

Leonardo Jensen Socas

**Ferro intracelular: fator modificável
de susceptibilidade cardiovascular?**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Programa de Ciências Médicas

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

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2015

Leonardo Jensen Socas

**Ferro intracelular: fator modificável
de susceptibilidade cardiovascular?**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Programa de Ciências Médicas

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

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Socas, Leonardo Jensen

Ferro intracelular : fator modificável de susceptibilidade cardiovascular? /
Leonardo Jensen Socas. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--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.Ferro 2.Insuficiência cardíaca 3.Miócitos cardíacos
4.Camundongos 5.Ratos 6.Técnicas de cultivo de células

USP/FM/DBD-293/15

Dedicatória

Este trabalho é dedicado para a melhor pessoa que já conheci, minha esposa Natalia Sanchez Jensen, amiga, cúmplice, companheira. Sempre preocupada com o ser humano e digna de toda felicidade que este mundo pode lhe proporcionar. Ainda não posso lhe dar o mundo, mas dedico com todo o meu amor, esforço e dedicação empregados neste trabalho. Obrigado por tudo.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador José Eduardo Krieger pela oportunidade da orientação e a realização deste trabalho no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular-InCor.

Agradeço aos professores e colaboradores: Alexandre Pereira, Adriana Girardi, Francisco Laurindo, Paulo Tucci, Vinicius Bassaneze, Denise Fernandes, Maria Claudia Irigoyen, Débora Levy, Pedro Vitorino, Miriam Alaniz, Juliana Nakamuta, Paulo Caleb, Ayumi Yamaguchi, Breno Espósito e Leonardo dos Santos.

Agradeço a todos os funcionários do laboratório pela ajuda, apoio e proatividade sempre que foi preciso: Silvana, Maúde, Rosangela, Juliana, Marcelly, Luciana, Lucia, Ana Maria, Andréia, Brendo, Arruda, Marcio, Juliana, Thiago, Mariliza, Noely, Renata, Monica, Leno e Rafael. Em especial Elida Neri e Renata Carmona que me acompanharam e me ajudaram de perto neste final de jornada.

Agradeço a todos os colegas do laboratório: Daniel, Renato, Carla, Ana Elisa, Camila, Kaliandra, Bianca, Pamela, Tamiris, Kaká, André, Aline, Fernanda, Samantha, Michele, Tell, Clara, Rodrigo, Thaís e João que assim como eu tiveram o desafio da pesquisa como prioridade na vida.

Agradeço em especial aos amigos que estiveram comigo diariamente e compartilharam as dificuldades e alegrias sempre com uma palavra de ajuda: Rafael Dariolli, Gabriela Venturini e Marcus Vinicius.

Agradeço as instituições de fomento à pesquisa CAPES, CNPQ e a Fundação Zerbini.

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

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

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

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

Sumário

Lista de siglas	i
Lista de símbolos	v
Índice de tabelas	vi
Índice de figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia das doenças cardiovasculares	1
1.2. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca (IC)	3
1.3. Metabolismo do Ferro	6
1.4. Doenças relacionadas com a sobrecarga de ferro	8
1.5. Evidências sobre o ferro como fator de risco cardiovascular	11
1.6. Componentes do metabolismo do ferro em células do sistema cardiovascular	12
2. Objetivos	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Estudo com pacientes - População de estudo	15
3.2. Análise das mutações Hfe	15
3.3. Estudo com animais	16
3.4. Tratamento com ferro dextrano	16
3.5. Morfologia cardíaca e avaliação funcional	16
3.6. Eutanásia e análises <i>postmortem</i>	17
3.7. Análise da expressão gênica	17
3.8. Imuno-histoquímica	18
3.9. Isolamento de cardiomiócitos neonatos	18
3.10. Imunofluorescência	19
3.11. Estimativa da congestão pulmonar	19
3.12. Conteúdo de ferro tissular por espectrometria de absorção atômica	20
3.13. Análises histológicas	20
3.14. Obtenção de células cardíacas primárias de ratos neonatos	21
3.15. Quantificação de Hidroxi-etídio e Etídio	23
3.16. Estimativa da razão glutatona reduzida/glutatona oxidada	24

3.17. Preparo das células para ensaio <i>High Content Screening</i> (HCS)	24
3.18. Quantificação de Nitrito	25
3.19. Avaliação global do influxo intracelular de cálcio	25
3.20. Análises do metabolismo celular	26
3.21. Análise estatística	27
4. Resultados	28
4.1. Mutações no gene Hfe estão associadas com aumento da mortalidade em pacientes com cardiomiopatia	28
4.2. O gene Hfe é normalmente expresso no coração de camundongos	29
4.3. Acúmulo de ferro ao longo da idade	31
4.4. Consequências da sobrecarga de ferro farmacológica	33
4.5. Análises estruturais cardíacas causadas pela sobrecarga de ferro	37
4.6. Caracterização de modelos de estudo in vitro para a sobrecarga de ferro	40
5. Discussão	52
7. Perspectivas	65
8. Referências Bibliográficas	66
ANEXO – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	79
APÊNDICE A – Manuscrito submetido à publicação na revista <i>Free Radical Biology & Medicine</i>	80
APÊNDICE B – Manuscrito não submetido à publicação	102

Lista de siglas

ALAS	Delta aminolevulínico sintetase
ANOVA	Análise de variância
AP	Angina pectoris
AVC	Acidente vascular cerebral
bp	<i>Base pairs</i> (pares de bases)
Bpm	Batidas por minuto
BSA	Albumina sérica bovina
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
CypA	Ciclofilina A
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCV	Doenças cardiovasculares
DcytB	Citocromo b duodenal
DHE	Dihidroetídio
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMT1	Transportador de metal divalente-1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dwt	<i>Dry weight</i> (peso seco)
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
EOH	Hidroxi-etídio
EUA	Estados Unidos da América

Fe	Ferro
FE%	Fração de ejeção
FEVE%	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FPN	Ferroportina
FTH1	Ferritina de cadeia pesada
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HAMP	Hepcidina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBSS	Solução de Hanks
HCl	Ácido clorídrico
HCP-1	<i>Heme carrier protein-1</i>
HCS	<i>High Content Screening</i>
HH	Hemocromatose Hereditária
HEPES	Ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico
HIF-2 α	<i>Hypoxia inducible factor-2-alpha</i>
HJV	Hemojuvelina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRS	<i>Horse Serum</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICD	Insuficiência cardíaca descompensada
IL-6R	Receptor de interleucina-6
InCor	Instituto do Coração

ip	Intraperitoneal
IRES	<i>Iron-responsive elements</i>
IRP	Proteína reguladora de ferro
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
LTCC	Canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NBCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
Per	<i>Percoll</i>
PFA	Paraformaldeído
PP	<i>Pre plating</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RBCs	<i>Red blood cells</i> (eritrócitos)
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
SUS	Sistema Único de Saúde

Tf	Transferrina
TFR1	Receptor de transferrina 1
TFR2	Receptor de transferrina 2
TIBC	<i>Total Iron Binding Capacity</i> (capacidade total de ligação do ferro)
TTCC	Canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo T
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
WT	<i>Wild type</i> (selvagens)
Wwt	<i>Wet weight</i> (peso úmido)

Lista de símbolos

cm	Centímetro
g	Gramas
kg	Kilograma
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m Ω	Miliohm
ms	Milisegundo
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
nm	Nanometro
pmol	Picomol
U	Unidade
ua	Unidade arbitrária
UV	Ultra-violeta
μ g	Micrograma
μ mol	Micromol
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
$^{\circ}$ C	Graus Celsius

Índice de tabelas

Tabela 1. Modelo de riscos proporcionais de Cox para mortalidade em 318 pacientes com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias, acompanhados em um hospital terciário. InCor, São Paulo, Brasil. _____ 29

Tabela 2. Efeitos da sobrecarga de ferro em camundongos WT e WT+ferro de acordo com parâmetros biométricos, hematológicos e parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo do ferro. _____ 37

Índice de figuras

Figura 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de 318 pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias, seguidos durante 10 anos, de acordo com a presença de mutações no gene Hfe (C282Y e/ou H63D)	28
Figura 2. O gene Hfe é normalmente expresso em diferentes tecidos	30
Figura 3. Caracterização do perfil do acúmulo de ferro ao longo da idade em animais selvagens por meio de espectrometria de absorção atômica	32
Figura 4. Quantificação dos níveis teciduais de ferro em diferentes órgãos por espectrometria de absorção atômica, tratamento por quatro semanas	34
Figura 5. Resultados observados após o tratamento com sobrecarga de ferro	35
Figura 6. Análise de parâmetros fisiológicos do pulmão e do fígado, com quantificação do acúmulo de ferro heme no órgão hepático	36
Figura 7. Parâmetros estruturais e genéticos após o tratamento com sobrecarga de ferro	39
Figura 8. Comparações entre dois métodos de extração primárias de cardiomiócitos por meio de parâmetros metabólicos, estresse oxidativo e de enzima antioxidante	42
Figura 9. Imunofluorescência do método de Per (coluna da esquerda) e do método de PP (coluna da direita), colorações com anticorpo antinitrorosina (amarelo), DAPI (azul) e antitroponina I (verde), quantificação das nitrações e produção cumulativa de nitrito	44
Figura 10. Caracterização das culturas primárias de cardiomiócitos	46
Figura 11. Quantificação da troponina I no cardiomiócito para os dois métodos de extração	47
Figura 12. Caracterização do influxo intracelular de cálcio para os diferentes métodos de extração	49
Figura 13. Quantificação de apoptose após sobrecarga de citrato de amônia férrico por 24 horas em células cardíacas extraídas por meio de protocolo pre plating (PP)	51

Resumo

Socas, LJ. Ferro intracelular: fator modificável de susceptibilidade cardiovascular? [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Mutações no gene Hfe causam a forma mais comum da hemocromatose hereditária, doença caracterizada por acúmulo progressivo de ferro nos tecidos parenquimatosos. Um estudo prévio conduzido em nosso laboratório (Am J Cardiol 88(4):388-91, 2001) encontrou associação entre mutação do gene Hfe e cardiomiopatia isquêmica, sugerindo que o acúmulo de ferro no tecido cardíaco pode ser um fator que potencializa as agressões ao sistema cardiovascular. O objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese de que o ferro aumenta a susceptibilidade ao risco cardiovascular. A análise de dados de 318 pacientes seguidos durante 10 anos indicou que variantes genéticas do Hfe estão associadas com maior mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias. Em seguida, verificou-se o acúmulo de ferro no coração, aorta e fígado ao longo de 1, 3, 6 e 12 meses em camundongos FVB. Para mimetizar os efeitos deletérios do ferro no ser humano, validamos proteínas envolvidas no metabolismo do ferro em camundongos e tratamos os animais com 10 mg diárias de ferro dextrano durante 4 semanas. Os resultados sem a sobrecarga de ferro já apontaram acúmulo de ferro significativo no coração e no fígado ao longo de 12 meses de vida, consistente com a ideia de aumento progressivo de risco cardiovascular associado ao envelhecimento. A sobrecarga de ferro foi associada com maior mortalidade e deterioração da função cardíaca. Os camundongos tratados com ferro apresentaram diminuição da fração de ejeção, redução da espessura do septo, maior remodelamento cardíaco e aumento do volume nuclear dos cardiomiócitos. Para entender as modulações gênicas causadas pelo ferro no coração, foi medida a expressão dos transcritos primários de mRNA relativo para os genes Hfe e para a hepcidina, encontrando-se ambos os genes significativamente menos expressos nos animais tratados com ferro em comparação ao grupo que só

recebeu salina. Por fim, com o intuito de estudar em condições mais controladas o comportamento cardíaco frente à sobrecarga de ferro, foram comparados dois protocolos de extração primária de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos para testes farmacológicos com ferro *in vitro*. O enriquecimento de cardiomiócitos *in vitro* se estabeleceu por dois métodos: separação por gradiente de *percoll* (*Per*) e por uma pré-seleção nomeada *pre plating* (*PP*). As células cardíacas foram mantidas por 8 dias em cultura e avaliações do metabolismo, produção de espécies reativas de oxigênio e contratilidade foram medidas. Ambos os métodos foram eficientes para a obtenção de células cardíacas, entretanto, as células extraídas por protocolo *PP* apresentaram metabolismo aumentado, com maior consumo de glicose e produção de lactato. Por diferentes parâmetros testados o protocolo *PP* apresentou maior estresse oxidativo, porém sem modular a quantidade de glutatonas reduzidas e oxidadas. Notadamente, o protocolo *PP* apresentou maior atividade contrátil com aumento dos batimentos e maior influxo intracelular de cálcio. Células cardíacas extraídas pelo método *PP* foram tratadas com citrato de amônia férrico com doses de 50 µg/mL e 100 µg/mL e, após 24 horas, foi possível observar aumento significativo de apoptose. Desta forma, os modelos celulares em questão apresentam-se como importantes ferramentas para a identificação de mecanismos moleculares e celulares associados aos efeitos deletérios causados pelo ferro. Em conjunto, os resultados do presente trabalho apoiam a hipótese de que o acúmulo de ferro no tecido cardíaco aumenta a susceptibilidade cardiovascular. Trabalhos futuros permitirão melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no acúmulo de ferro no coração ao longo do envelhecimento em pacientes com insuficiência cardíaca.

Descritores: Ferro; Insuficiência Cardíaca; Miócitos Cardíacos; Camundongos; Ratos; Técnicas de cultivo de células.

Abstract

Socas, LJ. *Intracellular iron: a modifiable risk factor for cardiovascular susceptibility?* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Mutations in Hfe gene lead to the most common form of hereditary hemochromatosis, an autosomal recessive disease associated with iron accumulation in parenchymal tissues. In a previous study conducted in our laboratory (Am J Cardiol 88(4):388-91, 2001), genetic variation in the Hfe gene was associated with ischemic cardiomyopathy, suggesting that higher cardiac concentrations of iron aggravates injuries on the cardiovascular system. The aim of the present study was to test the hypothesis that iron increases susceptibility to cardiovascular risk. Analysis of data from 318 patients with 10-year follow-up showed that genetic variation in the Hfe gene was associated with higher mortality among patients with heart failure due to cardiomyopathy of different etiologies. Next, we demonstrated iron accumulation in heart, aorta, and liver in mice (FVB background) aged 1, 3, 6, and 12 months. To mimic the deleterious effect of iron observed in humans, we validated proteins playing a major role in iron metabolism and treated mice with 10 mg of iron-dextran daily for 4 weeks. Results showed that even without iron overload there is significant iron accumulation in the heart and liver with time, at 12 months of age, consistent with the idea that there is a progressive age-related increase in cardiovascular risk. Iron overload was associated with higher mortality in mice and impairment of cardiac function; in response to iron treatment ejection fraction and septum thickness were reduced, while cardiac remodeling and myocyte nuclear volume were increased. To understand the underlying mechanisms associated with iron-mediated modulation of genes in the heart, we assessed Hfe and hepcidin mRNA expression and found that these genes were significantly less expressed in iron-treated animals compared with the saline solution group. Lastly, to study cardiac behavior in the face of iron overload under well-controlled conditions we compared two protocols for primary extraction of neonatal rat cardiomyocytes for in vitro pharmacological

tests: *Percoll* (*Per*) and *pre plating* (*PP*) extraction methods. Cardiac cells were used after 8 days and we measured metabolism, ROS production, and contractility. Both methods were effective in obtaining a high yield of cardiomyocytes. Nevertheless, cells extracted using *PP* protocol presented higher metabolic rate, as suggested by increased lactate production and glycolysis rate. In the *PP* protocol there was an increased oxidative stress, notwithstanding without modulating the amount of oxidized and reduced glutathione peroxidase. Notably, we found an increased contractile activity for pre-plating-prepared cells, with increased beating rate and higher calcium influx. Cardiac cells extracted by *PP* exposed to ferric ammonium citrate with doses of 50µg/mL and 100µg/mL, after 24 hours, displayed significant increased apoptosis. The cell models examined can be considered important tools for the identification of cell and molecular mechanisms associated with the harmful effects caused by iron. Taken together, the results of the present study support the hypothesis that cardiac tissue iron accumulation increases cardiovascular susceptibility. Further studies will help to unravel the mechanisms involved in cardiac iron accumulation throughout the aging process in patients with heart failure.

Descriptors: Iron; Heart Failure; Myocytes, Cardiac; Mice; Rat; Cell Culture Techniques.

1. Introdução

1.1. Epidemiologia das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em todo o mundo; em 2008, 17,5 milhões de pessoas morreram por esta razão, representando 30,5% dos óbitos na população mundial. Tem sido observada tendência de declínio nas taxas de morte por DCV nas últimas décadas, principalmente em mulheres com menos de 60 anos, relacionada com o combate dos principais fatores de risco, tais como: tabagismo, dieta rica em sódio, sedentarismo e consumo de álcool¹. Por outro lado, com o aumento da expectativa de vida da população mundial há um incremento na incidência das DCV conforme a idade².

Nos Estados Unidos (EUA), as DCV atingem 83,3 milhões de pessoas, entre elas 77,9 milhões com HAS, 7,8 milhões com angina pectoris (AP), 7,6 milhões com infarto agudo do miocárdio (IAM), 6,8 milhões com acidente vascular cerebral (AVC) e 5,1 milhões com insuficiência cardíaca (IC). Estima-se que, em média, mais de 2150 pessoas morrem por dia por causa das DCV nos EUA, o que corresponde a aproximadamente 1 óbito a cada 40 minutos².

O Brasil acompanha os EUA no que se refere à taxa de mortalidade por DCV, de 286 indivíduos para cada 100.000 habitantes, superando outros países da América Latina, como Argentina (207/100.000) e Chile (160/100.000). As DCV oneram o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, representando 13% das admissões hospitalares. Para indivíduos maiores de 60 anos, as admissões hospitalares por DCV atingem 27%³.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui a IC como uma das prioridades entre as enfermidades crônicas que necessitam de atenção dos setores da saúde em todo o mundo⁴. Estima-se que mais de 20 milhões de pessoas em todo mundo são acometidas por IC⁵.

Entre as ICs destaca-se a cardiomiopatia dilatada, que está relacionada com a causa de morte em indivíduos com hemocromatose hereditária (HH), doença autossômica recessiva caracterizada por progressivo acúmulo de ferro nos tecidos parenquimatosos. As mutações do gene Hfe mais prevalentes em pacientes com HH estão presentes nos sítios C282Y e H63D. A doença na mutação C282Y em homozigose manifesta-se entre 52-100% dos casos clinicamente diagnosticados. Na população geral, a frequência é de 0,4%. Em indivíduos caucasianos, mesmo em heterozigose a doença foi observada em 9,2%. Para portadores da mutação H63D a frequência é de 22% na população europeia. Estima-se que cerca de 40-70% das pessoas com genótipo C282Y/C282Y irão desenvolver evidência clínica de sobrecarga de ferro⁶.

Outros estudos populacionais com pacientes dos EUA, Austrália e Europa demonstraram que a frequência em homozigose e heterozigose para a mutação C282Y varia entre 0,2% e 0,7%, e entre 7% e 14%, respectivamente. A mutação H63D do gene Hfe possui prevalência em heterozigotos e homozigotos entre 15% e 40% e entre 2,5% e 3,6%, respectivamente. A frequência do genótipo C282Y/H63D é de aproximadamente 2%^{7,8}.

No Brasil, a incidência destas mutações é entre 3 a 8 vezes menor do que nos indivíduos europeus, entretanto o perfil das mutações é semelhante, o que pode ser atribuído à heterogeneidade da população brasileira. Um estudo brasileiro relatou que entre os pacientes com sobrecarga de ferro foi observada

frequência alélica de 76%, em que 30% eram homozigotos para a mutação C282Y⁹.

1.2. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca (IC)

A IC é uma síndrome em que o coração torna-se incapaz de ofertar oxigênio aos tecidos em taxa adequada às suas demandas, ou o faz à custa da elevação da sua pré-carga. A IC pode ocorrer por redução da capacidade cardíaca de perfundir os diferentes órgãos, ou por modificação das necessidades metabólicas dos tecidos. Portanto, existem condições tanto cardíacas como extracardíacas capazes de causar IC. São causas extracardíacas: beribéri, anemia, hipertireoidismo e sepse¹⁰.

Segundo Vilas-Boas et al.¹¹, a IC também pode ser dividida em forma aguda, crônica descompensada e refratária, mais detalhadamente:

- Insuficiência cardíaca aguda (sem diagnóstico prévio): Situação clínica na qual uma determinada agressão leva ao desencadeamento da síndrome clínica de IC em pacientes sem sinais e sintomas prévios. Entre as situações clínicas que exemplificam esse quadro estão IAM com ou sem complicações mecânicas e miocardite aguda, correspondendo à minoria dos casos de internações por IC;

- Insuficiência cardíaca crônica descompensada (exacerbação aguda de quadro crônico): Situação clínica na qual ocorre piora aguda ou gradual de sinais e sintomas de IC em repouso, em pacientes com diagnóstico prévio, requerendo intervenção terapêutica adicional imediata. Frequentemente, os pacientes apresentam sinais ou sintomas de congestão, limitando a realização

de atividade física. Essa apresentação clínica representa a mais importante causa de hospitalização por insuficiência cardíaca descompensada (ICD);

- Insuficiência cardíaca crônica refratária (baixo débito, associada ou não a graus diversos de congestão): Situação clínica na qual o paciente com diagnóstico prévio conhecido de IC apresenta com quadro de baixo débito e/ou congestão sistêmica e/ou limitação funcional persistentes, refratários ao tratamento clínico. O padrão hemodinâmico típico desses pacientes demonstra pressões de enchimento normais ou minimamente elevadas, pressão de pulso estreita e alterações perfusionais, com perda de função renal e fadiga extrema.

Segundo Barreto & Ramires¹², quando ocorre queda da função cardíaca, mecanismos adaptativos são estimulados visando corrigir a disfunção ventricular. Nos pequenos danos miocárdicos, estes mecanismos conseguem melhorar a função e, muitas vezes, normalizá-la. Nos comprometimentos maiores, estes mecanismos tornam-se insuficientes e, muitas vezes, a sua contínua estimulação pode desencadear um ciclo vicioso que leva à futura deterioração da função cardíaca.

O mecanismo de Frank-Starling, que melhor elucida a fisiologia do organismo frente à adversidade do processo isquêmico cardíaco, é usualmente um dos primeiros a ser desencadeado e resulta em melhora da função cardíaca. Quanto maior o estiramento das fibras miocárdicas no final da diástole (reflexo da pré-carga), maior a contratilidade miocárdica, ocorrendo elevação progressiva do desempenho cardíaco até que se atinja um platô de adaptação a partir do qual não ocorra mais intensificação da resposta miocárdica. Nas lesões maiores, este mecanismo não é suficiente e a contínua dilatação cardíaca torna-se um mecanismo desadaptativo¹².

De acordo com Bregagnollo et al.¹³, a IC é uma síndrome decorrente de várias causas incluindo doença isquêmica coronariana, processos inflamatórios, doenças valvares e hipertensão arterial, sendo que em resposta às agressões desencadeia-se um processo de remodelamento ventricular. A falta de suprimento sanguíneo para o coração implica especialmente em déficit de nutrientes e de oxigênio para as células¹⁴⁻¹⁶. Nesse cenário, inicia-se uma resposta inflamatória que tem por objetivo eliminar as células residentes mortas e preparar o local para a recomposição tecidual.

Inicialmente, os cardiomiócitos necróticos, por meio da ativação do sistema do complemento, desencadeiam resposta inflamatória evidenciada pela chegada de leucócitos na região isquêmica. Há primeiramente ação de neutrófilos, com posterior predomínio de monócitos, sendo estes os principais leucócitos presentes na região isquêmica nas primeiras 48 horas¹⁷.

A função dos leucócitos na resposta inflamatória é liberar fatores como citocinas e fatores de recrutamento de células e de crescimento, responsáveis pela reparação da região infartada, por meio da indução de apoptose em células residentes lesadas, fagocitose de células mortas e reabsorção da matriz extracelular, angiogênese, migração e diferenciação de miofibroblastos secretores de colágeno para a recomposição do tecido.

A invasão de fibroblastos na região atingida pela isquemia dará início à formação de um tecido fibroso rico em colágeno. Esse tecido, diferentemente do músculo cardíaco, não tem capacidade contrátil e por isso contribui de maneira negativa para a função cardíaca, visto que uma das características do infarto do miocárdio é o remodelamento ventricular para suprir o déficit funcional consequente da perda de massa muscular. A disfunção ventricular

resulta em insuficiência cardíaca, que causa comprometimento funcional de outros sistemas orgânicos do paciente.

O remodelamento é definido como as alterações no tamanho, geometria, forma, composição e função do coração após a agressão¹³. Insultos ao músculo cardíaco podem ser causados pela sobrecarga de ferro. Nos estágios iniciais, a sobrecarga de ferro pode causar disfunções diastólicas e arritmias, progredindo em estágios tardios para cardiomiopatia dilatada e IC.

1.3. Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento químico indispensável aos mamíferos e é encontrado em praticamente todos os seres vivos. Na sua forma iônica é importante na composição de proteínas e no transporte de oxigênio por meio da hemoglobina e mioglobina. Também participa da síntese de DNA como fator transcricional da ribonucleotídeo redutase, da produção de energia oxidativa (citocromo, catalase e peroxidase) nas mitocôndrias, assim como da inativação de radicais livres¹⁸.

A concentração média de ferro no organismo adulto é de aproximadamente de 4 a 5 g, estando 67% deste montante na forma de hemoglobina. A deficiência de ferro pode levar à anemia e o excesso à toxicidade, a qual pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da reação de Fenton¹⁹, que está ligada a diversas patologias, tais como: inflamação crônica, neurodegeneração e IC¹⁸.

A necessidade diária de ferro é cerca de 20-30 mg. A eritropoiese é essencialmente regulada pela reciclagem do metal pela reabsorção do ferro

nas hemácias senescentes, as quais são degradadas via reticuloendotelial macrofágica, em que o ferro é disponibilizado na circulação e reabsorvido através da transferrina pelos tecidos. A absorção de ferro é compensada pela descamação e por possíveis sangramentos, passível de manter a taxa fisiológica de reposição de 1-2 mg/dia²⁰.

A interrupção da homeostase do ferro no organismo humano pode alterar a concentração de ferro, excedendo a dose diária. Isto é acompanhado por um aumento gradual na saturação de transferrina em valores que atingem 100%. O acúmulo de ferro não ligado à transferrina é depositado nos tecidos e pode causar cardiomiopatias, diabetes mellitus, hipogonadismo, pigmentação da pele, artrite, cirrose hepática, fibrose hepática e câncer hepático²¹⁻²³.

Nos enterócitos, o ferro da dieta pode ser incorporado por Fe^{3+} (inorgânico), hemoglobina e mioglobina. Complexado com proteínas, o ferro é reduzido a Fe^{2+} pela proteína redutora citocromo b duodenal (DcytB) e transportado para os enterócitos duodenais por meio do transportador de metal divalente-1 (DMT1). O ferro heme é incorporado nos enterócitos após digestão da mioglobina e da hemoglobina, por meio de uma proteína transportadora de heme, chamada HCP1 (*heme carrier protein-1*). Dentro do enterócito, o heme é degradado pela heme oxigenase e o Fe^{2+} é liberado^{24,25}.

O controle sistêmico da absorção e excreção do ferro é modulado pelo hormônio peptídico circulante hepcidina (HAMP), cuja primeira descrição foi feita por Krause et al.²⁶, que concluíram que a hepcidina tem ação direta na proteína transmembranica ferroportina (FPN), e que a interação ocorre principalmente nos enterócitos, causando internalização e degradação de FPN.

