante. Para tal, os pesquisadores ressectaram o ápice do ventrículo esquerdo de camundongos com um dia de vida e após três semanas da lesão observaram uma breve resposta regenerativa, quando, a região da ressecção foi repovoada por tecido miocárdico funcional, o qual apresentou função normal de contração após oito semanas (43). Esse perfil regenerativo prevalece apenas nas primeiras horas após o nascimento, uma vez que a resposta da cirurgia realizada em camundongos com sete dias de vida é reparativa, com formação de uma escara de colágeno, semelhante à resposta no adulto. Mais que um modelo de estudo, o animal neonato, logo nas primeiras horas após o nascimento, proporcionou uma inédita “janela de oportunidades”. Dessa forma, o melhor entendimento da orquestrada resposta à lesão cardíaca em neonatos, bem como o desenvolvimento e modulação de novas terapias capazes de potencializar a regeneração cardíaca, são de grande valia para o tratamento de doenças cardiovasculares. Somado à remanescente capacidade de proliferação dos cardiomiócitos, acredita-se que a resposta do sistema imunológico dos neonatos logo nos primeiros dias de vida, influencia de

maneira diferente a capacidade de resposta inflamatória quando comparada à dos adultos, o que poderia favorecer, de certa forma, a regeneração cardíaca.

1.3 A resposta inflamatória no neonato – a transição do nascimento e a maturação do sistema inflamatório

No nascimento, os órgãos e sistemas são submetidos a uma dramática transição, quando passam do ambiente protegido intrauterino, biologicamente estéril, para um ambiente radicalmente distinto do meio externo, onde há tanto microrganismos benéficos quanto patogênicos, e quando a proteção torna-se vital (44, 45). Essa transição aguda é acompanhada de uma gradual maturação ao longo da idade e, logo após o nascimento, o sistema imunológico também passa por um período de maturação idade-dependente (44). Os sistemas imunológicos fetal e neonatal estão associados com três principais demandas fisiológicas: proteção contra infecção, que inclui patógenos virais e bacterianos na interface maternal-fetal (45, 46); prevenção de potenciais respostas de células pró-inflamatórias ou células T (Th1- *T Helper Cells 1*) que possam ser danosas à mãe e ao feto, por apresentar um potencial de induzir reações aloimunes; e a mediação da transição entre o ambiente intrauterino normalmente estéril e o ambiente desconhecido rico em antígenos no mundo exterior, incluindo a colonização primária da pele (47) e do trato intestinal (48) por microrganismos (44). Devido à já mencionada limitada exposição a antígenos no ambiente intrauterino, as já descritas falhas na resposta imune adaptativa dos neonatos e na falta de memória imunológica (49), os recém-nascidos devem se amparar no sistema imune inato para proteção (50, 51). O interesse no papel dos componentes inatos do sistema imunológico, em definir as capacidades de defesa dos neonatos tem uma longa, porém intermitente história. Essa falta de continuidade dos estudos acarretou em consideráveis lacunas, dando lugar a contradições na literatura. Nesse sentido, embora a compreensão geral tenha se desenvolvido na imaturidade ou na imunodeficiência dos neonatos, novos estudos indicam que os neonatos são competentes para desenvolver respostas maduras, sugerindo simplesmente que,

o menor tamanho ou a menor quantidade de células imunológicas atue na diferença das respostas entre adultos e neonatos (49). A maioria das pesquisas sobre imunologia em neonatos, há um tempo, tem se focado na dificuldade da mobilização de respostas adaptativas, tanto humoral quanto celular, logo nos primeiros dias de vida. Além da possível diferença na quantidade de mediadores, nas células disponíveis e também na qualidade das atividades das defesas imunológicas, outro fator importante que contribui para esse perfil é o menor número de células imunológicas presentes nos tecidos linfoides periféricos no começo da vida, especialmente em camundongos (49). Além de diferenças quantitativas, estudos realizados em humanos e em camundongos sugeririam também, diferenças qualitativas nas células imunes de neonatos e adultos. Experimentos desenvolvidos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostraram deficiências e também anomalias entre células T, B e células apresentadoras de antígenos (células APC) (49). Somada à ineficiente apresentação de antígenos por parte das células dendríticas (52), a co-estimulação de linfócitos naíve que está longe de ser a ideal (53) e os efeitos supressivos de anticorpos passivos (maternos) na resposta imune adaptativa já foram documentados (54). No que diz respeito à imunidade celular, estudos mostraram que sob estímulo, os linfócitos T de neonatos, tanto de humanos quanto de ratos, são menos responsivos que os de adultos. As células T de neonatos exibem deficiências como diminuição de respostas proliferativas (55-57), baixa produção de interleucina-2 (IL-2) (55), atividade citotóxica diminuída (58), pouca habilidade em fornecer auxílio aos linfócitos B (56, 59) e produção alterada de citocinas (57, 58), contribuindo, em suma, para uma global resposta imunológica celular diminuída (60). Além disso, diversos estudos mostraram uma redução da resposta inicial induzida por citocinas, incluindo a produção de endotoxina induzida por *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), pró-inflamatória e Th1-polarizante, de células de neonatos (61-64), enquanto que outros estudos sugeriram que a produção neonatal de interleucina-6 (IL-6), uma citocina com propriedades anti-inflamatórias (65) e características Th2-polarizantes (Th2- *T Helper Cells 2*) (66) pode estar aumentada (67, 68). Os níveis de produção de citocinas também parecem ser diferentes nos neonatos

quando comparados aos adultos. No período fetal, a produção excessiva de *interferon- γ* (IFN- γ) na interface materna-fetal não só é deletéria para a integridade placentária, como também a maior causa de perda fetal (69). A produção de interleucina-18 (IL-18), também reconhecida como um fator de indução de IFN- γ , por linfócitos de neonatos parece estar diminuída em comparação a células de adulto (70, 71). Além disso, outros estudos demonstram que as células T neonatais de humanos geralmente produzem menores níveis de IL-2, IFN- γ e interleucina-4 (IL-4) quando comparados às células de adultos, possivelmente devido ao status de deficiência de memória imunológica (72, 73). Os macrófagos de neonatos expostos a lipossacarídeos (LPS) também apresentam déficit na produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, interleucina-12 (IL-12) e TNF- α (74, 75), porém produziram níveis de interleucina-10 (IL-10) que foram de três a cinco vezes maiores que nos macrófagos adultos, sugerindo que os macrófagos neonatos podem ser deficientes na expressão de *toll-like receptor 2* (TLR2), *toll-like receptor 4* (TLR4) e *cluster of differentiation molecule 14* (CD14), receptores de LPS (75).

1.3.1. Os leucócitos neonatais

Em mamíferos, os recém-nascidos apresentam um número reduzido de granulócitos quiescentes e células progenitoras de monócitos, além de um estoque de precursores diminuído, que pode resultar em defeitos quantitativos dos neutrófilos em situação de estresse (no caso de sepse, por exemplo). No sentido qualitativo, os neutrófilos neonatais apresentam um bloqueio de múltiplos aspectos funcionais, como quimiotaxia, adesão de rolamento, transmigração e formação de pseudópodos (76-78). Tais defeitos funcionais se correlacionam com a alta proporção de neutrófilos imaturos no cordão umbilical, os quais apresentaram redução na expressão e função do receptor 3 do complemento (CR3, também conhecido por CD11b/CD18) (79) e expressão de L-selectina diminuída (80). Além disso, o recrutamento reduzido dos neutrófilos neonatais a locais de inflamação pode estar relacionado a não somente expressões diminuídas de integrinas e

selectinas, mas também devido à propensão de monócitos neonatais e APCs em produzirem grandes quantidades de IL-6 (64, 68), citocina que atua na migração de neutrófilos a locais de inflamação (66). Essas características dos neutrófilos neonatais começam a amadurecer nas primeiras semanas de vida (80). Os monócitos e macrófagos provêm de um precursor mieloide comum e possuem um papel essencial no sistema imunológico inato (81-83). Os monócitos são fagócitos mononucleares que circulam na corrente sanguínea e podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas nos tecidos periféricos. Os monócitos consistem em duas subpopulações: os clássicos e os não-clássicos (84). Os monócitos clássicos, também conhecidos como pró-inflamatórios, são importantes para a proteção imune inata contra patógenos infectantes. Essas células são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e também de originar células dendríticas produtoras de TNF e *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), as quais contribuem no desenvolvimento de respostas imunes adaptativas. Já os monócitos alternativos, ou anti-inflamatórios, patrulham a circulação sanguínea e são conhecidos por promoverem a cicatrização de tecidos. Há evidências de que essas células são derivadas dos monócitos clássicos e que também podem dar origem a macrófagos tecido-residentes (84). Os monócitos adquirem capacidade de diferenciação e de produção de mediadores inflamatórios precocemente (85-89), no entanto, evidências em humanos mostraram a imaturidade dessas células no sistema imunológico inato em fetos, incluindo seu componente fundamental, o sistema de fagocitose mononuclear. Além disso, o padrão de produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-6 e TNF- α apresentaram menores níveis em neonatos quando comparados aos adultos (90). Outros estudos mostraram que a quantidade dessas células circulantes é semelhante nos neonatos e nos adultos (91, 92), no entanto, a produção de monócitos por neutrófilos quimiotáticos e por fatores de ativação podem estar reduzidos nos neonatos (93).

1.3.2. O papel dos macrófagos na lesão cardíaca

Os macrófagos, que significam os “grandes comedores” na Grécia, são classificados como sendo as principais células fagocíticas em mamíferos e em outros organismos (94). Considerando a ontogenia e ações altamente heterogêneas (95), os macrófagos participam na limpeza de debris teciduais, na detecção de patógenos e do dano ao tecido. Três características chaves possibilitam os macrófagos a realizarem suas funções: (1) a adoção de ampla macropinocitose, a fim de avaliar a extensão da perturbação tecidual (96); (2) a disposição de um conjunto de receptores de reconhecimento (PRRs) que distinguem partículas estranhas e células dano-associadas, incluindo CD14, o receptor de LPS, receptores de manose e receptores Toll-like (TLRs), e cujas características favorecem na detecção e no processamento de antígenos, além de apresentarem os antígenos aos linfócitos T, via moléculas *major histocompatibility complex II* (MHC II), a fim de ativar as respostas imunes adaptativas; e (3) a secreção de fatores que facilitam seu papel como “faxineiros” teciduais e orquestradores de reparo (94). Diversos trabalhos mostraram a versatilidade desse tipo celular, atuando tanto na homeostase tecidual quanto no reparo de lesões, especialmente no coração (94). A partir de interações com outros tipos de células cardíacas, os macrófagos podem também participar da regeneração do miocárdio.

Há mais de 70 anos, patologistas cardíacos notaram que o infarto do miocárdio acarretava na intensa reação inflamatória caracterizada pela infiltração de leucócitos no coração infartado (97, 98). Nas décadas seguintes, o reconhecimento das propriedades nocivas dos leucócitos e sua associação com os cardiomiócitos na área da borda viável do infarto sugeriram que as subpopulações de células derivadas do sangue têm a capacidade de se aderir a cardiomiócitos viáveis e exercer efeitos citotóxicos, extendendo a lesão isquêmica (99). No adulto, a intensa reação inflamatória pós-lesão é um pré-requisito para a formação de uma cicatriz de colágeno (100). Esse processo resulta de uma sequência de eventos que podem ser classificados em três fases: a fase

inflamatória, a proliferativa e a de maturação (101). A morte aguda de cardiomiócitos no coração infartado, rapidamente ativa as vias do sistema imune inato que iniciam uma intensa, porém transiente, reação inflamatória. Essa resposta limpa as células mortas da área do infarto e os debris de matriz extracelular, e então é reprimida, a fim de preparar o tecido para a fase proliferativa do reparo. Durante essa fase, as células mononucleares e os macrófagos secretam fatores de crescimento que ativam as células mesenquimais reparativas, principalmente miofibroblastos e células vasculares. Os miofibroblastos secretam grande quantidade de proteínas de matriz extracelular, a fim de preservar a integridade estrutural do ventrículo esquerdo. A apoptose da maioria das células reparativas marca o fim da fase proliferativa, quando o infarto amadurece e a cicatriz de colágeno é formada (101). Embora os estímulos do microambiente e os fenótipos funcionais resultantes sejam variados, dois fenótipos principais de macrófagos foram sugeridos, na cinética da resposta inflamatória, baseando-se no esquema de polarização Th1/Th2. Isso inclui os macrófagos classicamente ativados (M1) e os alternativamente ativados (M2) (102, 103). As citocinas relacionadas à Th1, como IFN- γ ou LPS, polarizam os macrófagos para um fenótipo do tipo M1 (Figura 1), os quais são caracterizados pela alta expressão de interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), baixa expressão de interleucina-10 (IL-10) e são engajados em atividades inflamatórias, microbicidas e tumoricidas (104). Por outro lado, as citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, polarizam os macrófagos para o tipo M2 (Figura 1), os quais são caracterizados pela alta expressão de IL-10, interleucina-1ra (IL-1ra) e baixa expressão de IL-12, por exemplo. Além disso, essas células apresentam alta atividade fagocítica, alta expressão de receptores de galactose, manose, arginase e ainda possuem funções imunomodulatórias, diminuem a inflamação e promovem reparo e remodelamento tecidual (103, 105, 106).

Figura 1: Esquema representativo da polarização de macrófagos para o perfil M1, inflamatório e para o perfil M2, anti-inflamatório.

Os macrófagos M1 são os classicamente ativados, por IFN γ , LPS ou TNF α e secretam, dentre outras, quimiocinas e citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, ROS e TNF α . Possuem características de citotoxicidade e lesão tecidual. Já os macrófagos M2 são os alternativamente ativados, por IL-4, IL-13, IL-10 ou TGF β e secretam, dentre outras, IL-10, VEGF, PDGF, EGF, TGF β e arginase. Possuem características de supressão imunológica, proliferação, remodelamento e reparo tecidual. Adaptado do site: <http://endocomprehensive.blogspot.com.br/2014/06/macrophages.html>

1.3.3. Os macrófagos na regeneração cardíaca

A lesão cardíaca é normalmente acompanhada de uma robusta infiltração de células inflamatórias, e na regeneração cardíaca, vista em animais neonatos, isso não é diferente (107). Além disso, já foi descrita a ativação de genes ligados à resposta inflamatória logo após a lesão nesses animais (43, 107). Alguns trabalhos já demonstraram que o sistema imunológico continua sua maturação após o nascimento e que, muitas das mudanças na expressão de citocinas e de funções celulares que ocorrem, coincidem com o período de regeneração cardíaca no neonato (107). A habilidade dos macrófagos em infiltrar os tecidos, responder a

estímulos locais e transmitir sinais ligados à regeneração caracteriza-os como potenciais reguladores da regeneração tecidual, e considerando as propriedades regenerativas dos macrófagos vistas em outros tecidos (108, 109), essas células podem também atuar na regeneração cardíaca. Em *zebrafish*, por exemplo, devido ao coágulo de fibrina formado na área de ressecção apical, há recrutamento de células mieloides e de macrófagos, os quais secretam fatores de crescimento que atuam na regeneração (33, 37, 110-112). Nos camundongos neonatos, a recentemente demonstrada regeneração cardíaca após ressecção apical, também é acompanhada de resposta inflamatória, dediferenciação de cardiomiócitos, proliferação e rediferenciação. Aurora e colaboradores (107) sugeriram que os macrófagos são essenciais para a regeneração cardíaca no camundongo e que sete dias após a lesão, os neonatos ressectados com um dia de vida apresentaram mais macrófagos distribuídos uniformemente por todo o coração quando comparados aos neonatos ressectados com sete dias de vida. Por outro lado, a depleção de macrófagos eliminou a capacidade regenerativa cardíaca de camundongos neonatos (107), reduzindo também a vascularização miocárdica. Da mesma forma, a depleção de macrófagos resultou na alta taxa de mortalidade, acompanhada de aumentada dilatação da câmara do ventrículo esquerdo e afinamento da parede, em camundongos submetidos à criolesão (113). De maneira geral, as evidências sugerem que monócitos e macrófagos neonatais apresentam potenciais regenerativos e angiogênicos, diferenciando-os da função classicamente pró-fibrótica das células adultas (107).

Considerando que a descoberta de novos modelos de estudo com potencial de se tornarem ferramentas de modulação e exploração dos processos celulares e moleculares que governam a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos, os objetivos deste trabalho são testar a hipótese de que o rato neonato com um dia de vida (P1) apresenta potencial de regeneração cardíaca após ressecção apical e que tal potencial é perdido no rato neonato com sete dias de vida (P7), identificar por meio de ferramentas exploratórias, a ativação de vias ligadas à resposta anti-inflamatória, e demonstrar que os macrófagos M2 dão suporte à proliferação e previnem o remodelamento cardíaco adverso.

2. OBJETIVOS

Testar a hipótese de que o rato neonato com um dia de vida (P1) apresenta potencial de regeneração cardíaca quando submetido à cirurgia de ressecção apical, e que tal potencial está circunscrito somente nas primeiras horas após o nascimento.