O gene codificador da hepcidina consiste em três éxons e dois íntrons, onde o terceiro éxon codifica o peptídeo ativo²⁷. A forma bioativa da hepcidina possui 25 aminoácidos²⁸, com oito resíduos de cisteína, que formam entre si quatro pontes dissulfeto²⁹. A expressão da hepcidina é influenciada por estímulos sistêmicos tais como: reserva de ferro, nível de eritropoiese, inflamação, hipóxia e estresse oxidativo. Estes estímulos controlam os níveis de síntese de hepcidina atuando em proteínas existentes na superfície celular dos hepatócitos tais como: HFE, receptor 2 da transferrina (TFR2), hemojuvelina, matriptase-2 e receptor de interleucina-6 (IL-6R)³⁰. Estudos em camundongos transgênicos demonstram que a ausência da hepcidina leva à sobrecarga de ferro³¹.

1.4. Doenças relacionadas com a sobrecarga de ferro

Inúmeras doenças estão relacionadas com a sobrecarga de ferro, entre elas a Hemocromatose Hereditária (HH), caracterizada por elevada saturação de transferrina, elevados níveis de ferritina sérica, hematócrito normal e sobrecarga tecidual progressiva de ferro assimilado pela dieta. A HH se divide em cinco tipos. O mais estudado é o tipo I, descrito por mutação autossômica recessiva do gene Hfe, sendo sintomático nas mutações: C282Y em homozigose, H63D em homozigose e C282Y/H63D em heterozigose. Os sintomas aparecem em geral depois dos 40 anos de idade. Há maior incidência em indivíduos caucasianos masculinos, com incidência em uma a cada 200 pessoas^{32,33}.

O acúmulo de ferro no organismo atinge as células parenquimatosas, manifestando-se por cirrose, diabetes, cardiomiopatias, doenças arteriais e hipogonadismo³⁴⁻³⁷.

As mutações descritas para a HH resultam em uma baixa expressão de hepcidina. Isto sugere que a proteína Hfe também poderia interagir com o TFR2, baseado na ideia de que o complexo Hfe-TFR2 estaria envolvido no estímulo de produção de hepcidina. Gao et al.³⁸ ainda suscitaram a hipótese de que a interação da holotransferrina (transferrina ligada ao ferro) com o receptor 1 da transferrina (TFR1) seria capaz de libertar a Hfe, que ficaria então disponível para interagir com o TFR2, facilitando a transcrição de hepcidina³⁹.

A proteína Hfe está envolvida no mecanismo de modulação do ferro, formando um complexo que diminui a afinidade do TFR1 à holotransferrina. Quando os níveis plasmáticos de ferro saturam, o Hfe é capaz de translocar-se para o TFR2, desta maneira TFR2 consegue ativar a via de sinalização de ERK por fosforilação, aumentando a transcrição de hepcidina^{20,40}.

O papel exato do gene Hfe no metabolismo não é bem compreendido. Trata-se de uma molécula pertencente à classe I do complexo de histocompatibilidade principal, sem propriedades de transporte de ferro que, quando mutada, se encontra associada ao desenvolvimento de HH³². De fato, estudos demonstram que camundongos nocaute para Hfe apresentam fenótipo muito semelhante aos casos clínicos de HH⁴¹.

A relação entre mutações no gene Hfe e DCV ainda não foi completamente esclarecida. As mutações C282Y em homozigose e C282Y/H63D em heterozigose são os genótipos que parecem apresentar aumento moderado no risco de doença cardiovascular isquêmica⁴².

Além das mutações C282Y e H63D, mutações nos TFR2 também podem ser causadoras de hemocromatoses graves (tipo III). Outro caso de hemocromatose grave (tipo II) é a mutação no gene da hemojuvelina (HJV), que também pode estar associada com mutações em TFR2.

O tipo IV de HH é descrito por mutação autossômica dominante no gene SLC40A1, sendo sintomática a partir dos 10 anos de idade, com incidência semelhante entre homens e mulheres. A quinta forma de hemocromatose corresponde às mutações em FPN, que interferem na regulação da hepcidina, elevando-a no plasma, possibilitando a entrada de ferro no plasma. A sobrecarga de ferro é atenuada pela ação das células reticulo endoteliais macrofágicas, sem elevação da saturação de transferrina ou lesão hepática³⁹.

Além das patologias já mencionadas, podem ser citadas as talassemias alfa e beta, que atingem 15 milhões de pessoas em todo o mundo. Em sua forma crônica, a sobrecarga de ferro está relacionada com um quadro grave destas doenças. Contudo, quelantes de ferro podem mitigar os efeitos causados pela sobrecarga de ferro⁴³.

Em estudo clínico envolvendo 97 pacientes com neoplasias sólidas e hematológicas com histórico de tratamento com antraciclinas, testou-se a deposição de ferro cardíaca, eventos cardíacos e mutações no gene Hfe (C282Y e H63D). O acúmulo de ferro foi significativamente maior no coração quando as doses cumulativas de antraciclina foram superiores a 200 mg/m². Mutações haplótipas no gene Hfe do tipo 282C/63D e 282Y/63H, foram associadas com maior deposição de ferro no coração. Pacientes mutados no gene Hfe e tratados com antraciclinas apresentaram maior mortalidade⁴⁴.

1.5. Evidências sobre o ferro como fator de risco cardiovascular

Na década de 1980, Sullivan propôs pela primeira vez a hipótese de que a deficiência de ferro poderia proteger contra doença arterial coronariana. Esta hipótese foi inicialmente formulada para explicar o menor risco cardiovascular entre mulheres no período pré-menopausa, relacionado à perda de ferro na menstruação⁴⁵.

Estudos epidemiológicos conduzidos na década de 1990 apresentaram resultados conflitantes. Em uma coorte com amostra de 1931 finlandeses, foi encontrada associação positiva estatisticamente significativa entre a concentração sérica de ferritina e o risco de doença cardiovascular isquêmica⁴⁶. Em contraste, em um estudo com 4518 participantes do *National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study*, não foi encontrada associação entre maiores níveis de saturação de transferrina e aumento do risco de doença arterial coronariana ou de IAM⁴⁷.

Evidências genéticas provenientes de estudos conduzidos nos anos seguintes contribuíram para a compreensão da possível relação entre o *status* de ferro e o risco cardiovascular, sobretudo por meio do estudo da hemocromatose. Em pesquisa realizada pelo Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor-FMUSP), Pereira et al.⁴⁸ estudaram a distribuição de mutações relacionadas à hemocromatose em 319 pacientes com insuficiência cardíaca devido a cardiomiopatia de diferentes etiologias, acompanhados entre 1995 e 1997. Neste estudo, a heterozigose para a mutação C282Y do gene Hfe foi associada a um aumento de 6,64 no risco de apresentar cardiomiopatia isquêmica. Embora não seja possível

estabelecer uma relação de causalidade, este achado corrobora a hipótese de que uma maior concentração de ferro no tecido isquêmico destes pacientes possa aumentar a ocorrência de dano cardíaco por meio de estresse oxidativo, aspecto a ser elucidado em trabalhos futuros.

1.6. Componentes do metabolismo do ferro em células do sistema cardiovascular

Na última década, as evidências sobre o envolvimento do ferro na fisiopatologia de doenças cardiovasculares motivaram a investigação da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do mineral no tecido cardíaco. Merle et al.⁴⁹ descreveram a expressão de hepcidina em cardiomiócitos de ratos e sua regulação positiva em resposta à hipóxia, presumindo que esta constitui uma resposta protetora contra o aumento da formação de radicais livres por meio do aumento do conteúdo intracelular de ferritina, controlando, por conseguinte, a concentração de ferro livre no citosol.

Os autores sugerem, ainda, que a função da hepcidina no coração possa estar relacionada ao transportador de metal divalente-1 (DMT1), proteína de membrana que aumenta a captação de Fe^{2+} . Assim como a hepcidina regula a expressão de DMT1 no intestino, poderia também regular a captação de ferro nos cardiomiócitos via DMT1⁴⁹.

Estudos recentes evidenciaram a expressão de ferroportina em cardiomiócitos, cuja função ainda não foi totalmente esclarecida⁵⁰. Lakhali-Littleton et al.⁵¹ demonstraram que camundongos nocaute para FPN apresentaram deposição de ferro nos cardiomiócitos, bem como um fenótipo

consistente com cardiomiopatia dilatada e mortalidade significativamente maior do que animais do grupo controle.

A expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro no coração pode ser modulada pelo *status* do metal. Li et al.⁵² encontraram diminuição da expressão do RNAm de hepcidina e de ferritina no coração de ratos com deficiência de ferro induzida pela dieta. A deficiência de ferro não influenciou a expressão do gene Hfe no coração.

Os achados da literatura indicam a relevância de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro em células do sistema cardiovascular. Mais estudos são necessários para elucidar os aspectos envolvidos na homeostase celular deste mineral e suas possíveis implicações no manejo de disfunções cardíacas relacionadas à ausência de proporções adequadas de ferro.

2. Objetivos

2.1. Geral

Testar a hipótese de que o ferro intracelular é um fator modificável de susceptibilidade cardiovascular.

2.2. Específicos

- a) Determinar a associação entre variantes genéticas do gene Hfe e desfechos clínicos desfavoráveis em pacientes com insuficiência cardíaca;
- b) Determinar se os níveis de ferro tissular aumentam com o envelhecimento em roedores;
- c) Determinar se as células cardíacas expressam componentes associados ao controle da homeostase de ferro;
- d) Determinar se a sobrecarga de ferro resulta em acúmulo de ferro cardíaco semelhante àquele observado no fígado e no baço;
- e) Determinar se modelos celulares *in vitro* (cardiomiócitos) de sobrecarga de ferro recapitulam fenótipos e alterações moleculares observados no modelo *in vivo*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Estudo com pacientes - População de estudo

Trezentos e dezoito pacientes brasileiros (n=318) com insuficiência cardíaca devido a cardiomiopatia de diferentes etiologias foram estudados. Foi investigado o risco de mortalidade de acordo com a presença de pelo menos um alelo Hfe mutado (C282Y e/ou H63D), utilizando modelo de regressão de Cox. Os pacientes foram seguidos de maneira prospectiva de março de 1995 até março de 2005.

3.2. Análise das mutações Hfe

Amostras de sangue de 5 mL foram colocadas em tubos contendo ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA). Os *primers* utilizados para amplificar os fragmentos contendo os sítios de mutação C282Y e H63D incluíram sítios de restrição enzimática⁵³. Após a amplificação, o produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) gerado utilizando os *primers* para a mutação C282Y foi digerido com RsaI. O produto PCR 390-bp digerido com RsaI mostra dois fragmentos de 249 e 141 bp no DNA normal, enquanto o DNA mutante gera dois novos fragmentos (112 e 29 bp). O produto PCR gerado utilizando *primers* para a mutação H63D foi digerido com MboI. A mutação H63D destrói um sítio MboI no produto PCR 294 bp, enquanto o DNA normal gera três fragmentos de 138, 99 e 57 bp. Os produtos da digestão foram visualizados por eletroforese em um gel de agarose 3% com brometo de etídio.

3.3. Estudo com animais

Os estudos foram realizados de acordo com protocolos aprovados, seguiram diretrizes institucionais para o uso e manejo de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1). Todos os camundongos utilizados foram machos e tinham entre oito e 10 semanas de idade. Os ratos neonatais foram utilizados com um a dois dias de vida.

3.4. Tratamento com ferro dextrano

Ferro dextrano (Ferrodex®, cedido pela Tortuga, SP, BR) foi diluído em solução salina e administrado por via intraperitoneal (ip) em uma dose de 10 mg por injeção, ou administrou-se solução salina (0,5 mL NaCl 0,9%), em dias intercalados, durante quatro semanas em linhagem de animal FVB^{54,55}.

3.5. Morfologia cardíaca e avaliação funcional

A morfologia e a função cardíaca foram monitoradas pelo sistema de imagem SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA) no *baseline* e ao final do período de tratamento. As imagens foram gravadas sob anestesia com ketamina (70 mg/kg) e xilazina (4 mg/kg). Os parâmetros estruturais cardíacos foram determinados utilizando-se imagens M-mode e bi-dimensionais (B-mode). A câmara e a parede do ventrículo esquerdo foram calculadas por meio de medidas lineares e a fração de ejeção (FE%) foi calculada pelo método de Teicholz segundo Shumin Gao et. al⁵⁶.

3.6. Eutanásia e análises *postmortem*

Ao final do período experimental, os camundongos foram eutanasiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg ip). O ventrículo direito e o pulmão foram removidos, pesados, e os resultados foram expressos relativos ao comprimento da tíbia. O coração, o fígado, o duodeno e a aorta foram rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido. Foi coletado sangue para contagem de células sanguíneas em um analisador hematológico (Sysmex XT2000I). Valores de ferro sérico e da capacidade total de ligação do ferro (*total iron binding capacity* - TIBC) foram determinados por fotolorimetria (Modular 1 Roche). A porcentagem de saturação da transferrina foi calculada como ferro sérico/(TIBC) x 100.

3.7. Análise da expressão gênica

RNA total foi extraído do coração utilizando kit (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), segundo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado com espectrofotômetro NanoDrop, e 3,0 µg de RNA total foram reversamente transcritos em cDNA utilizando SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR) foi realizada como descrito na literatura⁵⁷. Genes de interesse foram medidos por RT-PCR usando o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguido pelo protocolo da *melting curve* para verificar a especificidade da geração de amplicon. Ciclofilina A (*CypA*) foi utilizada como gene constitutivo, ou seja, um gene que não varia em seu nível de expressão, para controle interno. O método comparativo delta delta ($\Delta\Delta Ct$) foi utilizado para análise de dados⁵⁸ - Hfe (por acesso GenBank) *primer forward*

5'-CATCAGTGGAGTCACCGTCT-3' e *reverse* 5'-CTCTCTTCCGTGGTTCAGC-3'; Ciclofilina A *primer forward* 5'-AATGCTGGACCAAACACAAA-3' e *reverse* 5'-CCTTCTTTCACCTTCCCAA-3'.

3.8. Imuno-histoquímica

A análise da proteína Hfe foi feita para o coração e fígado por imuno-histoquímica. Secções imersas em parafina foram primeiramente tratadas com exposição antigênica e bloqueadas com solução de caseína 1% em solução salina tamponada com fosfato. As secções de tecido foram em seguida incubadas com anticorpo anti-Hfe (1:100; sc-18806, Santa Cruz Biotec) por 18 horas a 4°C. As secções foram incubadas com um anticorpo secundário (Kit LSAB-DAKO) por 30 minutos e depois com substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) contracorado com hematoxilina de Mayer.

3.9. Isolamento de cardiomiócitos neonatos

Culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos neonatos foram estabelecidas conforme descrito previamente⁵⁹. Resumidamente, os corações excisados de camundongos FVB de 1-3 dias de idade foram cortados em pedaços de 1,0 mm³ e digeridos com colagenase 2 (Worthington, USA) por 15 minutos, em seis diferentes etapas. Fibroblastos foram removidos por pré-incubação por duas horas a 37 °C. As células não aderentes foram coletadas e semeadas em placas de seis poços contendo Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com FBS a 10%, 5-bromo-2-deoxiuridina

(BrdU) 10 μ M (Roche, USA) e antibióticos por 24 horas. Após este período, as células foram mantidas em DMEM +10% FBS sem BrdU.

3.10. Imunofluorescência

Os cardiomiócitos foram fixados em paraformaldeído (PFA) a 4% por 10 minutos a 4°C, lavados com *phosphate buffer solution* (PBS) e permeabilizados com Nonidet 0,1% por 30 minutos em temperatura ambiente. Após bloqueio com caseína 2% diluída em PBS por uma hora em temperatura ambiente, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos: anti-tropomiosina sarcomérica (1:200, T-9283, Sigma-Aldrich) e anti-Hfe (1:100, sc-18806, Santa Cruz Biotec.). Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa 488 e 555 (1:300, Molecular probes, Inc, Eugene, OR). As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

3.11. Estimativa da congestão pulmonar

Como indicador de congestão pulmonar, foi calculado o conteúdo de água nos pulmões. Para esta finalidade, os pulmões foram isolados, excisados e imediatamente pesados, obtendo-se o peso úmido (Wwt) da peça. As amostras foram levadas ao dessecador (70°C) durante 48 horas, até obter peso constante, possibilitando a medida do peso seco (Dwt). O conteúdo de água foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: % H₂O = [(Wwt – Dwt) / Wwt] x 100.

3.12. Conteúdo de ferro tissular por espectrometria de absorção atômica

Fígado, coração, baço e aorta foram colocados em um tubo limpo e foi realizada secagem até obter peso constante no dessecador a 70°C (aproximadamente 72 horas). As amostras secas foram pesadas (massas variaram entre 0,8 a 44 mg) e colocadas em tubos de polipropileno Falcon® (15 mL), contendo 300 µL de HNO₃ e 100 µL de H₂O₂. Os tubos foram fechados e imersos em banho-maria (modelo Q222TM, Quimis Scientific Appliances, Sao Paulo, Brazil) a ~90°C durante 60 minutos. Os materiais de referência certificados pelo *National Institute of Standard and Technology* (NIST, Gaithersburg, USA) fígado bovino (NIST 1577b) e músculo bovino (NIST 8414) foram digeridos utilizando-se os mesmos procedimentos e foram analisados para avaliar a confiabilidade do método. A solução em branco e a solução da amostra foram compostas de até 5 mL (aorta), 10 mL (coração) e 15 mL (fígado) com água deionizada (18 mΩ cm). A determinação do ferro foi realizada por meio de espectrometria de absorção atômica em forno de chama (modelo Vario 6, Analytik Jena AG, Germany) para as amostras de fígado e coração, ou por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (modelo ZEE nit 60, Analytik Jena AG, Germany) para amostras de aorta, e os resultados foram expressos em µg/g tecido seco.

3.13. Análises histológicas

O ventrículo esquerdo foi fixado em formalina 10%, embebido em parafina e cortado em secções de 5 µm que foram montadas em lâminas. Em seguida, amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, azul da Prússia e

picrosirius red. Como estimativa da hipertrofia de miócitos, o volume nuclear médio foi calculado de acordo com a seguinte equação: volume nuclear = $\pi \times D \times d^2 / 6$ (d = menor diâmetro; D = maior diâmetro nuclear)⁶⁰. As imagens dos cortes e as medidas foram realizados por meio do Leica QWin 3 (Leica QWin Plus V 3.5.1 – Leica Microsystems).

Metodologia utilizada na padronização e caracterização de modelos *in vitro* de culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos

3.14. Obtenção de células cardíacas primárias de ratos neonatos

Dois protocolos distintos foram utilizados para a extração de cardiomiócitos de ratos (*Wistar Rattus norvegicus*), sendo o primeiro denominado *pre plating* (PP) modificado a partir de Armesilla et al.⁶¹, e o outro *Percoll* (Per) modificado a partir de Morisco et al.⁶². Ambos utilizaram de 5-10 animais, 24 a 48 horas após nascimento, que foram sacrificados por deslocamento cervical. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e os corações foram retirados e transferidos para placa de petri contendo tampão ADS 1 X (NaCl 0,1 M, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8mM, D-Glucose 0,1%, NaH₂PO₄.H₂O 0,8 mM e HEPES 20 mM) em 500 mL de H₂O ultrapura. O tecido foi seccionado em cubos de 1 mm³ e transferido para tubo plástico contendo ou 3 mL de solução de colagenase 2 (126 U/mL Worthington Biochemical Corp.- USA 41J12869) e pancreatina (0,2 mg/mL - Sigma-Aldrich P3292); em 90 mL de ADS 1X para o método de extração por *pre plating* (PP) ou o tecido foi transferido para outro tubo contendo 3 mL de solução com 1 mg/mL de colagenase 2 (Worthington, USA) para o método de *Percoll* (Per). Cada digestão foi mantida sob agitação a 37°C

por quinze minutos. Após cada período de incubação o sobrenadante foi recuperado e acrescido o dobro do volume de Newborn Calf Serum-NBCS (Gibco 16010-159). Esta suspensão de células foi submetida à centrifugação 340G por 5 minutos a 4°C para cada etapa e armazenada em estufa a 37°C sob 5%CO₂. Após o término das seis digestões o material designado ao *pre plating (PP)* foi filtrado em membrana de 100 µm com 2 mL de meio fresco e incubado em placas T75 por 45 minutos a 37°C sob 5%CO₂ para a adesão dos fibroblastos. Depois da incubação o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 340G por 5 minutos, o *pellet* foi suspenso em 15 mL de meio completo contendo: DMEM-Low e M199 (4:1) com 10% de HRS (Horse Serum - Gibco 26050-088), 5% de NBCS e 1% de BrdU (Sigma B5002).

Para o protocolo de extração por *Percoll (Per)*, ao término das seis digestões, cuidadosamente se adicionou 1,5 mL de ADS 1X contendo as células em um novo tubo com o gradiente de *percoll* (GE 17-089101), assim preparou-se uma solução contendo 9 partes de *percoll* para 1 de ADS 10X. A partir dessa solução foram feitas duas novas soluções: *Top*, solução de baixa densidade para retirada dos fibroblastos e *Bottom*, solução para o isolamento dos cardiomiócitos. Na solução de *Bottom* foi adicionado 5 mg de Phenol red (Sigma P3532). Para a formação do gradiente, o tubo foi centrifugado por 30 minutos a 340G, sem desaceleração. As células que estavam na fase média do tubo, formando uma nuvem branca, foram aspiradas e centrifugadas novamente a 340G por 5 minutos, o *pellet* foi suspenso em 15 mL de meio para o *Per*. DMEM-High com 10% de Horse Serum-HRS (Gibco 26050-088), 5% de NBCS e 1% de BrdU (Sigma B5002). Todas as células foram contadas com azul de Tripán e plaqueadas sob matriz de laminina (Invitrogen 23017-015) na

concentração de 10^5 células por cm^2 . As culturas foram mantidas durante oito dias com trocas de meio a cada 48 horas.

3.15. Quantificação de Hidroxi-etídio e Etídio

Após 8 dias de cultura, cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias em placas de 6 poços foram lavados com solução de Hanks (HBSS) por duas vezes e incubados com $50 \mu\text{M}$ de dihidroetídio (DHE) (Sigma D7008) em HBSS a 37°C com $5\% \text{CO}_2$ por 30 minutos. As células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com HBSS gelado. As células foram extraídas com acetonitrila (Sigma 34851) e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi retirado e liofilizado em Speed Vac (Thermo Savant) e armazenado a -80°C . As análises descritas foram padronizadas por Fernandes et al.⁶³, em que amostras foram suspendidas em $80 \mu\text{L}$ de fase móvel A (acetonitrila) e injetadas no sistema HPLC (cromatografia líquida de alta performance - Espectrofotômetro Beckman DU-640) para a detecção de DHE e seus derivados. O DHE foi monitorado por absorção na região UV a 245nm , enquanto que os compostos fluorescentes EOH e etídio foram monitorados por detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 595 \text{ nm}$). Durante a separação cromatográfica, a quantificação de DHE remanescente foi utilizada como controle interno da extração. As concentrações dos subprodutos de degradação do DHE foram normalizadas pelo número de células para cada poço.

3.16. Estimativa da razão glutatona reduzida/glutatona oxidada

As células foram lisadas, suspensas em 5% de ácido sulfossalicílico e centrifugadas a 13.000G para separação de proteínas. Para quantificação de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi utilizado o *Glutathione Fluorescent Detection Kit* (K006 F-1, Arbor Assays, Ann Arbor, Michigan, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.17. Preparo das células para ensaio *High Content Screening* (HCS)

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em placa de bordas escuras de 96 poços e as imagens foram adquiridas por meio do aparelho *ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System* (Molecular Devices).

As células foram fixadas com 4% de PFA por 60 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS e para permeabilização foi utilizado Nonidet p40 (Sigma 213277) por 30 minutos, seguido de duas lavagens com PBS. O bloqueio foi feito com 5% de albumina sérica bovina (BSA) por 60 minutos à temperatura ambiente. Todos os anticorpos primários foram diluídos em 2% de BSA e incubados *overnight* a 4°C. A proporção dos anticorpos utilizados foi de 1:200 anti-Troponina I (Abcam ab47003), 1:200 anti-CD31 (Abcam ab24590), 1:100 anti-CD90 (BD 555593), 1:200 anti-nitrotirosina (Sigma N5538).

Após incubação com anticorpo primário as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário. Todas as células foram incubadas com 1:100 de DAPI (Life Technologies) por uma hora em temperatura ambiente e protegidas da luz, assim como dos anticorpos

secundários, incubados nas proporções de 1:300 por 3 horas em temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as imagens foram obtidas.

3.18. Quantificação de Nitrito

A produção de nitrito (NO_2^-) foi quantificada após 8 dias de cultura primária de cardiomiócitos. O meio foi recolhido após 48 horas da troca e injetado em uma câmara de refluxo contendo vanádio (III) em ácido clorídrico 3 mol/L (HCl 3N) aquecida até 85°C . Estas condições reduzem o NO_2^- estequiometricamente para óxido nítrico (NO). O NO libertado foi purgado com uma corrente de gás azoto dirigida por vácuo para a câmara de reação de um analisador de quimioluminescência (modelo 280, Sievers). O analisador foi calibrado no dia do experimento, com padrões NO_2^- , e os resultados foram normalizados para o número de células de cada experimento.

3.19. Avaliação global do influxo intracelular de cálcio

Parâmetros relacionados com a contratilidade global das células cardíacas de ratos neonatos para os dois protocolos foram avaliados por meio do equipamento *Fluostar Omega*. Este equipamento permite a avaliação rápida e automatizada para a quantificação da fluorescência emitida em células aderidas. As culturas de cardiomiócitos foram incubadas com o fluoróforo fluo-4 NW *Calcium Assay kit* (Life Technologies F36206) por 45 min a 37°C em $5\%\text{CO}_2$. Posteriormente, as medidas de intensidade de fluorescência sem estímulo foram feitas pelo modo *well scanning*, sendo captadas por nove leituras em sítios diferentes para cada poço. Para cada condição metodológica

foram feitas no mínimo quatro réplicas. A quantificação do influxo de cálcio intracelular ao longo do tempo foi realizada por injeção de isoprenalina 1nmol/L para cada poço. O aparelho captou níveis de fluorescência a cada 20 ms, a 37°C, por meio da configuração *well mode* do equipamento⁶⁴. Todas as leituras foram ajustadas com uma sensibilidade de ganho de aquisição igual a 1763 com luz de excitação em 585 nm e emissão em 520 nm. As intensidades médias do modo *well scanning* foram normalizadas pelo número total de células, porém uma formula com maior número de normalizadores foi utilizada para as análises de *well mode*, representadas pela fórmula:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{(F - F_{\text{base}})}{(F_{\text{base}} - B)}$$

Onde F representa o valor de fluorescência medido, Fbase é a fluorescência antes do estímulo e B é o sinal do poço sem o fluoróforo.

3.20. Análises do metabolismo celular

No sexto dia após a extração, seguido de 48 horas de condicionamento do meio de cultura para as células do *PP* e *Per*, uma alíquota de 200 µL do meio foi retirada e analisada por contador de eletrólitos (ABL800 Flex, Radiometer Copenhagen). A produção total de lactato foi normalizada pelo número de células de cada réplica. Para o cálculo do índice de consumo de glicose foi utilizada a seguinte fórmula: $(C_i - C_f) / C_i = X$, onde C_i representa a quantidade de glicose inicial de cada meio de cultura e C_f o consumo de glicose final. Os valores obtidos também foram normalizados pelo número total de células para cada réplica.