Objetivos específicos:

Determinar um método de avaliação da confiabilidade da cirurgia de ressecção apical, como característica de inclusão dos animais no estudo;

Avaliar a perfusão tecidual e a função cardíaca global na janela de regeneração e em longo prazo nos ratos adultos, em ambos os grupos, em condições basais e no pós-carga;

Identificar proteínas-chave de vias ligadas à resposta inflamatória nos ratos P1, através de ferramentas exploratórias de ionização tecidual e análise da relação massa/carga;

Avaliar o papel da resposta inflamatória, mais especificamente, o papel dos macrófagos polarizados para o perfil anti-inflamatório, na proliferação de cardiomiócitos isolados e na prevenção do remodelamento de fibroblastos cardíacos, em cultura de células de ratos neonatos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cirurgia de ressecção apical cardíaca

Ratos *Wistar* fêmeas com diferentes idades foram mantidas em caixas especiais (dois animais/caixa) com livre acesso à água e a comida, sob ciclo claro-escuro de 12 horas. Um rato macho *Wistar* foi adicionado à caixa para o acasalamento. Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas em caixas individuais e o controle do momento do nascimento dos filhotes foi feito por observação de duas vezes ao dia (de manhã e à tarde). A cirurgia de ressecção apical foi realizada em ratos neonatos com um e sete dias após o nascimento. A anestesia para o procedimento foi realizada por hipotermia e após cerca de 10 minutos de exposição do neonato à cama de gelo (mantida dentro de um isopor para evitar ganho de calor), os ratos tanto com um, quanto com sete dias de vida apresentaram coloração mais arroxeada, característica pela redução da atividade respiratória, redução dos movimentos das patas, redução da sensibilidade à dor e também dos batimentos cardíacos. A partir daí, os ratos foram fixados à mesa de procedimentos pelas patas, expondo melhor, assim, o tórax. A cirurgia consistiu na toracotomia lateral entre a 5ª e a 6ª costela, com exposição da cavidade torácica (essa posição de abertura garante acesso direto ao ápice cardíaco; Figura 2). Pequenos espaçadores foram utilizados para garantir acesso ao coração e então, com uma pinça fina, abriu-se uma pequena fenda no pericárdio a fim de permitir livre movimentação e exposição do ápice cardíaco à superfície. Uma porção do ápice então foi extraída com uma tesoura de íris e logo em seguida, o coração foi realocado na cavidade torácica. O animal foi então suturado, com fio de sutura não absorvível 7.0, unindo a área muscular entre as duas costelas e depois a pele externa. Ao final do procedimento, o neonato foi colocado em uma câmara com temperatura e ventilação controladas. O período de reaquecimento do animal foi gradualmente restabelecido até completa mobilidade do animal (aproximadamente 20 minutos). Os procedimentos experimentais estavam de acordo com as normas

e regras institucionais e foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#285/12).

Figura 2: Cirurgia de ressecção apical em ratos neonatos

O animal foi fixado à mesa cirúrgica e a toracotomia lateral foi realizada entre a 5ª e a 6ª costela. Pequenos espaçadores garantiram acesso ao pericárdio, o qual foi perfurado, a fim de garantir mobilidade do coração (A). Com uma tesoura de íris, foi realizada a ressecção apical (B), e a porção apical retirada está apontada com a seta (seta branca, B).

3.2. Ressonância magnética

O exame de ressonância magnética foi realizado a fim de determinar a porção da área cardíaca ressectada nos ratos neonatos submetidos ao procedimento cirúrgico. Para tal, foi utilizado um scanner de 1.5T (*Philips Achieva*) e uma bobinha de punho de quatro canais para maior sensibilidade do exame. Os ratos neonatos foram anestesiados por inalação de uma dose controlada de isoflurano (*Isothane*, Baxter Healthcare), em aproximadamente 1-1,5% 1L/minuto de oxigênio e foram colocados sob uma bolsa de 250 ml de solução salina para obtenção de sinal pelo equipamento, na posição decúbito dorsal, e primeiro as patas. Um localizador plano de três canais e uma sequência de pulsos bidimensionais de campo rápido forneceram imagens de localização cardíaca e a prescrição da próxima sequência de pulsos de imagens. O tempo médio de aquisição das imagens em três dimensões foi de oito minutos e 52 segundos. Os animais foram escaneados antes e imediatamente após a cirurgia, e aqueles que não apresentaram a porcentagem mínima de 15% de ressecção do ápice cardíaco

foram excluídos do grupo experimental. As aquisições foram analisadas no software Vevo de análise de imagens (*Vevo Analysis Packages*) e a porcentagem de ressecção foi a diferença entre as áreas cardíacas pré e pós-procedimento.

3.3. Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)

A avaliação de perfusão miocárdica foi realizada com 21 dias após a cirurgia e aos 60 dias de vida, nos dois grupos experimentais, por tomografia computadorizada por emissão de fóton único, através do scanner Triumph™ (GE Healthcare). Para tal, os ratos foram anestesiados com 1.5 - 2.5% de isoflurano em 2 L/minuto de oxigênio e, aproximadamente, 37 MBq Sestamibi-99mTc foram injetados na veia caudal. Os animais foram posicionados no scanner e a aquisição foi feita após, em média, 30 minutos da injeção do tecnécio radioativo. O tempo de aquisição foi de aproximadamente 30 minutos. As imagens foram analisadas de acordo com o método de Bullseye, o qual dividiu o coração em 17 segmentos, dos quais cinco representaram o ápice cardíaco e os outros 12, a área remota do coração. Os dados foram normalizados pela porcentagem do segmento cardíaco que apresentou maior atividade, e a quantificação foi realizada de maneira “cega” por um profissional especializado.

3.4. Análises hemodinâmicas cardíacas

O desempenho cardíaco global foi avaliado por aferência direta através de exames hemodinâmicos. Os ratos sham-operados e os ratos ressectados com um e sete dias após o nascimento foram avaliados aos 60 dias de vida. Os animais foram anestesiados com dose ajustada de cloreto de uretano (1,5 g/kg; Sigma-Aldrich) e a veia femoral esquerda foi acessada para suplementação de anestesia, administração de droga ou solução salina. Um cateter de pressão e volume (MicroTip – modelo 1.4 French SPR 839; Millar Instruments) foi inserido na carótida direita e foi posicionado imediatamente abaixo das válvulas aórticas para monitorar níveis de pressão e volume. Depois de cinco minutos de aferência da

pressão sanguínea arterial basal, o cateter foi posicionado na cavidade do ventrículo esquerdo para aferência de pressão e volume simultâneos e contínuos. A veia jugular direita foi, então, canulada e um volume de 10 μ l de solução salina a 15% foi injetado para aferência de condutância paralela. A calibração do volume foi realizada utilizando-se da regressão linear da condutância do volume do sangue total (quatro câmaras cilíndricas contendo um volume especificado de sangue de rato recém-heparinizado) *versus* o sinal correspondente adquirido pelo cateter de condutância (sangue fresco heparinizado). Os dados foram analisados utilizando-se do *LabChart 7 Software System* (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista) e os parâmetros obtidos foram: frequência cardíaca (FC), média da pressão arterial sistólica (MAP), as pressões diastólicas (LVEDP) e sistólica (LVESP) do ventrículo esquerdo, elevação máxima da pressão do ventrículo esquerdo ($+dP/dt_{max}$) e declínio ($-dP/dt_{max}$), constante de decaimento da pressão do ventrículo esquerdo (Tau), volume sistólico (VS), débito cardíaco (DC) e trabalho cardíaco (TC). Os parâmetros hemodinâmicos foram determinados sob condições basais e durante a sobrecarga de pressão com administração de volume ajustado (25-75 mg/kg de peso corporal) do vasoconstritor cloridrato de fenilefrina (PHE; Sigma-Aldrich) na veia femoral esquerda após vagotomia bilateral, a qual foi realizada a fim de prevenir alterações na frequência cardíaca induzida pelo barorreflexo. As doses de PHE foram ajustadas para cada animal a fim de produzir elevações comparáveis na pressão arterial (de 60-80% maior que na condição basal). A inclinação da relação linear entre a pressão e o volume sistólico final (ESPVR) foi obtida durante a oclusão transiente da veia cava inferior. Depois das aferências, os corações dos animais foram rapidamente coletados, pesados e fixados.

3.5. Análise histológica

As análises histológicas a fim de avaliar a neoformação tecidual e/ou remodelamento cardíaco dos ratos ressectados com um ou sete dias após o nascimento, foram realizadas 21 dias após a cirurgia (P1+21 e P7+21) e nos ratos

adultos, com 60 dias de vida. Os animais foram sacrificados por administração da combinação dos anestésicos xilazina e quetamina (15 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente). Os corações foram então rapidamente coletados, lavados em solução salina, embebidos em solução de meio de congelamento (Tissue-teck O.C.T., Sakura), congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C, até o processamento. Já a análise do infiltrado inflamatório de macrófagos foi realizada em corações de ratos ressectados com um ou sete dias de vida (P1 e P7, respectivamente), coletados um dia ou cinco dias após a lesão (D1 e D5, respectivamente), lavados, fixados em paraformaldeído (PFA) 4% e incluídos em paraplast. Os cortes histológicos do material congelado foram realizados no criostato e os cortes histológicos dos corações incluídos em paraplast foram realizados em micrótomo tradicional, ambos os cortes com 6 µm de espessura.

3.5.1. Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE)

Para todo e qualquer procedimento histológico realizado, os cortes foram fixados em solução de acetona 100% gelada por 20 minutos. A análise geral do tecido foi realizada através da coloração de Hematoxilina (por um minuto) e Eosina (por 30 segundos), a qual cora o tecido vivo em tons de rosa (eosina) e os núcleos celulares em roxo (hematoxilina).

3.5.2. Método de polarização por coloração de Picrosírius-Red (PR)

A coloração de PR permitiu uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido, através da distinta interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados. Depois de fixados, os cortes histológicos foram submetidos à solução de 0,1% de solução de *Sirius-Red* (Direct Red 80, Sigma Aldrich) em ácido pícrico saturado, por 30 minutos. Depois foram lavados em água corrente e os núcleos celulares foram contra corados com Hematoxilina, por um minuto. As lâminas histológicas foram preparadas com meio de montagem e laminina para posterior análise no microscópio de luz.

3.5.3. Ensaio de imunofluorescência

A neoformação celular dos ratos neonatos submetidos à cirurgia de ressecção apical foi avaliada através da imunofluorescência do tecido marcado por Troponina I cardíaca e Conexina 43, como marcador de junções comunicantes. Os cortes foram bloqueados, para evitar ligação inespecífica do anticorpo, com PBS 2% caseína, por uma hora a temperatura ambiente (TA) e incubados com os anticorpos primários *overnight* a 4°C (Troponina I cardíaca ab19615, 1:50, Abcam; Conexina 43, ab11370, 1:50, Abcam). No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBS e os anticorpos secundários conjugados com Alexa fluor 488 e 555 (ambos a 1:400, Invitrogen, Life Technologies) e DAPI (1:100, Invitrogen, Life Technologies), para corar os núcleos, e incubados por 90 minutos a TA, ao abrigo da luz. Os cortes foram então, lavados em PBS e montados com meio de montagem e laminina para análise em microscópio de fluorescência.

3.5.4. Ensaio de imunohistoquímica

Para avaliar a infiltração de macrófagos no tecido cardíaco, foi realizado o ensaio de imunohistoquímica para células CD68 positivas. Os cortes foram hidratados (soluções de xilol e álcool) e lavados 3x em água corrente e, submetidos à recuperação antigênica (1:10, *Antigen Retrieval Buffer 1*, PMB1-250, *Spring Bioscience*) em panela de pressão, por 15 minutos, até atingir 95°C e por mais 15 minutos até atingir 36°C. As lâminas foram resfriadas por 20 minutos e então foram bloqueadas em solução de PBS BSA 2% por uma hora, a TA. O anticorpo primário foi diluído em PBS na concentração desejada (CD68 – 1:100, ab31630, Abcam), e os cortes foram incubados *overnight* a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e a peroxidase endógena foi bloqueada. Para detecção da reação de imunohistoquímica, utilizamos *Histofine®* (uma gota por corte, *Simple Stain MAX PO*, Nichirei Biosciences Inc.) por 30 minutos, a TA. A revelação da peroxidase foi realizada através de

3,3'Diaminobenzidine (DAB, DAB-125, Spring Bioscience) por 10 minutos, ao abrigo da luz. Os núcleos foram contra corados com Hematoxilina (por um minuto) e os cortes foram desidratados e montados, para análise no microscópio de luz.

3.5.5. Análise e quantificação das imagens

As imagens obtidas tanto através do microscópio de fluorescência quanto pelo microscópio de luz, foram analisadas pelo software LeicaQwin (*LeicaQwin Image Analysis Software*). Considerando que a área das imagens analisadas no software não varia, foi feita uma relação entre a quantidade de células positivas pela área tecidual total, a fim de evitar que os dados estivessem superestimados.

3.6. Ferramenta exploratória de espectrometria de massas por *MALDI imaging*

A ferramenta de *MALDI imaging* (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) consiste em uma técnica exploratória de espectrometria de massas e cuja análise dos dados também pode ser combinada com um banco de dados de identificação de proteínas, o Mascot. Os experimentos foram realizados no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP Rio Claro – São Paulo, em parceria com o Prof. Dr. Mario Palma. A aquisição dos dados consistiu na ionização do tecido cardíaco congelado de ratos neonatos ressectados com um ou sete dias de vida. Os corações de ambos os grupos foram coletados 12, 24, 48 e 120 horas após a cirurgia e congelados. No criostato, foram realizados cortes histológicos de 10-15 µm de espessura e estes foram posicionados em uma lâmina especial de metal a qual foi ionizada, gerando um espectro de proteínas com relação massa/carga. Paralelamente, outras seções histológicas foram posicionadas em lâminas tradicionais de vidro, as quais determinaram a posição morfológica cardíaca. O procedimento foi dividido em etapas analíticas sequenciais: (1) deposição de matriz em pontos específicos do tecido, a fim de estabelecer a distribuição de uma ou mais proteínas, segundo

suas respectivas massas moleculares na imagem de MALDI; (2) hidrólise ou digestão enzimática de pontos distintos do tecido, onde as proteínas de interesse estariam localizadas; (3) aquisição de espectros de massas desses digestos utilizando-se de MALDI; (4) análise das sequências massa/carga (MS/MS) e pesquisa em banco de dados, para identificação das proteínas, e (5) correlação das imagens dos peptídeos gerados.

3.7. Extração de RNA

Esse procedimento foi realizado tanto para: (1) preparar as amostras de coração de ratos neonatos para o sequenciamento do RNA total e (2) confirmar a polarização de macrófagos derivados da medula-óssea.

Para o sequenciamento do RNA total, foi considerado apenas um terço do coração, tanto de ratos com um ou sete dias de vida submetidos à cirurgia de ressecção cardíaca (R1 e R7, respectivamente), coletados com um e cinco dias após a cirurgia (D1 e D5, respectivamente), quanto de seus respectivos ratos sham-operados (S1 ou S7). As amostras foram transferidas para tubos de 2 ml contendo esferas de cerâmica de 2,8 mm (CK28, Bertin), e homogeneizadas com 1 ml de *TRizol*® (Gibco/BRL, Invitrogen), utilizando-se do homogeneizador *Precellys 24 (Lysis & Homogenization)*, Bertin por duas vezes, de 20 segundos cada. Para as células de macrófagos, ao final de nove dias de cultivo, o sobrenadante foi descartado, e 1 ml de *TRizol*® (*TRizol*® Reagent, Thermo Fischer Scientific) foi acrescentado às placas. Após algumas homogeneizações o volume de *TRizol*® foi transferido a tubos de 1,5 ml e congelado. Os próximos passos foram comuns a ambas as amostras. A extração do RNA foi realizada segundo o protocolo do *TRizol*® (*RNA Isolation Procedure*). O precipitado final de RNA obtido foi ressuscitado em 100 µl de água livre de RNase. As concentrações das amostras foram determinadas a partir da medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (*ND-1000 spectrophotometer* – NanoDrop Technologies, Inc.). A integridade das amostras para o sequenciamento do RNA total foi analisada por meio do *Bioanalyzer RNA* (Agilent Technologies,

Santa Clara). A integridade das demais amostras foi analisada por gel de agarose a 0,8%.

3.7.1. Transcrição do DNA complementar

Após a extração do RNA total das células, 5 µg de RNA foram transcritos reversamente em cDNA, utilizando-se do kit *SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies) em termociclador *T100™ Thermal Cycler* (BioRad).

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

A confirmação da polarização dos macrófagos, ao final do experimento, foi realizada pela expressão gênica específica (Tabela 1) através do ensaio de qRT-PCR no equipamento *QuantStudio™ 12k Flex Real-Time PCR System* (*MicroAmp® Optical 384-well Reaction Plate*). O reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem) foi utilizado para o experimento. A amplificação foi estabelecida em: 95°C por 10 minutos para a ativação da *AmpliTaQ DNA Polymerase*, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (para desnaturação das fitas) e 60°C por 60 segundos (para anelamento do *primer* e extensão) e a análise do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo. O software quantificou a intensidade de fluorescência dada pelo *SYBR* e normalizou pelos dados de fluorescência obtidos pelo ROX. No início da amplificação, foi detectada a linha de base, pela fluorescência inicial, e o aumento acima dessa linha indicou a detecção dos produtos de amplificação gerados. O ΔRn consistiu do sinal de fluorescência do produto pelo sinal de fluorescência da linha de base. O parâmetro Ct foi definido como sendo o número de ciclos cuja fluorescência (ΔRn) cruzava essa linha (*Threshold cycle*). A diferença de expressão gênica dos diferentes genes foi determinada a partir da comparação das médias de ΔCt obtidas (já descontando o normalizador). Os dados foram apresentados por expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimental}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$).