3.21. Análise estatística

As análises dos dados foram feitas utilizando o software Prism (GraphPad Softwares Inc., San Diego, USA). Os valores são expressos como média \pm desvio padrão para as análises com animais *in vivo* e média \pm erro padrão para experimentos *in vitro*. A taxa de mortalidade cumulativa foi calculada pela curva de sobrevida de Kaplan-Meier e comparada pelo teste log-rank. O modelo de riscos proporcional de Cox foi utilizado para análise multivariada analisando a influência de diferentes parâmetros no *baseline* na predição de maior mortalidade. Diferenças entre grupos foram comparadas pelo teste de ANOVA 1 via, seguido dos testes post-hoc de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para comparação da média de estudos com apenas dois grupos foi aplicado teste t de student e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Mutações no gene Hfe estão associadas com aumento da mortalidade em pacientes com cardiomiopatia

Um total de 318 pacientes com IC devido a cardiomiopatia de diferentes etiologias foi verificado, a partir de amostras de DNA, quanto à presença de pelo menos uma variante gênica relacionada com a hemocromatose (C282Y e/ou H63D). A presença de variações genéticas do gene Hfe foi associada com mortalidade significativamente maior em comparação a indivíduos não mutados (21,7%), pela curva de Kaplan-Meier (Figura 1). Posteriormente, em modelo de regressão de Cox, verificou-se diferença significativa quanto à presença da mutação e a fração de ejeção ($p=0,04$ e $p=0,01$, respectivamente) (Tabela 1).

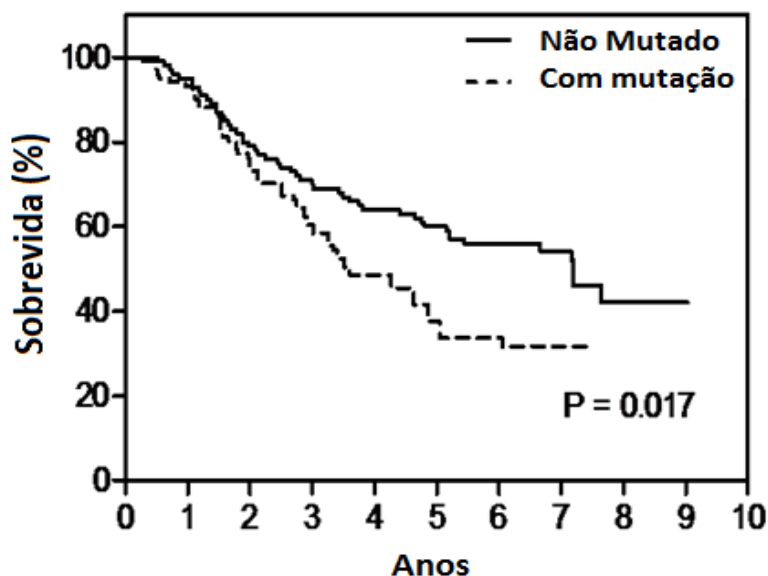


Figura 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de 318 pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias, seguidos durante 10 anos, de acordo com a presença de mutações no gene Hfe (C282Y e/ou H63D).

Tabela 1. Modelo de riscos proporcionais de Cox para mortalidade em 318 pacientes com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias, acompanhados em um hospital terciário. InCor, São Paulo, Brasil.

Variável	Hazard Ratio	valor de p
Mutação Hfe	1,81	0,04
Idade, anos	1,00	0,83
Sexo, feminino	0,53	0,09
Idiopática, sim	1,23	0,44
NYHA	1,33	0,09
FEVE, %	0,95	0,01
Creatinina sérica	1,20	0,58
Etnia	-	0,59

NYHA= New York Heart Association; Classes funcionais do grau de insuficiência cardíaca. FEVE=Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

4.2. O gene Hfe é normalmente expresso no coração de camundongos

Culturas primárias de células cardíacas de camundongos neonatos com auxílio de técnicas de imunofluorescência evidenciaram a presença do gene Hfe em cardiomiócitos (Figura 2B), enquanto não foi observada a presença da proteína em outros tipos celulares presentes no coração, como células endoteliais e fibroblastos (Figura 2D). Ademais, a proteína Hfe também foi observada *in vivo* por meio de imuno-histoquímica de coração de camundongos (Figura 2F), além da sua evidente localização no fígado (Figura 2H), o principal órgão armazenador de ferro.

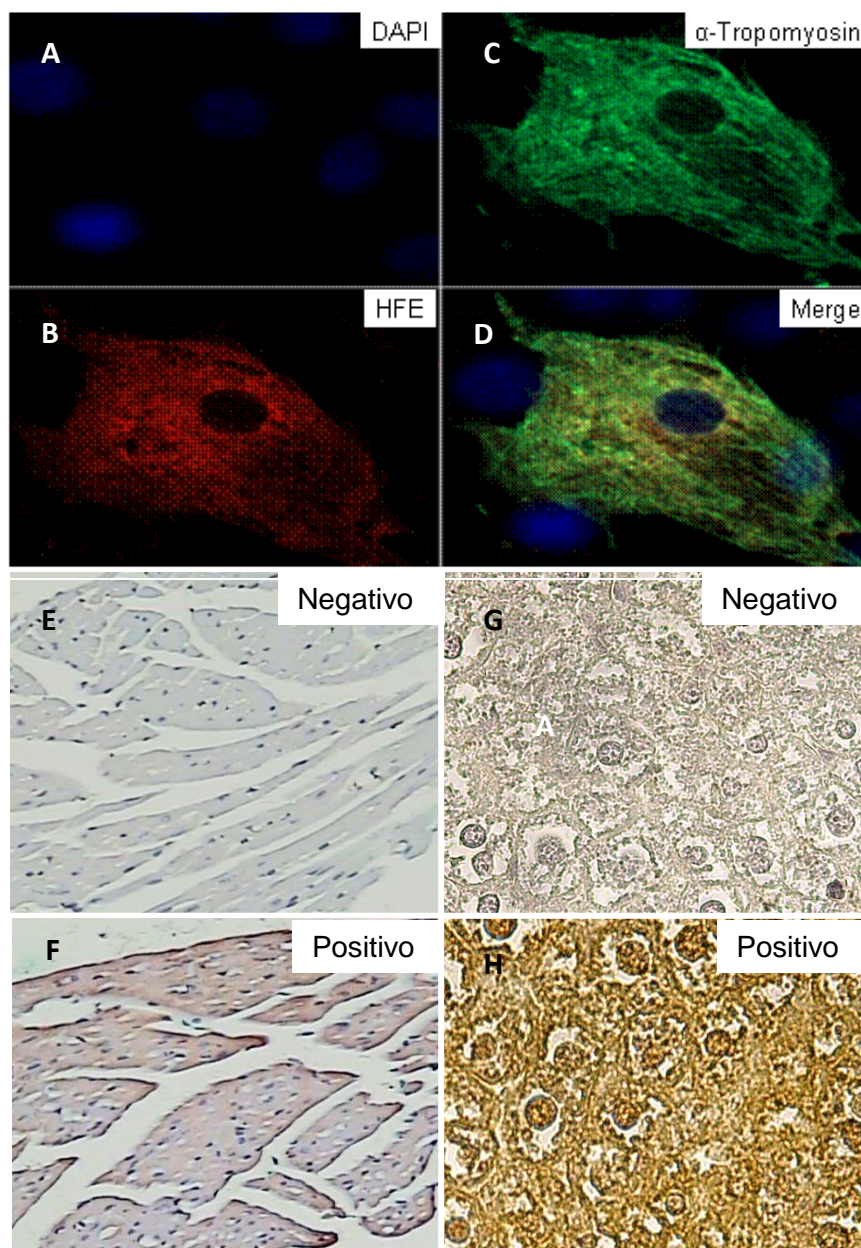


Figura 2. O gene Hfe é normalmente expresso em diferentes tecidos. As quatro primeiras figuras representam uma cultura primária de células cardíacas e foram coradas por imunofluorescência: (A) Marcação em azul do núcleo da célula com DAPI; (B) Marcação em vermelho da proteína Hfe; (C) Marcação em verde da proteína α -tropomiosina; (D) Marcação com combinação (merge) das três marcações: azul, vermelho e verde. As quatro figuras da parte inferior representam a imunohistoquímica em tecidos histológicos (aumento de 100x): (E) Reação negativa somente com anticorpos secundários no coração e (G) no fígado; (F) Reação positiva com anti-Hfe com anticorpos primário e secundário no coração e (H) no fígado (aumento de 100x).

4.3. Acúmulo de ferro ao longo da idade

Com base nos resultados anteriormente citados em humanos que sugeriram que os níveis de ferro elevados podem potencializar as agressões ao sistema cardiovascular, acompanhamos o acúmulo de ferro ao longo do tempo em diferentes órgãos em camundongos (Figura 3). Na fase de transição entre o período neonatal e o período juvenil houve um decaimento significativo dos níveis de ferro no coração (1° mês $947,5 \mu\text{g/g} \pm 94,88$ vs $290,7 \mu\text{g/g} \pm 17,88$ para o 3° mês, $n=11$, $p<0,0001$). Para a comparação do 1° mês de vida com o 12° mês houve aumento significativo do acúmulo de ferro no coração ($947,5 \mu\text{g/g} \pm 94,88$ vs $1262 \mu\text{g/g} \pm 121,7$, respectivamente, $n=11$, $p=0,02$).

Como representante do sistema vascular, verificou-se que o acúmulo de ferro na aorta não resultou em alterações significativas no *status* de ferro ao longo da idade (Figura 3B). Todavia, para o acúmulo de ferro no fígado (Figura 3C), houve um aumento progressivo e significativo após a fase juvenil e adulta, (1°mês $748,3 \mu\text{g/g} \pm 90,83$ vs $1076 \mu\text{g/g} \pm 131$ do 6°mês, $n=11$, $p=0,0475$) e (1°mês $748,3 \mu\text{g/g} \pm 90,83$ vs $1346 \mu\text{g/g} \pm 155,3$ para o 12°mês, $n=11$, $p=0,0022$).

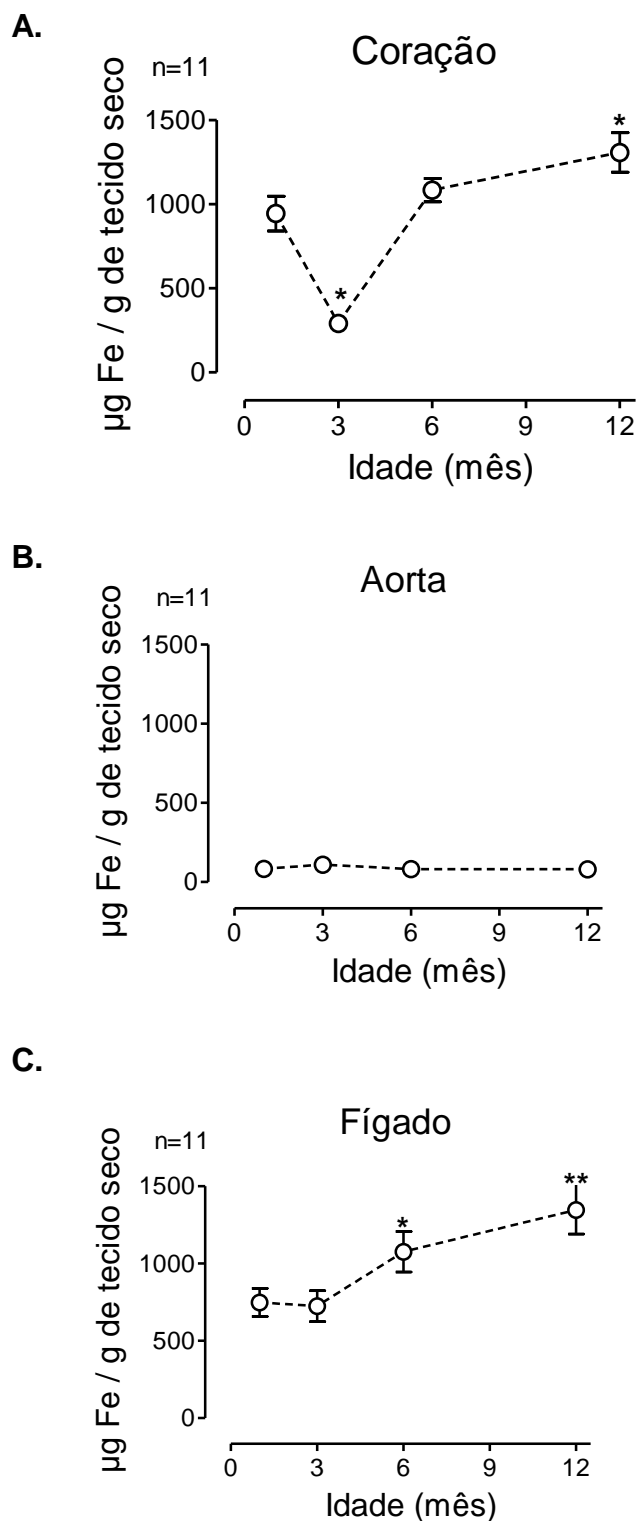


Figura 3. Caracterização do perfil do acúmulo de ferro ao longo da idade em animais selvagens por meio de espectrometria de absorção atômica. (A) Acúmulo de ferro no coração ao longo do tempo. (B) Acúmulo de ferro na aorta ao longo do tempo. (C) Acúmulo de ferro no fígado ao longo do tempo.

4.4. Consequências da sobrecarga de ferro farmacológica

As análises foram expandidas para desafiar os animais a uma sobrecarga de ferro crônica e entender quais são as consequências para os indivíduos mais susceptíveis ao ferro, mimetizando assim as possíveis repercussões das variantes genéticas e/ou não genéticas. Desta maneira, os animais selvagens tratados com ferro apresentaram dez vezes mais ferro no coração (Figura 4A), quando comparados aos animais controle (WT 0,325 mg/g \pm 0,054 vs 3,304 mg/g \pm 0,19 WT+ferro, n=7, p<0,0001).

Da mesma forma, a quantidade de ferro na aorta (Figura 4B) foi quase vinte vezes maior nos animais tratados com ferro quando em comparação ao controle (WT 0,214 mg/g \pm 0,053 vs 6,757 mg/g \pm 1,231 WT+ferro, n=6, p=0,0007). O maior aumento encontrado foi no fígado (Figura 4C), com quantidades de ferro que quadruplicaram os níveis basais do metal (WT=0,5125 mg/g \pm 0,11 vs 23 mg/g \pm 2,22 para WT+ferro, n=6, p<0,0001). Os níveis de ferro no baço (Figura 4D) com a sobrecarga foram significativamente maiores em comparação aos animais controle (WT= 3,353 mg/g \pm 0,20 vs 21,07 mg/g \pm 2,16 WT+ferro, n=6, p<0,0001).

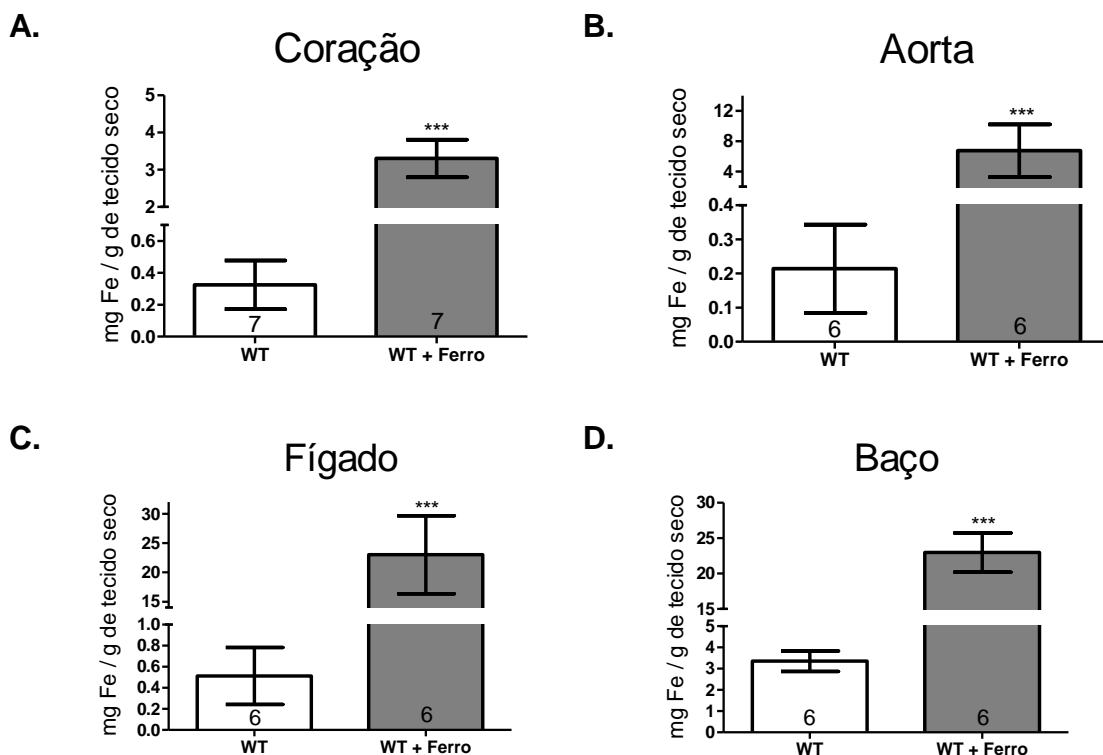


Figura 4. Quantificação dos níveis teciduais de ferro em diferentes órgãos por espectrometria de absorção atômica, tratamento por quatro semanas. (A) Nível de ferro no coração. (B) Nível de ferro na aorta. (C) Nível de ferro no fígado. (D) Nível de ferro no baço.

As consequências oriundas da sobrecarga de ferro comprometeram a sobrevivência dos animais tratados com o metal. A mortalidade foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle; 50% dos animais não resistiram ao término do tratamento (Figura 5A).

As repercussões cardíacas causadas pelo ferro resultaram em aumento significativo do peso cardíaco (Figura 5B) dos animais tratados com ferro (WT 6,24 mg/mm \pm 0,215 vs 5,255 mg/mm \pm 0,062 WT+ferro, n=6, p=0,0038). Além disso, houve diminuição significativa da função cardíaca, caracterizando cardiomiopatia entre os animais tratados com ferro, tanto para a fração de ejeção (WT 68,83% \pm 3,84 vs 52,14% \pm 3,49, n=6, p=0,0082, Figura 5C),

quanto para a espessura do septo na diástole (WT 68,8 mm \pm 3,84 vs 52,14 mm \pm 3,5, n=6, p=0,0082, Figura 5D).

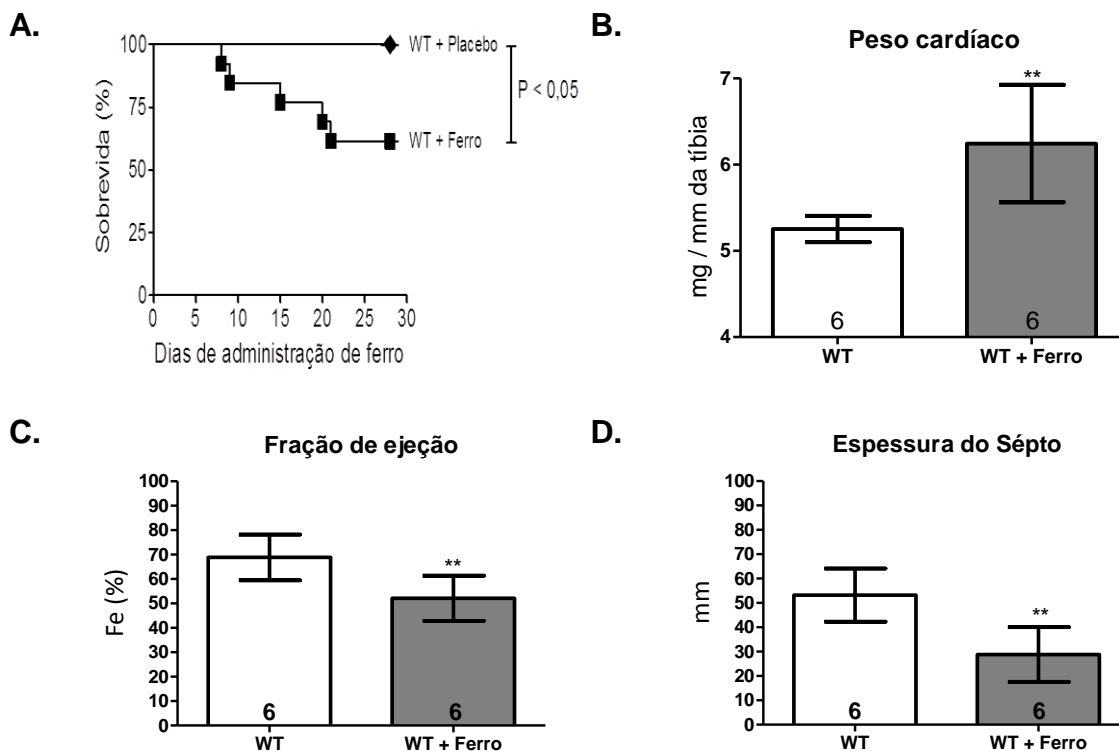


Figura 5. Resultados observados após o tratamento com sobrecarga de ferro: (A) curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos submetidos ao tratamento crônico com ferro. * $p < 0,05$ WT vs WT+ferro Teste Log-rank (Mantel-Cox). (B) Peso cardíaco dos animais tratados com ferro ou salina por quatro semanas. (C) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%) para WT e WT+ferro. (D) Espessura do septo em camundongos WT vs WT+ferro.

Mais um indício da presença de cardiomiopatia causada por ferro foi a caracterização de congestão pulmonar (Figura 6A), visto que os animais tratados com ferro apresentaram maior teor de água nos pulmões quando comparados com os animais WT 78,43% \pm 0,20 vs WT+ferro 80,27% \pm 0,33, n=6, $p=0,0008$. Porém, não houve diferença entre as quantificações de congestão hepática (Figura 6B). O ferro heme (Figura 6B), a forma mais tóxica para as células em geral, aumentou significativamente no fígado (WT=0,084% \pm 0,03 vs

10,73% \pm 0,80 para o grupo WT+ferro, n=5, p<0,0001). Além disso, a massa hepática dos animais tratados com ferro apresentou peso significativamente maior quando em comparação aos animais WT (Tabela 2).

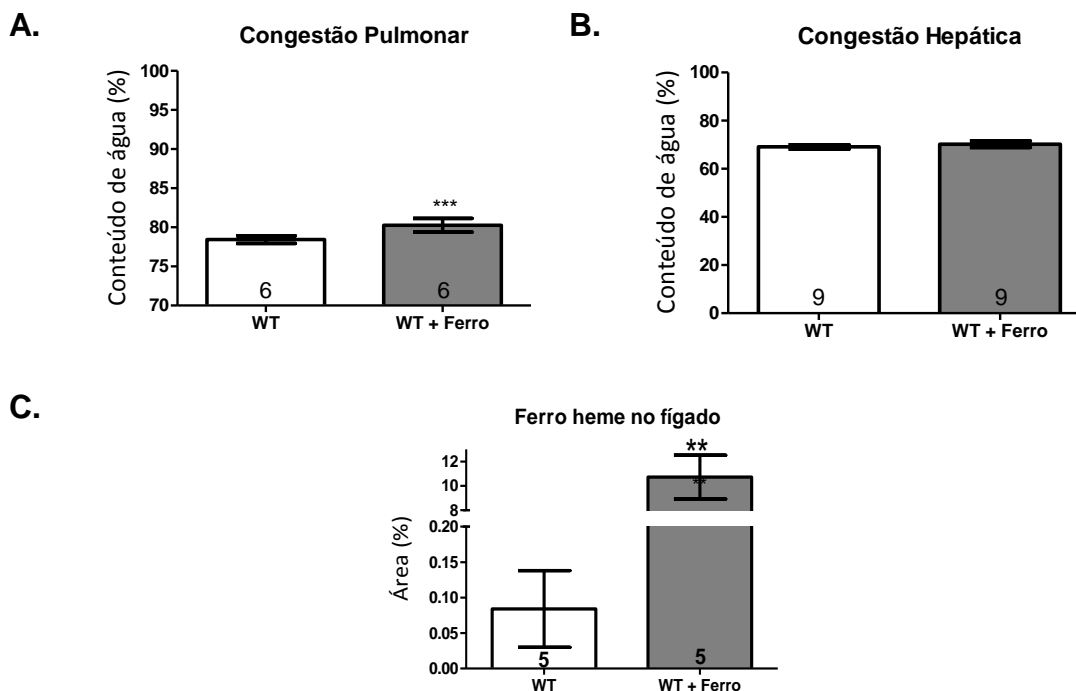


Figura 6. Análise de parâmetros fisiológicos do pulmão e do fígado, com quantificação do acúmulo de ferro heme no órgão hepático. (A) Acúmulo de água nos pulmões medidos a partir do peso úmido e peso seco do órgão. (B) Acúmulo de água no fígado, quantificado a partir do peso úmido e peso seco do órgão. (C) Quantificação do ferro heme tecidual hepático por meio de coloração histológica de azul da Prússia.

De modo geral, o tratamento com ferro ocasionou aumento nos parâmetros de níveis séricos de ferro e saturação de transferrina. Ademais, houve uma discreta diminuição na contagem de células vermelhas, sem alterações no nível de hemoglobina, no grupo tratado com ferro e não houve diferença entre as contagens de células brancas e plaquetas. Além disso,

houve um aumento significativo na massa esplênica, corroborando com o alto acúmulo de ferro no baço (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da sobrecarga de ferro em camundongos WT e WT+ferro de acordo com parâmetros biométricos, hematológicos e parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo do ferro.

	Placebo	Sobrecarga de ferro
Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	213,80 \pm 5,10	613,20 \pm 64,10 ^{***}
Sat. de transferrina (%)	58,30 \pm 1,00	94,00 \pm 1,60 ^{***}
RBCs ($10^6/\text{mm}^3$)	8,83 \pm 0,05	7,92 \pm 0,44 [*]
Hemoglobina (mg/dL)	12,60 \pm 0,20	12,10 \pm 0,20
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3,14 \pm 0,86	3,54 \pm 0,76
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1160,00 \pm 25,00	1345,00 \pm 100,00
Massa corpórea (g)	26,00 \pm 0,40	27,90 \pm 0,40
Comprimento da tibia (mm)	14,40 \pm 0,40	14,20 \pm 0,40
Massa cardíaca (mg/mm)	5,25 \pm 0,06	6,14 \pm 0,12 [*]
Massa pulmonar (mg/mm)	10,37 \pm 0,32	11,83 \pm 0,25 [*]
Massa esplênica (mg/mm)	6,63 \pm 0,19	9,49 \pm 0,32 [*]
Massa hepática (mg/g body)	108,80 \pm 3,80	195,90 \pm 5,80 [*]

RBCs = hemácias. Valores expressos como média \pm erro padrão da medida. * $p < 0,05$ WT vs. WT+ferro. Análise estatística por teste t student, $n=6-10$ por grupo.

4.5. Análises estruturais cardíacas causadas pela sobrecarga de ferro

Para entendermos as repercussões celulares causadas pelo acúmulo de ferro no cardiomiócito, foram realizadas análises histológicas. Na quantificação do volume nuclear do miócito (Figura 7A), foi encontrado aumento estatisticamente significativo no volume nuclear, representado por $65,5 \mu\text{m}^3 \pm$

2,02 para os animais WT e $86,5 \text{ um}^3 \pm 5,68$ para o grupo WT+ferro, n=4, p=0,0131.

O aumento do remodelamento cardíaco também foi evidenciado por meio da quantificação do colágeno intersticial no tecido cardíaco dos animais injetados com ferro-dextrano (Figura 7B(a,c), representados por $2,45\% \pm 0,095$ de marcação por picosirius nos animais controle vs $3,514\% \pm 0,25$ para os animais tratados com ferro, n=5, p=0,004 (Figura 7C). Outro dado que sugere cardiotoxicidade é a deposição de ferro heme no coração (Figura 7B (b,d), que foi significativamente maior nos animais tratados com ferro em comparação aos animais controle (Figura 7D).

Na busca por entender as modulações gênicas causadas pelo ferro no coração, foi medida a expressão dos transcritos primários de mRNA relativo para os genes Hfe (Figura 7E) e para a Hpcidina (Figura 7F), nos grupos controle e nos grupos tratados com ferro. Ambos os genes para o grupo WT+ferro estavam significativamente menos expressos do que nos animais controle.

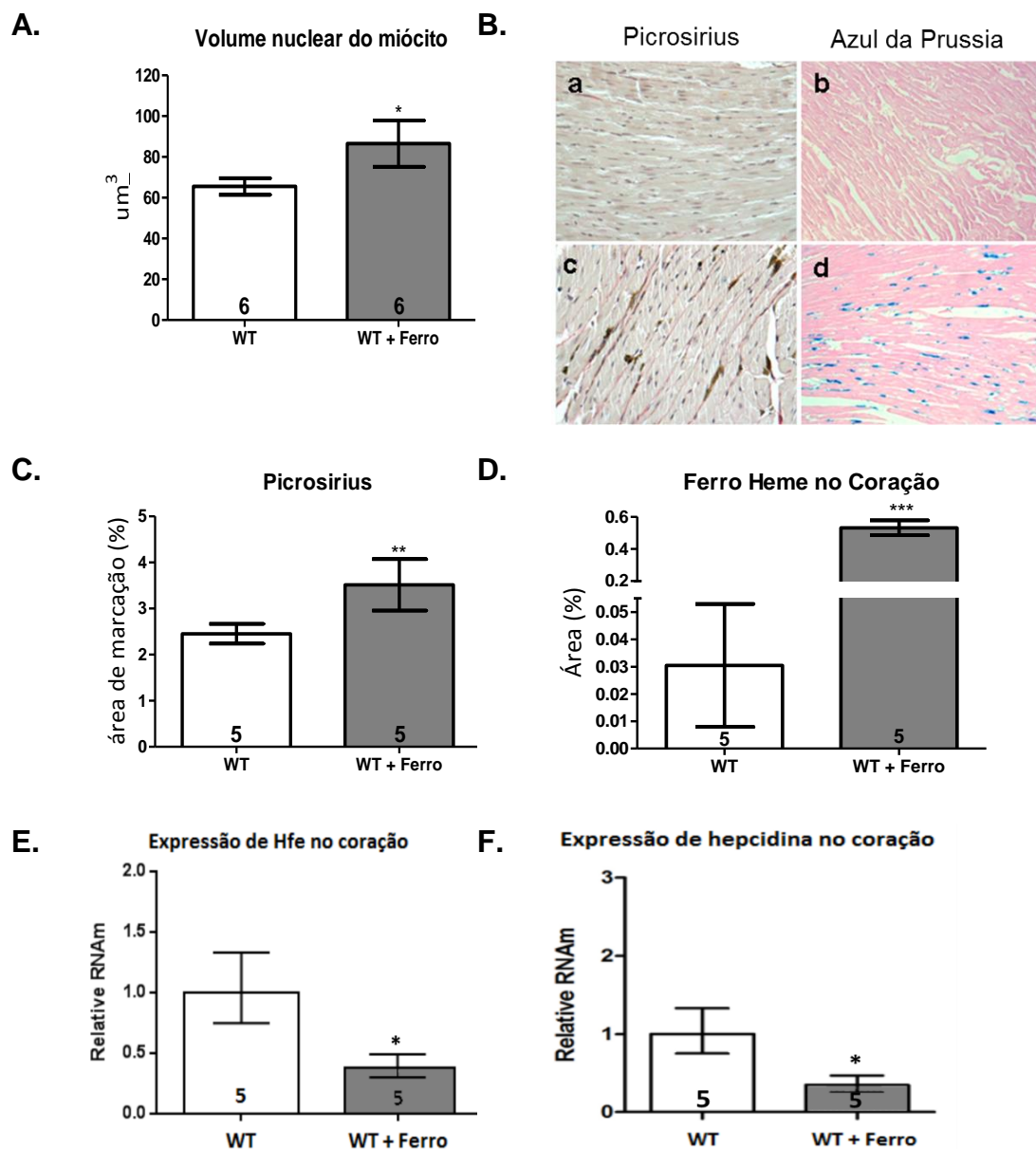


Figura 7. Parâmetros estruturais e genéticos após o tratamento com sobrecarga de ferro: (A) O gráfico representa o volume nuclear do miócito. (B) Fotomicrografias de miocárdio marcado com picrosirius para quantificar o colágeno intersticial em WT B(a), WT+ferro B(c). Fotomicrografias de miocárdio marcado com azul da Prússia para quantificar o acúmulo tecidual de ferro heme em WT B(b) e WT+ferro B(d). Os gráficos representam: volume nuclear do miócito. (C) O gráfico representa a quantificação do colágeno intersticial. (D) O gráfico representa a quantificação de acúmulo de ferro heme no coração. (E) Gráfico comparativo da expressão relativa do gene Hfe no coração após sobrecarga de ferro. (F) Gráfico comparativo da expressão relativa do gene da hepcidina após sobrecarga de ferro. * $p < 0,05$ ferro vs. placebo; teste t de Student para todas as análises.

4.6. Caracterização de modelos de estudo *in vitro* para a sobrecarga de ferro

Com o intuito de estudar em condições mais controladas o comportamento cardíaco frente à sobrecarga de ferro, utilizou-se da extração primária de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos para os tratamentos com o ferro. Assim, partiu-se inicialmente da caracterização destas células por meio de parâmetros relacionados ao metabolismo, produção de espécies reativas de oxigênio e medidas funcionais dos miócitos.

Nesta primeira etapa proposta, foram observados dados inconsistentes referentes à funcionalidade dos cardiomiócitos e respostas variáveis do aumento do estresse oxidativo frente à sobrecarga de ferro para o protocolo de *Percoll* (*Per*), que tem como princípio o enriquecimento da cultura primária de cardiomiócitos por meio da separação das células por gradiente de densidade. Deste modo, foram buscados outros protocolos de extração primária para utilização nos experimentos. A partir deste momento, foram distinguidas diferenças importantes entre o protocolo *Per* testado inicialmente e o protocolo de *pre plating* (*PP*), método que enriquece a cultura com cardiomiócitos por uma pré-seleção antes do plaqueamento final.

Além da caracterização das células primárias de cardiomiócitos, decidiu-se comparar os dois métodos e comprovar estas diferenças observadas em momentos diferentes por meio de ensaios pareados, utilizando técnicas avançadas para a obtenção dos resultados.

A primeira evidência que demonstrou diferenças entre *PP* e *Per* foi referente ao metabolismo (Figura 8A). Houve um aumento significativo na produção de

lactado para o protocolo de *PP* quando comparado com o protocolo de *Per*, $6,13 \mu\text{mol} \pm 0,09$ vs $7,50 \mu\text{mol} \pm 0,42$; $n = 3$, $p = 0,032$.

Para o consumo de glicose também foi possível observar um aumento significativo da razão de consumo das células extraídas pelo método de *PP* em comparação com *Per*, $0,024\% \pm 0,0071$ vs $0,097 \pm 0,007$; $n = 3$, $p = 0,0027$.

Para compreensão de possíveis efeitos do aumento do metabolismo sobre a produção de radicais livres, mediu-se indiretamente a quantidade de produção de radicais superóxidos nas células dos diferentes métodos de extração, por meio da formação de hidróxi-etídio (EOH) e a ação também indireta de outros oxidantes através da quantificação do etídio (Figuras C e D respectivamente). Neste sentido, ambas as quantificações estavam significativamente aumentadas para o protocolo de *PP* em comparação ao *Per* (EOH= $0,031 \text{ pmol} \pm 0,0078$ *Per* vs $0,052 \text{ pmol} \pm 0,0092$ *PP*; Etídio= $0,6225 \text{ pmol} \pm 0,1330$ *Per* vs $1,381 \text{ pmol} \pm 0,095$ *PP*; ambos expressos por média \pm desvio padrão, com $n=5$ e $p<0,01$).

Para verificar se as diferentes composições dos meios de cultura influenciavam a produção de ROS, os meios de cultura foram invertidos, as células de *Per* receberam durante todo tempo em cultura DMEM Low/M199 e as células do *PP* receberam o meio do método de *Percoll* DMEM high, e os mesmos parâmetros foram avaliados (Figura 8C e 8D). Contudo, as diferenças foram mantidas, indicando que a composição do meio não influenciou a geração de ROS para os diferentes métodos de extração (EOH = $0,021 \text{ pmol} \pm 0,0051$ *Per* vs $0,055 \text{ pmol} \pm 0,01$, $n=5$, $p=0,01$; Etídio = $0,65 \text{ pmol} \pm 0,185$ vs $1,523 \text{ pmol} \pm 0,198$, $n=5$, $p=0,01$).

Posteriormente, foram quantificados os níveis de glutathiona reduzida (Figura 8E) e a relação da glutathiona reduzida pela oxidada (Figura 8F) e não foram encontradas diferenças significativas entre os dois protocolos.

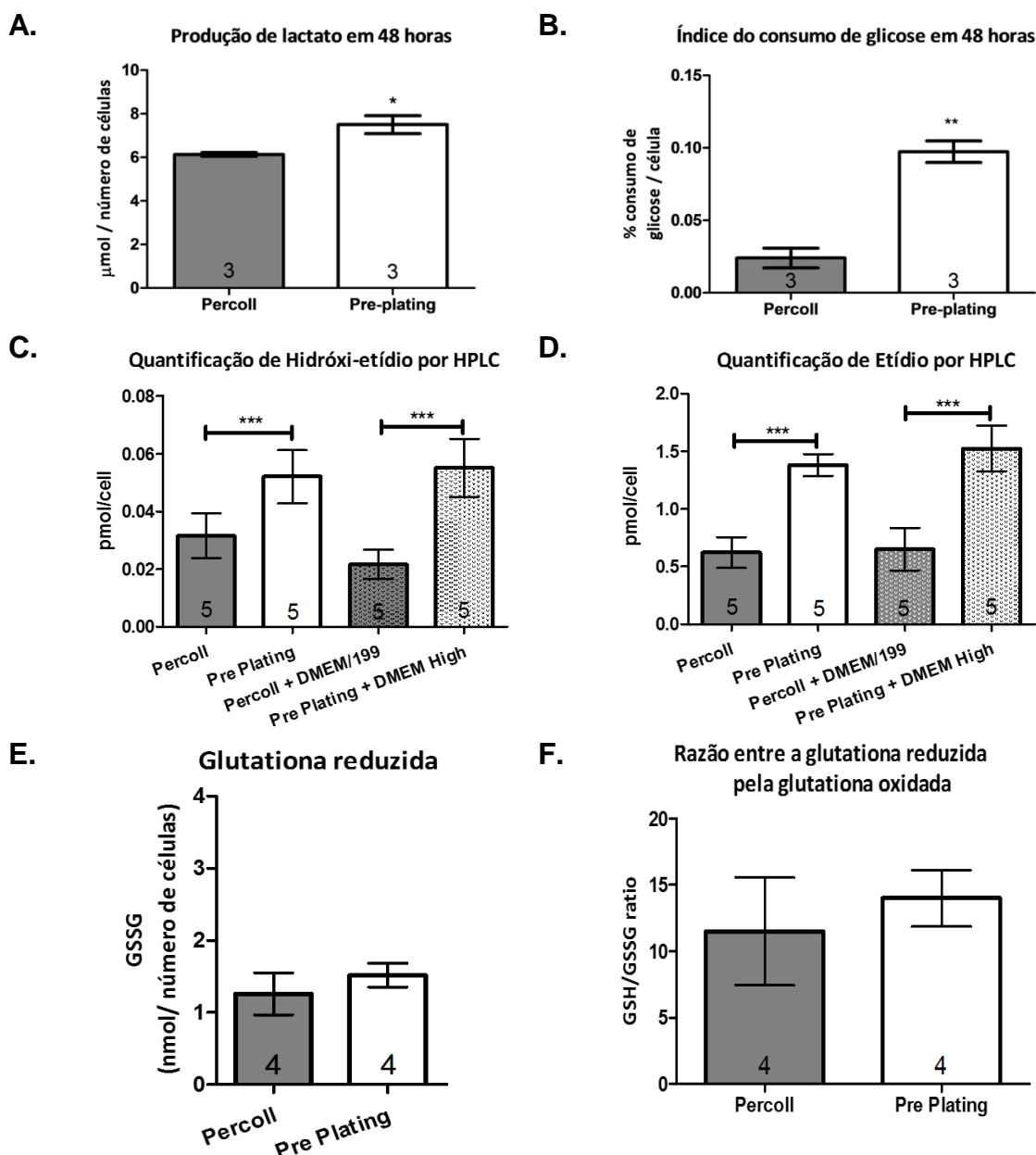


Figura 8. Comparações entre dois métodos de extração primárias de cardiomiócitos por meio de parâmetros metabólicos, estresse oxidativo e de enzima antioxidante. (A) Produção de lactato por 48 horas ao término dos oito dias de cultura primária. (B) Razão do consumo de glicose após 48 horas do término do oitavo dia de manutenção das células. (C) Produção de hidróxi-etídio por HPLC. (D) Produção de etídio por HPLC. (E) Avaliação da quantidade de glutathiona reduzida entre os dois protocolos. (F) Relação entre a quantidade de glutathiona reduzida pela quantidade de glutathiona oxidada.

Na busca por melhor elucidar as consequências do aumento do estresse oxidativo, verificou-se a quantidade de nitração proteica para os diferentes métodos de extração. Visualmente foi possível observar maior marcação de nitrotirosinas para o protocolo *PP* (Figura 9A-IV), quando comparado com as nitrações do protocolo *Per* (Figura 9A-III). Ademais, por meio da quantificação da marcação de nitrotirosinas, observou-se aumento significativo para o protocolo *PP* ($1,9 \times 10^5 \pm 4817$ vs $3,9 \times 10^5 \pm 26980$, $n = 3$, $p < 0,0001$), quando comparado ao *Per*. Além disso, foi medida a produção cumulativa de nitrito em 48 horas e novamente houve aumento significativo para o *PP* quando comparado ao *Per* ($0,187 \pm 0,037$ pmol/cel vs $0,723 \pm 0,107$ pmol/cell; $p = 0,0092$; $n = 3$).

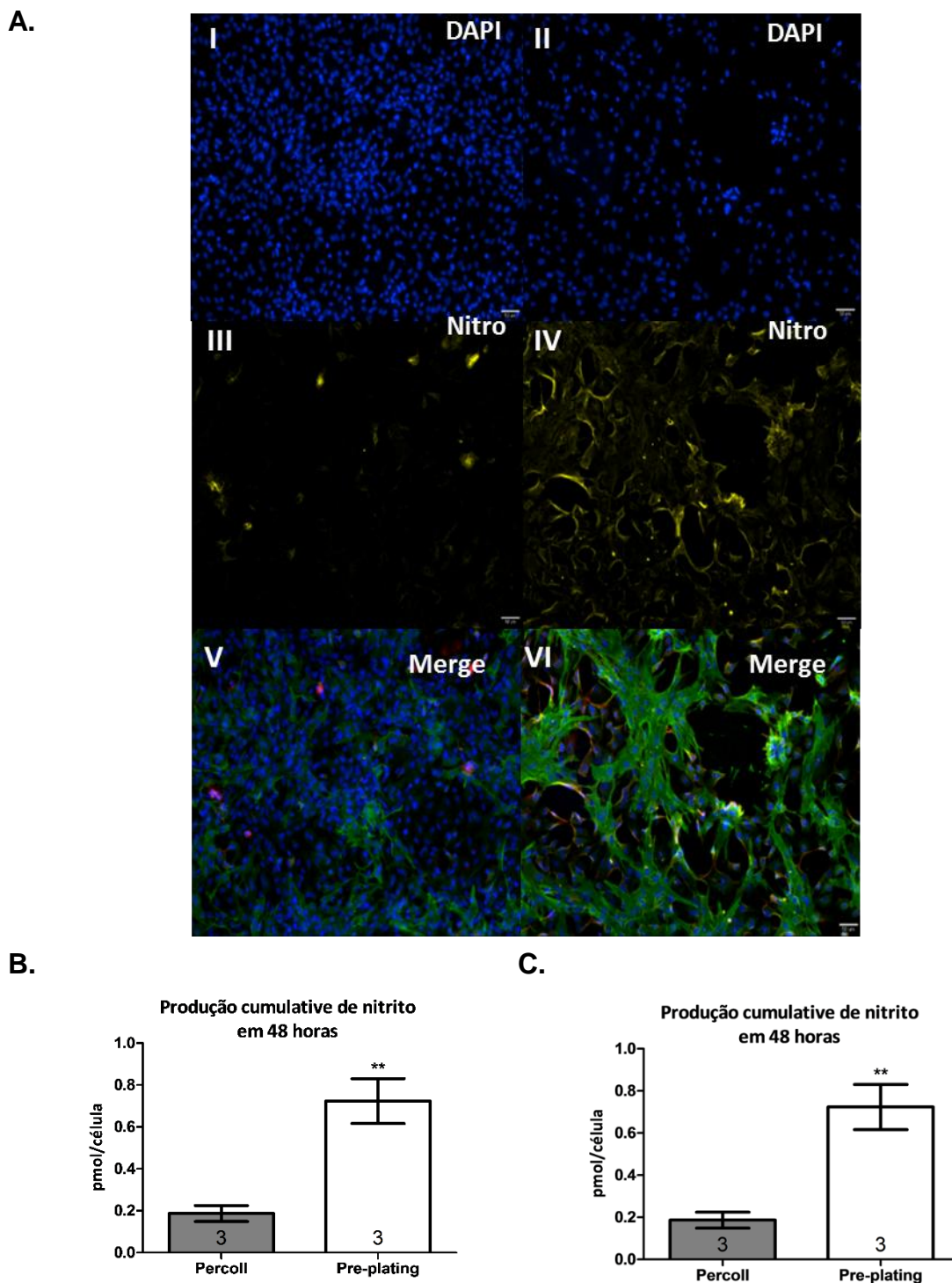
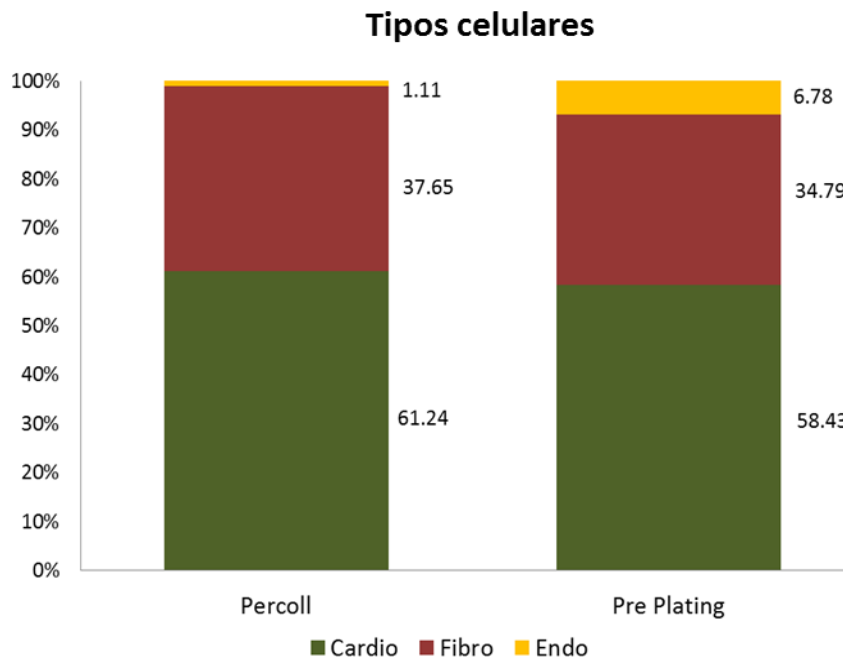


Figura 9. Imunofluorescência do método de *Per* (coluna da esquerda) e do método de *PP* (coluna da direita), colorações com anticorpo antinitrotyrosina (amarelo), DAPI (azul) e antitroponina I (verde), quantificação das nitrações e produção cumulativa de nitrito. (A) Imunofluorescências onde: I- Núcleo das células *Per* coradas com DAPI. II- Núcleo das células do *PP* coradas com DAPI. III- Células do *Per* coradas com antinitrotyrosina. IV- Células do *PP* coradas com antinitrotyrosina. V- Células do *Per* coradas com DAPI, antinitrotyrosina e troponina I. VI- Células do *PP* coradas com DAPI, antinitrotyrosina e troponina I. (B) Quantificação da intensidade de marcação com antinitrotyrosina para os dois protocolos. (C) Produção cumulativa de nitrito no meio de cultura após 48 horas para os dois protocolos.

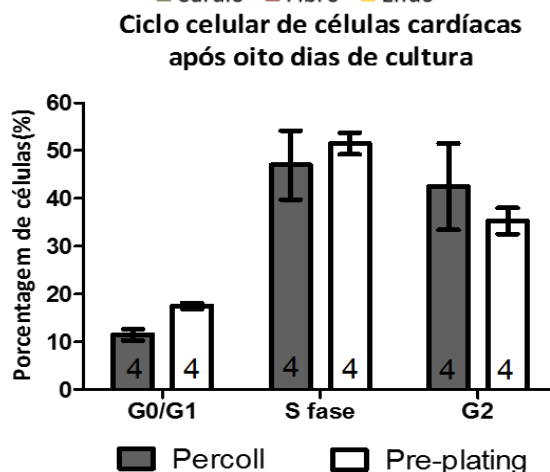
As diferenças encontradas até o momento não estão relacionadas com a quantidade dos diferentes tipos celulares que compõem as culturas primárias de células cardíacas, para o protocolo de *Percoll*, 61,24% das células eram cardiomiócitos, 37,65% fibroblastos e 1,11% células endoteliais. Semelhantemente, as células do protocolo de *pre plating* apresentaram 58,43% de cardiomiócitos, 34,79% de fibroblastos e 6,78% de células endoteliais (Figura 10A). Em seguida, foram avaliadas as porcentagens de células para cada fase do ciclo celular e não foram observadas diferenças significativas entre os dois métodos. Ressalta-se que a maioria das células de ambos os métodos estava estacionada na fase S (Figura 10B).

Em relação ao rendimento do método de extração para cada protocolo, o método de *PP* apresentou uma quantidade significativamente maior do número de células viáveis quando comparado com o método de *Per* no momento da extração (Figura 10C; *Per* $2,56 \times 10^6 \pm 0,13$ n=8 vs *PP* $3,52 \times 10^6 \pm 0,17$, n=7, p=0,0007).

A.



B.



C.

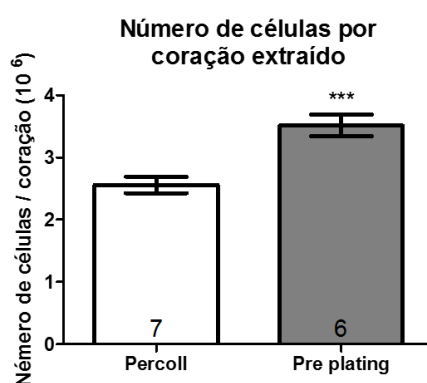


Figura 10. Caracterização das culturas primárias de cardiomiócitos. (A) Porcentagem dos tipos celulares prevalentes em cada protocolo, Cardio= marcação de cardiomiócitos com troponina I; Fibro=marcação de fibroblastos com CD90; Endo=marcação de células endoteliais com CD31. (B) Porcentagem do ciclo celular para os diferentes protocolos. (C) Rendimento celular por coração para cada protocolo.

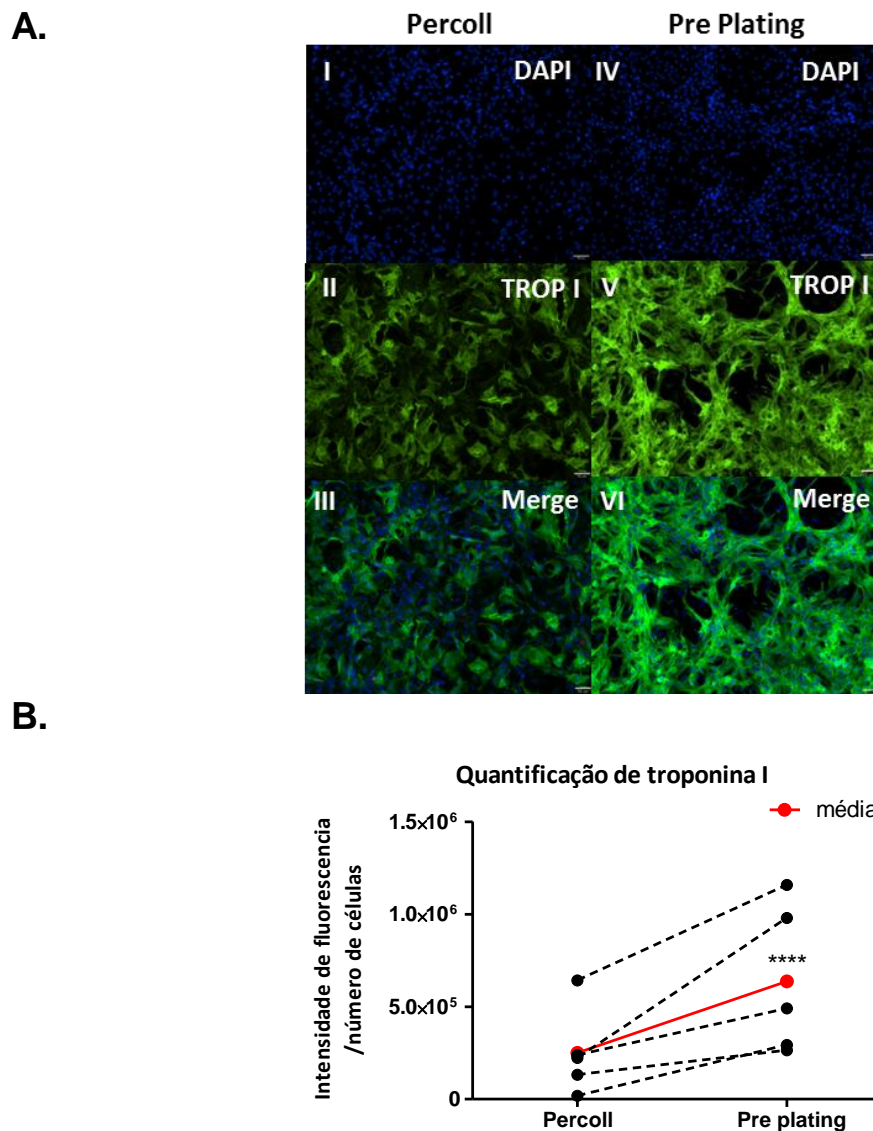


Figura 11. Quantificação da troponina I no cardiomiócito para os dois métodos de extração. (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-troponina I em verde e DAPI em azul. I- Núcleos celulares do protocolo *Per* corados em azul com DAPI. II- Cardiomiócitos do protocolo *Per* corados em verde. III- Núcleos celulares corados em azul com DAPI e cardiomiócitos corados em verde para o protocolo *Per*. IV- Núcleos celulares corados em azul com DAPI para o protocolo *PP*. V- Cardiomiócitos do protocolo *PP* corados em verde. VI- Núcleos celulares corados com DAPI e cardiomiócitos corados em verde para o protocolo *PP*. (B) Quantificação por HCS da intensidade de fluorescência emitida pela marcação da troponina I, normalizada pela quantidade de células totais.