Gene	Primer sense (Forward) -5'3'	Primer anti-sense (Reverse) -3'5'
Arginase1	TCCAAGCCAAAGCCCATAGA	AGCTTTCCTTAATGCTGCGG
IL-1 β	TGAAGCAGCTATGGCAACTG	ATCTTTTGGGGTCTGTCAGC

Tabela 1: *Primers* utilizados no qRT-PCR.3

3.8. Sequenciamento de RNA – *Illumina*

Após a obtenção das amostras de coração para o sequenciamento (Item 3.7), a preparação das bibliotecas e a técnica de sequenciamento de última geração – RNAseq (também conhecida como WTSS – *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*) foram realizadas no Laboratório de Sequenciamento de Larga Escala da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo – FMUSP. Os RNAs totais das amostras foram purificados utilizando-se do *RNeasy Mini kit* (Qiagen) e analisados no *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). As amostras com RNI (*RIN score*, valor de integridade das amostras de RNA) superior a 9,0 e com razão A260/280 superior a 1,8 foram consideradas adequadas para a preparação das bibliotecas com *TruSeq Stranded Total RNA with “Ribo-Zero” Gold kit* (Illumina). As bibliotecas foram individualmente quantificadas por PCR em tempo real (qRT-PCR) e sequenciadas no equipamento *HiSeq2500* (Illumina), com *pair-end reads* (2x100 ciclos), de acordo com instruções do fabricante. Os valores de referência utilizados foram $p\text{-valor} \leq 0,05$; $z\text{-score} \leq \pm 1,96 \geq$; $fold\text{-change} \leq \pm 1,3 \geq$. Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados utilizando-se de ferramentas de bioinformática. Os *reads* foram filtrados utilizando-se de *Perl script* que removeu os *reads* com baixa qualidade, e os incluídos foram mapeados com o *software Bowtie2 v.2.1.0* (114), utilizando-se do genoma do rato (*Rattus norvegicus RN5*, NCBI) e do banco de dados *bioDBnet* (115). Os *reads* mapeados foram classificados pelo *software SAMTools v0.1.18* (116) e a contagem de *reads* foi realizada através do *HTSeq-counting v0.5.4p2*. A análise da expressão diferencial foi realizada pelo pacote *DESeq v.1.12.1* (117),

utilizando-se do *R-Bioconductor* (118) com o mesmo padrão já descrito anteriormente (119). Além disso, foi utilizada a ferramenta *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA, Broad Insitut), um método computacional que determinou, em um grupo definido de genes, as diferenças estatísticas de acordo com diferentes estados biológicos. No caso dos dados obtidos pelo sequenciamento do RNA, as análises de vias específicas foram classificadas e avaliadas quanto à idade do animal vs procedimento vs tempo pós-procedimento. As anotações dos genes foram feitas no software *Biomart* (120).

3.9. Ingenuity

Através do Ingenuity, foi possível realizar uma análise de enriquecimento dos dados obtidos pelo RNA-seq. Os dados gerados pelo RNA-seq foram combinados em análises dois a dois, ou seja, o animal ressectado vs seu respectivo sham-operado, para todos os grupos experimentais (por exemplo, a comparação R1D1/S1D1, sendo o rato ressectado com um dia, coletado com um dia após a cirurgia foi comparado com seu respectivo sham-operado, coletado com um dia após a cirurgia). Além disso, as comparações pareadas foram tabeladas junto com os respectivos valores considerados de $p\text{-valor} \leq 0,05$; $z\text{-score} \leq \pm 1,96$ e $fold\text{-change} \leq \pm 1,3$ e combinados com os recursos online da plataforma de análise. Já no programa, a espécie “rato” foi selecionada e as análises (*Core analysis*) foram realizadas, o que resultou nas funções biológicas e moleculares mais relevantes, nas principais vias canônicas e vias de desenvolvimento e doenças. Além disso, com essa ferramenta é possível realizar a sobreposição de genes mais relevantes e genes tidos como “nós” de interação entre as vias biológicas mais significativas.

3.10. Extração de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos

Ratos neonatos com um dia de vida foram sacrificados por decapitação, dentro do fluxo laminar, e os corações foram extraídos e mantidos em tampão de

extração filtrado (ADS 1x: NaCl 0,1 M; KCl 5,4 mM; MgSO₄ 0,8 mM; D-glucose 0,1%; NaH₂PO₄.H₂O 0,8 mM; Hepes 20 mM) em placa de *Petri*. Os átrios e os vasos maiores foram descartados, e os corações foram picotados em pedaços pequenos, com uma tesoura de íris. Os corações foram então, homogeneizados com pipeta *Pasteur* e transferidos para um tubo *falcon*, contendo de 3 a 4 ml de tampão de digestão, composto de collagenase tipo II (*Worthington Biochemical Corporation*) e pancreatina (Sigma Aldrich), na proporção 1:2, em 90 ml de ADS 1x filtrado. Os tubos foram transferidos a um agitador constante, com rotação de 140 rpm a 37°C por 15 minutos. Depois, o sobrenadante foi coletado e inativado com 3 a 4 ml de meio de extração de cardiomiócitos (*DMEM Low Glucose* + meio 199, na proporção 4:1, suplementados com 5% de HRS, 2,5% de NBCS e 1 µg/ml de BrdU), centrifugado a 1200 rpm por cinco minutos, ressuspensionado em 1 ml de meio de extração de cardiomiócitos e mantido na incubadora até o final do protocolo. Este procedimento foi repetido seis vezes, ou até o tecido estar completamente digerido. Depois disso, o material proveniente das digestões foi ressuspensionado em 10 ml de meio e plaqueado em garrafa de T75 por 45 minutos (*pre-plating*). O período de *pre-plating* já foi descrito por se obter, no sobrenadante, cardiomiócitos em suspensão, e que a maioria das células que permanecem aderidas à garrafa, seja fibroblastos cardíacos (121). Para obtenção dos cardiomiócitos, após esse período, o sobrenadante foi coletado, centrifugado, ressuspensionado no volume desejado e as células foram plaqueadas em placas previamente tratadas com laminina por duas horas, a 37°C. Após a coleta do sobrenadante, adicionamos o meio de cultivo de fibroblastos cardíacos (*DMEM High Glucose* suplementado com 2% de FBS) às células que permaneceram aderidas na garrafa do *pre-plating*.

3.11. Extração, cultivo e polarização de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos

A cultura de macrófagos derivados da medula óssea de ratos adultos (BMDMØ) foi realizada a fim de se obter, as populações de macrófagos

polarizados para os perfis pró e anti-inflamatórios e com isso, o sobrenadante resultante da polarização dessas células. Ratos adultos (300-350 g) foram sacrificados por administração da combinação dos anestésicos xilazina e quetamina (15 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente) e tiveram as patas traseiras retiradas. Os músculos foram desprezados e os ossos do fêmur e da tíbia foram cuidadosamente limpos, evitando qualquer perfuração e contato com o meio externo. Dentro no fluxo laminar, os ossos foram perfurados em suas extremidades e com uma seringa, foram “lavados” com meio de cultura RPMI suplementado com 10% FBS, em placa de *Petri*. O lavado foi transferido para um tubo *falcon*, centrifugado a 1200 rpm por cinco minutos, a 4°C e foram adicionados 2 ml de tampão de lise de hemácias, por um minuto, no gelo. Depois disso, foram adicionados 3 ml de meio RPMI suplementado com 10% FBS e uma nova centrifugação foi realizada. As células foram ressuspensas e plaqueadas ($6,562 \cdot 10^5$ células/cm²).

3.11.1. Diferenciação da cultura em macrófagos

A diferenciação dos macrófagos foi realizada durante nove dias, sendo que com sete dias de diferenciação, foram adicionadas as proteínas recombinantes de polarização para os perfis pró e anti-inflamatórios. No dia zero, foram adicionados 30 ng/ml da proteína recombinante MCSF (*Recombinant Rat Macrophage Colony Stimulation Factor, Peprotech*) ao meio de cultura, o qual foi trocado depois de três dias e depois a cada dois dias. A cada troca do meio de cultura, a mesma concentração de proteína foi adicionada.

3.11.2. Polarização da cultura de macrófagos

No sétimo dia de diferenciação, a polarização foi realizada. Para macrófagos do tipo M1, inflamatórios foram utilizados 10 ng/ml da proteína recombinante IFN- γ (*Recombinant Rat IFN- γ , Peprotech*) e, para macrófagos do tipo M2, anti-inflamatórios, foram utilizados 20 ng/ml da proteína recombinante IL-4

(*Recombinant Rat IL-4*, Peprotech). Após 48 horas de polarização, o sobrenadante foi coletado em tubos de 1,5 ml e congelado para posterior uso.

3.12. Proliferação e quantificação celular de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos

Após o *pre-plating*, os cardiomiócitos foram plaqueados, em placas *Greiner* de 96 poços para avaliação por *High Content Screening (HCS)*, na confluência de $3,125.10^4$ células/cm² para avaliação de proliferação em estado de normóxia (5% O₂). Para os experimentos de hipóxia (1% O₂), os cardiomiócitos foram plaqueados na confluência de $9,375.10^4$ células/cm². Os cardiomiócitos foram mantidos em cultura por 48 horas, quando formaram uma camada de células com batimento espontâneo, demonstrando a viabilidade da cultura. Após esse período, o meio de cultura foi trocado para um meio *starving* (DMEM L + meio 199, na proporção 4:1, sem suplementação) por uma hora. Logo em seguida, foram adicionados 100 µl do meio condicionado dos macrófagos M1 e M2, meio RPMI suplementado com 10% de FBS (como controle positivo) e meio RPMI *starving* (como controle negativo), em triplicata, nos poços da placa *Greiner*. As placas foram mantidas por 48 horas em normóxia e por 24 horas em hipóxia, quando foram lavadas e fixadas em PFA 4% para posterior marcação.

Para avaliação da diferenciação por expressão de alfa actina de músculo liso (α SMA) de fibroblastos cardíacos de neonatos, os fibroblastos aderidos e mantidos no dia da extração de cardiomiócitos foram tripsinizados, contados e plaqueados na concentração $3,125.10^4$ células/cm², em placas *Greiner* de 96 poços. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado e ao final do dia, as células foram mantidas em *starving overnight*. No dia seguinte, foram adicionados 100 µl dos meios condicionados M1 e M2, suplementados com 10 ng/ml de TGF- β (*Recombinant human-TGF β 1 Protein*, 240-B-002, R&D systems) e meio RPMI suplementado com 10% de FBS mais 10 ng/ml de TGF- β (como controle positivo), às células, em triplicata. As placas foram mantidas por 48 horas, quando foram lavadas e fixadas em PFA 4%, para posterior marcação.

3.13. Ensaio de HCS (High-Content Screening)

O ensaio de HCS assemelha-se a uma imunocitoquímica, e foi utilizado para avaliação da quantidade e proliferação de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos; para a diferenciação de fibroblastos cardíacos e para a confirmação da cultura de macrófagos. A placa utilizada apresenta as laterais em preto, para melhor avaliação da marcação de imunofluorescência (*96 Well Greiner Microplate, Black, Clear Bottom*). Para montagem dos experimentos, as placas foram fixadas em solução de PFA 4% e lavadas 3x em PBS. Para a marcação de anticorpos nucleares, foi realizada a permeabilização celular (solução de PBS 0,05% Tween) por 15 minutos, a 4°C. Depois disso, as placas foram lavadas e bloqueadas em solução de PBS 5% BSA, por uma hora, a TA. Os anticorpos primários utilizados foram diluídos em PBS 2% BSA (α SMA - 1:100, ab5694, Abcam; Ki67 - 1:300, ab16667, Abcam; Tropomiosina - 1:300, T-9283, Sigma Aldrich; Vimentina – 1:300, ab92547, Abcam; CD68 - 1:500, ab31630, Abcam) e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada 3x em PBS e os anticorpos secundários conjugados (Alexa flúor 488 - 1:500, A11001, Invitrogen, Life Technologies; Alexa flúor 555 – 1:500, A21428, Invitrogen, Life Technologies) foram diluídos em PBS e incubados junto com o DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride- 1:500, D1306, Invitrogen, Life Technologies) por 1 hora e 20 minutos, a TA, ao abrigo da luz. Depois disso, as placas foram lavadas 3x em PBS e foram adicionados 100 μ l de PBS em cada *well*. As imagens foram obtidas através da plataforma *Image X Press Micro High Content* (Molecular Devices, EUA) e foram adquiridos cinco sítios por poço e três poços por tratamento. A análise foi realizada pelo software *Multiwave cell scoring MetaExpress*. Nos experimentos com mais de duas cores (Tropomiosina/ Vimentina / DAPI ou Tropomiosina/ Ki67/ DAPI), foi utilizado o *multiwave cell scoring*; e no caso de apenas duas cores (demais análises), foi utilizado o programa de análise *cell scoring*.

3.14. Expressão de citocinas por membrana *array*

Para análise de expressão de citocinas presentes nos sobrenadantes de macrófagos pró e anti-inflamatórios, foram realizados *arrays* de quatro membranas, sendo elas: controle negativo (sobrenadante de macrófagos diferenciados com sete dias, sem que houvesse polarização); M1 e M2 (n=2). Para tal, o protocolo foi utilizado de acordo com instruções do fabricante (*Rat Cytokine Array*, #ARY008, R&D Systems). Em primeiro lugar, as membranas foram bloqueadas em solução específica do *kit*, por uma hora a TA. Durante esse período, preparou-se 1,0 ml (150 µl de cada meio condicionado polarizado, n=7 para cada grupo M1 ou M7; ou 1,0 ml de sobrenadante de macrófagos com sete dias de polarização) de amostra para 0,5 ml de tampão. Junto a esse *mix*, foi adicionado o coquetel de anticorpos primários para detecção, o qual foi incubado por uma hora, a TA. Após esse tempo, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com as soluções contendo as amostra mais o coquetel de anticorpos primários. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com avidina-HRP (1:2000) por 30 minutos, a TA. Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com solução de quimiluminescência por um minuto e então reveladas.

3.14.1. Análise da expressão das citocinas *array*

As análises foram realizadas no software *ImageQuant TL* (GE Healthcare Life Sciences), pelo programa *Array Analysis*. Em primeiro lugar, uma máscara comum às membranas foi criada, com adequação das dimensões dos *spots* de cada amostra, a fim de evitar superestimar os valores obtidos. Em seguida, os valores dos *backgrounds* foram considerados e os volumes finais das aquisições foram normalizados pelos controles positivos. A tabela final gerada foi analisada e os valores considerados foram em relação à alteração em relação ao basal (controle positivo).

3.15. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados em gráficos de barras como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). O teste *t* de *Student* não pareado foi utilizado para realizar as comparações das médias de ΔCt ; comparar os valores de Troponina I cardíaca e quantidade de fibras de colágeno na área reparada após a ressecção dos grupos sham-operados e ressectados com um e sete dias de vida, após 21 dias da cirurgia e com 60 dias de vida. *One-way ANOVA* com teste *Turkey* pós-hoc foi utilizado para comparar as fibras de colágeno intersticiais e as medidas hemodinâmicas dos grupos experimentais. *Two-way ANOVA* com teste *Bonferroni* pós-hoc foi utilizado para comparar a perfusão às repetidas aferências cardíaca nos grupos experimentais 21 dias após a cirurgia e com 60 dias de vida. *One-way ANOVA* com teste *Dunnet* pós-hoc foi utilizado para comparar os resultados obtidos pela imunohistoquímica do infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco; para imunocitoquímica de Tropomiosina/Ki67 e de αSMA , considerando o p -valor $\leq 0,05$ para todas as comparações estatísticas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Softwares Inc.*).

4. RESULTADOS

4.1. Cirurgia e quantificação da ressecção apical

Ratos neonatos foram submetidos à cirurgia de ressecção apical, que consistiu na excisão da área do ápice cardíaco, por meio de uma tesoura de íris. O exame de ressonância magnética foi realizado antes e imediatamente após a cirurgia de ressecção apical, a fim de avaliar a efetividade do procedimento e determinar a porção da área ressectada. A avaliação da porcentagem de ressecção foi obtida a partir da aquisição e quantificação da área do coração antes e logo após o procedimento (Figura 3B). Os animais selecionados para o estudo apresentaram, no mínimo, 15% de ressecção de área da câmara. Nesse sentido, com o exame de ressonância magnética, foi possível determinar os valores médios da ressecção cardíaca, tanto para os ratos com um dia de vida (P1: $18 \pm 1,0\%$, Figura 3A), quando para os ratos com sete dias de vida (P7: $16 \pm 1,3\%$, Figura 3A). Na figura 3A nota-se a porção apical ressectada, na aquisição pós-lesão, em comparação com a aquisição antes da cirurgia. No geral, a taxa de sobrevivência do procedimento foi de, aproximadamente, 60% em ambos os grupos, sendo que a maioria das baixas ocorreu logo após a cirurgia (Tabela 2).

Grupo experimental	# de ratos operados	# de ratos que sobreviveram	% êxito
Rato com um dia de vida (P1)	120	70	58,33%
Rato com sete dias de vida (P7)	127	78	61,41%

Tabela 2: Taxa de sobrevivência após a cirurgia de ressecção apical cardíaca em ratos neonatos.

A taxa de sobrevivência foi de, aproximadamente 60% nos dois grupos experimentais, considerando que a maioria das baixas obtidas se deu na primeira hora após o procedimento.