Após 8 dias de cultura, quantificou-se a troponina I nos cardiomiócitos (Figura 11B), a qual está diretamente relacionada com a estrutura contrátil dos cardiomiócitos e, curiosamente, houve aumento significativo dos níveis da proteína para o protocolo de *PP* quando comparado com o protocolo *Per*. Ademais, foi investigado o comportamento funcional de contratilidade miocítica por meio de medidas do influxo intracelular de cálcio global para os diferentes protocolos e foi encontrado aumento significativo da frequência de influxo de cálcio para dentro do cardiomiócito por unidade de tempo (Figura 12A), $15,5 \text{ bpm} \pm 0,92 \text{ Per}$ vs $31 \text{ bpm} \pm 5,23 \text{ PP}$, $n=6$, $p=0,0154$.

Além disso, como análise descritiva (Figura 12B), foi possível perceber ondas de influxo de cálcio com perfil diferente e menos constante em relação ao tempo para o protocolo *Per*, quando comparado com o método de *PP*. Em relação à intensidade de fluorescência emitida para cada protocolo (Figura 12C), foi possível observar aumento significativo da fluorescência nas análises basais para as células do *PP* ($169,2 \text{ ua} \pm 21,02$) em comparação com as células do *Per* ($70,9 \text{ ua} \pm 9,44$), $n=7$, $p=0,0011$. Fato que pode ser visualizado no gráfico de perfil de intensidade de fluorescência por tempo para os dois protocolos pareadamente analisados (Figura 12D).

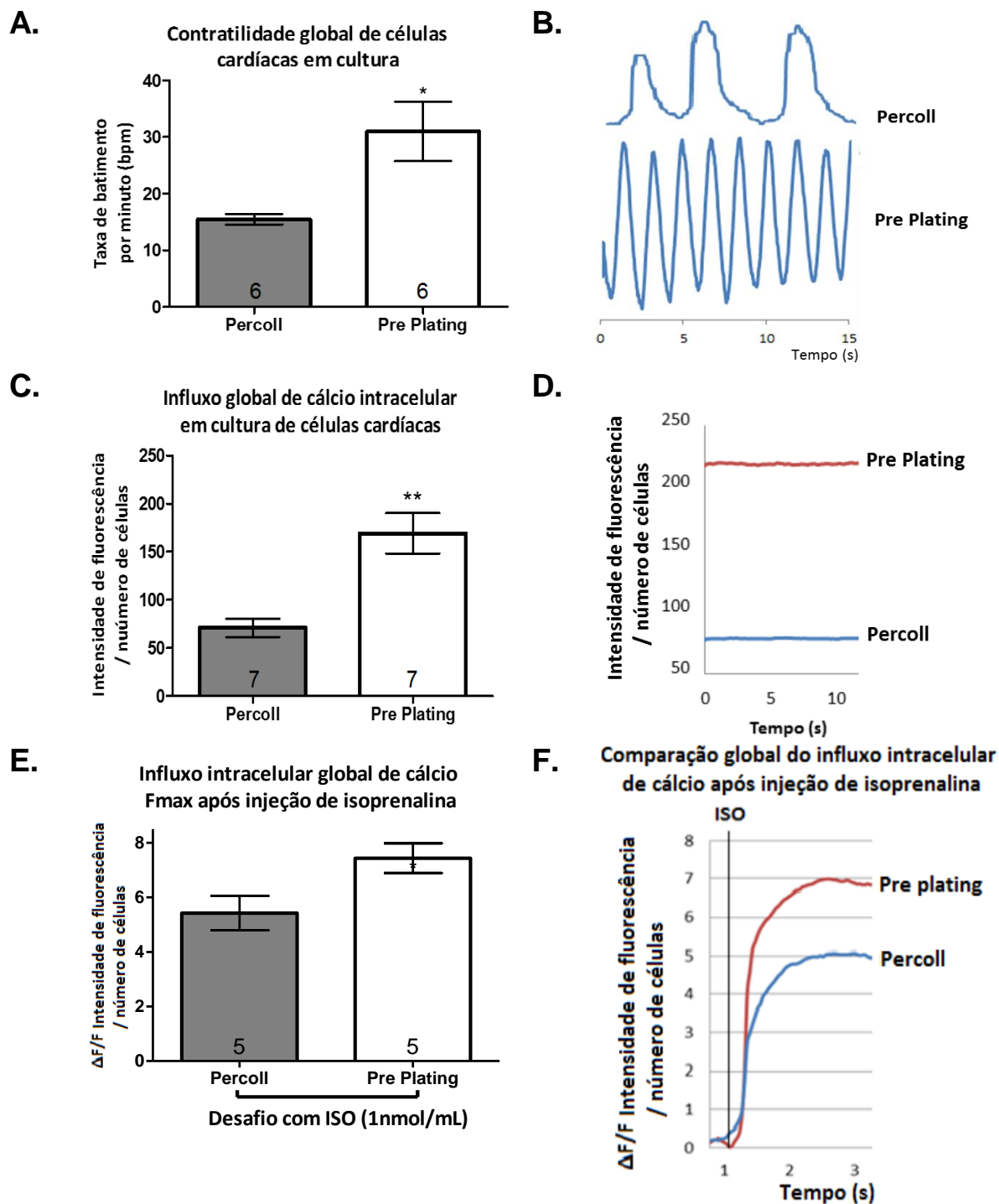


Figura 12. Caracterização do influxo intracelular de cálcio para os diferentes métodos de extração. (A) Número de batimentos de cardiomiócitos por minuto. (B) Perfil do influxo intracelular de cálcio para os diferentes protocolos. (C) Influxo basal intracelular de cálcio. (D) Perfil de intensidade de fluorescência emitida para cada método de extração por meio do influxo intracelular de cálcio. (E) Influxo intracelular máximo de cálcio após desafio com 1nmol/mL de isoprenalina. (F) Perfil de influxo intracelular de cálcio máximo após administração de isoprenalina 1nmol/mL.

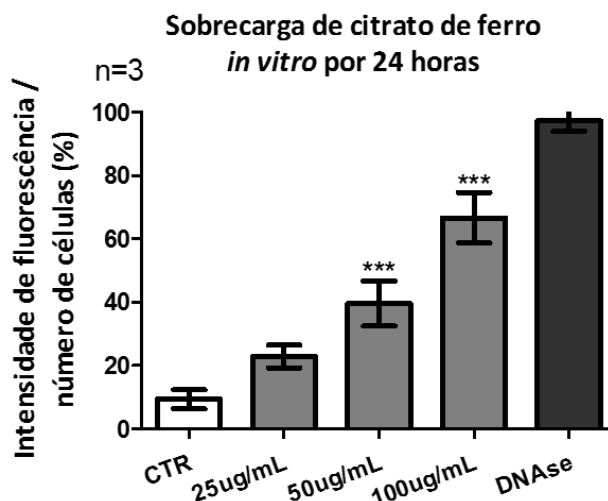
Após as análises das células no estado basal, as culturas de células cardíacas foram desafiadas com 1nmol de isoprenalina e novamente as células do protocolo *PP* responderam com aumento significativo da intensidade de fluorescência quando comparadas com a intensidade emitida pelas células do protocolo *Per* (Figura 12E). Os valores calculados representam o pico máximo de fluorescência atingido para cada protocolo: 5,42 ua \pm 0,63 *Per* vs 7,44 ua \pm 0,54 *PP*, n=5, p=0,042. O perfil de resposta após administração de isoprenalina pode ser visualizado no gráfico que sobrepõe as curvas de resposta à isoprenalina em relação ao tempo (Figura 12F).

Baseado nos resultados vistos até o momento, apesar do protocolo *PP* apresentar maior produção de ROS, constatou-se não apenas a quantidade de troponina-I aumentada em *PP*, mas um aumento significativo da contratilidade miocítica. Da mesma forma, as células extraídas pelo protocolo de *PP* estavam metabolicamente mais ativas e por estes motivos foram escolhidas como ferramenta para os testes farmacológicos com sobrecarga de ferro *in vitro*.

Assim, cardiomiócitos sofreram sobrecarga de ferro por 24 horas com diferentes concentrações de citrato de amônia férrico e os efeitos foram avaliados por técnica de Tunel (Figura 13). As células tratadas com ferro nas concentrações de 50 μ g/mL e 100 μ g/mL apresentaram aumento significativo de apoptose quando comparadas ao controle (Figura 13A). O controle versus a dose de 50 μ g/mL de ferro correspondeu a 9,41% \pm 1,72 vs 39,57% \pm 4,12, respectivamente, n=3, p<0,05. Assim como o controle versus a dose de 100 μ g/mL de ferro correspondeu a 9,41% \pm 1,72 vs 66,66% \pm 4,6, respectivamente, n=3, p<0,05. A dose de ferro mais alta (100 μ g/mL) não apenas aumentou a apoptose, mas diminuiu visivelmente o número de células

na placa (Figura 13B-V e VI), assim como o controle positivo com DNase (Figura 13B- VII e VIII).

A.



B.

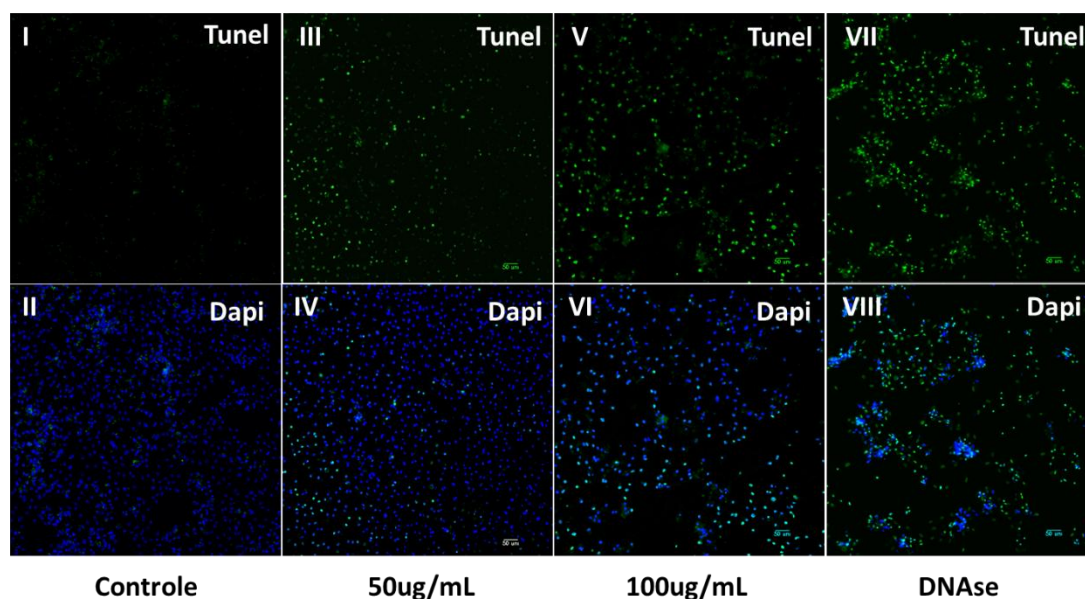


Figura 13. Quantificação de apoptose após sobrecarga de citrato de amônia férrico por 24 horas em células cardíacas extraídas por meio de protocolo *pre plating* (PP). (A) Porcentagem de intensidade de fluorescência para células marcadas para apoptose divididas pelo número total de células. (B) Imunofluorescência para quantificação de apoptose por HCS. I- Marcação de Tunel sem tratamento. II- Marcação do núcleo celular por DAPI sem tratamento. III- Marcação de Tunel em células tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ferro. IV- Marcação nuclear por DAPI em células tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. V- Marcação por Tunel em células tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ferro. VI- Marcação nuclear por DAPI em células tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ferro. VII- Marcação de células por Tunel com DNase 5ng/uL por 10 minutos em células cardíacas. VIII- Marcação com DAPI em células tratadas com DNase 5ng/uL por 10 minutos em células cardíacas.

5. Discussão

Estudos conduzidos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor indicaram a existência de associação entre mutação do gene Hfe e cardiomiopatia isquêmica⁴⁸. Expandimos nossos estudos por meio de acompanhamento por 10 anos de pacientes com as principais variantes genéticas do Hfe (C282Y e/ou H63D) e foi encontrada mortalidade significativamente maior em pacientes com insuficiência cardíaca devido a cardiomiopatia de diferentes etiologias. Nossos dados sugerem que o acúmulo de ferro no tecido cardíaco pode ser um fator potencializador das agressões ao sistema cardiovascular.

A associação entre variantes do gene Hfe e o risco de doença arterial coronariana foi recentemente investigada em uma metanálise incluindo 16 estudos, realizada por Lian et al.⁶⁵. Os resultados apontaram que o alelo H63D foi associado com aumento significativo de 6% no risco cardiovascular em populações caucasianas.

A eficiência do ferro²⁺ para ceder elétrons e do ferro³⁺ para aceitá-los é uma propriedade fundamental para uma série de reações bioquímicas. Todavia, esta característica pode se converter em uma situação potencialmente perigosa, podendo catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radicais hidroxila, peroxila, alcoxila e tioíla⁶⁶.

O ferro é capaz de induzir uma série de lesões ao DNA, desde modificações de bases nitrogenadas à quebra e formação de adutos de DNA. Além disso, o ferro parece ser capaz de modificar o padrão de metilação de diversos genes.

Uma das lesões mais prevalentes induzidas pelo ferro é a indução da formação de 8-hidroxi guanina, indicadora de dano oxidativo⁶⁷.

Estudos indicam que o fígado de pacientes com hemocromatose hereditária apresenta em maior número hipermetilações aberrantes de DNA em alguns genes, em comparação ao tecido hepático normal. Ainda, a presença de 8-hidroxi guanina na ilha CpG diminui substancialmente a ligação de proteínas de ligação ao metil-Cpg e pode afetar a expressão gênica⁶⁷. Além disso, segundo Eisenstein et al.⁶⁸, a alta carga de ferro corporal total dos animais leva à desestabilização de mRNAs.

No que se refere à expressão gênica, nossos dados relacionados com a sobrecarga de ferro em animais demonstraram diferenças na expressão do gene Hfe e do gene da hepcidina, que diminuíram significativamente no grupo tratado com ferro, sugerindo duas possíveis alternativas: os transcritos primários celulares estariam sendo degradados pelo ferro, ou de fato há uma modulação para diminuição da expressão destas duas importantes proteínas na regulação do ferro celular e sistêmico.

O mecanismo de regulação gênica intracelular relacionado ao ferro é conhecido por meio de regulação pós-transcricional de genes responsivos à presença de ferro, chamados de Elementos Responsivos ao Ferro (IREs), que interagem com a Proteína Reguladora de Ferro (IRP). Este complexo fica ligado à extremidade 5' dos transcritos primários das ferritinas, HIF-2 α (*hypoxia inducible factor*), ferroportina e ALAS (delta aminolevulínico sintetase), prevenindo sua degradação; entretanto, com a presença de ferro, é capaz de liberar o transcrito primário para a produção da proteína⁶⁹.

A hepcidina é um hormônio peptídico produzido principalmente no fígado, o qual se liga ao exportador de ferro (ferroportina) e induz sua degradação, conseqüentemente diminuindo a transferência de ferro dos enterócitos para a circulação^{24,70}. A expressão da hepcidina em roedores é controversa; enquanto na condição de hipóxia há aumento na expressão de hepcidina no fígado, no coração a hepcidina apresenta regulação positiva. Especula-se que isto ocorra para conferir proteção às células cardíacas⁴⁹.

Em modelo de camundongos nocaute para o gene Hfe, a sobrecarga de ferro aumentou a deposição de ferro no coração e foi associada com maior produção de ROS e diminuição de enzimas antioxidantes, incluindo glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Além disso, os animais apresentaram maior susceptibilidade ao dano cardíaco após isquemia-reperfusão, evidenciado por disfunção ventricular e apoptose de cardiomiócitos em comparação a camundongos WT⁴¹.

Estudos em humanos indicam que nos estágios iniciais da sobrecarga de ferro as repercussões cardíacas se manifestam por disfunção diastólica de ventrículo esquerdo. Quando o acúmulo de ferro persiste, a maioria dos pacientes desenvolve remodelamento do ventrículo esquerdo (VE), levando à dilatação ventricular e diminuição da fração de ejeção, constituindo a cardiomiopatia dilatada. Na minoria dos casos, ao redor de 10%, a disfunção de VE leva, com o avançar da idade, ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar, dilatação de VD e IC sem remodelamento anatômico de VE e com fração de ejeção preservada, característica de cardiomiopatia restritiva⁷¹.

As avaliações sistêmicas e cardíacas demonstradas com a sobrecarga de ferro em camundongos em nosso trabalho evidenciaram um tratamento crônico

efetivo com ferro que resultou em diminuição da fração de ejeção e diminuição da espessura da parede septal, com remodelamento cardíaco e hipertrofia nos cardiomiócitos, indícios relacionados com morte celular e que são característicos de cardiomiopatias de diferentes etiologias. Outros trabalhos na literatura, como o estudo de Moon et al.⁷², encontraram alterações ecocardiográficas em camundongos submetidos a tratamento com ferro dextrano com doses crônicas.

O tratamento atual para a sobrecarga sistêmica de ferro consiste na remoção de ferro por flebotomia na ausência de anemia, ou o uso de quelantes³⁹. O aprofundamento da compreensão da expressão de proteínas que participam da regulação homeostática do ferro em células do sistema cardiovascular pode contribuir para identificar alvos específicos de intervenções para diminuir os efeitos agudos e a longo prazo do acúmulo de ferro.

Estudos recentes testaram o efeito de intervenções com transferrina ou hepcidina exógenas e com agonistas da hepcidina³⁹. Embora a terapia com hepcidina não seja capaz de reverter a sobrecarga de ferro estabelecida, pode contribuir para diminuir o dano causado pelo ferro ao redistribuir o mineral dos tecidos parenquimatosos para os macrófagos, onde o ferro é menos tóxico⁷³.

O desenvolvimento de intervenções que promovam a regulação da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro de maneira restrita ao coração seria relevante para evitar efeitos adversos causados por interferência na regulação do ferro sistêmico, por exemplo, a anemia ferropriva causada pela indução da superexpressão de Hfe em camundongos poderia prevenir o acúmulo de ferro nos tecidos⁷⁴. Estudos prévios descreveram que o

Hfe é responsável por inibir a ligação do Fe-Tf (ferro-transferrina) ao TFR1 e reduz a entrada de ferro na célula⁷⁵.

Mutações tanto no Hfe quanto no TFR2 podem causar deposição de ferro. Em condições normais, Hfe e TFR2 interagem e o TFR2 compete com TFR1 pela ligação ao ferro. Conforme a saturação de transferrina aumenta, a transferrina desloca Hfe do TFR1 para TFR2. Além disso, o aumento da saturação de transferrina resulta na estabilização da proteína TFR2⁷⁶.

De maneira semelhante, a regulação dos níveis de TFR2 é modulada pela transferrina^{77,78}. Esta conexão entre Hfe e TFR2 induz a ativação de vias ERK1/2, indicando que o TFR2 pode atuar como sinalizador para a produção de hepcidina⁷⁹.

Outro possível alvo para o tratamento da cardiomiopatia causada pela sobrecarga de ferro são os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L (LTCC) e tipo T (TTCC), que são abundantemente expressos no coração. Na sobrecarga de ferro, o ferro não ligado à transferrina (Fe^{2+}) entra nos cardiomiócitos através de canais de cálcio voltagem-dependentes e do transportador de metal divalente-1 (DMT1)⁸⁰.

Kumfu et al.⁸¹ induziram sobrecarga de ferro em camundongos com beta-talassemia e estudaram o efeito de inibidores de LTCC, TTCC e DMT1. Todos os tratamentos diminuíram o depósito de ferro no coração, a concentração do marcador de estresse oxidativo malondialdeído no coração e a concentração de ferro não ligado à transferrina no plasma. O inibidor de TTCC ainda diminuiu significativamente a mortalidade em animais com sobrecarga de ferro.

No presente estudo, os resultados sem a sobrecarga de ferro apontaram acúmulo de ferro no coração e no fígado de camundongos ao longo de 12

meses de vida. O envelhecimento e o acúmulo de ferro parecem estar relacionados. No estudo *Hemochromatosis and Iron Overload Screening* (HEIRS), indivíduos adultos com valores elevados de saturação de transferrina e de ferritina sérica apresentaram menor comprimento de telômeros, marcador de estresse oxidativo e do envelhecimento biológico⁸².

Arvapalli et al.⁸³ relataram que ratos com 33 meses de idade apresentavam 72% mais ferro no tecido cardíaco e 87% mais ferro no fígado em comparação a animais com 6 meses de idade. O tratamento dos animais com quelante de ferro diminuiu o acúmulo do mineral e a apoptose no coração. Este é mais um indício de que, assim como observado em nosso estudo, o ferro se acumula nos tecidos parenquimatosos progressivamente ao longo da vida, aumentando a apoptose celular e reduzindo o comprimento telomérico.

O acúmulo de ferro também pode ser um fator para o agravamento de patologias com desenvolvimento relacionado à idade. Jiang et al.⁸⁴ conduziram um estudo com mulheres saudáveis de 30 a 55 anos, participantes do *Nurses' Health Study*, que foram seguidas durante 10 anos. Foi encontrada associação positiva entre maiores estoques corporais de ferro e a incidência de diabetes tipo 2, independente da presença de obesidade e outros fatores de risco para a doença. O papel do acúmulo de ferro no desenvolvimento de diabetes tipo 2 envolve o aumento da formação de ROS com consequente disfunção de células beta pancreáticas⁸⁵.

O acúmulo de ferro no coração ao longo da vida é consistente com as evidências de aumento progressivo de risco cardiovascular associado ao envelhecimento. As taxas anuais de um primeiro evento cardiovascular aumentam de 3/1000 homens aos 35-44 anos de idade para 74/1000 homens

aos 85-94 anos. Para mulheres, taxas comparáveis ocorrem uma década depois e a diferença entre os sexos se estreita com o avançar da idade².

A prevalência de hipertrofia ventricular, de insuficiência cardíaca e de fibrilação atrial aumentam dramaticamente com o avançar da idade. O envelhecimento está associado ao aumento da rigidez arterial, elevação da pressão sistólica. O incremento da pressão, por sua vez, contribui para o aumento da massa ventricular esquerda, tendo a IC como consequência⁸⁶.

Quanto à relação entre ingestão dietética de ferro e risco cardiovascular, esta foi avaliada em uma série de estudos epidemiológicos. Em metanálise com inclusão de 21 estudos de coorte somando 292.454 participantes com 30 a 99 anos no *baseline*, a ingestão de ferro heme apresentou associação positiva com a incidência de doença arterial coronariana⁸⁷. Os mecanismos relacionados ao risco parecem envolver o aumento do estresse oxidativo, que promove a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tornando-as mais aterogênicas, e o aumento da inflamação⁸⁸.

O ferro heme, tanto livre quanto em hemoproteínas, pode catalisar a formação de radicais livres, principalmente pela formação de oxo-ferril. O ferro heme também contribui como reagente para a formação de ROS, ao invés de catalisador, ao interagir diretamente com o oxigênio por meio dos radicais ferril e perferril⁸⁹.

Os resultados do presente estudo indicaram que a sobrecarga crônica de ferro resultou em deterioração da função cardíaca e aumento de morte em camundongos. A deposição de ferro heme tanto no fígado como no coração demonstrou estes como sendo órgãos alvo para ação do ferro. Todavia, a característica do fígado de armazenar ferro, faz do órgão mais resistente frente

à sobrecarga (Figura 6B). Se compararmos os níveis de ferro cardíacos dos animais selvagens (WT) com 12 meses de idade, 1262 µg de ferro/g de tecido seco (figura 3A), com o nível de ferro no fígado aos 6 meses de idade, 1076 µg de ferro/g de tecido seco (Figura 3C), podemos perceber que a concentração de ferro cardíaco é tão elevada quanto a concentração de ferro no fígado, órgão chave para a regulação de ferro sistêmico. Esta comparação ilustra a importância do coração como órgão coadjuvante no armazenamento de ferro e participante ativo do metabolismo sistêmico do metal.

Por fim, buscou-se determinar se modelos celulares de cardiomiócitos recapitulam, pelo menos em parte, os fenótipos observados *in vivo* com a sobrecarga de ferro. Para tanto, foram utilizadas culturas primárias de cardiomiócitos neonatais, as quais vêm sendo utilizadas em estudos relacionados ao desenvolvimento, toxicologia, farmacologia e fisiologia desde a década de 1960⁹⁰.

O procedimento é considerado relativamente simples⁹¹ quando comparado ao procedimento de Langendorff com cardiomiócitos adultos. No entanto, existem diversos protocolos com pequenas adaptações⁹² e a comunidade científica ainda desconhece o impacto destas diferenças nas células relacionado ao procedimento em si.

Este protocolo pode ser sintetizado em três etapas: obtenção do coração e divisão em fragmentos; digestão enzimática; e purificação/isolamento dos cardiomiócitos. No presente trabalho, foram caracterizados e comparados dois importantes métodos de obtenção de células cardíacas de ratos neonatos: extração por método de *Percoll* (*Per*) e extração pelo método de *Pre Plating* (*PP*). Testou-se a hipótese de que os protocolos, cujas principais diferenças se

encontram nas duas últimas etapas (digestão e purificação), poderiam resultar em populações de cardiomiócitos com diferenças relevantes.

Os resultados indicaram que ambos os protocolos foram eficientes em obter um alto rendimento de cardiomiócitos, apesar de pequenas diferenças no número de células. As principais diferenças foram relacionadas ao metabolismo de cardiomiócitos, produção de ROS e desempenho funcional. Características metabólicas e funcionais foram maiores no método *PP*. Assim como o aumento da produção de lactato e da taxa de consumo de glicose indicam aumento do metabolismo, que também corroboram com aumento da atividade contrátil, caracterizada por maior frequência cardíaca e maior influxo de cálcio intracelular.

Todavia, foi evidenciado um aumento significativo do acúmulo de nitrotirosinas, assim como da ação de superóxidos na formação de radicais livres, que provavelmente estão relacionados com aumento do metabolismo para o método *PP*.

Ambas as populações foram semelhantes com relação aos percentuais de cardiomiócitos (aproximadamente 60%) e de fibroblastos (35%), independente do método utilizado. Em estudos *in vivo*, observa-se aproximadamente 30 a 50% de cardiomiócitos na população de células cardíacas^{93,94}. Sabe-se que o método *Percoll* remove até 90% dos fibroblastos⁹⁵. Nossos dados indicaram que o enriquecimento por ambos os métodos foi eficiente e mesmo após 8 dias em cultura a população de fibroblastos foi incapaz de substituir a população de cardiomiócitos.

As nitrações proteicas podem ser utilizadas como marcador de estresse oxidativo⁹⁶. O peroxinitrito rapidamente produz nitrotirosinas, que se decompõe

em tirosina e nitrito. Conseqüentemente, nossos resultados indicaram que um estresse nitrosativo maior ocorre no protocolo *PP*, com base na formação de peroxinitrito. Em cardiomiócitos, o estresse oxidativo/nitrosativo pode ser causado por danos mecânicos ou químicos^{97,98} ou hipóxia⁹⁹ e pode resultar em apoptose.

As diferenças mais proeminentes entre os dois protocolos testados estão nas quantidades e nos tipos das enzimas de digestão utilizadas em cada técnica e no método de purificação. Mas as formulações dos meios de cultura também podem desencadear a geração excessiva de ROS¹⁰⁰. Inicialmente, acreditou-se que o estresse oxidativo pudesse estar relacionado com a composição dos meios de cultura diferentes para cada protocolo. Mas por HPLC, comprovou-se que a composição dos meios não alterou o estado redox da célula do *PP* quando comparado com *Per*.