Figura 3: Ressonância magnética e quantificação da área cardíaca ressectada.

(A) As porcentagens (média $\pm$ SEM) dos ventrículos cardíacos ressectados nos ratos P1 e P7 (n=12 para ambos os grupos). (B) As imagens da ressonância magnética foram obtidas antes e imediatamente após a cirurgia de ressecção apical. A linha pontilhada mostra a área cardíaca utilizada na quantificação da cirurgia de ressecção cardíaca.

4.2. Ratos P1 apresentam cardiomiócitos na região ressectada, após 21 dias

Depois de 21 dias da cirurgia, o tecido cardíaco de ambos os grupos foi avaliado quanto à resposta à reparação tecidual, tanto para a neoformação de células quanto, para a formação de uma cicatriz. A quantidade de células positivas para Troponina I, uma proteína cardíaco-específica, foi aproximadamente 8,5 vezes maior em ratos P1 quando comparada aos ratos P7 (Figura 4A). Além disso, o padrão da marcação dos ratos P1 apresentava-se de maneira uniforme, quando comparado a uma marcação rara, dispersa e inconsistente dos animais P7 (P1: $77,3 \pm 9,5$ u.a./mm² vs. P7: $9,0 \pm 3,9$ u.a./mm², Figuras 4B-E). Além de evidências da neoformação de cardiomiócitos pela proteína cardíaca Troponina I

nos ratos P1, essas células apresentaram-se positivas para Conexina 43, sugerindo a presença de características de cardiomiócitos maduros, com proteínas transmembranas, que se organizam para formar junções comunicantes (Figura 4F). Por outro lado, no padrão disperso da marcação de Troponina I dos ratos P7, as células raramente apresentaram marcação para a proteína Conexina 43 (Figura 4G). A marcação nuclear por DAPI sugeriu que as células na região do ápice dos ratos P7 não são cardiomiócitos, em sua maioria, por serem células Troponina I-cardíacas negativas (Figuras 4C, E, G). Nesse sentido, os ratos P7 apresentaram acentuada deposição de colágeno tanto na região apical quanto nas áreas remotas à lesão, quando comparados aos ratos P1 (P1: $6,2 \pm 1,4$ vs. P7: $12,4 \pm 1,0$; colágeno da região apical; P1: $4,4 \pm 0,4$ vs. P7: $7,3 \pm 0,6$; colágeno das áreas remotas à lesão; Figuras 5A–C).

Figura 4: Quantificação de Troponina I cardíaca (u.a./mm²) e marcação positiva de Conexina 43 no tecido neoformado.

(A) A marcação positiva para Troponina I-cardíaca (em verde) foi avaliada por área de tecido cardíaco (média $\pm$ SEM) de ratos P1 (n=6) e P7 (n=7), 21 dias após a cirurgia de ressecção apical. As imagens indicam a marcação positiva para Troponina I cardíaca de (B) P1 (20 x), (C) P7 (20 x), (D) P1 (40 x) e (E) P7 (40 x), e a marcação positiva para Conexina 43 (em vermelho) de (F) P1 (20 x) e (G) P7 (20 x). Os núcleos estão identificados em azul (marcação por DAPI). As barras brancas pontilhadas indicam a área de ressecção. *p-valor $\leq$ 0,05

Figura 5: Quantificação de fibras de colágeno através da marcação de Picrossírius Red (porcentagem de área).

(A) As barras indicam a porcentagem de fibras de colágeno na região apical e na área remota do coração (média $\pm$ SEM) de P1 (n=8 e 5, respectivamente) e P7 (n=10 e 7, respectivamente), 21 dias após a cirurgia de ressecção apical. As imagens indicam a marcação positiva das fibras de colágeno de (B) P1 (20 x) e (C) P7 (20 x). *p-valor $\leq$ 0,05

Os resultados sugerem que 21 dias após a cirurgia de ressecção apical cardíaca, os ratos P1 apresentaram cardiomiócitos neoformados e pouca deposição de colágeno na área apical ressectada (Figuras 4 e 5). Ainda assim, a arquitetura do tecido e o alinhamento das células positivas para Troponina I e Conexina 43, pareceram não estar completamente preservados nesses animais (Figura 4). Nesse sentido, a perfusão cardíaca foi avaliada a fim de determinar se o perfil de resposta à lesão comprometeria a perfusão cardíaca em longo prazo.

4.3. Hipoperfusão apical nos animais P1 e P7

O exame de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) foi realizado com o objetivo de estudar a circulação sanguínea no coração e determinar a presença e/a localização de quaisquer áreas lesadas do músculo cardíaco, evidenciadas por circulação sanguínea insuficiente, em dois tempos, nos ratos com 21 dias após a lesão e também na fase adulta, nos mesmos ratos com 60 dias de vida, a fim de também avaliar as consequências dessa intervenção em longo prazo, na fase adulta. O radio fármaco Sestamibi-^{99m}Tc normalmente se concentra no miocárdio após administração sistêmica e também pela perfusão proporcional ao fluxo sanguíneo local. Uma vez anestesiados, esse radio fármaco foi injetado através da veia caudal dos animais. Depois da aquisição, realizada normalmente após 30 minutos da injeção, a análise do exame foi realizada pelo método Bullseye e o coração foi dividido em 17 segmentos, sendo cinco representando o ápice cardíaco e os outros 12 representando a área remota do coração. De maneira interessante, tanto os ratos P1 quanto os ratos P7, apresentaram hipoperfusão, com menor acúmulo do radio fármaco no ápice cardíaco em relação às outras áreas remotas do coração, 21 dias após a cirurgia ($38 \pm 12\%$ e $70 \pm 10\%$, P1 e P7, respectivamente) e com 60 dias de vida ($64 \pm 9,8\%$ e $55 \pm 14,0\%$, P1 e P7, respectivamente; Figuras 6A-B).

Figura 6: Perfusão miocárdica através do exame de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) dos segmentos cardíacos dos ratos P1 e P7.

As barras indicam (média $\pm$ SEM) o acúmulo relativo do radio fármaco Sestamibi-99mTc na área apical (5 segmentos, barras em preto) e nas outras áreas remotas do coração (12 segmentos, barras em cinza) dos animais (A) P1 (n=6) e (B) P7 (n=5). *p-valor $\leq$ 0,05

4.4. A função cardíaca é preservada nos ratos P1 sob estresse hemodinâmico

Com o intuito de acompanhar a performance cardíaca global e a o efeito da regeneração tecidual em longo prazo, a função cardíaca foi avaliada em condições basais e após administração de droga farmacológica indutora de estresse hemodinâmico (PHE), nos ratos com 60 dias de vida, de ambos os grupos. O desempenho cardíaco global, em condições basais, apresentou-se preservado nos ratos adultos de ambos os grupos P1 e P7, quando comparados aos ratos sham-operados (Tabela 3). Por outro lado, os principais parâmetros

hemodinâmicos relacionados ao desempenho cardíaco em resposta ao estresse de pós-carga apresentaram-se comprometidos nos ratos P7, quando comparados tanto aos ratos P1, quanto aos sham-operados (Figura 7). Sob estresse farmacológico, mudanças na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) em relação aos níveis basais (mmHg) foram estatisticamente maiores nos ratos P7, enquanto os ratos P1 e os sham-operados responderam de maneira semelhante, sugerindo um déficit na fração de ejeção nos ratos do grupo P7 (P7: $5,6 \pm 1,8$ vs. sham: $1,3 \pm 0,4$ e P1: $0,6 \pm 0,6$ mmHg; p-valor ≤ 0.05 ; Figura 7A). De maneira semelhante, os ratos do grupo P7 apresentaram alterações mais elevadas na mudança no volume sistólico (VS), em relação ao basal, quando comparados tanto aos ratos P1, quanto aos sham-operados (P7: $-40,3 \pm 4,9$ vs. sham: $-27,1 \pm 4,1$ e P1 $-6,9 \pm 11,4\%$ de mudança em relação ao basal; p-valor ≤ 0.05 ; Figura 7B).

Descrição	SHAM	P7	P1	p-valor
Biometria				
Peso corporal (PC), g	327 ± 53	306 ± 64	337 ± 28	0,4535
Coração/PC, mg·g ⁻¹	0.0039 ± 0.0003	0.0040 ± 0.0004	0.0036 ± 0.0004	0,2267
Hemodinâmica				
FC, batimentos/min-	370 ± 12,4	378 ± 15,4	341 ± 20,1	0,296
MAP, mmHg	85 ± 3,07	89 ± 5,8	98 ± 8,6	0,368
LVESP, mmHg	113 ± 5,8	119 ± 4,8	122 ± 9,01	0,483
LVEDP, mmHg	9 ± 1,7	13 ± 4,3	10 ± 0,9	0,581
DC, µl·min ⁻¹	40600 ± 3489	35771 ± 6619	41100 ± 9339	0,804
FE, %	75 ± 7,8	65 ± 3,3	69 ± 14,06	0,471
TC, mmHg·ml ⁻¹	11439 ± 940	10383 ± 2265	13391 ± 2852	0,082
+dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	10229 ± 961	10123 ± 1044	10674 ± 2233	0,987
-dP/dtmax, mmHg·s ⁻¹	-6057 ± 567	-6061 ± 520	-5496 ± 456	0,804
VS, µL	110,5 ± 5,3	89,63 ± 12,02	111,4 ± 16,2	0,270
VDF, µL	151 ± 12,5	147 ± 25,5	177 ± 16	0,873

Tabela 3: Biometria e parâmetros Hemodinâmicos dos ratos sham-operados, P7 e P1 em condições basais.

Discriminação dos valores basais da hemodinâmica, normalizados pelo peso corporal vs peso do coração (médias ± SEM): PC, peso corporal; FC, frequência cardíaca; MAP, média da pressão arterial sistólica; LVESP, pressão final sistólica do ventrículo esquerdo; LVEDP, pressão final diastólica do ventrículo esquerdo; DC, débito cardíaco; FE, fração de ejeção; TC, trabalho cardíaco; +dP/dtmax e -dP/dtmax, taxa máxima de aumento e diminuição de pressão, respectivamente; VS, volume sistólico e VDF, volume final da diástole.

Figura 7: Resposta cardíaca após o estresse da sobrecarga.

As barras representam (média $\pm$ SEM) as repercussões induzidas pela injeção de fenilefrina, expressas por porcentagem (%) de mudança em relação ao basal (exceto por LVEDP expressa por elevação de mmHg em relação ao estado basal) na Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (A) (LVEDP), Volume Sistólico (B) e Trabalho Cardíaco (C) dos ratos sham-operados (n=6), P7 (n=6) e P1 (n=5). Os valores positivos e negativos resultaram do aumento ou decréscimo nos parâmetros avaliados, respectivamente. O declínio global dos valores da relação do Volume e Pressão Finais da Sístole (VPFS) como um índice de (D) performance sistólica e o Volume e Pressão Finais da Diástole (VPFD) como um índice de (E) rigidez diastólica. *p-valor $\leq 0,05$

As mudanças no trabalho cardíaco (TC) em relação a níveis basais, o qual representa o índice global do desempenho cardíaco, que depende tanto da

geração de pressão, quanto da capacidade de ejeção durante cada batimento, apresentou perfis semelhantes entre os ratos P1 e os sham-operados, e valores diminuídos nos ratos P7 (P7: $-4,8 \pm 7,2$ vs. sham: $15 \pm 4,7$ e P1: $47 \pm 17,8\%$ de mudança em relação a níveis basais; p-valor $\leq 0,05$; Figura 7C). A queda da relação linear entre o volume e a pressão do final da sístole (ESPVR) apresentou menores valores nos ratos P7 quando comparados aos ratos P1 e sham-operados, sendo este consistente com a diminuição da performance sistólica nos mesmos animais (P7: $0,97 \pm 0,07$ vs. sham: $1,5 \pm 0,17$ e P1: $1,3 \pm 0,1$ mmHg; p-valor $\leq 0,05$; Figura 7D). Finalmente, a queda da relação da pressão e volume no final da diástole (EDPVR) nos ratos P7, apresentou maiores valores quando comparados aos ratos P1 e sham-operados, sugerindo aumento na rigidez diastólica nos ratos desse grupo (P7: $0,1 \pm 0,02$ vs. sham: $0,03 \pm 0,01$ e P1: $0,06 \pm 0,01$ mmHg; p-valor $\leq 0,05$; Figura 7E). Além disso, a relação entre as mudanças na geração do trabalho sistólico e aumento na pressão sistólica (Figura 8) resultou na correlação positiva similar nos ratos P1 e sham-operados (r de Pearson: 0,5; média de inclinação: $0,66 \pm 0,07$ e r de Pearson: 0,57; média de inclinação: $0,64 \pm 0,04$, respectivamente), enquanto a correlação entre os ratos P7 foi basicamente plana (com r de Pearson: 0,13; média de inclinação: $0,14 \pm 0,05$). Esses dados estão de acordo com uma performance sistólica diminuída nos ratos P7, quando comparados aos P1 e aos sham-operados. Outros parâmetros hemodinâmicos, os quais não demonstraram diferenças no pós-carga entre os grupos experimentais, em relação aos níveis basais, estão evidenciados na Tabela 4.

Descrição	SHAM	P7	P1	ANOVA (P valor)
Hemodinâmica				
FC	-2,21 ± 0,28	-4,13 ± 0,77	7,0 ± 7,3	0,24
LVSP	47,2 ± 1,3	53,7 ± 2,2	53 ± 1,3	0,28
DC	-17,5 ± 12,5	-58,9 ± 9,8	-25,8 ± 11,6	0,06
FE	-35,72 ± 6,6	-51,33 ± 6,8	-30,44 ± 9,5	0,17
+dP/dtmax	51,9 ± 8,7	42,6 ± 5,3	45,1 ± 6,4	0,62
-dP/dtmax	81,2 ± 11,5	92 ± 12,5	92,7 ± 17,6	0,79

Tabela 4: Parâmetros hemodinâmicos dos animais sham-operados, P7 e P1 sob condições de estresse.

FC, frequência cardíaca; LVSP, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; DC, débito cardíaco; FE, fração de ejeção; +dP/dtmax e -dP/dtmax, taxa máxima de aumento e diminuição de pressão, respectivamente.

Figura 8: Curvas de regressão linear do trabalho cardíaco correlacionando-se ao aumento da pressão sistólica.

Os dados estão expressos em média da porcentagem de mudança em relação a níveis basais, para todos os grupos experimentais.

Os resultados obtidos foram consistentes com o aumento da deposição de fibras de colágeno intersticial (fibrose) nos corações dos ratos adultos do grupo P7, quando comparados aos sham-operados e aos ratos P1 (P7: $11,4 \pm 0,64$ vs. sham-operados: $5,1 \pm 0,37$ e P1: $6,9 \pm 0,6$; p-valor $\leq 0,05$, Figura 9G). Nota-se que

esses resultados são consistentes com os dados observados com 21 dias após a cirurgia de ressecção (Figura 5A). A análise através do método de polarização por Pricrossíus demonstrou que os cardiomiócitos dos grupos de ratos sham-operados e P1, com 60 dias de vida, apresentavam-se circundados por fibras de colágeno finas e levemente birrefringentes, em tons de verde (Figura 9A-D). No grupo P1, poucos cardiomiócitos encontravam-se circundados por fibras espessas em tons de amarelo, com aumento da birrefringência (Figura 9D). Por outro lado, o tecido cardíaco do grupo P7 exibiu uma grande quantidade de cardiomiócitos circundados por espessas fibras de colágeno, em tons de amarelo brilhante (altamente birrefringente), ou por fibras de colágeno em tons de vermelho (Figuras 9E e F).

Figura 9: Quantificação de fibras de colágeno intersticiais nas secções coronais cardíacas dos ratos dos grupos P1 e P7, com 60 dias, de acordo com o método de Picrosirius.

As imagens indicam as marcações positivas de Picrosirius-Hematoxilina sob microscópio de luz convencional, nos ratos sham-operados (A) P1 (C) e P7 (E) e sob microscópio de luz polarizada, em sham-operados (B), P1 (D) e P7 (F). (G) As barras indicam a porcentagem média da quantificação das fibras de colágeno (média $\pm$ SEM) dos sham-operados (n=6), P7 (n=6) e P1 (n=5). *p-valor $\leq$ 0,05

Em resumo, o rato com um dia de vida apresentou neoformação de células cardíaco-específicas (conforme observado pela marcação positiva da proteína Troponina I) e de junções comunicantes (Conexina 43), quando submetido à ressecção de 15% ou mais da câmara cardíaca. No entanto, essa “janela de oportunidade” só está presente nas primeiras horas após o nascimento, uma vez

que os ratos ressectados com sete dias de vida repararam a área do ápice cardíaco com uma cicatriz, basicamente, de colágeno. Além disso, foi acompanhado pela primeira vez, o resultado da lesão e reparação em longo prazo, nos ratos adultos e demonstramos que tanto os ratos ressectados com um (P1) quanto com sete dias de vida (P7), apresentam déficit de perfusão na região apical. Entretanto, os parâmetros hemodinâmicos, após administração de indutor de estresse, estão preservados nos ratos P1, sugerindo uma combinação favorável da neoformação de cardiomiócitos funcionais, ausência de tecido fibrótico significativo e também de rigidez na câmara cardíaca, com baixo remodelamento compensatório do coração. Essas evidências não podem ser traduzidas diretamente à reparação cardíaca no adulto, porém indicam um interessante modelo, que ganha destaque, para mecanismos pós-natais de reparo cardíaco.