A solução de percoll é composta por partículas de sílica coloidal coberta com polivinilpirrolidona (PVP) e não é considerada tóxica. Entretanto, seu uso para preparação de espermatozoides foi descontinuado em virtude de evidências que apontavam redução da motilidade e da viabilidade celular, possivelmente pelos maiores níveis de endotoxinas¹⁰¹. Evidências de que a PVP causa dano às membranas celulares e sua associação com anormalidades cromossômicas são possíveis problemas para a utilização do reagente de percol¹⁰². Além do mais, as enzimas digestivas podem alterar o perfil de proteínas da superfície celular em longo prazo¹⁰³.

Células cardíacas extraídas pelo método *PP* foram tratadas com citrato de amônia férrico com doses de 50 µg/mL e 100 µg/mL e, após 24 horas, foi possível observar aumento significativo de apoptose para as duas

concentrações testadas. A literatura traz evidências de que a morte celular induzida por ferro está relacionada com apoptose, por meio de ativação da via das caspases¹⁰⁴. Toblli et al.¹⁰⁵ encontraram aumento significativo dos níveis de nitrotirosina e de caspase 3 no coração, fígado e rins de ratos tratados com ferro dextrano, indicando aumento de estresse nitrosativo e apoptose.

No presente estudo, foram utilizadas técnicas avançadas e seguras com algoritmos para quantificação pré-estabelecidos em software, tanto para medidas de imunofluorescência por HCS quanto para medidas de influxo global de cálcio por meio do equipamento Fluostar Omega. Uma limitação desta última técnica é que esta não nos permite avaliar se o aumento do influxo de cálcio intracelular para o protocolo *PP* corresponde a maior sincronismo em culturas de células cardíacas ou se de fato há aumento da força contrátil do cardiomiócito. Todavia, o aumento de respostas encontradas para o protocolo *PP* sugere um comportamento mais ativo da função miocítica.

Os modelos celulares em questão apresentam-se como importantes ferramentas para a identificação de mecanismos moleculares e celulares associados aos efeitos deletérios causados pelo ferro. Contudo, uma série de parâmetros diferiu quanto ao metabolismo celular, função e estrutura dependendo do método utilizado para isolamento de cardiomiócitos, indicando que a escolha do procedimento deve ser criteriosa para evitar vieses indesejados.

Assim, em conjunto os dados apresentados mostram que:

1. Variante do gene *Hfe*, que supostamente favorece o acúmulo de ferro intracelular, está associada a piores desfechos clínicos em uma coorte de seguimento de pacientes portadores de insuficiência cardíaca. Estes

- dados são consistentes com a ideia de que o ferro pode ser um fator de que confere susceptibilidade a lesões cardiovasculares;
2. O ferro tecidual aumenta no decorrer da idade em camundongos e pode se tornar um fator adjuvante, aumentando a susceptibilidade do sistema cardiovascular a lesões. Será importante determinar se o acúmulo de ferro em amostras de tecido cardíaco humano se comporta da mesma maneira e se os níveis de ferro teciduais são influenciados por variantes genéticas do gene Hfe;
 3. O tecido cardíaco e os cardiomiócitos em cultura expressam proteínas-chaves que participam do controle da homeostase de ferro e, portanto, podem ser alvos terapêuticos em potencial para redução de risco cardiovascular;
 4. A sobrecarga crônica de ferro, que resulta em disfunção cardiovascular e morte, resultou em acúmulo de ferro cardíaco comparável aos aumentos observados em órgãos que participam da homeostase de ferro (e.g. fígado e baço);
 5. Finalmente, na validação de modelos celulares de cardiomiócitos, identificamos uma dependência importante do tipo de extração sobre aspectos metabólicos, produção de ROS, estrutura e contratilidade de cardiomiócitos de animais neonatos que deverão ser levados em conta, uma vez que podem influenciar o desenho experimental e a compreensão destes mecanismos que estão associados ao papel do ferro como fator de risco cardiovascular.

6. Conclusões

Em conjunto, os resultados do presente trabalho apoiam a hipótese de que o acúmulo de ferro no tecido cardíaco aumenta a susceptibilidade cardiovascular. Trabalhos futuros permitirão melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no acúmulo de ferro no coração ao longo do envelhecimento em pacientes com insuficiência cardíaca.

7. Perspectivas

O número de publicações relacionadas à regulação do ferro cresceu nos últimos anos, porém ainda não se sabe quais são os níveis ideais de ferro no coração para cada faixa etária e o quanto isto é variável nos seres humanos. Além disso, conhecer os efeitos e as características dos mecanismos envolvidos no metabolismo do ferro é importante para eleger genes ou moléculas-alvo que possam ser modulados de maneira farmacológica ou genética visando mitigar os efeitos deletérios causados pelo ferro.

Por fim, esclarecer por meio de técnicas seguras a relação do acúmulo de ferro com as insuficiências cardíacas em geral, ajudaria a entender como combater as DCV, patologias que mais se relacionam com óbitos no mundo.

8. Referências Bibliográficas

1. Butler; D. Un targets top killers. *Nature* 2011; 477: 260-261.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127(1): e6-e245.
3. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet* 2011; 377(9781): 1949-61.
4. WHO. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization: Geneva; 2011.
5. Mahmood SS, Wang TJ. The epidemiology of congestive heart failure: the Framingham Heart Study perspective. *Glob Heart* 2013; 8(1): 77-82.
6. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol* 2001; 154(3): 193-206.
7. Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjer E, Kannelønning K, Fjosne U, et al. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(10): 1108-15.
8. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005; 352(17): 1769-78.
9. Cançado RD, Guglielmi AC, Vergueiro CS, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattonne CS, et al. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles

- in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J* 2006; 124(2): 55-60.
10. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* 2002; 105(11): 1387-93.
 11. Vilas-Boas F, Follath F. Current insights into the modern treatment of decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87(3): 369-77.
 12. Barretto ACP, Ramires JAF. Insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 1998; 71(4): 635-642.
 13. Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supra-aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88(2): 225-33.
 14. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Quaini F. The Failing Heart. *Adv Clin Path* 1997; 1(2): 137-148.
 15. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; 98(14): 1355-7.
 16. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82(11): 1111-29.
 17. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2002; 12(3): 371-378.

18. Beutler E. Disorders of iron metabolism. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TJ, Prchal JT. 7^o ed. New York: MacGraw-Hill; 2006.
19. Viatte L, Vaulont S. Heparin, the iron watcher. *Biochimie* 2009; 91(10): 1223-8.
20. Pantopoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol* 2008; 14(45): 6893-901.
21. Adams PC, Barton JC. Haemochromatosis. *Lancet* 2007; 370(9602): 1855-60.
22. Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005; 25(4): 433-49.
23. Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127(5 Suppl 1): S79-86.
24. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306(5704): 2090-3.
25. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005; 122(5): 789-801.
26. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480(2-3): 147-50.
27. Leong WI, Lönnnerdal B. Heparin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr* 2004; 134(1): 1-4.

28. Ganz T. Heparin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(4): 251-4.
29. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7806-10.
30. Darshan D, Anderson GJ. Interaction signals in the control of heparin expression. *Biometals* 2009; 22: 77-87.
31. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of heparin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15): 8780-5.
32. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13(4): 399-408.
33. Merryweather-Clarke AT, Worwood M, Parkinson L, Mattock C, Pointon JJ, Shearman JD, et al. The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br J Haematol* 1998; 101(2): 369-73.
34. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988; 318(21): 1355-62.
35. McKusick V.A. Mendelian Inheritance in Man. *Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1994.

36. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 2003; 12(17): 2241-7.
37. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, McDonnell SM, Press N, Adams PC, et al. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA* 1998; 280(2): 172-8.
38. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009; 9(3): 217-27.
39. Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 2012; 366(4): 348-59.
40. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Férec C, Robson KJ. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet* 2010; 128(3): 233-48.
41. Turoczi T, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, et al. HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res* 2003; 92(11): 1240-6.
42. Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Grande P, Appleyard M, Nordestgaard BG. Hereditary hemochromatosis and risk of ischemic heart disease: a prospective study and a case-control study. *Circulation* 2005; 112(2): 185-93.

43. Thomas CE, Aust SD. Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch Biochem Biophys* 1986; 248(2): 684-9.
44. Cascales A, Sánchez-Vega B, Navarro N, Pastor-Quirante F, Corral J, Vicente V, et al. Clinical and genetic determinants of anthracycline-induced cardiac iron accumulation. *Int J Cardiol* 2012; 154(3): 282-6.
45. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*. 1981; 1(8233): 1293-4.
46. Salonen JT, Nyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992; 86(3): 803-11.
47. Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, Makuc DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1994; 330(16): 1119-24.
48. Pereira AC, Cuoco MA, Mota GF, da Silva FF, Freitas HF, Bocchi EA, et al. Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2001; 88(4): 388-91.
49. Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2663-8.
50. Ge XH, Wang Q, Qian ZM, Zhu L, Du F, Yung WH, et al. The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 2009; 20(11): 860-5.
51. Lakhal-Littleton S, Wolna M, Carr CA, Miller JJ, Christian HC, Ball V, et al. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is

- important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(10): 3164-9.
52. Li YQ, Bai B, Zheng QQ, Yan H, Zhuang GH. Quantitative study of iron metabolism-related genes expression in rat. *Biomed Environ Sci* 2013; 26(10): 808-19.
53. Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K, Lakka TA, Heliö T, Salonen JT. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 1999; 100(12): 1274-9.
54. Bartfay WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfay E, et al. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res* 1999; 43(4): 892-900.
55. Bartfay WJ, Hou D, Brittenham GM, Bartfay E, Sole MJ, Lehotay D, et al. The synergistic effects of vitamin E and selenium in iron-overloaded mouse hearts. *Can J Cardiol* 1998; 14(7): 937-41.
56. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2011; 1: 71-83.
57. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95-125.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.

59. Smyth JW, Vogan JM, Buch PJ, Zhang SS, Fong TS, Hong TT, et al. Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin 43 vesicles to the plasma membrane. *Circ Res* 2012; 110(7): 978-89.
60. Gerdes AM, Liu Z, Zimmer HG. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience* 1994; 5(3): 203-8.
61. Armesilla AL, Williams JC, Buch MH, Pickard A, Emerson M, Cartwright EJ, et al. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31318-28.
62. Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J. Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(3): 561-73.
63. Fernandes DC, Wosniak J Jr, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1): C413-22.
64. Mohamed TM, Abou-Leisa R, Baudoin F, Stafford N, Neyses L, Cartwright EJ, et al. Development and characterization of a novel fluorescent indicator protein PMCA4-GCaMP2 in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 63: 57-68.
65. Lian J, Xu L, Huang Y, Le Y, Jiang D, Yang X, et al. Meta-analyses of HFE variants in coronary heart disease. *Gene* 2013; 527(1): 167-73.

66. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Vaquero MP. Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 2010; 25(3): 350-65.
67. Prá D, Franke SI, Henriques JA, Fenech M. Iron and genome stability: an update. *Mutat Res* 2012; 733(1-2): 92-9.
68. Eisenstein RS. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 627-62.
69. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 197-213.
70. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7811-9.
71. Kremastinos DT, Farmakis D. Iron overload cardiomyopathy in clinical practice. *Circulation* 2011; 124(20): 2253-63.
72. Moon SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, et al. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol* 2011; 32(7): 947-52.
73. Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology* 2011; 2011: 538-42.
74. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2008; 7(3): 205-14.

75. Roy CN, Penny DM, Feder JN, Enns CA. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 9022-8.
76. Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem* 2006; 281(39): 28494-8.
77. Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004; 104(13): 4294-9.
78. Johnson MB, Enns CA. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* 2004; 104(13): 4287-93.
79. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 21): 4486-98.
80. Tsushima RG, Wickenden AD, Bouchard RA, Oudit GY, Liu PP, Backx PH. Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ Res* 1999; 84(11): 1302-9.
81. Kumfu S, Chattipakorn S, Chinda K, Fucharoen S, Chattipakorn N. T-type calcium channel blockade improves survival and cardiovascular function in thalassemic mice. *Eur J Haematol* 2012; 88(6): 535-48.
82. Mainous AG 3rd, Wright RU, Hulihan MM, Twal WO, McLaren CE, Diaz VA, et al. Telomere length and elevated iron: the influence of phenotype and HFE genotype. *Am J Hematol* 2013; 88(6): 492-6.

83. Arvapalli RK, Paturi S, Laurino JP, Katta A, Kakarla SK, Gadde MK, et al. Deferasirox decreases age-associated iron accumulation in the aging F344XBN rat heart and liver. *Cardiovasc Toxicol* 2010; 10(2): 108-16.
84. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004; 291(6): 711-7.
85. Creighton Mitchell T, McClain DA. Diabetes and hemochromatosis. *Curr Diab Rep* 2014; 14(5): 488.
86. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 2003; 107(2): 346-54.
87. Hunnicutt J, He K, Xun P. Dietary iron intake and body iron stores are associated with risk of coronary heart disease in a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Nutr* 2014; 144(3): 359-66.
88. Yang W, Li B, Dong X, Zhang XQ, Zeng Y, Zhou JL, et al. Is heme iron intake associated with risk of coronary heart disease? A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Nutr* 2014; 53(2): 395-400.
89. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202(2): 199-211.
90. Harary I, Farley B. In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. *Exp Cell Res* 1963; 29: 466-74.
91. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(3): 288-98.

92. Fu J, Gao J, Pi R, Liu P. An Optimized Protocol for Culture of Cardiomyocyte from Neonatal Rat. *Cytotechnology* 2005; 49: 109-116.
93. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research* 2005; 65: 40-51.
94. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1883-1891; 2007.
95. Chlopčikova S, Psotova J, Miketova P. Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 145:49-55; 2001.
96. Pacher P, Beckma JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
97. Li S, Jiao X, Tao L, Liu H, Cao Y, Lopez BL, et al. Tumor necrosis factor- α in mechanic trauma plasma mediates cardiomyocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1847-1852; 2007.
98. Combes A, McTiernan C, Brooks SS, Feldman AM. UV light synergistically enhances the cardiotoxic effects of interleukin 1 β through peroxynitrite formation. *Journal of Cardiac Failure* 2001; 7: 165-175.
99. Zhang YL, Wei J. R. 3-nitrotyrosine, a biomarker for cardiomyocyte apoptosis induced by diabetic cardiomyopathy in a rat model. *Molecular Medicine Reports* 2013; 8: 989-994.
100. Combelles CM, Hennes ML. Media composition: antioxidants/chelators and cellular function. *Methods in molecular biology* 2012; 912: 129-159.

101. Mortimer D. Sperm preparation methods. *Journal of Andrology* 2000; 21: 357-366.
102. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive Medicine and Biology* 2012; 11: 165-176.
103. Gedye CA, Hussain A, Paterson J, Smrke A, Saini H, Sirskyj D, et al. Cell surface profiling using high-throughput flow cytometry: a platform for biomarker discovery and analysis of cellular heterogeneity. *PLoS One* 2014; 9(8): e105602.
104. Wang Y, Wu M, Al-Rousan R, Liu H, Fannin J, Paturi S, et al. Iron-induced cardiac damage: role of apoptosis and deferasirox intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336(1): 56-63.
105. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Dominici FP, Angerosa M. Nitrosative Stress and Apoptosis by Intravenous Ferumoxytol, Iron Isomaltoside 1000, Iron Dextran, Iron Sucrose, and Ferric Carboxymaltose in a Nonclinical Model. *Drug Res* 2015; 65(7): 354-60.

ANEXO – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

CAC 3405/09/156



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.02.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **028/10** intitulado: **"USO DE SUBLINHAGENS DE CAMUNDONGOS QUE SUPEREXPRESSAM O GENE Hfe NO MIOCÁRDIO PARA REDUZIR SUSCEPTIBILIDADE A CARDIOMIOPATIAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS"** apresentado pela **Comissão Científica do Instituto do Coração.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger

Pesquisador (a) Executante : Leonardo dos Santos

CEP-FMUSP, 19 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
23/02/10
Elaíne

APÊNDICE A – Manuscrito submetido à publicação na revista *Free Radical Biology & Medicine*

Title: Neonatal cardiomyocytes ROS production, metabolism and function performance in vitro are influenced by extraction method

Corresponding Author: Prof. Dr. José E Krieger

All Authors: Leonardo Jensen; Elida Neri; Vinicius Bassaneze; Débora Levy; Douglas Veronez; Sérgio P Bydlowski; Idágene A Cestari; José E Krieger

Article type: Original Research/ Original Contribution

Dear Prof. Dr. Krieger,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in *Free Radical Biology & Medicine*.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/frbm/>

Your username is: krieger

If you need to retrieve password details, please go

to:http://ees.elsevier.com/frbm/automail_query.asp%

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to *Free Radical Biology & Medicine*. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,

Editorial Office
Free Radical Biology & Medicine

Title: Neonatal cardiomyocytes ROS production, metabolism and function performance in vitro are influenced by extraction method

Names and affiliations: Leonardo Jensen¹; Elida Neri¹; Vinicius Bassaneze¹; Débora Levy²; Douglas Veronez³; Sérgio Paulo Bydlowski²; Idágene Aparecida Cestari³; José Eduardo Krieger¹

Abbreviations: Jensen, L.¹; Neri, E.¹; Bassaneze, V.¹; Levy, D.²; Veronez, DM.³; Bydlowski, S.P.², Cestari, I.A.³, Krieger, J.E.^{1*}.

1 - Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology/LIM 13, University of São Paulo School of Medicine Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School

2 - Laboratory of Genetics and Molecular Hematology/LIM31, University of São Paulo School of Medicine Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School

3 - Bioengineering Division, University of São Paulo School of Medicine Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School

***Corresponding author:** Prof. Dr. José Eduardo Krieger: E-mail: krieger@incor.usp.br

Permanent address

Instituto do Coração (InCor) Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Av Dr Enéas Carvalho Aguiar, 44, ZIP: 05403-000. City: São Paulo State: SP. Country: Brazil

Abstract

Background

Neonatal cardiomyocytes from several different species are widely used since late 1960's for developmental, toxicological, pharmacological and physiological studies. The relatively easiness of the procedure has made appear a great number of adaptations in the protocol over the years. The impact of these differences on metabolic, functional and on population has been neglected. Here were described and compared in details two important in vitro culture methods for obtaining neonatal rat cardiomyocytes: Percoll (*Per*) and pre-plating (*PP*) extraction methods.

Methodology/Principal Findings

Curiously, cardiomyocytes obtained from pre-plating procedure had a higher lactate production (*Per* versus *PP*; mean \pm SEM; 6.13 \pm 0.09 μ mol/cell versus 7.50 \pm 0.42 μ mol/cell; p = 0.032) and glucose consumption rate (0.024 \pm 0.007 %/cell versus 0.097 \pm 0.007 %/cell; p = 0.0027; n = 3), indicating glycolytic metabolism preference even after 8 days of culture. This was correlated with an increased reactive oxygen species (ROS) production, indirectly measured by ethidium (0.6225 \pm 0.059 pmol/cell versus 1.381 \pm 0.042 pmol/cell; p <0.01; n = 5) and hydroxy-ethidium production (0.031 \pm 0.003 pmol/cell versus 0.052 \pm 0.004 pmol/cell; p <0.01; n = 5). Also protein nitration could be detected on cells under High Content Screening (HCS) (1.9 \times 10⁵ \pm 4817 versus 3.9 \times 10⁵ \pm 26980; P<0.0001; n= 3), as wells as nitrotyrosine accumulation on cell medium (0.0072 \pm 0.0011 versus 0.0019 \pm 0.0003; p=0,0092) indicating nitrosactive stress on these cells.

Conclusions/Significance

This study demonstrated that several parameters related to cell metabolism, function and structure can be different on rat neonatal cardiomyocytes depending on

the method used for cell isolation. Care should be taken on choosing the procedure in order to avoid undesired bias.

Keywords

Rat, cardiomyocytes, ROS, cardiomyocyte extraction methods, Percoll, Pre-plating

Introduction

Mammalian cardiac cells exhibit functional mechanisms with metabolic correspondence among species [1]. Further understanding on mechanisms requires well-characterized cell models that approximate the physiological behavior in vivo. In this context, primary culture of neonatal rat cardiomyocytes has been used as a tool to understand not-fully differentiated cardiomyocyte physiology and disease. Moreover, this technique allows in vitro study of drugs, including cardiotoxicity (for preliminary clinical studies), as well as strategies to promote cardiac regeneration [2].

Considering development, the mammalian heart presents a transient regenerative potential for a short period after birth. When harmed, a response characterized by cardiomyocyte proliferation with minimal hypertrophy or fibrosis is observed, however these capacities are lost by seven days of age [3]. This characteristic can be encountered on immature cardiomyocytes, which still proliferates for some days after the extraction [4, 5] in a tight regulated mechanism [6]. Also, after this period, cardiac cells shift from the glycolysis (predominant mode for ATP production) to fatty acid β -oxidation, which accounts for 60-90% of the energy demands of the heart [7, 8]. This shift involves changes in the gene expression profile, resulting in a significant increase in cardiomyocytes length and volume [9].

As the animal develops, heart size also enlarges to ensure sufficient blood flow to tissues that are undergoing growth. Cardiac output augments, requiring more contractile strength [10]. The increased number of mitochondria leads to greater generation of reactive oxygen species (ROS), and there is a parallel increase in the production of antioxidant enzymes [11].

Understanding these processes occurring simultaneously and identifying differences related to the method of obtaining these cell types increases the reliability

and comprehension of study findings. Primary culture of neonatal rat cardiomyocytes is widely used in research, including studies of oxidative stress [12]. Nonetheless, little is known about the metabolic conditions, the production of ROS, and changes in the contractile function of cardiomyocytes that might occur depending on primary culture conditions.

With the aim of understanding how these conditions can modify physiological characteristics of cells, we described and compared in details two important in vitro culture methods for obtaining neonatal rat cardiomyocytes: Percoll extraction (Per) and pre-plating (PP). We observed differences between the two methods regarding number of cells obtained, metabolism, calcium influx, and redox status after eight days of in vitro culture, pointing out the need for a judicious choice of the method for obtaining cardiac cells.

Materials and Methods

Primary culture of cardiomyocytes. Two different protocols were used for rat (*Rattus norvegicus*, Wistar) neonatal cardiomyocytes extraction; one denominated pre-plating (abbreviated as *PP*, based on *Amersilla* [13] protocol) and the other denominated Percoll (*Per* based on *Dr. Sadoshima's lab* [14] protocol) procedure. The main differences between these two protocols were on the second and third main steps. (1) *Heart obtaining and mincing step*: In common, animals were sacrificed by cervical dislocation 24 to 48 hours after born. Heart ventricles were removed with scissors to get pieces of about 1mm³ and placed in a tube containing ADS buffer 1x for washing. (2) *Enzymatic digestion step*: For *PP* procedure, the pieces were transferred to a tube 50mL falcon containing 3 mL of collagenase type II digestion solution (36mg; Sigma Aldrich - Worthington, USA) and pancreatin (18mg, Sigma-Aldrich) from a

previously prepared 90mL solution with buffer solution 1X ADS. For *Per* procedure the pieces were transferred to a 50mL tube with 3mL of collagenase II only (50mg; Sigma Aldrich - Worthington, USA) in 50mL of buffer solution 1X ADS). Each digestion was incubated at 37°C with shaking (~190 rpm) for 10 min, afterwards the supernatant was removed and twice the volume of supernatant was added with Newborn Calf Serum-NBCS (Gibco 16010-159). Cells were centrifuged at 340g (1100rpm) for 5min. Supernatant was carefully poured off and then pellet was suspended in 10 mL plating medium and retained at 37°C and 5% of CO₂. This digestion procedure was repeated six times. (3) *Isolation/purification step*: At the end of digestion, for *PP* method cells were passed in 100µm cell strainer followed by 2 mL fresh medium into empty Falcon. The content was plated in a T150 flask pre plating for 45 min at 37°C for fibroblasts adhesion. Supernatant of pre plating was centrifuged at 340g for 5 minutes then pellet resuspended in 15 mL complete culture medium of DMEM-Low and 199 mixture (4:1) with 10% of HRS (Horse Serum), 5% of NBCS and 1% of Bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma B5002). Cells were counted and plated on laminin-coated plates in 10⁵cells/cm². For the *Per* method at the end of digestion step, 32mL of ADS 1x were added in falcon tube with phenol red, 2mL of cells suspension were overlaid on top of Percoll and centrifuged at 3000 rpm, 30min, with deceleration speed. Next, upper and middle layer of Percoll-separated digests were aspirated. Cells were centrifuged at 340g (1100rpm) for 5min, then the pellet was resuspended in 15 mL complete culture medium of DMEM-High with 10% of Horse Serum-HRS (Gibco 26050-088), 5% of NBCS and 1% of BrdU. Cells were counted and also plated on laminin-coated plates with 10⁵cells/cm². For experiments, cells were only used after 8 days. This long period was chose to prevent acute minor alterations on cells that can be observed after the extraction procedure and minimize variability.

Measurements of glucose consumption and lactate production: For this measurement, cardiomyocytes culture medium was exchanged on day 6 after

extraction. After 48 hours of conditioning, media were collected for glucose consumption and lactate production assessment. Data was acquired using electrolytes counter (FLEX ABL800, Radiometer Copenhagen). To calculate the glucose rate consumption the following formula was used: $\text{LacC} = (C_i - C_f)/C_i$, where C is the initial concentration of glucose for each culture medium and Cf the final concentration. Values were normalized according to number of cells and the initial amount of glucose available in each medium type used.

HPLC conditions: Separation of dihydroxyethidium (DHE), hydroxyethidium (EOH), and ethidium was performed as previously described [15]. The optimal wavelength emission range for EOH detection was considered 570–580 nm, while 595 nm was used for both EOH and ethidium detection. Chromatographic separation was carried out using Phenomenex columns in a HPLC system (Waters) equipped with a rheodyne injector and photodiode array (W2996) and fluorescence (W2475) detectors. Solutions A (pure acetonitrile) and B (water/10% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) were used as a mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. Runs started with 0% solution A. A linear increase to 40% solution A during the initial 10 min was performed. This proportion was kept for additional 10 min and finally changed to 100% solution A for additional 5 min, and to 0% solution A on the last 10 min. DHE was monitored by ultraviolet absorption at 245 nm. EOH and ethidium were monitored by fluorescence detection with excitation 510 nm and emission 595 nm. Quantification was performed by comparison of integrated peak areas between the obtained and standard solutions under identical chromatographic conditions. DHE as molecules were used on cell culture (Invitrogen, catalog number D-116). Aliquots containing 2mM of DHE in DMSO were suspended in Hank's Balanced Salt Solution-HBSS (Gibco 14025-076). DHE was incubated at 37°C for 30 min on cardiomyocytes primary culture in 50µM concentration. The samples were washed with HBSS, collected, and lyophilized. Finally, samples

were suspended in solution A and injected in HPLC equipment (60 μ L) for measurement.

Measurement of GSSG/GSH ratio. Cells were lysed, suspended in 5% sulphosalicylic acid and centrifuged at 13,000 g to separate the proteins. For the quantification of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione we used the Glutathione Fluorescent Detection Kit (K006 F-1, Arbor Assays, Ann Arbor, Michigan, USA) according to manufacturer's instructions.

NO production. 50 μ L Nitric oxide was indirectly evaluated by measurement of nitrite (NO_2^-). Briefly, after 8 days of primary culture of cardiomyocytes the medium was collected and injected into a reflux chamber containing vanadium(III) in 3N HCl heated to temperature higher than 85°C. The analyzer was calibrated on the day of the experiment with NO_3^- standards, and the results were normalized to the cell number in the plate.