Considerando a inédita “janela de oportunidades” circunscrita apenas no rato neonato com um dia de vida, e que resposta inflamatória já foi descrita por participar e ser crucial à regeneração cardíaca, o próximo objetivo foi determinar o perfil da resposta inflamatória no neonato P1, utilizando-se de modernas ferramentas exploratórias, e se esse perfil favoreceria a proliferação de cardiomiócitos no pós-lesão.

4.5. Análise exploratória por espectrometria de massas por *MALDI imaging*

A técnica de espectrometria de massas por *MALDI imaging* teve como objetivo principal identificar a ativação de proteínas diferencialmente expressas ligadas à resposta inflamatória nos grupos P1 e P7, bem como sua localização de acordo com o tempo após a cirurgia de ressecção apical. Para tal, foram realizados cortes histológicos dos corações congelados de ratos P1 e P7, coletados em diferentes momentos após a cirurgia e dispostos em lâmina de metal especial, para ionização das moléculas. A distribuição tecidual de duas proteínas cardíacas, Miosina e Tropomiosina, foi realizada a fim de validar a eficiência e a confiabilidade do método (Figura 10). Nos primeiros ensaios, os tempos de 12 e

120 horas após a cirurgia de ressecção apical apresentaram melhor distribuição das proteínas cardíacas ao longo do tecido. No entanto, os tecidos cardíacos analisados apresentaram dificuldades de reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a área do coágulo remanescente, resultante da ressecção apical e indicado pela linha tracejada apresentou baixa expressão de proteínas. Em vista da dificuldade de reprodução das aquisições das proteínas cardíacas estruturais, como controle positivo da técnica, optamos por utilizar a ferramenta de imageamento por *MALDI* não mais como ferramenta exploratória, mas para validação e disposição espacial de proteínas-alvo que poderiam ser encontradas em experimentos futuros.

Figura 10: Imagens moleculares para as proteínas cardíacas.

As imagens foram geradas para (A) Miosina e (B) Tropomiosina, respectivamente, a partir de cortes histológicos de ratos operados com um e sete dias de vida, nos tempos 12, 24, 48 e 120 horas após a cirurgia de ressecção apical. Essas imagens foram utilizadas como controle positivo da técnica. A escala utilizada para a coloração das imagens varia do preto (0%) ao vermelho (100%), significando a ausência e a presença das proteínas, respectivamente.

4.6. Sequenciamento de RNA de alta geração – RNA-seq

Nesse experimento, o grupo de animais sham-operados foi incluído e foram analisados de maneira pareada com os ratos submetidos à cirurgia de ressecção apical. As amostras foram coletadas com um (D1) e cinco (D5) dias após a cirurgia

(R1D1 e R1D5; R7D1 e R7D5, respectivamente; Figura 11) e os corações dos ratos sham-operados foram coletados na mesma janela de tempo (S1D1 e S1D5; S7D1 e S7D5, respectivamente; Figura 11), permitindo que as análises fossem realizadas de maneira pareada e levando em consideração três parâmetros importantes: (1) a idade do animal quando o procedimento foi realizado (R1 vs R7); (2) o tipo de procedimento (sham-operado vs cirurgia de ressecção apical) e (3) o tempo após o procedimento (1 vs 5 dias depois do procedimento; Figura 13).

Figura 11: Esquema do desenho experimental da aquisição das amostras utilizadas no sequenciamento de alta geração do RNA total.

A cirurgia de ressecção apical ou a “falsa cirurgia” foram realizadas nos ratos P1 e P7 e as coletas foram realizadas um dia (D1) e cinco dias (D5) depois do procedimento. Apenas a porção apical, correspondente a 1/3 do coração, em média, foi considerada para o experimento.

Em primeiro lugar, foram analisadas a quantidade e a qualidade de *reads* gerados no sequenciamento (Figura 12). A média global de *reads* gerados foi de 35 milhões, para todos os grupos (Figura 12 A), quantidade considerada suficiente para que a análise fosse realizada, uma vez que 95% dos *reads* apresentaram qualidade superior a Q30 e *score* elevado em toda sua extensão (Figura 12B).

Figura 12: Controle de qualidade dos reads gerados pelo sequenciamento do RNA total.

(A) Quantidade total de *reads* produzidos para cada grupo experimental, tanto ressectado quando sham-operado; (B) Os *scores* de qualidade ao longo da extensão das bases.

Em seguida, as amostras foram agrupadas, considerando os três parâmetros (idade no procedimento; o tipo de procedimento e o tempo após o procedimento). De acordo com a análise de componente principal (PCA, Figura 13), os agrupamentos foram determinados principalmente pela idade dos animais no procedimento (eixo x, correspondente a 42% da variância) e pelo tempo após o procedimento (eixo y, correspondente a 19% da variância). O tipo de procedimento (cirurgia de ressecção ou falsa cirurgia) pareceu exercer pequena influência na expressão global das amostras, exceto nos animais R1D1/S1D1, os quais aparecem com maiores distâncias entre os pontos, diferentes dos demais.

Figura 13: Diagrama de PCA.

Este método indica o agrupamento das amostras respectivas pareadas e também a alta relevância dos parâmetros relacionados à idade e tempo no procedimento.

O agrupamento hierárquico pelo método de distância de Poisson (Figura 14) determinou as similaridades entre as amostras analisadas. Nota-se que os ratos ressectados e coletados depois de um dia do procedimento (R1D1 e R7D1) apresentam-se em dois blocos bem definidos, na extremidade superior esquerda (R1D1) e na extremidade inferior direita (R7D1), sugerindo particularidades específicas dentro de cada grupo.

Figura 14: Diagrama de distância de Poisson.

Esse método demonstrou as semelhanças de expressão entre os grupos analisados, destacando os grupos R1D1 e R7D1, nos cantos superior esquerdo e inferior direito, respectivamente.

4.6.1. Análise por expressão diferencial

A análise de expressão diferencial dos dados obtidos foi realizada a partir de comparações pareadas (animal ressectado vs seu respectivo sham-operado). As análises foram sistematizadas em diagramas de *Venn*, considerando novamente, os três parâmetros principais. Dentre os genes diferencialmente expressos obtidos das comparações, a intersecção entre a expressão nos três parâmetros considerados resultou em 26 genes comuns aos grupos (Figura 15A, no meio, em vermelho escuro). Desses 26 genes, 13 deles apresentaram genes *go-term* avaliados no software *Panther*, associados a importantes funções biológicas, tais como resposta ao estímulo, sistema imunológico, metabolismo e processo de desenvolvimento (Figura 15B).

Figura 15: Análise da expressão diferencial realizada em comparações pareadas.

(A) O esquema de intersecção gênica, mostrando os 26 genes comuns às análises, nos três parâmetros considerados. (B) Os processos biológicos dos 13 genes *go-term* avaliados pelo software *Panther*, incluindo o sistema imunológico.

Através da ferramenta de análise *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), um método computacional que determina as diferenças estatísticas de acordo com diferentes estados biológicos, foi possível avaliar a atividade de uma via específica em função do tipo de procedimento, idade no procedimento, e tempo pós-procedimento. Com isso, a atividade de uma determinada via, por expressão de um gene específico obtido pelo sequenciamento do RNA total, foi avaliada por um método contínuo, do dia dois (dois dias de vida, referentes ao R1D1 ou S1D1) até o dia 12 (doze dias de vida, referentes ao R7D5 ou S7D5), promovendo a análise e comparações entre os grupos considerados. Nesse sentido, o perfil de algumas vias ligadas à resposta inflamatória, foi avaliado e comparado nos parâmetros considerados (Figura 16).

Figura 16: Análises de vias inflamatórias por Gene Set. Vias inflamatórias dos genes inflamatórios e anti-inflamatórios.

(A) IL-2; (B) IL-6; (C) IL-4; (D) IL-10; (E) IL-12 e (F) VEGF analisadas por GSEA. As comparações foram realizadas e as principais diferenças se apresentaram na idade dos animais no procedimento. *p-valor $\leq 0,05$ para (A) tempo pós-procedimento S1D1/S1D5 e R7D1/R7D5, idade no procedimento S1D1/S7D1; (B) idade no procedimento S1D1/S7D1; (C) procedimento R1D1/S1D1, tempo pós-procedimento S1D1/S1D5 e idade no procedimento S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D5/R7D5; (D) idade no procedimento para S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D1/R7D1 e R1D5/R7D5; (E) idade no procedimento S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D1/R7D1 e R1D5/R7D5; (F) idade no procedimento para S1D1/S7D1.

Os resultados obtidos por GSEA sugeriram que, dentre os parâmetros de análise considerados, as expressões dos genes considerados (Figura 16) foram influenciadas principalmente, pela idade dos animais no procedimento, com valor estatisticamente significativo, *p-valor $\leq 0,05$ para (IL-2, Figura 16A) tempo pós-procedimento S1D1/S1D5 e R7D1/R7D5, idade no procedimento S1D1/S7D1; (IL-6, Figura 16B) idade no procedimento S1D1/S7D1; (IL-4, Figura 16C) procedimento R1D1/S1D1, tempo pós-procedimento S1D1/S1D5 e idade no procedimento S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D5/R7D5; (IL-10, Figura 16D) idade no procedimento para S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D1/R7D1 e R1D5/R7D5; (IL-12, Figura 16E) idade no procedimento S1D1/S7D1, S1D5/S7D5, R1D1/R7D1 e R1D5/R7D5; (VEGF, Figura 16F) idade no procedimento para S1D1/S7D1. Além disso, dentre as vias inflamatórias dos genes avaliados, sugeriu-se também, que a resposta inflamatória nos animais P1 estava menos expressa quando comparada aos animais P7 (Figuras 16A, C, D e F) e que a maturação da resposta inflamatória ocorre em função do tempo.

Nesse sentido e uma vez que a resposta é influenciada pela idade dos animais no procedimento, realizamos análises de enriquecimento a fim de determinar os principais processos biológicos relacionados ao sistema inflamatório, logo no período inicial da vida, através da ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis – IPA* (Ingenuity).

4.6.2. Análise de enriquecimento

Através do Ingenuity, as expressões gênicas obtidas pelo sequenciamento do RNA total, foram tabeladas junto com os respectivos valores de $p \leq 0,05$; $z\text{-score} \leq \pm 1,96 \geq$ e $fold\text{-change} \leq \pm 1,3 \geq$ e realizadas em comparações pareadas, ou seja, o animal ressectado em relação ao seu respectivo sham-pareado. Nas análises de enriquecimento, as expressões gênicas combinadas resultaram nos processos biológicos mais relevantes ligados a resposta inflamatória e movimentos celulares de recrutamento, migração e adesão (Figura 17). Os processos biológicos encontrados sugeriram que o efeito do procedimento

resultou em diferentes perfis de expressão das vias entre os grupos analisados e nas comparações, as barras em vermelho representaram a ativação da via correspondente, em relação ao respectivo sham-operado, e as barras em azul, o bloqueio da expressão. Na comparação R1D1/S1D1, destacaram-se ativação, migração e recrutamento de células mieloides, neutrófilos e fagócitos (Figura 17A 1). Algumas dessas vias foram recapituladas apenas nos grupos R7D5/S7D5 (Figura 17A 4), enquanto que nos grupos R1D5/S1D5 e R7D1/S7D1, não houve alteração no perfil de expressão das vias ligadas à resposta inflamatória. Um perfil semelhante foi visto nas vias ligadas ao movimento celular (Figura 17B), quando as principais respostas à lesão apresentaram-se somente nos grupos R1D1/S1D1 (Figura 17B 1) e nos grupos R7D5/S7D5 (Figura 17B 4). Esses dados apresentaram-se semelhantes ao agrupamento pelo método de Poisson (Figura 14), sugerindo que as principais diferenças e particulares estariam restritas, sobretudo, aos grupos R1 vs R7, e que a idade no procedimento (Figura 16) poderia influenciar diretamente nos resultados observados.

Figura 17: Análise de enriquecimento pelo Ingenuity.

Processos e vias biológicas ligadas à (A) resposta inflamatória e (B) movimentos celulares ligados à resposta à cirurgia de ressecção dos ratos P1 e P7 em relação ao seu sham-operado, nos diferentes tempos (1- R1D1 vs S1D1; 2- R1D5 vs S1D5; 3- R7D1 vs S7D1; 4- R7D5 vs S7D5). As barras em vermelho representam a via ativada correspondente e as barras em azul, o bloqueio da expressão.

Em suma, os resultados obtidos através da análise por ferramentas exploratórias sugerem que os ratos com um dia de vida são capazes de desenvolver uma resposta inflamatória, com ativação de processos biológicos

relacionados ao sistema imunológico, e também que a idade do animal no procedimento influencia no efeito da resposta, sugerido por análises de GSEA. Embora os processos biológicos sugiram uma maturação tempo-dependente, processos biológicos de genes ligados à ativação e atração de células inflamatórias e de macrófagos apresentaram-se ativados em resposta à lesão, corroborando com evidências previamente descritas no camundongo (107). Nesse sentido, avaliamos a capacidade dos macrófagos de se infiltrar, de fato, no tecido cardíaco após a lesão de ressecção apical.

4.7. Infiltrado de células CD68 positivas no tecido cardíaco

A capacidade de macrófagos de se infiltrarem no tecido cardíaco de ratos P1 e P7, com um e cinco dias após a lesão (D1 e D5, respectivamente) foi avaliada através do ensaio de imunohistoquímica para células CD68 positivas (Figuras 18A-E). Os resultados demonstraram que em resposta à cirurgia de ressecção apical, os macrófagos foram capazes de se infiltrar na área da lesão e que nos grupos P1, o efeito do tempo pós-cirurgia não alterou a quantidade de células infiltradas por área de tecido.

Figura 18: Infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco pós-lesão.

O infiltrado foi avaliado (média ± SEM) pela marcação de células CD68 positivas, na região apical do coração de ratos ressectados (A) P1+1 (n=7); (B) P1+5 (n=7); (C) P7+1 (n=7) e (D) P7+5 (n=6). (E) Quantificação de células CD68 positivas, normalizadas pela área do tecido, considerando que o animal não ressectado (NR) não apresenta infiltrado apical de macrófagos. A comparação se deu em relação ao P1D1. ns= não significante; * = p-valor ≤ 0,05 e *** = p-valor ≤ 0,001

Considerando a baixa população de células inflamatórias no tecido, e as subpopulações de macrófagos na cinética da resposta inflamatória, decidimos avaliar se os diferentes perfis de polarização, pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2) dos macrófagos, apresentavam particularidades e se o efeito seria específico das mesmas. Uma vez que o perfil anti-inflamatório de macrófagos (M2) foi sugerido como sendo o predominante em camundongos neonatais no pós-lesão (107), avaliou-se se o perfil M2 de macrófagos favoreceria a proliferação de cardiomiócitos nos ratos neonatais.

4.8. Diferenciação e polarização de macrófagos para o perfil M2

O cultivo de macrófagos polarizados foi realizado durante nove dias, sendo que a polarização para os perfis M1 e M2 ocorreu nas últimas 48 horas. Através do ensaio de *High Content Screening* (HCS, Figura 19A), a população de macrófagos na placa de cultura (células CD68 positivas) foi avaliada e ao final do procedimento, confirmamos a polarização específica por expressão gênica através de qRT-PCR, (Figuras 19B-C). Os meios condicionados resultantes do processo de polarização de macrófagos foram utilizados nos experimentos, para testar nossa hipótese.

Figura 19: Diferenciação e polarização de macrófagos derivados da medula óssea.

(A) População de macrófagos na placa, ao final do experimento (CD68 em verde e DAPI para núcleos, em azul), avaliados por HCS. Ao final da polarização, a técnica de qRT-PCR confirmou diferenças na expressão gênica de marcadores pró-inflamatório (B) IL-1 β , para macrófagos M1 e anti-inflamatório (C) arginase1, para macrófagos M2. As barras indicam (média $\pm$ SEM) as médias dos níveis de expressão de RNAm.

4.9. O perfil M2 de macrófagos eleva a taxa de proliferação de cardiomiócitos submetidos a estresse

A fim de avaliar a influência do perfil anti-inflamatório de macrófagos na proliferação de cardiomiócitos, utilizamos cardiomiócitos (CM) em cultura, isolados de corações de ratos com um dia de vida e submetemos ao tratamento com meio condicionado de macrófagos polarizados para ambos os perfis, pró e anti-inflamatório. Considerando a grande quantidade de fatores de crescimento presente no meio de cultura suplementado com soro, avaliamos o perfil e a taxa de proliferação da cultura de CM no controle negativo (meio RPMI *starving*) e no controle positivo (meio RPMI suplementado com 10% de FBS), pela análise de células positivas para CM (tropomiosina cardíaca) e para fibroblastos (células vimentina-positivas; Figuras 20A-B) e para CM em proliferação (marcação de tropomiosina cardíaca e Ki67), respectivamente, por HCS (Figuras 20C-D).

Figura 20: Perfil da cultura de CM nos tratamentos controle.

Avaliação, por HCS, da cultura de CM e fibroblastos cardíacos nos (A) controle negativo (meio RPMI, *starving*) e (B) positivo (meio RPMI + 10% de FBS), evidenciada por CM (tropomiosina, em verde), fibroblastos (vimentina, em vermelho) e núcleos celulares (DAPI, em azul); e da taxa de proliferação nos (C) controle negativo e (D) positivo, evidenciada por tropomiosina (verde), ki67 (marcador de proliferação) e núcleos celulares (DAPI, em azul).