High Content Screening (HCS): Apparatus ImageXpress Micro-Widefield High Content Imaging System (Molecular Devices) acquired immunofluorescence assays were performed in the dark edges of plate 96 wells (Sigma CLS3603) images. Cells were fixed with 4% PFA for 60 minutes at room temperature, washed two times with PBS and for permeabilization Nonidet p40 (Sigma 74385) was used for 30 minutes followed by two washes with PBS. Blocking was done with 5% BSA for 60 minutes at room temperature. All primary antibodies were diluted in 2% BSA and incubated overnight at 4°C. The proportion of antibody used was 1:200 Troponin I (Abcam ab47003); 1:200 CD31 (Abcam ab24590); 1:100 CD90 (BD 555593) and 1:200 anti-nitrotyrosin (Sigma N5538). After incubation with primary antibody, cells were washed twice with PBS and incubated with secondary antibody. All cells were incubated with 1:100 DAPI (Molecular Probes D1306) for one hour at room temperature and protected from light, as well as the secondary antibody was incubated in ratios of 1:300 for 3

hours in room temperature. After this period, cells were washed twice with PBS, and images were obtained.

Global assessment of intracellular calcium influx: Parameters related to the global contractility of cardiac cells for both protocols were evaluated on Fluostar Omega plate reader equipment using a protocol adapted from Mahomed and cols [16]. This equipment allows for rapid and automated evaluation for quantification of fluorescence emitted in adhered cells. The cardiomyocyte cultures were incubated with Fluo-4 NW fluorophore Calcium Assay kit (Life Technologies F36206) for 45 min at 37°C in 5% CO₂. Subsequently, the unstimulated fluorescence intensity measurements were made by the method "well scanning". Nine readings at different locations of each well for each condition were made, including at least four methodological replicates. Quantitation of intracellular calcium influx over time was performed by injection of isoprenaline 1nM to each well. Fluorescence levels were acquired every 20ms at 37°C by setting "well mode" on the equipment. All readings were adjusted for gain acquisition sensitivity equal to 1763, considering excitation light at 485 nm and emission at 520nm. The average intensities at "well scanning" mode were normalized by the total number of cells. For "well mode" a formula with more normalizing parameters was used:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{(F - F_{\text{base}})}{(F_{\text{base}} - B)}$$

F indicates the measured fluorescence amount, Fbase is the fluorescence before the stimulus and B is the signal without the fluorophore inside the well.

Statistical Analysis: Different cardiomyocytes extractions (containing a pool of 3 or more isogenic 1-2 day-old animals) were considered for sample enumeration and were paired with at least four replicates in the same day of experiment. Data are

expressed as means \pm SEM or as mean percentage \pm SEM. Differences on the mean of *Per* and *PP* groups are compared using t test ($p < 0.05$ for significance). When more than two elements were considered, 1W-ANOVA with Bonferroni posttest ($p < 0.05$) were used.

Results

First, we wanted to clarify if cardiomyocytes obtained by Percoll or Pre-plating methods had relevant cellular metabolism differences after being maintained eight days of culture. Curiously, cardiomyocytes obtained from pre-plating procedure had a higher lactate production (*Per* versus *PP*; mean \pm SEM; 6.13 ± 0.09 $\mu\text{mol}/\text{cell}$ versus 7.50 ± 0.42 $\mu\text{mol}/\text{cell}$; $p = 0.032$; $n = 3$; Figure 1A) and glucose consumption rate (0.024 ± 0.007 $\%/ \text{cell}$ versus 0.097 ± 0.007 $\%/ \text{cell}$; $p = 0.0027$; $n = 3$; Figure 1B), indicating a glycolytic metabolism.

Next, we tested whether this correlates with an increase of ROS production. Through quantification of oxidative degradation of DHE (included on cell culture), it was also possible to indirectly observe a significant increase of ROS in the *PP* protocol when compared to *Per* protocol. This is indicated by a significant increase of ethidium (0.6225 ± 0.059 $\mu\text{mol}/\text{cell}$ versus 1.381 ± 0.042 $\mu\text{mol}/\text{cell}$; $p < 0.01$; $n = 5$; Figure 1C) and hydroxy-ethidium production (0.031 ± 0.003 $\mu\text{mol}/\text{cell}$ versus 0.052 ± 0.004 $\mu\text{mol}/\text{cell}$; $p < 0.01$; $n = 5$; Figure 1D). Because there are different amounts of antioxidants on the original formulation of culture medium used in each method, a new measurement was performed exchanging the medium types between cultures since the first day of extraction, but obtaining similar results (Figure 1C and 1D).

To explore if there were changes in overall ability to balance the effect of oxidative stress, we measured on both protocols the amount of oxidized and reduced glutathione peroxidase, however, no significant differences were observed (Figure 1E and F).

On another hand, and increase on protein nitration on PP group was detected ($1.9 \times 10^5 \pm 4817$ versus $3.9 \times 10^5 \pm 26980$; $P < 0.0001$; $n = 3$), as well as nitrotyrosine accumulation on cell medium (0.0072 ± 0.0011 versus 0.0019 ± 0.0003 ; $p = 0.0092$; $n = 3$; Figure 1H and 1I). These changes were accompanied by a quantitative nitrite accumulation in the culture medium (0.187 ± 0.037 pmol/cell versus 0.723 ± 0.107 pmol/cell; $p = 0.0092$; $n = 3$; Figure 1G).

Next, general cell culture parameters were compared between the two methods. The number of heart cells by heart obtained was significantly higher on Pre plating method when compared to Percoll method ($2.56 \times 10^6 \pm 0.13$ cells versus $3.5 \times 10^6 \pm 0.17$ cells; $n = 7-8$; Figure 2A). In addition, prevalence of endothelial cells, fibroblasts and cardiomyocytes were accounted after eight days of primary extraction (Figure 2B). Cardiomyocytes were labeled as Troponin I+ cells, which was averaged at 58.43% for *PP* and 61.24% for *Per* protocol ($p > 0.05$). CD90+ fibroblasts accounted as 34.79% for *PP* and 37.65% for *Per* Protocol ($p > 0.05$). CD31+ endothelial cells represented 6.78% on *PP*, and only 1.11% *Per* method ($n = 5$, $p < 0.05$). Besides, we observed a significant increase on Troponin I quantity inside cells (250400 ± 105400 versus 636900 ± 182800 $N = 5$; $p < 0.05$; $n = 5$; Figure 2A). Furthermore, comparison of cell cycles in the different extraction methods demonstrated to be similar (16% versus 11% in the G0 phase / G1; 50% versus 47% for the S-phase synthesis, and finally 34% versus 42% for G2 phase; $p > 0.05$; $n = 4$).

Lastly, the global contractile activity was measured indirectly by intracellular calcium influx through a high throughput approach. It was observed a fixed increased beating rate for pre-plating-prepared cells (Figure 3A and 3B). In addition, the basal intracellular calcium quantity was significantly higher for *PP* method, indicated by higher fluorescence intensity (7.44 ± 0.5426 versus 5.42 ± 0.6331 ; $p = 0.04$; $n = 7$; Figure 3C and 3D), and was sustained over time. When cells were challenged with 1nM

isoprenaline to increase beating rate and beating strength, PP method also presented higher fluorescence (169.2 ± 21.02 versus 70.89 ± 9.446 ; $n=5$; Figure 3E and 3F).

Discussion

Neonatal cardiomyocytes are widely used for developmental, toxicological, pharmacological and physiological studies since 1960's [17]. The procedure is considered relatively easy [18], when compare to adult cardiomyocyte Langendorf method. However, several protocols with adaptations exists [18, 19] and the scientific community is not aware of the impacting differences on cells that may be related to the extraction procedure itself. The procedure consists of three main steps: heart obtaining and mincing, enzymatic digestion and purification/isolation of cardiomyocytes. In this work we tested the hypothesis that protocols that have their main differences focused on the two last steps (digestion and purification) could result in cardiomyocytes population with relevant dissimilarities.

Results indicated that both protocols were efficient in obtaining a high yield of cardiomyocytes, despite small differences on cell numbers. The main differences observed concerned cardiomyocytes metabolism, ROS production, and functional behavior. The increased lactate production and glycolysis rate indicates higher metabolic activity on pre plating method, and an increased beating rate on this population corroborates the data.

Both populations were similar regarding cardiomyocytes (approximately 60%) and fibroblasts (35%) percentages, regardless of the method used. In vivo studies observed approximately 30%-50% of cardiomyocytes [20, 21] on heart population. Percoll procedure is known to remove up to 90% of fibroblasts [22]. Our findings indicated that enrichment by both methods was consistent and even after 8 days of

culture the fibroblast population was unable to surrogate the population of cardiomyocytes.

Nitrotyrosine can be used as an indicator of nitrosative stress [23]. Peroxynitrite readily yields nitrotyrosine, which rapidly decomposes into tyrosine and nitrite. Consequently, our results indicated that a higher nitrosative stress is ongoing on PP protocol based cells. On cardiomyocytes, oxidative/nitrative stresses caused by mechanical or chemical damage [24, 25] or hypoxia [26] can result in apoptosis. The available NO for nitration of tyrosines can have several sources, and both peroxynitrite [27, 28] or myeloperoxidase nitrite conversion [29] have already been studied on cardiomyocytes context. The underlying mechanism specifically for neonatal cardiomyocytes deserves further elucidation.

The most prominent differences between protocols are the amounts and types of digestion enzymes used in each of the techniques and the method used for purification/isolation. The cell medium formulation can trigger the generation of excessive levels of ROS [30]. Initially, we believed that oxidative stress could be related to the different cell medium composition on each protocol. Nevertheless, we demonstrated by HPLC that cell medium composition did not alter the redox state of pre-plated cells in comparison with Per.

Percoll is composed by colloidal silica particles coated with polyvinylpyrrolidone (PVP) and is generally considered non-toxic and with very low osmotic activity. However, its use for spermatozoids preparation was discontinued because of evidences that it reduces cell motility and viability possibly because of high endotoxin levels in some batches [31]. Evidences that PVP causes cell membrane injury (by transmission electron microscopy), and its association with chromosomal abnormalities are suggestive of problems [32]. Finally, digestive enzymes can change the cell surface protein profile [33] in a long-term manner.

In the present study, we used advanced and safe techniques with quantification algorithms pre-established in software for immunofluorescent HCS assays as well as for global calcium influx using Fluostar Omega plate reader equipment. One limitation of the latter technique is that it does not allow us to assess whether the increased intracellular calcium influx in PP protocol corresponds to increased synchrony in cardiac cell cultures or to an actual increase in cardiomyocyte contractile strength. Nevertheless, the increased responses observed for pre-plating prepared cells suggest that these cells are more active. In sum, both protocols were efficient in obtaining a high yield of cardiomyocytes but presented noticeable differences; therefore, the choice of the method must take into account the study hypothesis.

Conclusions

This study demonstrated that several parameters related to cell metabolism, function and structure can be different on rat neonatal cardiomyocytes depending on the method used for cell isolation. Care should be taken on choosing the procedure in order to avoid undesired bias.

Acknowledgements

LS receives training fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and VB receives training fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2011/19678-1). This work was funded by grants from FAPESP. We also want to thank Laura I. V. Brandizzi for technical assistance on nitrite measurement assay.

Bibliography

- [1] Mitcheson, J. S.; Hancox, J. C.; Levi, A. J. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular research* **39**:280-300; 1998.
- [2] Parameswaran, S.; Kumar, S.; Verma, R. S.; Sharma, R. K. Cardiomyocyte culture - an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges. *Can J Physiol Pharmacol* **91**:985-998; 2013.
- [3] Porrello, E. R.; Mahmoud, A. I.; Simpson, E.; Hill, J. A.; Richardson, J. A.; Olson, E. N.; Sadek, H. A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**:1078-1080; 2011.
- [4] Collesi, C.; Zentilin, L.; Sinagra, G.; Giacca, M. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *The Journal of cell biology* **183**:117-128; 2008.
- [5] Sen, A.; Dunnmon, P.; Henderson, S. A.; Gerard, R. D.; Chien, K. R. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen. *The Journal of biological chemistry* **263**:19132-19136; 1988.
- [6] Mahmoud, A. I.; Kocabas, F.; Muralidhar, S. A.; Kimura, W.; Koura, A. S.; Thet, S.; Porrello, E. R.; Sadek, H. A. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* **497**:249-253; 2013.
- [7] Kolwicz, S. C., Jr.; Purohit, S.; Tian, R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* **113**:603-616; 2013.
- [8] Lopaschuk, G. D.; Ussher, J. R.; Folmes, C. D.; Jaswal, J. S.; Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **90**:207-258; 2010.
- [9] Madrazo, J. A.; Kelly, D. P. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* **44**:968-975; 2008.
- [10] Arany, Z.; He, H.; Lin, J.; Hoyer, K.; Handschin, C.; Toka, O.; Ahmad, F.; Matsui, T.; Chin, S.; Wu, P. H.; Rybkin, I.; Shelton, J. M.; Manieri, M.; Cinti, S.; Schoen,

F. J.; Bassel-Duby, R.; Rosenzweig, A.; Ingwall, J. S.; Spiegelman, B. M. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* **1**:259-271; 2005.

[11] Jezek, P.; Hlavata, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2478-2503; 2005.

[12] Roth, E.; Marczin, N.; Balatonyi, B.; Ghosh, S.; Kovacs, V.; Alotti, N.; Borsiczky, B.; Gasz, B. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Exp Clin Cardiol* **16**:92-96; 2011.

[13] Armesilla, A. L.; Williams, J. C.; Buch, M. H.; Pickard, A.; Emerson, M.; Cartwright, E. J.; Oceandy, D.; Vos, M. D.; Gillies, S.; Clark, G. J.; Neyses, L. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *The Journal of biological chemistry* **279**:31318-31328; 2004.

[14] Morisco, C.; Zebrowski, D. C.; Vatner, D. E.; Vatner, S. F.; Sadoshima, J. Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **33**:561-573; 2001.

[15] Fernandes, D. C.; Wosniak, J., Jr.; Pescatore, L. A.; Bertoline, M. A.; Liberman, M.; Laurindo, F. R.; Santos, C. X. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**:C413-422; 2007.

[16] Mohamed, T. M.; Abou-Leisa, R.; Baudoin, F.; Stafford, N.; Neyses, L.; Cartwright, E. J.; Oceandy, D. Development and characterization of a novel fluorescent indicator protein PMCA4-GCaMP2 in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **63**:57-68; 2013.

[17] Harary, I.; Farley, B. In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. *Experimental cell research* **29**:466-474; 1963.

[18] Louch, W. E.; Sheehan, K. A.; Wolska, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* **51**:288-298; 2011.

- [19] Fu, J.; Gao, J.; Pi, R.; Liu, P. An Optimized Protocol for Culture of Cardiomyocyte from Neonatal Rat. *Cytotechnology* **49**:109-116; 2005.
- [20] Camelliti, P.; Borg, T. K.; Kohl, P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research* **65**:40-51; 2005.
- [21] Banerjee, I.; Fuseler, J. W.; Price, R. L.; Borg, T. K.; Baudino, T. A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**:H1883-1891; 2007.
- [22] Chlopcikova, S.; Psotova, J.; Miketova, P. Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **145**:49-55; 2001.
- [23] Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**:315-424; 2007.
- [24] Li, S.; Jiao, X.; Tao, L.; Liu, H.; Cao, Y.; Lopez, B. L.; Christopher, T. A.; Ma, X. L. Tumor necrosis factor-alpha in mechanic trauma plasma mediates cardiomyocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**:H1847-1852; 2007.
- [25] Combes, A.; McTiernan, C.; Brooks, S. S.; Feldman, A. M. UV light synergistically enhances the cardiotoxic effects of interleukin 1beta through peroxynitrite formation. *Journal of cardiac failure* **7**:165-175; 2001.
- [26] Zhang, Y. L.; Wei, J. R. 3-nitrotyrosine, a biomarker for cardiomyocyte apoptosis induced by diabetic cardiomyopathy in a rat model. *Molecular medicine reports* **8**:989-994; 2013.
- [27] Gunaydin, H.; Houk, K. N. Mechanisms of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine. *Chem Res Toxicol* **22**:894-898; 2009.
- [28] Polewicz, D.; Cadete, V. J.; Doroszko, A.; Hunter, B. E.; Sawicka, J.; Szczesna-Cordary, D.; Light, P. E.; Sawicki, G. Ischemia induced peroxynitrite dependent modifications of cardiomyocyte MLC1 increases its degradation by MMP-2 leading to contractile dysfunction. *J Cell Mol Med* **15**:1136-1147; 2011.
- [29] Yan, Z.; Liang, F.; Guo, L.; Wang, J.; Wang, X. L.; Cheng, X. L.; Ma, X. L.; Liu, H. R. Myeloperoxidase increased cardiomyocyte protein nitration in mice subjected to

nonlethal mechanical trauma. *Biochemical and biophysical research communications* **393**:531-535; 2010.

[30] Combelles, C. M.; Hennes, M. L. Media composition: antioxidants/chelators and cellular function. *Methods in molecular biology* **912**:129-159; 2012.

[31] Mortimer, D. Sperm preparation methods. *Journal of andrology* **21**:357-366; 2000.

[32] Kato, Y.; Nagao, Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive medicine and biology* **11**:165-176; 2012.

[33] Gedye, C. A.; Hussain, A.; Paterson, J.; Smrke, A.; Saini, H.; Sirskyj, D.; Pereira, K.; Lobo, N.; Stewart, J.; Go, C.; Ho, J.; Medrano, M.; Hyatt, E.; Yuan, J.; Lauriault, S.; Kondratyev, M.; van den Beucken, T.; Jewett, M.; Dirks, P.; Guidos, C. J.; Danska, J.; Wang, J.; Wouters, B.; Neel, B.; Rottapel, R.; Ailles, L. E. Cell surface profiling using high-throughput flow cytometry: a platform for biomarker discovery and analysis of cellular heterogeneity. *PloS one* **9**:e105602; 2014.

Legends

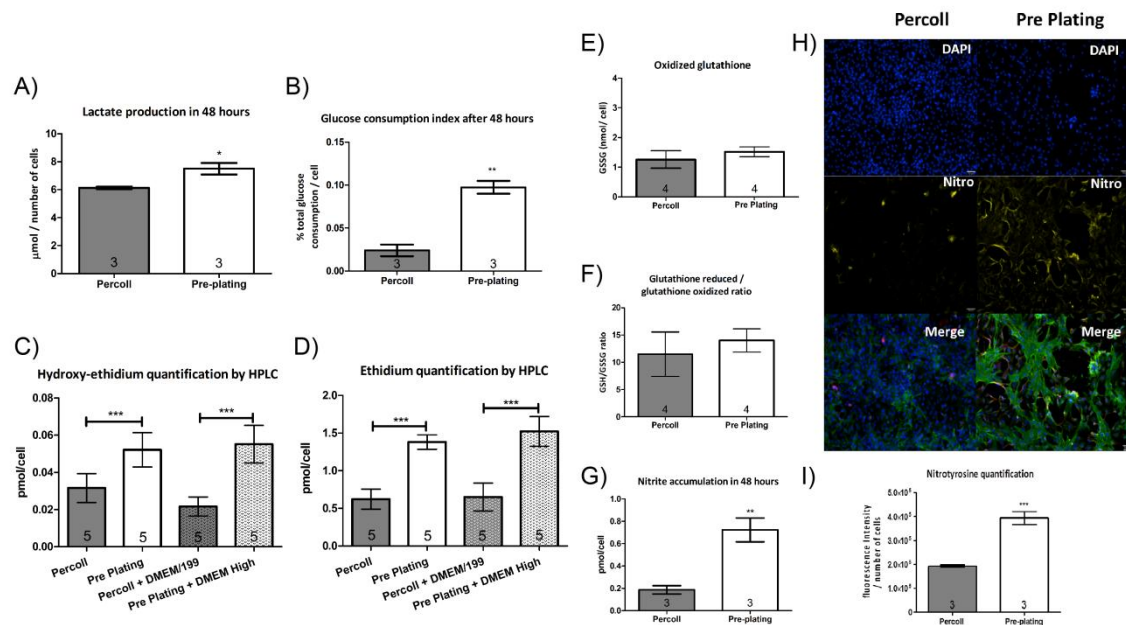


Figure 1- Cardiomyocyte metabolic influences depending on extraction method.

(A) Lactate production on conditioned medium after 48h incubation. (B) Glucose consumption ((Delta Glucose)/ Initial Glucose concentration) / cell number on conditioned medium after 48h). (C) Hydroxy ethidium and (D) Ethidium quantification to indirectly determinate ROS production. Cell culture medium was switched in order to prove the independence of formulation on cell ROS production profile. Oxidized Glutathione (E) and ratio between glutathione reduced to glutathione oxidized as an indicative for cell response to oxidative stress. (G) Nitrite production, related to nitroperoxyde. (H) Representative image and (I) quantification of nitrotyrosine on cardiac cells, assayed by HCS.

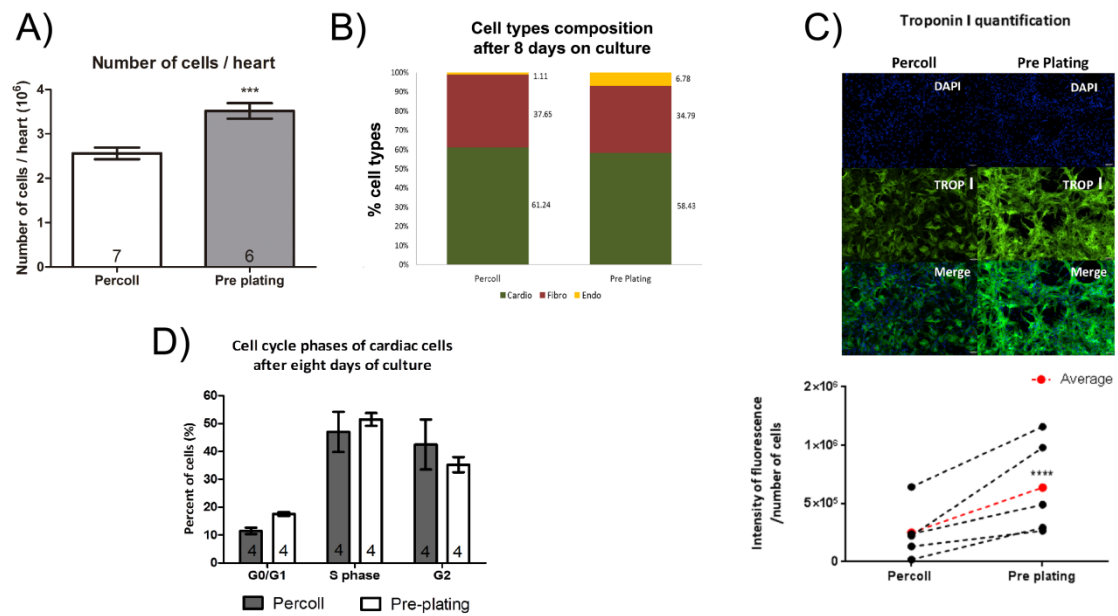


Figure 2- General cell culture parameters were not influenced by different methods, except troponin I quantity per cell. (A) Number of cells (million) obtained from each rat heart considering both methods. (B) Composition of major cell population considering Troponin I+ cells as cardiomyocytes, CD90+ cells as cardiac fibroblasts and CD31+ cells as endothelial cells. (C) Representative images of troponin I and quantitative measurement. (D) Percentage of cells on different G0/G1, S and G2 cell cycle phases.

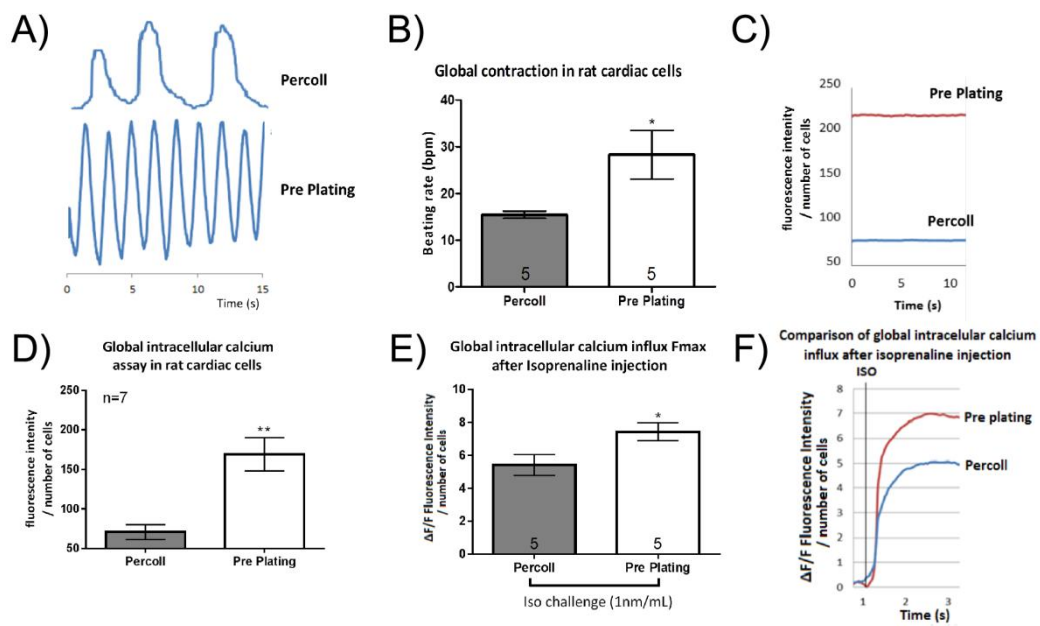


Figure 3- Cardiomyocyte functional influence depending on extraction method

(A) Representative image of fluorescence that is related to global intracellular calcium along time. From this data was possible to obtain the (B) average beating rate. (C) basal intracellular calcium along time and (D) average comparing both methods. (E) Variation on fluorescence after isoprenaline injection on cell culture medium plate. (F) Representative image for comparison of differential response after isoprenaline injection.

APÊNDICE B – Manuscrito não submetido à publicação

Este artigo não pode ser publicado por problemas metodológicos; foram encontradas duas mutações genéticas não descritas para o gene de interesse inserido nos animais transgênicos utilizados neste trabalho (Figura 1). A mutação gera um códon de parada da transcrição e, portanto, sem explicações diretas do verdadeiro efeito cardioprotetor. Além disso, este animal foi desenvolvido por meio da técnica de recombinação homóloga, fato que não garante que as sequências inseridas do gene Hfe foram para regiões seguras dos cromossomos e que as diferenças encontradas sejam, de forma confiável, atribuídas ao inserto do Hfe incorporado ao DNA dos animais transgênicos.

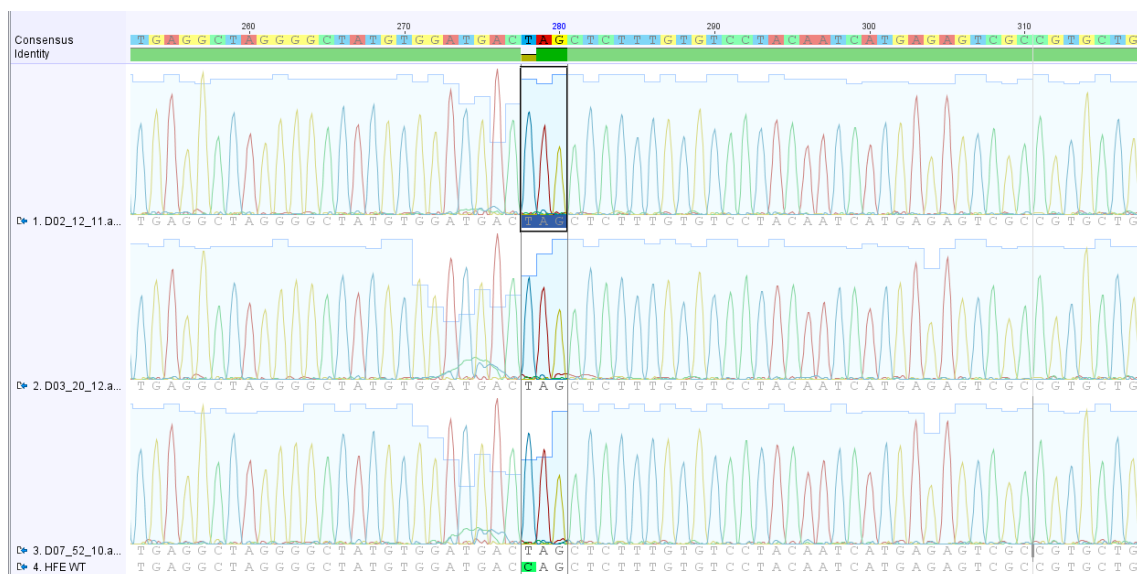


Figura 1. Resultado do sequenciamento de três animais, o códon de parada está sinalizado como primeiro sítio de mutação (stop códon).