Avaliações morfológicas das células, por HCS, sugerem que o cultura suplementado com 10% de soro foi suficiente para aumentar a quantidade de fibroblastos cardíacos (Figura 20B) e também elevar a taxa de proliferação de CM (Figura 20D), quando comparado ao controle negativo (Figuras 20A e C). Considerando o perfil do tratamento dos meios de cultura *starving* e suplementado com soro, e a taxa de proliferação “basal” vista no controle positivo, avaliamos se o efeito do tratamento do meio condicionado M2 na proliferação de CM em cultura seria suficiente para elevar as taxas de proliferação de cardiomiócitos (Figura 21). De maneira interessante, ambos os meios condicionados M1 (Figura 21B) e M2

(Figura 21C) foram capazes de elevar a taxa de proliferação de CM, a níveis semelhantes aos do controle positivo (Figura 21A).

Figura 21: Aumento da taxa de proliferação dos CM submetidos ao tratamento dos meios condicionados M1 e M2.

As barras ilustram (média $\pm$ SEM) a elevada taxa de proliferação de CM de células submetidas ao tratamento com meios M1 e M2 e controle positivo (meio RPMI + 10% de FBS), em comparação ao controle negativo (meio RPMI *starving*, $n=9$) (A). As imagens ilustram os CM (tropomiosina, em verde) em proliferação (ki67, em vermelho), quando submetidos a tratamento com meios condicionados M1 (B) e M2 (C). Os núcleos se encontram em azul (DAPI). ****= $p \leq 0,0001$

Uma vez que cardiomiócitos, tratados com ambos os perfis inflamatórios apresentaram aumento da taxa de proliferação, em condições basais, a níveis semelhantes ao controle positivo (RPMI + 10% FBS), avaliamos o perfil de proliferação de cardiomiócitos, quando submetidos a fator indutor de estresse (hipóxia, com 1% de O_2), tratados com ambos os meios condicionados (Figura

22). No entanto, apenas o meio condicionado M2 foi capaz de elevar a taxa de proliferação de CM neonatais (Figura 22A).

Figura 22: Aumento da taxa de proliferação de CM quando submetidos ao tratamento com meio condicionado e à hipóxia.

(A) As barras ilustram (média $\pm$ SEM) a taxa de proliferação de CM elevada no tratamento com meio condicionado M2, quando submetidos à hipóxia ($n=9$, **** p -valor $\leq 0,0001$). As imagens representam os cardiomiócitos (em verde), a marcação positiva para Ki67 (vermelho) e os núcleos em DAPI (azul) do controle negativo (B), controle positivo (C), meio condicionado M1 (D) e M2 (E).

Considerando que 2/3 do coração é composto por fibroblastos, e que essas células são essenciais na modulação da reparação, bem como dos efeitos deletérios do pós-lesão cardíaca, avaliamos o efeito do meio condicionado M2 em fibroblastos cardíacos, quando submetidos à indução experimental da diferenciação dessas células em miofibroblastos.

4.10. O perfil M2 de macrófagos previne a diferenciação em fibroblastos TGF- β -induzidos

A taxa de proliferação das células tropomiosina-negativas foi avaliada quando submetidas aos tratamentos com meios condicionados M1 e M2. De maneira semelhante ao que foi encontrado em cardiomiócitos em condições basais (Figura 21), ambos os perfis da polarização de macrófagos foram suficientes para elevar a taxa de proliferação de fibroblastos cardíacos, a níveis semelhantes do controle positivo (Figura 23A). Por outro lado, de maneira inversa, somente o tratamento com meio condicionado M2 foi capaz de reduzir a intensidade de expressão de alfa actina de músculo liso (α SMA), em fibroblastos submetidos à diferenciação TGF- β -induzida (Figura 23B), em razão do controle positivo (meio RPMI + 10% FBS, suplementado com 10ng/ml TGF- β).

Figura 23: Aumento da taxa de proliferação e prevenção da diferenciação de fibroblastos submetidos ao tratamento com meio condicionado M2.

(A) As barras indicam (média $\pm$ SEM) que ambos os meios condicionados M1 e M2 foram capazes de elevar a taxa de proliferação de células CM-negativas, a níveis semelhantes ao controle positivo (meio RPMI + 10% FBS + 10ng/ml TGF- β); No entanto, somente o M2 preveniu a diferenciação de fibroblastos TGF- β -induzidos, por intensidade de expressão de α SMA, em razão do controle positivo (B) (n=9; *p-valor $\leq$ 0,05). As imagens ilustram a intensidade da marcação nas condições de controle positivo (C), meio condicionado M1 (D) e M2 (E); α SMA (verde) e núcleos em DAPI (azul). ***p-valor $\leq$ 0,001 e ****p-valor $\leq$ 0,0001

Considerando os promissores efeitos pró-regeneração vistos nos tratamentos submetidos ao meio condicionado M2, o *array* de citocinas foi utilizado como abordagem exploratória, a fim de identificar potenciais efetores da condição anti-inflamatória.

4.10. Membrana *array* para citocinas

Avaliamos a expressão de citocinas presentes nos meios condicionados de macrófagos polarizados para os perfis pró e anti-inflamatórios, M1 e M2, respectivamente. As membranas foram incubadas aos pares, sendo controle vs M2; e M1 vs M2, e os resultados obtidos foram normalizados pelos controles positivos e negativos. Os dados foram expressos na unidade arbitrária porcentagem de intensidade (volume) normalizada (Figuras 24A-B).

Figura 24: Membrana *array* para citocinas.

As membranas foram realizadas e reveladas pareadas: (A) meio controle de macrófagos vs M2 e (B) M1 vs M2. Os meios condicionados M1 e M2 foram obtidos a partir da combinação de experimentos independentes de polarização (n=7).

Os valores normalizados das citocinas presentes nos sobrenadantes controle, M1 e M2 foram separados e as comparações foram realizadas de duas maneiras: (1) as citocinas presentes em ambos os grupos de M1 e M2, diferentes do controle (M1 & M2 $\neq$ Controle); e (2) as citocinas exclusivas de M2, diferentes do M1 e controle (M2 $\neq$ M1 & Controle; Figura 25).

Citocinas	Controle	M1	M2
RANTES	-	+++	+++
IL-13	-	-	-
IL-1a	-	+	++
CINC-1	-	++++	++++
Thymus Cytokine	++	-	+
IL-17	-	-	-
IL-1B	-	-	+
CINC-2a/b	+	++++	++++
TIMP-1	++++	++++	++++
IP-10	-	+++	+
IL-1ra	+++	++++	++++
CINC-3	-	+++	++++
TNF-a	-	-	-
LIX	-	++	++
IL-2	-	-	-
CNTF	-	-	-
VEGF	-	++++	+
L-selectin	-	++	-
IL-3	-	-	-
Fractalkine	-	-	+
MIG	-	+	-
IL-4	-	-	++++
GM-CSF	-	-	-
MIP-1a	-	++++	++++
IL-6	-	-	+
slcam-1	-	+	+
MIP-3a	-	++	++++
IL-10	-	++	++
IFN- γ	-	+++	-

LEGENDA
(%vol/nd)

1-5: +

5-10: ++

10-20: +++

20-30: ++++

+30: +++++

Figura 25: Análise de comparação das citocinas expressas para cada condição.

Os valores normalizados foram dispostos a fim de realizar as comparações de expressão das citocinas entre o meio condicionado controle, M1 e M2.

Nas avaliações, foram consideradas a ausência vs a presença de citocinas através do experimento de membranas *array*, entre os meios condicionados M1, M2 e controle. Dentre as citocinas presentes em ambos os sobrenadantes,

diferentes do controle, destacaram-se 15 citocinas principais (Figura 26). Uma vez que ambos os meios condicionados M1 e M2 foram capazes de elevar a taxa de proliferação de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos em cultura (Figuras 21 e 23), sugerimos que tal efeito pode ser resultado da presença e/ou atuação dessas 15 citocinas comumente expressas.

M2 & M1 ≠ Controle	M2 ≠ M1 & Controle
RANTES, IL-1 α , CINC-1, CINC-2 α/β , TIMP-1, IP-10, IL-1ra, CINC-3, LIX, VEGF, MIP-1 α , sICAM-1, MIP-3 α , IL-10	IL-4 IL-6 IL-1 β Fractalkine

Figura 26: Citocinas expressas nos dois grupos comparativos.

As análises se deram por citocinas comuns aos meios condicionados M1 & M2 ≠ controle (15 citocinas) e citocinas exclusivas de M2 ≠ M1 & Controle (quatro citocinas).

No entanto, quando submetidos à hipóxia, somente os cardiomiócitos tratados com meio condicionado M2 apresentaram aumento na taxa de proliferação (Figura 22). Além disso, o meio condicionado M2 também preveniu a diferenciação-induzida de fibroblastos cardíacos por intensidade de expressão de α SMA (Figura 23). Nesse sentido, as citocinas exclusivamente expressas no meio condicionado M2, foram IL-4, IL-6, IL-1 β e Fractalkine (Figura 26). Essas citocinas tornam-se potenciais candidatos a novas abordagens experimentais que explorem o potencial regenerativo em células cardíacas.

De forma conjunta, os resultados obtidos sugerem que o meio condicionado de macrófagos polarizados para o perfil M2 foi capaz de sustentar a proliferação de células cardíacas totais, a níveis basais; ativar a proliferação específica de cardiomiócitos neonatais submetidos à hipóxia; e prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos neonatais submetidos ao tratamento com TGF- β .

5. DISCUSSÃO

A cirurgia de ressecção apical cardíaca, como modelo de lesão cardíaca, foi primeiramente descrita em zebrafish e recentemente aplicada em camundongos, quando Porrello e colaboradores (43) demonstraram, pela primeira vez em mamíferos, a regeneração cardíaca pós-natal após perda tecidual. Considerando a abstenção de informações, o estudo de neoformação celular no coração pós-natal de ratos auxilia no desenvolvimento de futuras abordagens translacionais, no sentido de explorar a inédita capacidade de regeneração cardíaca que a “janela de oportunidades” circunscrita apenas nas primeiras horas após o nascimento oferece, além da importância que esse modelo representa no estudo da cardiologia.

No presente estudo, avaliamos a resposta cardíaca à cirurgia de ressecção apical, realizada em ratos com um e sete dias de vida, a curto e longo prazo. Além disso, desenvolvemos um método de quantificação precisa da porção cardíaca ressectada, a partir do imageamento por ressonância magnética antes e logo após a cirurgia (Figura 3), o qual foi utilizado como critério excludente, a fim de evitar diferenças metodológicas na cirurgia, e considerando apenas os ratos que apresentaram 15% ou mais de área cardíaca ressectada (Figura 3).

Nossos resultados evidenciaram pela primeira vez, a neoformação tecidual em ratos com um dia de vida, após 21 dias da cirurgia de ressecção apical. Na parte I dos resultados, demonstramos que ratos P1 apresentaram células Troponina I-cardíacas e Conexina 43 (Figuras 4B, D, F) com esparsas fibras de colágeno ao longo da área neoformada, sugerindo que o processo regenerativo foi realizado, em sua maioria por cardiomiócitos, porém não foi completo. Por outro lado, nos ratos com sete dias de vida (P7), submetidos à cirurgia de ressecção apical, o processo reparativo da lesão foi majoritariamente via deposição de fibras de colágeno e formação de escara (Figuras 5A, C), apesar de raros e esparsos agregados de células Troponina I-cardíacas tenham sido vistos na região do ápice, 21 dias após a lesão (Figura 4). Embora os ratos P1 apresentem resposta

mais extensa e robusta quando comparados aos ratos P7, os resultados encontrados sugerem que a restauração do tecido não é completa, em ambos os grupos analisados. Nossos resultados estão em contraste com estudos anteriores realizados em camundongos submetidos a 15% de ressecção apical (43), os quais sugeriram a completa regeneração cardíaca e também com a ausência completa da capacidade regenerativa relatada em camundongos submetidos à ressecção apical de 10% do coração (122). De maneira similar, Bryant e colaboradores demonstraram que apesar da evidente neoformação de cardiomiócitos após 21 dias da cirurgia, fibras de colágeno estavam presentes em camundongos submetidos a 15% de ressecção cardíaca apical, e que a quantidade de deposição de colágeno tecidual fora proporcional à extensão cirúrgica (123). Dentre as possibilidades, o processo de neoformação de cardiomiócitos nos ratos parece ser incompleto devido à maioria das células cardíacas já estar com o ciclo celular aprisionado e, portanto, perderem o potencial proliferativo logo após o nascimento (6, 124, 125). Nesse sentido, os raros cardiomiócitos que ainda possuem a capacidade de se proliferar, podem não ser em número suficiente para fornecer a completa restauração tecidual no pós-lesão.

A desorganização na arquitetura das células neoformadas, sugerida pela falta de alinhamento uniforme das células Troponina I-positivas observada nos ratos P1 (Figuras 4 B, D), nos levou a explorar se o suprimento vascular à região estaria comprometido e se as consequências da regeneração precoce poderiam influenciar na função cardíaca global durante a vida adulta. Embora a porcentagem de ressecção cardíaca (entre 15-18% do coração) seja significativa em ratos neonatos, e em animais adultos, essa porção torna-se basicamente irrelevante devido à adaptação e aumento do tamanho do coração. Ademais, as consequências observadas em longo prazo poderiam refletir às diferenças da reparação tecidual relatadas nos ratos P1 e P7, e como esses eventos contribuiriam em minimizar a lesão cardíaca precoce, com o passar do tempo.

A esse respeito, os resultados obtidos pelas aquisições da perfusão tecidual realizadas em dois períodos, com 21 dias pós-lesão e com 60 dias de vida, no mesmo animal, foram apresentados em relação ao tecido viável remoto,

para cada aquisição do mesmo grupo (Figura 6). Esse tipo de análise minimizou o viés associado às diferenças morfológicas do coração nas duas idades avaliadas. O exame de perfusão tecidual por SPECT é frequentemente utilizado para avaliar a perfusão cardíaca global, no infarto do miocárdio, tanto em modelos experimentais quanto em estudos clínicos (126, 127). Dado que a fibrose substitui o tecido muscular viável e não possui perfusão significativa, o exame por SPECT com injeção do radiofármaco Sestamibi-99mTc, é usado para estimar a proporção do infarto do miocárdio (128). Em nosso estudo, a análise dos dados realizada através do método de Bullseye (129) revelou um desbalanço de suprimento vascular em ambos os grupos P1 e P7, nos dois tempos analisados (Figura 6). No grupo P7, a captação reduzida do radiofármaco na região apical foi consistente com a ausência de cardiomiócitos e a possível neoangiogênese insuficiente (Figura 6B). Por outro lado, a hipoperfusão observada nos ratos do grupo P1 (Figura 6A), não havia sido antecipada, apesar da escassa presença de fibras de colágeno na área regenerada. Nesse sentido, acredita-se que a hipoperfusão sustentada da região apical neoformada nesses animais, poderia estar relacionada à inadequada neoangiogênese e que, além do suprimento sanguíneo insuficiente, os cardiomiócitos neoformados poderiam apresentar disfunções metabólicas.

A avaliação da função cardíaca por ecocardiografia, em condições hemodinâmicas basais, é frequentemente utilizada, em decorrência de terapias celulares e gênicas pós-infarto do miocárdio experimental. No entanto, nosso grupo já demonstrou que, mesmo os ratos submetidos ao infarto do miocárdio de uma extensa área do ventrículo esquerdo (35-45%), apresentam parâmetros hemodinâmicos normais, avaliados tanto por métodos não invasivos quanto por determinação intracardíaca direta de valores de pressão/volume. Sob essas condições, os roedores, ao contrário dos humanos, irão apresentar função cardíaca comprometida somente quando submetidos a estresse farmacológico (130-133). Nossos resultados demonstraram que, sob condições basais, os parâmetros cardíacos globais encontravam-se preservados nos animais adultos dos grupos avaliados (sham-operado, P7 e P1, Tabela 3), através de avaliações

hemodinâmicas diretas. Por outro lado, sob estresse de pós-carga induzido por administração farmacológica, os parâmetros cardíacos apresentaram-se comprometidos no grupo P7 e preservados no grupo P1 (Figura 7). Esses dados sugerem que a combinação favorável da neoformação de cardiomiócitos e ausência de uma escara rígida de tecido fibrótico na região ressectada do ápice, contribuem para uma função cardíaca preservada no grupo P1 e, que embora apresentem hipoperfusão apical sustentada, houve ausência de remodelamento compensatório do coração nesses animais. Por outro lado, a deficiência de formação de novos cardiomiócitos e a significativa escara de fibrose nos ratos do grupo P7 acarretaram em um cenário desfavorável, com comprometimento da função cardíaca após a administração de PHE, evidenciado por déficit da ejeção, frequentemente visto no infarto do miocárdio, acompanhado por valores elevados de LVEDP (Figura 7A)(134). Esses dados foram consistentes com valores de ESPVR diminuídos, o que indica performance sistólica diminuída no grupo P7 (Figura 7D), e com o aumento da inclinação da relação pressão e volume no final da diástole (EDPVR), sugerindo acentuada rigidez da câmara cardíaca (Figura 7E), os quais se correlacionam com o aumento do número de fibras de colágeno e da espessura dessas fibras, nos animais adultos do grupo P7 (Figuras 9E e F).

Coletivamente, nossos dados forneceram pela primeira vez, evidências de que ratos com um dia de vida quando submetidos à cirurgia de ressecção de 15-18% do coração, apresentam cardiomiócitos neoformados na área lesada e que esse potencial é transiente, sendo perdido aos sete dias de vida. Embora incompleto e acompanhado de hipoperfusão tecidual sustentada, a resposta cardíaca global aos efeitos de pós-carga, após administração de indutor de estresse, apresentou-se preservada nos ratos adultos do grupo P1. Apenas com os dados obtidos, não é possível a translação direta a estratégias terapêuticas de reparo no coração adulto, porém, essas evidências indicam um interessante modelo com mecanismos de regeneração cardíaca pós-natais, com neoformação de cardiomiócitos e ausência de remodelamento cardíaco adverso. A cirurgia experimental de ressecção apical cardíaca não se assemelha aos principais tipos de lesão no adulto, como a isquemia e o infarto do miocárdio. No entanto, a

compreensão e caracterização molecular de resposta regenerativa em ratos neonatos, dada pela inédita neoformação de cardiomiócitos no local da lesão, com baixa deposição de colágeno, podem auxiliar no desenvolvimento de futuros tratamentos terapêuticos que recapitulem esse potencial no adulto.

Sabe-se que a lesão cardíaca é normalmente acompanhada de ativação do sistema inflamatório. Nos adultos, a resposta inflamatória no infarto do miocárdio, por exemplo, é necessária para que haja o estímulo ao processo de reparo, acompanhado pela formação de escara de tecido fibrótico na área da lesão (101, 135). Considerando a escassez de fibras significativas de colágeno e a ausência de remodelamento cardíaco adverso no processo de neoformação tecidual nos ratos P1, levantamos a hipótese de que a resposta inflamatória nesses animais seria diferente da dos adultos, e que, o perfil do sistema imunológico em processo de maturação, poderia favorecer a proliferação endógena de cardiomiócitos. Decidimos então, utilizar ferramentas exploratórias a fim de avaliar proteínas que pudessem estar diferencialmente expressas entre grupos avaliados. A ferramenta exploratória de espectrometria de massas por *MALDI imaging*, que além de ionizar as proteínas teciduais e combinar as relações massa/carga com uma resolução de 100-200 μm , é capaz de apontar a posição/localização das proteínas expressas. A fim de determinar a confiabilidade do método, realizamos, em primeiro lugar, um experimento de controle positivo da técnica (Figura 10). No entanto, acreditamos que o processo de obtenção das amostras através de cortes histológicos do tecido cardíaco e a preparação das amostras por digestão de matriz, foram suficientes para favorecer a degradação das proteínas teciduais. Considerando que a análise ocorre por tempo de voo de peptídios, combinado com a relação de massa/carga provenientes de bibliotecas de bioinformática, compromete-se a obtenção de um novo alvo quando a técnica é utilizada como ferramenta exploratória (136), uma vez que esses fragmentos podem ser combinados em diversas e diferentes sequências. Frente a isso, optamos por considerar a ferramenta de análise por *MALDI imaging* como método de confirmação da localização tecidual de determinada proteína, e não mais como ferramenta exploratória.

O sequenciamento do RNA (RNAseq – HiSeq 2500 – *Illumina*), como ferramenta exploratória robusta de análise do transcriptoma total, permite identificar e quantificar transcrito raros, detectar isoformas, novos transcritos e modificações pós-traducionais e/ou mutações/SNPs com alta precisão, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos. Nos últimos anos, a análise do transcriptoma tem contribuído para o entendimento de mudanças no perfil de expressão de camundongos neonatais, no processo de regeneração cardíaca. Experimentos realizados a partir do transcriptoma de camundongos com 10 dias de vida, não manipulados, sham-operados e submetidos à ligadura da artéria esquerda descendente foram descritos por Hauber e colaboradores (137) e os resultados obtidos sugeriram a expressão diferencial de genes ligados ao ciclo celular ou mitose, à matriz extracelular e também às vias de síntese de colágeno. Por outro lado, O'Meara e colaboradores (138) demonstraram que o transcriptoma de cardiomiócitos de camundongos com potencial regenerativo cardíaco, apresentaram perfil de regressão nos processos de diferenciação, com reativação de programas latentes de desenvolvimento. O papel do sistema imunológico foi descrito por Han e colaboradores (139), cujos resultados indicaram que genes ligados à resposta inflamatória aguda induzem a proliferação de cardiomiócitos em camundongos neonatais submetidos à ressecção apical. A escassez de dados na literatura que abordem a resposta inflamatória de ratos logo no início da vida, principalmente ainda quando submetidos à lesão cardíaca, faz da interpretação dos dados um desafio. No entanto, acreditamos que os nossos resultados venham a somar na compreensão e na construção do perfil da resposta regenerativa circunscrita no rato neonato.

A fim de determinar o perfil da resposta inflamatória nos ratos neonatos, e se esse perfil influencia na resposta regenerativa observada nos ratos P1, também foram considerados ratos sham-operados. Essa abordagem permitiu a comparação dos resultados obtidos pelo sequenciamento do RNA total considerando três parâmetros principais: idade no procedimento (ratos com um ou sete dias de vida); tipo de procedimento (cirurgia de ressecção apical ou falsa cirurgia) e tempo após o procedimento (um ou cinco dias após o procedimento)

(Figura 11). O agrupamento pelo método de distância de Poisson revelou que ambos os grupos R1 e R7 apresentam particulares bem definidas na expressão gênica (Figura 14), sugerindo que genes que participam do processo regenerativo no rato P1 podem estar diferentemente expressos no grupo P7. Somado a isso, a análise da expressão diferencial revelou a presença de genes comuns aos três parâmetros analisados, e que dentre os processos biológicos regidos por genes, o processo do sistema imunológico mostrou-se presente (Figura 15). A análise por GSEA (Figura 16), a qual determina a atividade de uma via em particular, em função de diferentes processos biológicos, sugeriu que as principais mudanças nos perfis de expressão gênica de algumas vias ligadas à resposta inflamatória deram-se, sobretudo pela idade do animal no procedimento. Por outro lado, as análises de enriquecimento, obtidas através do Ingenuity em comparações dois a dois, sugerem que a cirurgia de ressecção apical nos ratos P1 ativa processos biológicos ligados à resposta inflamatória, em comparação com seu respectivo sham-operado, sugerindo que além do fator “idade no procedimento”, o perfil de resposta é potencializado devido ao procedimento (Figuras 17A e B 1). Além disso, a resposta aguda observada nos ratos R1 é mais robusta, com um dia após a lesão (D1), enquanto que nos ratos R7, a ativação da resposta inflamatória robusta ocorre mais tardiamente, com cinco dias após a lesão (D5; Figuras 17A e B). Isso pode ser devido ao processo do nascimento, o qual já foi descrito, por estar acompanhado da ativação do processo inflamatório (140, 141). Além disso, nossos dados, de certa forma, corroboram com evidências descritas em camundongos, de que a maturação do sistema inflamatório é idade-dependente (49).

De modo geral, as análises exploratórias sugeriram que a ativação das vias ligadas à resposta inflamatória nesses animais corrobora com dados da literatura que sugerem que, mesmo os neonatos são capazes de exibir respostas maduras às comparadas a dos adultos, sendo que as principais diferenças estariam na quantidade e na qualidade de mediadores, das células inflamatórias disponíveis (49). Por esse motivo, decidimos avaliar a capacidade de infiltração de macrófagos no tecido lesado e verificamos que a cirurgia de ressecção apical

cardíaca (Figura 18) foi suficiente para que macrófagos infiltrassem no tecido dos ratos P1D1 (Figura 18E), a níveis mais elevados que no animal não ressectado (NR). No entanto, o infiltrado não foi maior nos animais P1D5, embora os ratos tanto P7D1 quanto P7D5, tivessem apresentado um infiltrado maior (Figuras 18C-D). Esses resultados sugerem que há uma relação inversa entre a capacidade proliferativa de cardiomiócitos vs a infiltração de macrófagos, uma vez que nos animais do grupo P1, os quais apresentam potencial regenerativo, a quantidade de células CD68+ infiltradas na área lesada não foi afetada com o tempo pós-lesão. Esses resultados corroboram com dados previamente descritos (43, 107), os quais sugerem que monócitos e macrófagos são capazes de infiltrar no tecido pós-lesão, além de serem decisivos à regeneração cardíaca em camundongos neonatos. No geral, a ativação de vias ligadas à resposta e ao recrutamento de células inflamatórias, combinada com a capacidade dos macrófagos, de fato, se infiltrarem no tecido cardíaco pós-lesão, sugerem, pelo menos em partes, a participação do sistema inflamatório em neonatos. Sabendo que os macrófagos infiltrados no tecido são polarizados para dois perfis principais, os inflamatórios (M1) e os anti-inflamatórios (M2) (142, 143) e, considerando a neoformação de cardiomiócitos, com escassa deposição de fibras de colágeno no pós-lesão de ratos P1, sugerimos que o perfil predominante dos macrófagos no coração desses animais é do tipo anti-inflamatório, o qual poderia favorecer a proliferação de cardiomiócitos e prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos.

Uma vez no tecido cardíaco, os macrófagos atuam tanto na secreção de citocinas pró-inflamatórias, com função de citotoxicidade, quanto na fase anti-inflamatória, proliferativa e reparativa (143, 144). Nesse sentido, os macrófagos polarizados para o perfil M2, apresentariam potenciais regenerativos, favorecendo a proliferação e prevenindo o remodelamento do coração de ratos P1. Embora presentes, a baixa quantidade de macrófagos infiltrados no coração de ambos os grupos de ratos neonatais (Figura 18), dificultou a seleção e identificação dos diferentes perfis dessas células no tecido cardíaco. Frente a isso, utilizamos o método de diferenciação e polarização de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMØ) de ratos *Wistar* adultos. Esse método utilizado além de estar bem

caracterizado, permite a obtenção de grande quantidade de células (145, 146) e em nossos experimentos, a diferenciação apresentou cerca de 100% de eficiência (Figura 19A) e a polarização para os perfis M1 (Figura 19B) e M2 (Figura 19C) foi específica, quando avaliada a expressão gênica por qRT-PCR. O sobrenadante resultante do procedimento de polarização dos macrófagos foi utilizado para testar nossa hipótese.

Para tal, avaliamos o efeito do tratamento com meio condicionado de macrófagos de ambos os perfis, na proliferação de cardiomiócitos neonatais, em condições basais de cultura de células. Nossos resultados sugeriram que ambos os meios condicionados de macrófagos foram capazes de elevar a taxa de proliferação de cardiomiócitos, a níveis semelhantes ao do controle positivo (Figura 21A-C). No entanto, a fim de avaliar o efeito do estresse na taxa de proliferação das células tratadas com meio condicionado de macrófagos M1 e M2, submetemos a cultura de cardiomiócitos a hipóxia (1% de O₂). De maneira inédita, somente o meio condicionado M2 foi capaz de elevar a taxa de proliferação cardiomiócito-específica (Figuras 22D-E), sugerindo que o efeito da resposta anti-inflamatória aguda, além de ser potencializado no estresse, foi suficiente para estimular a proliferação de cardiomiócitos em cultura. A hipóxia, assim como a isquemia, desencadeia efeitos ligados à alteração do metabolismo, como acidose láctica, produção diminuída de energia pela mitocôndria, podendo levar à morte celular (147-149). Nos cardiomiócitos isolados de neonatos, a hipóxia causa efeitos compensatórios, como por exemplo, a hipertrofia e também morte celular (150, 151). No entanto, o tratamento com meio condicionado M2 foi capaz de elevar a taxa de proliferação, avaliada através da proteína Ki67, a qual está associada à proliferação celular, e o fato de estar presente durante as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e ausente em células com ciclo bloqueado (G0), a torna um excelente marcador de atividade celular. (152, 153) Alguns trabalhos já demonstraram que o meio condicionado anti-inflamatório de macrófagos estimula a proliferação de células cancerígenas em cultura, como visto em células de cólon (154) e de pulmão (155), e agora nós demonstramos

pela primeira vez, a aumento do index proliferativo de cardiomiócitos isolados de ratos neonatais, sob efeito do meio condicionado anti-inflamatório M2.

Tendo em vista que os fibroblastos cardíacos apresentam um importante papel de mecanossensores do coração, alguns trabalhos sugerem que sua interação direta com cardiomiócitos e com células inflamatórias infiltradas, influencia no perfil de resposta e remodelamento pós-lesão (156, 157). Nesse sentido, avaliamos se o meio condicionado M2 também seria capaz de prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos de ratos P1, quando submetidos ao indutor de diferenciação de miofibroblastos (TGF- β , (158, 159)). A expressão de α SMA é um marcador clássico de diferenciação de miofibroblastos, secretores de colágeno, quando submetidos a algum indutor de estresse, como o infarto do miocárdio (158, 159). Nossos resultados indicam que, embora ambos os meios condicionados M1 e M2 sejam suficientes para elevar a proliferação de células tropomiosina-negativas, nas culturas de cardiomiócitos (Figura 23A), somente o meio condicionado M2 foi capaz de prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos de ratos, avaliada pela intensidade de expressão da proteína α SMA, frente a um estímulo indutor (Figuras 23B). Uma vez que os macrófagos anti-inflamatórios apresentam características pró-fibróticas em adultos (160, 161), nossos resultados sugerem que fibroblastos cardíacos de ratos neonatos submetidos ao tratamento com meio condicionado anti-inflamatório, apresentam um perfil regenerativo, com prevenção da diferenciação de um caráter celular patológico. Em suma, os resultados obtidos *in vitro*, sugerem que o meio condicionado de macrófagos anti-inflamatórios, estimula a proliferação de cardiomiócitos, em condições basais e quando submetidos à hipóxia, além de prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos induzidos, de ratos neonatais.

Considerando os efeitos com potenciais regenerativos, das células cardíacas submetidas ao tratamento com meios condicionados de macrófagos, decidimos avaliar as principais citocinas presentes nos sobrenadantes a fim de determinar as que poderiam ser consideradas candidatas do processo (Figura 25). Uma vez que ambos os meios condicionados, M1 e M2 foram capazes de elevar a taxa de proliferação de cardiomiócitos e de fibroblastos cardíacos, mas somente o

meio condicionado M2 foi capaz de elevar a taxa de proliferação de cardiomiócitos submetidos à hipóxia (Figura 22) e de prevenir a diferenciação de fibroblastos cardíacos induzidos por TGF- β (Figura 23), decidimos comparar as citocinas expressas tanto no meio condicionado M1 e M2, que fossem diferentes do meio controle (Figura 26), e também avaliar as citocinas exclusivas do meio condicionado M2, em comparação com o meio condicionado M1 e controle (Figura 26).

Dentre as 28 citocinas avaliadas, 15 destacaram-se como sendo diferentes do controle, mas semelhantes tanto ao meio condicionado M1 quanto ao M2 (Figura 27), sendo essas: RANTES, IL-1 α , CINC-1, CINC-2 α/β , TIMP-1, IP-10, IL-1ra, CINC-3, LIX, VEGF, MIP-1 α , sICAM-1, MIP-3 α e IL-10. Agora, as citocinas exclusivamente expressas no meio condicionado M2, sendo diferentes do M1 e o do controle foram avaliadas, e o resultado sugeriu uma quantidade restrita das citocinas presentes, sendo essas IL-4, IL-6, IL-1 β e Fractalkine (Figura 27). Embora o papel de algumas citocinas exclusivas presentes no meio condicionado M2 já terem sido descritas por estimularem a resposta inflamatória aguda (162, 163), a citocina IL-6 já foi descrita por apresentar tanto propriedades pró, quanto anti-inflamatórias (164). Todavia, de maneira geral, nossos resultados sugerem que essas citocinas podem ser potenciais candidatas a novas abordagens experimentais que explorem o potencial regenerativo das células cardíacas neonatais, combinando o efeito proliferativo de cardiomiócitos e a prevenção da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Além disso, os efeitos observados sugerem um *interplay* entre fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos e a o papel da resposta inflamatória, na reparação cardíaca (157, 165), e novos experimentos fazem-se necessários a fim de compreender e explorar esses efeitos em novas abordagens terapêuticas que direcionem a resposta após lesão do miocárdio, em adultos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que ratos com um dia de vida apresentam capacidade de responder ao estímulo de ressecção apical, com ativação de processos biológicos ligados a recrutamento e maturação de células inflamatórias e infiltração de macrófagos, e cujo perfil anti-inflamatório aumenta a taxa de proliferação de cardiomiócitos e previne a diferenciação induzida de fibroblastos cardíacos neonatais. Ainda, o potencial de neoformação de cardiomiócitos observado no rato P1 é perdido nos ratos com sete dias de vida (P7). Além disso, até o presente momento, os dados obtidos nesse trabalho são inéditos e abrem uma nova possibilidade de exploração e modulação de novas abordagens terapêuticas regenerativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardiovascular diseases prevention and control: missed opportunities. World Health Organization; [cited 2014 Feb 15]; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en/.
2. Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País. Portal Brasil - Saúde; [cited 2011 Sep 06]; Available from: <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>.
3. Liu L, Eisen HJ. Epidemiology of heart failure and scope of the problem. *Cardiol Clin*. 2014 Feb;32(1):1-8, vii.
4. Burton PB, Raff MC, Kerr P, Yacoub MH, Barton PJ. An intrinsic timer that controls cell-cycle withdrawal in cultured cardiac myocytes. *Developmental biology*. 1999 Dec 15;216(2):659-70.
5. Winick M, Noble A. Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Developmental biology*. 1965 Dec;12(3):451-66.
6. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1996 Aug;28(8):1737-46.
7. Li F, Wang X, Bunger PC, Gerdes AM. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1997 Jun;29(6):1541-51.
8. Li F, Wang X, Gerdes AM. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1997 Jun;29(6):1553-65.
9. Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008 Oct;45(4):567-81.
10. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual review of physiology*. 2010;72:19-44.
11. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research*. 1991 Jun;68(6):1560-8.
12. Sigurdsson A, Swedberg K. The role of neurohormonal activation in chronic heart failure and postmyocardial infarction. *American heart journal*. 1996 Jul;132(1 Pt 2 Su):229-34.
13. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):326-35.
14. Lin Z, Pu WT. Strategies for cardiac regeneration and repair. *Science translational medicine*. 2014 Jun 4;6(239):239rv1.

15. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. *Pathophysiology. BMJ*. 2000 Jan 15;320(7228):167-70.
16. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006 Jun;290(6):H2196-203.
17. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep 21;355(12):1199-209.
18. Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2006 Aug;30(2):353-61.
19. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):937-42.
20. Zacchigna S, Giacca M. Extra- and intracellular factors regulating cardiomyocyte proliferation in postnatal life. *Cardiovascular research*. 2014 May 1;102(2):312-20.
21. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell stem cell*. 2013 Jun 6;12(6):689-98.
22. Gerbin KA, Murry CE. The winding road to regenerating the human heart. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2015 May-Jun;24(3):133-40.
23. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):668-73.
24. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):664-8.
25. Hudson JE, Porrello ER. The non-coding road towards cardiac regeneration. *Journal of cardiovascular translational research*. 2013 Dec;6(6):909-23.
26. Porrello ER, Olson EN. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem cell research*. 2014 Nov;13(3 Pt B):556-70.
27. Carvalho AB, de Carvalho AC. Heart regeneration: Past, present and future. *World journal of cardiology*. 2010 May 26;2(5):107-11.
28. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2001 Jun 7;344(23):1750-7.
29. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009 Apr 3;324(5923):98-102.
30. Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogorek B, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):305-15.

31. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):433-6.
32. Gonzalez-Rosa JM, Martin V, Peralta M, Torres M, Mercader N. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development*. 2011 May;138(9):1663-74.
33. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2188-90.
34. Wang J, Panakova D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, et al. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*. 2011 Aug;138(16):3421-30.
35. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):607-19.
36. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):601-5.
37. Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):606-9.
38. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation research*. 1998 Jul 13;83(1):15-26.
39. Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *The American journal of physiology*. 1997 Jan;272(1 Pt 2):H220-6.
40. Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, Rubart M, Soonpaa MH, de la Riviere AB, et al. Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2008 Apr 1;78(1):18-25.
41. Lorts A, Schwanekamp JA, Elrod JW, Sargent MA, Molkentin JD. Genetic manipulation of periostin expression in the heart does not affect myocyte content, cell cycle activity, or cardiac repair. *Circulation research*. 2009 Jan 2;104(1):e1-7.
42. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature medicine*. 2007 Aug;13(8):970-4.
43. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011 Feb 25;331(6020):1078-80.
44. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews Immunology*. 2007 May;7(5):379-90.
45. Barbero S, Ponte PL. [Infectious diseases in the fetus and newborn infant]. *Archivio per le scienze mediche*. 1977 Oct-Dec;134(4):413-35.
46. McDonagh S, Maidji E, Ma W, Chang HT, Fisher S, Pereira L. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *The Journal of infectious diseases*. 2004 Aug 15;190(4):826-34.
47. Marchini G, Nelson A, Edner J, Lonne-Rahm S, Stavreus-Evers A, Hulténby K. Erythema toxicum neonatorum is an innate immune response to commensal

microbes penetrated into the skin of the newborn infant. *Pediatric research*. 2005 Sep;58(3):613-6.

48. Karlsson H, Hessle C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infection and immunity*. 2002 Dec;70(12):6688-96.

49. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature reviews Immunology*. 2004 Jul;4(7):553-64.

50. Krishnan S, Craven M, Welliver RC, Ahmad N, Halonen M. Differences in participation of innate and adaptive immunity to respiratory syncytial virus in adults and neonates. *The Journal of infectious diseases*. 2003 Aug 1;188(3):433-9.

51. Firth MA, Shewen PE, Hodgins DC. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 2005 Dec;6(2):143-58.

52. Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1723-6.

53. Han P, McDonald T, Hodge G. Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology*. 2004 Sep;113(1):26-34.

54. Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003 Jul 28;21(24):3406-12.

55. Hassan J, Reen DJ. Cord blood CD4+ CD45RA+ T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology*. 1997 Mar;90(3):397-401.

56. Piguet PF, Irle C, Kollatte E, Vassalli P. Post-thymic T lymphocyte maturation during ontogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 1981 Sep 1;154(3):581-93.

57. Adkins B, Hamilton K. Freshly isolated, murine neonatal T cells produce IL-4 in response to anti-CD3 stimulation. *Journal of immunology*. 1992 Dec 1;149(11):3448-55.

58. Barbey C, Irion O, Helg C, Chapuis B, Grand C, Chizzolini C, et al. Characterisation of the cytotoxic alloresponse of cord blood. *Bone marrow transplantation*. 1998 Jul;22 Suppl 1:S26-30.

59. Splawski JB, Jelinek DF, Lipsky PE. Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Feb;87(2):545-53.

60. Garcia AM, Fadel SA, Cao S, Sarzotti M. T cell immunity in neonates. *Immunologic research*. 2000;22(2-3):177-90.

61. Peters AM, Bertram P, Gahr M, Speer CP. Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha by neonatal monocytes. *Biology of the neonate*. 1993;63(3):157-62.

62. De Wit D, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, et al. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *Journal of autoimmunity*. 2003 Nov;21(3):277-81.

63. Levy O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *Journal of endotoxin research*. 2005;11(2):113-6.
64. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA, et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatric research*. 2006 Aug;60(2):205-9.
65. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Jan 15;101(2):311-20.
66. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology*. 2005 Sep 15;175(6):3463-8.
67. Marchini G, Berggren V, Djilali-Merzoug R, Hansson LO. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta paediatrica*. 2000 Sep;89(9):1082-6.
68. Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Moller JC, Bucsky P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatric research*. 2002 Mar;51(3):317-22.
69. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*. 1993 Jul;14(7):353-6.
70. La Pine TR, Joyner JL, Augustine NH, Kwak SD, Hill HR. Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 interferon gamma response to group B Streptococci. *Pediatric research*. 2003 Aug;54(2):276-81.
71. Nomura A, Takada H, Jin CH, Tanaka T, Ohga S, Hara T. Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: a distinctive interleukin-18 response. *Experimental hematology*. 2001 Oct;29(10):1169-76.
72. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunology today*. 1999 Jul;20(7):330-5.
73. Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunology today*. 2000 Jan;21(1):35-41.
74. Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, La Pine TR, Hill HR. Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion. *The Journal of infectious diseases*. 2000 Sep;182(3):974-7.
75. Chelvarajan RL, Collins SM, Doubinskaia IE, Goes S, Van Willigen J, Flanagan D, et al. Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Jun;75(6):982-94.
76. Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *British journal of haematology*. 2000 Jul;110(1):18-28.
77. Henneke P, Berner R. Interaction of neonatal phagocytes with group B streptococcus: recognition and response. *Infection and immunity*. 2006 Jun;74(6):3085-95.

78. Ulrichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants. *NeoReviews*. 2004;5(10).
79. Reddy RK, Xia Y, Hanikyrova M, Ross GD. A mixed population of immature and mature leucocytes in umbilical cord blood results in a reduced expression and function of CR3 (CD11b/CD18). *Clinical and experimental immunology*. 1998 Dec;114(3):462-7.
80. Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clinical and experimental immunology*. 1995 Jul;101(1):183-9.
81. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:669-92.
82. Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Jun 6;201(11):1761-9.
83. Zlabinger GJ, Mannhalter JW, Eibl MM. Cord blood macrophages present bacterial antigen (*Escherichia coli*) to paternal T cells. *Clinical immunology and immunopathology*. 1983 Sep;28(3):405-12.
84. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature reviews Immunology*. 2011 Nov;11(11):788-98.
85. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology*. 2008;26:421-52.
86. Fleer A, Gerards LJ, Verhoef J. Host defence to bacterial infection in the neonate. *The Journal of hospital infection*. 1988 Feb;11 Suppl A:320-7.
87. Narni-Mancinelli E, Campisi L, Bassand D, Cazareth J, Gounon P, Glaichenhaus N, et al. Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Sep 3;204(9):2075-87.
88. Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, et al. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2008 Aug 15;29(2):306-17.
89. Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C. Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatric research*. 2004 Aug;56(2):219-26.
90. Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, et al. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infection and immunity*. 2011 Apr;79(4):1588-96.
91. Menge C, Neufeld B, Hirt W, Schmeer N, Bauerfeind R, Baljer G, et al. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1998 Apr 30;62(4):309-21.
92. Flaminio MJ, Rush BR, Davis EG, Hennessy K, Shuman W, Wilkerson MJ. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2000 Mar 15;73(3-4):267-85.

93. Hagiwara K, Kataoka S, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2000 Oct 31;76(3-4):183-90.
94. Pinto AR, Godwin JW, Rosenthal NA. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem cell research*. 2014 Nov;13(3 Pt B):705-14.
95. Mabbott NA, Kenneth Baillie J, Hume DA, Freeman TC. Meta-analysis of lineage-specific gene expression signatures in mouse leukocyte populations. *Immunobiology*. 2010 Sep-Oct;215(9-10):724-36.
96. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology*. 2011 Nov;89(8):836-43.
97. Mallory GK, White PD, Salcedo-Salgar J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J* 1939;18:647-71.
98. Mallory GK, White, P. D. & Salcedo-Salgar, J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. . *Am Heart J*. 1939;18:647-71.
99. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukiella G, Shappell SB, Taylor AA, et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Oct;90(4):1335-45.
100. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2002 Jan;53(1):31-47.
101. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research*. 2012 Jan 6;110(1):159-73.
102. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593-604.
103. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002 Nov;23(11):549-55.
104. Biswas SK, Chittethath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*. 2012 Sep;53(1-3):11-24.
105. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005 Dec;5(12):953-64.
106. Mantovani A. From phagocyte diversity and activation to probiotics: back to Metchnikoff. *European journal of immunology*. 2008 Dec;38(12):3269-73.
107. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2014 Mar;124(3):1382-92.
108. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American journal of pathology*. 2015 Oct;185(10):2596-606.
109. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Jun 4;110(23):9415-20.

110. Korf-Klingebiel M, Reboll MR, Klede S, Brod T, Pich A, Polten F, et al. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nature medicine*. 2015 Feb;21(2):140-9.
111. Huang WC, Yang CC, Chen IH, Liu YM, Chang SJ, Chuang YJ. Treatment of Glucocorticoids Inhibited Early Immune Responses and Impaired Cardiac Repair in Adult Zebrafish. *PLoS One*. 2013;8(6):e66613.
112. Becker RO, Chapin S, Sherry R. Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians. *Nature*. 1974 Mar 8;248(5444):145-7.
113. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology*. 2007 Mar;170(3):818-29.
114. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr;9(4):357-9.
115. Mudunuri U, Che A, Yi M, Stephens RM. bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics*. 2009 Feb 15;25(4):555-6.
116. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9.
117. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
118. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80.
119. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
120. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc*. 2009;4(8):1184-91.
121. Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp*. 2013(79).
122. Andersen DC, Ganesalingam S, Jensen CH, Sheikh SP. Do neonatal mouse hearts regenerate following heart apex resection? *Stem Cell Reports*. 2014 Apr 8;2(4):406-13.
123. Bryant DM, O'Meara CC, Ho NN, Gannon J, Cai L, Lee RT. A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015 Feb;79:315-8.
124. Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circulation research*. 2002 May 31;90(10):1044-54.
125. Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):521-44.
126. Acton PD, Thomas D, Zhou R. Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2006 Jun-Aug;22(3-4):429-34.

127. Oliveira LF, Mejia J, Carvalho EE, Lataro RM, Frassetto SN, Fazan R, Jr., et al. Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2013 Jul;101(1):59-67.
128. Gibbons RJ. Tc-99m SPECT sestamibi for the measurement of infarct size. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011 Sep-Dec;16(3-4):321-31.
129. Nuyts J, Mortelmans L, Suetens P, Oosterlinck A, de Rou M. Model-based quantification of myocardial perfusion images from SPECT. *J Nucl Med.* 1989 Dec;30(12):1992-2001.
130. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Goncalves GA, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One.* 2009;4(6):e6005.
131. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, et al. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One.* 2010;5(8):e12077.
132. Goncalves GA, Vassallo PF, dos Santos L, Schettert IT, Nakamuta JS, Becker C, et al. Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. *Gene Ther.* 2010 Mar;17(3):305-14.
133. dos Santos L, Antonio EL, Souza AF, Tucci PJ. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010 Jul;88(7):724-32.
134. Iskandrian AS, Segal BL, Hakki AH. Left ventricular end-diastolic pressure in evaluating left ventricular function. *Clin Cardiol.* 1981 Jan;4(1):28-33.
135. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol.* 2014 May;11(5):255-65.
136. Wattenberg A, Organ AJ, Schneider K, Tyldesley R, Bordoli R, Bateman RH. Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002 Jul;13(7):772-83.
137. Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, Tiefenthaler V, Metzler B, Aitman T, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging (Albany NY).* 2012 Dec;4(12):966-77.
138. O'Meara CC, Wamstad JA, Gladstone RA, Fomovsky GM, Butty VL, Shrikumar A, et al. Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration. *Circulation research.* 2015 Feb 27;116(5):804-15.
139. Han C, Nie Y, Lian H, Liu R, He F, Huang H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res.* 2015 Oct;25(10):1137-51.
140. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct;11(5):317-26.

141. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007 Jan;25(1):21-39.
142. Fujiu K, Wang J, Nagai R. Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovascular research.* 2014 May 1;102(2):232-9.
143. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
144. Frangogiannis NG. Emerging roles for macrophages in cardiac injury: cytoprotection, repair, and regeneration. *The Journal of clinical investigation.* 2015 Aug 3;125(8):2927-30.
145. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008 Nov;Chapter 14:Unit 14 1.
146. Manzanero S. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol.* 2012;844:177-81.
147. Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol.* 2007 Nov 1;584(Pt 3):715-26.
148. Jennings RB, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Myocardial ischemia and reperfusion. *Monogr Pathol.* 1995;37:47-80.
149. Williams RS, Benjamin IJ. Protective responses in the ischemic myocardium. *The Journal of clinical investigation.* 2000 Oct;106(7):813-8.
150. Ito H, Adachi S, Tamamori M, Fujisaki H, Tanaka M, Lin M, et al. Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 1996 Jun;28(6):1271-7.
151. Matsuoka R, Ogawa K, Yaoita H, Naganuma W, Maehara K, Maruyama Y. Characteristics of death of neonatal rat cardiomyocytes following hypoxia or hypoxia-reoxygenation: the association of apoptosis and cell membrane disintegrity. *Heart Vessels.* 2002 Sep;16(6):241-8.
152. Walsh S, Ponten A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovascular research.* 2010 Jun 1;86(3):365-73.
153. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22.
154. Engstrom A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *Int J Oncol.* 2014 Feb;44(2):385-92.
155. Zhang B, Zhang Y, Yao G, Gao J, Yang B, Zhao Y, et al. M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. *Clinics (Sao Paulo).* 2012 Aug;67(8):901-6.
156. Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circulation research.* 2010 Jan 8;106(1):47-57.
157. Takeda N, Manabe I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflam.* 2011;2011:535241.
158. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue

myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993 Jul;122(1):103-11.

159. Lijnen P, Petrov V. Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002 Jul-Aug;24(6):333-44.

160. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul;1832(7):989-97.

161. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Mar;122(3):787-95.

162. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring;45(2):27-37.

163. Morari J, Anhe GF, Nascimento LF, de Moura RF, Razolli D, Solon C, et al. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. *Diabetes*. 2014 Nov;63(11):3770-84.

164. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):878-88.

165. Van Linthout S, Miteva K, Tschope C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular research*. 2014 May 1;102(2):258-69.

8. APÊNDICES

3793/12/049

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Coordenador da CELA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **21.11.12**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **294/12** intitulado: **"Caracterização morfológica e molecular da regeneração cardíaca em ratos neonatos submetidos à ressecção apical,"** que utilizará 40 ratos wistar, apresentado pela Comissão Científica do Incor.

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

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador (a) Executante: Camila Zogbi Nogueira

CEP-FMUSP, 21 de novembro de 2012.

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

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

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

22/11/12
Basile

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
 Av. Dr. Arnaldo, 450 – Instituto Osório Friciro 2º andar CEP 01246-900 – Fone: 3061-8004
 e-mail: cep.fm@usp.br

ORIGINAL RESEARCH

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

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

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

Keywords

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

Correspondence

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

Funding Information

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

Received: 18 July 2014; Accepted: 21 July 2014

doi:10.14814/phy2.12115

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

*These investigators contributed equally to this work.

Introduction

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

Abstract

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

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