Iron-regulatory protein Hfe exerts cardioprotective effects in mice

ABSTRACT

Mutations in *Hfe* cause the most common form of hereditary hemochromatosis (HH). We hypothesized that in this situation the *Hfe* gene exerts cardioprotective effect. We designed MHC-*Hfe* transgenic mice that overexpress *Hfe* under control of a specific myocardial promoter (α -Myosin Heavy Chain: MHC). Comparing MHC-*Hfe* against FVB background (WT), no differences were found between biometric, hematological, and biochemical parameters related to iron metabolism. The *Hfe* gene in MHC-*Hfe* mice were overexpressed in the heart ~3.3-fold, without differences in other organs, resulting in smaller iron accumulation in the heart from 6 months of life. Moreover, MHC-*Hfe* mice at 3 months had lower oxidative stress by nitrotyrosine in the heart (70.04 ± 13.12 vs 87.54 ± 7.09 WT). We induced iron overload for 4 weeks (10 mg iron dextran/day), and observed that the mortality was significantly lower in transgenic animals (12.5% vs. 42.1% WT) despite similar serum iron levels (562 ± 48 $\mu\text{g/dL}$ vs. 613 ± 64 $\mu\text{g/dL}$ WT). In MHC-*Hfe* mice, there were less accumulation of iron in the heart (2.0 ± 0.1 vs. 3.3 ± 0.2 mg/g WT), less hepatic and pulmonary congestion and similar accumulation of iron in the liver, spleen, and aorta compared with WT. Posteriorly, we treated animals with isoproterenol (30mg/kg/h, 4 weeks), and MHC-*Hfe* animals had a significant reduction in cardiac hypertrophy 83.14 ± 8.45 vs 116.9 ± 19.70 WT, as well as in the production of collagen resulting from cardiac remodeling (3.75 ± 0.37 vs 5.08 ± 1.04 WT), and MHC-*Hfe* mice did not develop pulmonary congestion. Overexpression of *Hfe* in the myocardium was sufficient to reduce oxidative stress and able to mitigate the deleterious phenotype of iron overload and treatment with isoproterenol, suggesting a relevant role of this protein in the heart.

Funding: CNPq and Zerbini Fundation

INTRODUCTION

Genetic iron overload is a disorder found in hereditary hemochromatosis (HH) predominantly caused by mutations in the *Hfe* gene (1), which promotes chronic increase in iron absorption in parenchymal cells. The protein encoded by the hemochromatosis gene (*Hfe*) usually participates in inhibitory pathways for iron absorption and may cause progressive tissues deposition of the metal resulting in hepatic cirrhosis, hepatocellular carcinoma, diabetes, hypogonadism, arthritis, premature death and heart failure (2-7).

Iron is an essential component for normal function of living organisms; a catalyst for oxidation-reduction processes and energy production into the cells. However, in excess it can be extremely cytotoxic due to ability in generating oxidative stress (8, 9). In the heart, iron overload conducts to myocarditis with ventricular arrhythmias and dysfunction, following by heart failure that represents the major cause of death in these patients (10).

The relevance of the *Hfe* gene has been studied using a transgenic mouse model that mimics the human *Hfe* mutation (11, 12) as well as using a knockout mice for this mutation (13-16). These studies showed that animals exhibited similar susceptibility to iron overload in many tissues compared to human HH (17, 18) and subsequent heart diseases (17, 19).

We have previously reported that polymorphisms in the *Hfe* gene are associated with ischemic cardiomyopathy and mortality. However, the role played by the *Hfe* gene in the heart remains to be elucidated, suggesting that *Hfe* mutations may be not only a possible genetic marker for increased cardiovascular risk, but also that it could play an important role in protecting the heart in pathological situations (20).

Based on clinical data obtained by our group here we tested the hypothesis that *Hfe* gene exerts cardioprotective effect and to better understand its function we generated a mutant mouse model of cardiac-specific overexpression of *Hfe* under cardiac alpha-myosin heavy chain promoter (MHC-*Hfe*) and challenged these animals with chronic iron overload and with chronic isoproterenol treatment.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Three hundred and eighteen Brazilian patients (n=318) with heart failure and cardiomyopathy of different etiologies were studied. We investigated mortality risk according with the presence of at least one *Hfe* mutated allele using a Cox hazard

model (C282Y and/or H63D). Patients were prospectively followed-up from March, 1995 till March 2005 and the end-points of mortality or heart transplantation were used in this analysis.

Assessment of Hfe mutations genotypes

The 5-ml blood samples were drawn into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid. Primers used to amplify the fragments encompassing the C282Y and H63D mutation sites included internal restriction enzyme control sites (21). After amplification, the polymerase chain reaction (PCR) product generated using the primers for the C282Y mutation was digested with RsaI. The 390-bp PCR reaction product digested with RsaI shows 2 fragments of 249 and 141 bp in normal DNA, whereas mutant DNA generates 2 new fragments (112 and 29 bp). The PCR product generated using primers for the H63D mutation was digested with MboI. The H63D mutation destroys an MboI site in the 294 bp PCR product, whereas normal DNA generates 3 fragments of 138, 99, and 57 bp. Digestion products were visualized by electrophoresis in a 3% agarose gel with ethidium bromide and stored in digital form.

Animals

All studies were performed according to protocols approved and followed institutional guidelines for care and use of laboratory animals, and the Institutional Review Board of the University of São Paulo Medical School, Brazil. To establish an *in vivo* mouse model for cardiac-specific overexpression of hemochromatosis (*Hfe*) gene, we cloned *Hfe* gene under the control of cardiac alpha-myosin heavy chain (α MHC) promoter construct to generate the transgenic mouse MHC-*Hfe*. Transgenic mice with cardiac-specific overexpression of *Hfe* (MHC-HFE) were backcrossed into a FVB background (WT). *Hfe* genotyping was by PCR using a *Hfe* sense primer (5' - TGCTGAACACGGAAGAGAG - 3'), and an antisense primer (5' - CATTAAATCAGCGTATCCACATAGC - 3'). Except when stated otherwise, all mice were male with 8-10 weeks of age at the time of the studies. In all experiments, WT mice were used as controls with the same age.

Iron-dextran treatment

Iron-dextran (Ferrodex®, kind gift from Tortuga, SP, BR) was diluted in saline and administered via intraperitoneal (ip) injection at a dose of 10 mg per injection, or saline (0.5 mL NaCl 0.9%) every other day for 4 weeks in transgenic MHC-*Hfe* mice and FVB controls (19, 22).

Isoproterenol treatment

Transgenic animals and WT were treated with Isoproterenol hydrochloride (Sigma) at a dose of 30mg/kg/h with osmotic minipumps (Alzet, 2002) implanted subcutaneously for four weeks (23, 24).

Cardiac morphological and functional assessment

Cardiac morphology and function were monitored by SEQUOIA 512 imaging system (ACUSON Corporation, Mountain View, CA) at baseline and at the end of the treatment period. Images were recorded under anesthesia with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg). Heart sonographic structural parameters were determined using the M-mode and bi-dimensional mode (B-mode) images. The chamber and the wall of left ventricle were calculated from linear measurements and ejection fraction (EF%) was calculated by Teicholz method according to Shumin Gao et. al. (25).

Euthanasia and postmortem analyses

At the end of the experimental period, mice were euthanized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip). Right ventricle and lung were removed, weighted, and results expressed relative to tibia length. The heart, liver, duodenum, and aorta were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Whole blood for complete blood counts was collected and analyzed on cell analyzer (Sysmex XT2000I). Blood was collected for other purposes and serum iron values and total iron binding capacity (TIBC) were determined by automatized photolorimetry (Modular 1 Roche). Percent transferrin saturation was calculated as serum iron / (TIBC) × 100.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted from heart using TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's instructions, The extracted RNA was quantified with NanoDrop spectrophotometer, and 3.0 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA by using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative real-time PCR was performed according to previous report (26). Genes of interest were measured by RT-PCR (Applied Biosystem, ABI Prism® 7700 Sequence Detection System) using the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) followed by the melting curve protocol to verify the specificity of the amplicon generation. Cyclophilin A (*CypA*) was used as a housekeeping internal control gene. The comparative delta delta CT ($\Delta\Delta Ct$) method was used for data analyses (27). Hfe (by GenBank access), forward primer 5'-

CATCAGTGGAGTCACCGTCT-3' and reverse primer 5'-
 CTCTCTTCCGTGGTTCAGC-3'; and Cyclophilin A, forward primer 5'-
 AATGCTGGACCAAACACAAA-3' and reverse primer 5'-
 CCTTCTTTACCTTCCCAA-3'.

Immunohistochemistry

Hfe expression on cardiac, liver and intestinal tissue was performed by immunohistochemistry. Sections embedded in paraffin were first treated with antigenic exposure, and then blocked with 1% casein solution in phosphate-buffered saline. Tissue sections were then incubated with anti-*Hfe* antibody (1:100; sc-18806, Santa Cruz Biotech) for 18 hours at 4°C. Sections were incubated with a secondary antibody (Kit LSAB-DAKO) for 30 min and then with DAB substrate-chromogen solution counterstained with Mayer's hematoxylin.

Isolation of neonatal cardiomyocytes

Primary culture neonatal mouse cardiomyocytes were established according to previously described (28). Briefly, hearts excised from 1-3 days-old FVB mice were cut into 1.0 mm³ pieces and digested with Collagenase II (Worthington, USA) for 15 minutes, in six different rounds. Fibroblasts were removed by pre-incubation for 2 hour at 37 °C. The non-adherent cells were collected and seeded in 6-well plate containing H-DMEM supplemented with 10% FBS, BrdU 10 µM (Roche, USA) and antibiotics for 24 h. After this period, cells were maintained in H-DMEM +10% FBS without BrdU.

Immunofluorescence

Cardiomyocytes were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes at 4°C, washed in PBS and permeabilized with 0.1% Nonidet P-40 for 30 minutes at room temperature. After blocking with 2% casein diluted in PBS for 1 hour at room temperature, the samples were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: animal anti-sarcomeric tropomyosin (1:200, T-9283, Sigma-Aldrich), animal anti-*Hfe* (1:100, sc-18806, Santa Cruz Biotech.). The secondary antibodies used were ALexa 488 and 555 (1:300, Molecular probes, Inc, Eugene, OR). Images were obtained using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

Protein Extraction and 3-Nitrotyrosine quantification

Proteins were extracted from heart (LV) through mechanical lysis with extraction buffer 1% TRITON X-100, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 25mM HEPES supplemented with PMSF (Sigma), phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2 (Sigma) and total protease inhibitor (Sigma). Total protein were quantified by Bradford assay according to manufacture and measured with Victor²™ Wallac 1420 multilabel counter. 3-Nitrotyrosine concentrations were quantified in 0,5 µg/µl from LV tissue protein with commercially available sandwich ELISA kit (East Biopharm Kit) according to manufacture recommendations (29).

Body weight, heart weight and lung congestion

As a valuable index of congestion and therefore a degree of heart failure, the water content in the lungs was calculated. For this purpose, lungs were isolated, excised and immediately weighed, obtaining the wet weight (Wwt) of the piece. These samples were kept in desiccator (70°C) for 48 hours (period in which there is no more loss of water) thereby providing the dry weight (Dwt) of the sample. The water content was calculated using the following formula: % H₂O = [(Wwt – Dwt) / Wwt] x 100.

Tissular iron content by atomic absorption spectrometry

Liver, heart, spleen and aorta were placed in a clean tube and dried until constant weight in desiccator at 70°C (about 72 hours). The dried samples were weighed (masses varied from 0.8 to 44 mg) and placed in polypropylene Falcon® tubes (15 mL), containing 300 µL HNO₃ and 100 µL H₂O₂. These tubes were closed and immersed in a water-bath (model Q222TM, Quimis Scientific Appliances, Sao Paulo, Brazil) at ~90°C during 60 minutes, making possible to digest up to 60 samples simultaneously. Certified reference materials of bovine liver (NIST 1577b) and bovine muscle (NIST 8414) from National Institute of Standard and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) were digest using the same procedure and analyzed to check the reliability of the proposed method. Blank and sample solutions were made up to 5 mL (aorta), 10 mL (heart) and 15 mL (liver) with deionized water (18 MΩ cm). Iron determination was performed by flame atomic absorption spectrometry (model Vario 6, Analytik Jena AG, Germany) for liver and heart samples, or by graphite furnace atomic absorption spectrometry (model ZEE nit 60, Analytik Jena AG, Germany) for aorta samples and results were expressed as µmol/g dry weight. Specimens were dried and digested, and iron content was determined by flame atomic absorption spectrometry for

liver and heart samples, or by graphite furnace atomic absorption spectrometry for aorta samples.

Histological studies

Left ventricle was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin and cut into 5µm sections that were mounted onto slides. Then samples were stained with hematoxylin and eosin, Prussian blue and picrossirius red. As an estimative of myocyte hypertrophy, the average nuclear volume was calculated according to the following equation: nuclear volume = $\pi \times D \times d^2 / 6$ (d = shorter diameter; D = longer nuclear diameter) (30). Images of slices and the measurements were performed by Leica QWin 3 (Leica QWin Plus V 3.5.1 – Leica Microsystems).

Statistical analysis

All data were analyzed using Prism software (GraphPad Softwares Inc., San Diego, USA) and expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Measurement). Cumulative mortality rate was calculated by Kaplan-Meyer survival curve and was compared using the log-rank test. Cox Proportional Hazards Method was used for multivariate analysis evaluating the power of different baseline parameters in predicting higher mortality. Differences among groups were compared by two way ANOVA test for 3 or more groups and one way ANOVA to compare 2 groups followed by Tukey's post-hoc test or Bonferroni post-hoc test. A p-value lower than 0.05 was considered significant.

RESULTS

***Hfe* mutations are associated with increased mortality in patients with cardiomyopathy**

A total of 318 patients with heart failure due to cardiomyopathy of different etiologies had DNA results for at least 1 hemochromatosis gene variant C282Y and H63D (21.7%). Phenotypic data of our patients and COX proportional Hazards model for mortality are shown in Supplemental Table 1. The genetic variations in the *Hfe* gene were associated with increased mortality compared to non-mutation subjects as shown by Kaplan-Meyer survival curve (Fig 1) even after adjustment for other covariates in a Cox hazard model presented with relative risk (RR=1.57) and confidence interval (CI 1.05-2.36). This difference was present and homogeneous in all etiological subgroups analyzed with C282Y and H63D mutation.

Hfe is normally expressed in mice myocardium

The Wild-type mouse myocyte exhibits Hfe (supplementary Fig. 1B and 1F) but not expressed in other types of cardiac cells as evidenced by immunofluorescence (supplementary Fig. 1A). Furthermore, the Hfe protein is also produced in the liver (supplementary Fig. 1H). Based on human studies, we generated an *in vivo* mouse model with cardiac-specific overexpressing *Hfe* (Fig. 2A) as evidenced by 3-fold increase in heart *Hfe* expression; $P=0.05$ (Fig. 2C) and no changes in duodenal *Hfe* expression (Fig. 2D). Transgenic mice MHC-Hfe exhibited normal growth rate (Fig. 2B) and no differences in biometric, hematological and biochemical parameters related to iron metabolism features from 1 to 12 months-old as compared with FVB control animals (Supplementary Table 2). Transgenic mice (MHC-Hfe) express Hfe ~2 fold more protein when compare with WT animals in the heart $p=0.0086$ (Fig 2E). While production of the Hfe protein in the duodenum there is no difference between the two animals (Fig 2F).

MHC-Hfe transgenic mice is less susceptible to iron overload

We extended our analysis and tested the consequences of cardiac overexpressing *Hfe* during iron overload. Chronic iron administration resulted in an increased in ~10-fold iron accumulation in the heart of WT animals ($p=0.0001$; MHC-Hfe vs WT) (Fig. 3D), resulting in approximately 50% cumulative mortality rate as shown by the Kaplan-Meyer survival curve (Fig. 3A). Remarkably, in the MHC-Hfe animals, iron treatment resulted in just ~6-fold iron accumulation in the heart (Fig. 3D), that was associated with approximately 10% cumulative mortality rate as compare to control animal (Fig. 3A). In the liver (~32-fold increase), iron accumulation was similar in both groups (Fig. 3E) as well as in the spleen (~6-fold increase) and in the aorta (~45-fold increase); (supplementary Fig 2A and 2B, respectively).

Echocardiographic recordings confirmed the iron-overload cardiomyopathy with significant reductions of systolic function in WT mice. Control animals exhibited impaired systolic function as assessed by ejection fraction ($p=0.0215$) (Fig 3B), and diastolic parameters were also impaired with reduced septum thickness in WT mice ($p=0.0067$), but these were not observed in MHC-Hfe mice (Fig. 3C). No significant changes were noted in LV dimensions at diastole, and no evidence of isovolumetric relaxation time was observed as well (supplementary Fig. 2C and 2D, respectively).

The structural parameters in animals treated with iron, serum levels of iron and transferrin saturation were increased with iron injection, being these elevations equivalent in all mice lineages. Moreover, a slight reduction in red blood cell count

without significant changes on hemoglobin level, white cell count and platelet count were found similarly in all iron-treated groups (supplementary Tab 3).

However, chronic iron overload led to significant increment of heart indexed-weight at sacrifice only in WT ($P < 0.05$) without differences between MHC-Hfe mice injected with iron-dextran or placebo. Similarly, lung mass ($P < 0.05$) was higher only in WT iron-treated animals while MHC-Hfe iron-treated remained similar to placebo group (supplementary Tab 3).

Histological analysis (Fig 4) showed a significant increase in the myocyte nuclei volume estimated from heart samples of iron-overloaded when compared to placebo-treated WT ($p=0.0052$) (Fig. 4i), while no significant change was found in MHC-Hfe group injected with iron-dextran. Interstitial collagen in the cardiac tissue, as evaluated by red-stained fibers with picrosirius, was increased in both iron-injected groups. However, MHC-Hfe animals with chronic iron overload exhibited reduced fibrosis compared to WT injected with iron-dextran ($p=0.0002$) (Fig 4).

Semi-quantitative evaluation of myocardial intracellular non-heme iron deposition in myocardium and liver using Prussian blue staining and confirmed significant less iron accumulation in MHC-Hfe heart when compared with WT mice ($p=0.005$) (Fig 4g). Nevertheless, accumulation of iron in the liver was not significantly different in both groups (Fig 4h).

The cardioprotective effect in MHC-Hfe animals was not restricted to iron overload

To confirm if the cardioprotection in MHC-Hfe animals was restricted to iron overload, we treated the animals with chronic isoproterenol doses. Heart weight ($p=0.0156$) (Fig 5A) and nuclear volume of myocytes ($p \leq 0.0001$) (Fig 5B) confirmed significant cardiac hypertrophy in WT mice in comparison to the MHC-Hfe groups. In addition, MHC-Hfe mice did not present cardiac hypertrophy. In the assessment of cardiac remodeling, both treated groups with isoproterenol exhibited increased cardiac fibrosis compared to their controls. However, the magnitude of cardiac remodeling was significantly inferior in MHC-Hfe animals compared to WT mice treated with isoproterenol ($p \leq 0.0001$) (Fig 5D). MHC-Hfe animals with chronic isoproterenol treatment did not present lung congestion, whereas, in WT mice treated with isoproterenol, pulmonary congestion was significantly increased compared to the other groups ($p=0.0004$) (Fig 5C).

Other parameters as survival curve, cardiac function by echocardiographic and accumulation of iron in the heart and liver by atomic absorption spectrometry had no statistical differences (supplementary Fig 3A and 3F).

Cardiac gene expression in MHC-Hfe mice modulated hepcidin and ferritin heavy chain in the heart

Hfe gene overexpression, without intervention, changed the expression of certain genes involved in iron metabolism in the heart. All genes analyzed were normalized by Cyclophilin A (CypA) housekeeping. Both Hepcidin expression (Hamp) ($p=0.0004$) (Fig. 6A) and the Ferritin heavy chain subunit (FTH1) ($p=0.0326$) (Fig. 6B) were significantly less expressed in MHC-Hfe mice compared with WT. Otherwise, transferrin receptor 2 (TRF2) and ferritin light chain subunit (FTL1) showed no statistical difference when compared with WT (Fig. 6C and 6D, respectively).

MHC-Hfe reduced oxidative stress and iron accumulation during aging

In order to understand why the transgenic mice are less susceptible to heart damage, we analyzed the iron accumulation of the animals at 1, 3, 6, and 12 months of age, in different organs. From the age of 6 months until 12 months, we observed a progressive statistically significant reduction of iron accumulation in the heart of transgenic animals compared to WT (Fig 7B). The same parameters were also investigated in the liver and in the aorta without statistical significance between groups (Fig 7D and 7C, respectively).

General oxidative stress was measured by Elisa and heart nitrotyrosine level revealed MHC-Hfe mice had significantly less nitrated proteins when compared with control ($p=0.01$) (Fig 7A).

DISCUSSION

The present study shows the relevance of the *Hfe* gene in the heart, that when mutated (H63D and/or C282Y) is a predictive factor of mortality in patients with heart failure of different etiologies. The cardiac repercussions caused by later stages of iron overload is related to systolic dysfunction (10), as observed in our treatments. Iron overload is associated with an increase in the production of reactive oxygen species and a consequent decrease in antioxidants enzymes in the heart, as glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase (17, 31).

Overexpression of the *Hfe* gene restricted to the heart tissue was fundamental to prevent interference in the regulation of systemic iron, since that *Hfe* overexpression in the liver would lead the animals to an anemic state (32). Previous studies described that *Hfe* is responsible for inhibiting the binding of Fe-Tf (transferrin) on TFR1 and

reduces iron entrance in other cell types (33). Under this perspective, we observed less accumulation of iron in the heart and a reduced susceptibility to heart damage and oxidative stress in MHC-Hfe model.

Mutations in both *Hfe* and TFR2 are known to cause iron deposition. In normal conditions Hfe and TFR2 interact, and TFR2 competes with TFR1 for Hfe binding. As serum Tf saturation increases, Tf likely displaces Hfe from TFR1. Furthermore, increased Tf saturation results in stabilization of TFR2 protein (34). Likewise, the regulation of TFR2 protein levels is modulated by transferrin (35, 36). This Hfe connection with TFR2 induces the activation of ERK1/2 pathways, supporting the evidence that TFR2 may function as a signaling to hepcidin production (37). In our model the expression of hepcidin is reduced in MHC-Hfe animals when compared with WT animals, which suggests a lower activation of the ERK1/2 pathway signaling for the production of hepcidin. However, the complete molecular function of Hfe is not yet understood (32).

In the present study, the difference in TFR2 expression in the heart of animals MHC-Hfe and WT was not statistically significant. These data are related to the serum transferrin saturation, which also did not differ between MHC-Hfe and WT animals (supplementary tab 2).

Hepcidin is a peptide hormone produced mainly by the liver, which binds to the iron exporter ferroportin and induces its degradation, thus decreasing the transfer of iron from enterocytes to the circulation (38, 39). Hepcidin expression is controversial in rodents; while in the condition of hypoxia there is increase in the expression of hepcidin in the liver, in the heart hepcidin is strongly up regulated. It is speculated that this happens to protect cardiac cells (40).

The expression of genes involved in intracellular iron regulation in the model of *Hfe* gene overexpression (MHC-Hfe) indicates a decrease in the iron content of the heart. Iron is a modulatory factor of the gene expression of ferritins, this occurs through post-transcriptional regulation of genes responsive to the presence of iron, called Iron-Responsive Element (IRE) interacting with Iron-Regulatory Protein (IRP). This complex linked to 5' extremity of the primary transcript of ferritins, prevents its degradation and in the presence of iron is able to release the primary transcript that produces the protein (41). In our study we found only decreased levels of ferritin heavy chain (FTH1), showing a reduced presence of iron in the MHC-Hfe heart when compared with WT animals. Unfortunately, we couldn't analyze gene expression with iron treatment, because the high total-body iron burden of the animals leads to destabilization of mRNAs (42).

Interestingly, *Hfe* overexpression was effective in reducing the damage caused by chronic treatment with isoproterenol. Analyzing the causes of oxidative stress, activation of β -adrenergic receptor by isoproterenol triggers phosphorylation of ERK1/2 and P38 MAPK. This might not only increase cardiac hypertrophy, but also cardiac remodeling (43). Coincidentally, hepcidin signaling pathway is the same pathway activated with isoproterenol treatment. Thus, if MHC-*Hfe* animals produce less hepcidin compared with WT, we can hypothesize that there is a decrease in the activation of this pathway. If true, this would explain why MHC-*Hfe* animals showed less susceptibility to cardiac hypertrophy damage and lower cardiac remodeling when treated with isoproterenol compared with WT animals.

Altogether these data show that *Hfe* gene might be an important target for the treatment of heart failure, regardless of its participation in the iron cycle.

FIGURES

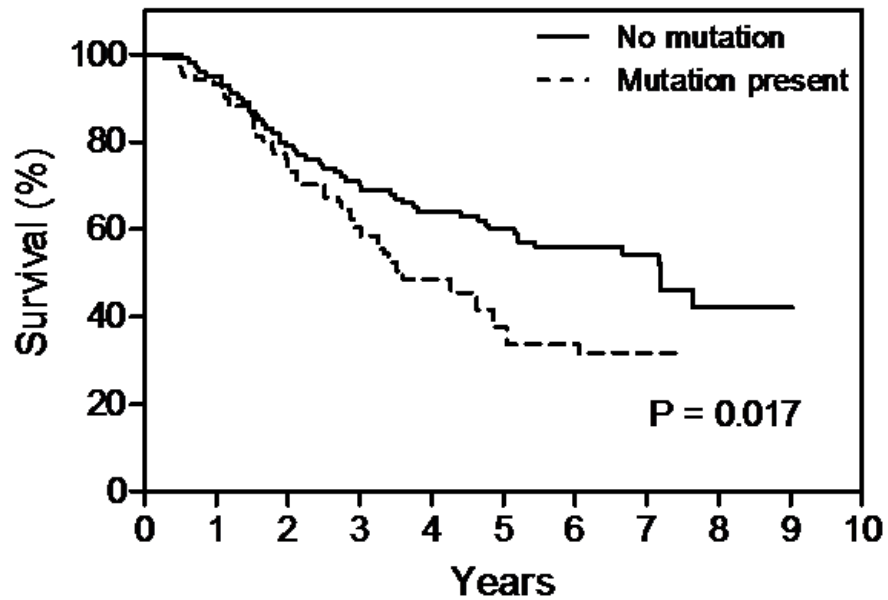


Figure 1. Kaplan-Meier survival curve of 318 Brazilian patients with heart failure of different etiologies in accordance with the presence of *Hfe* mutations (C282Y and/or H63D) followed-up for 10 years.

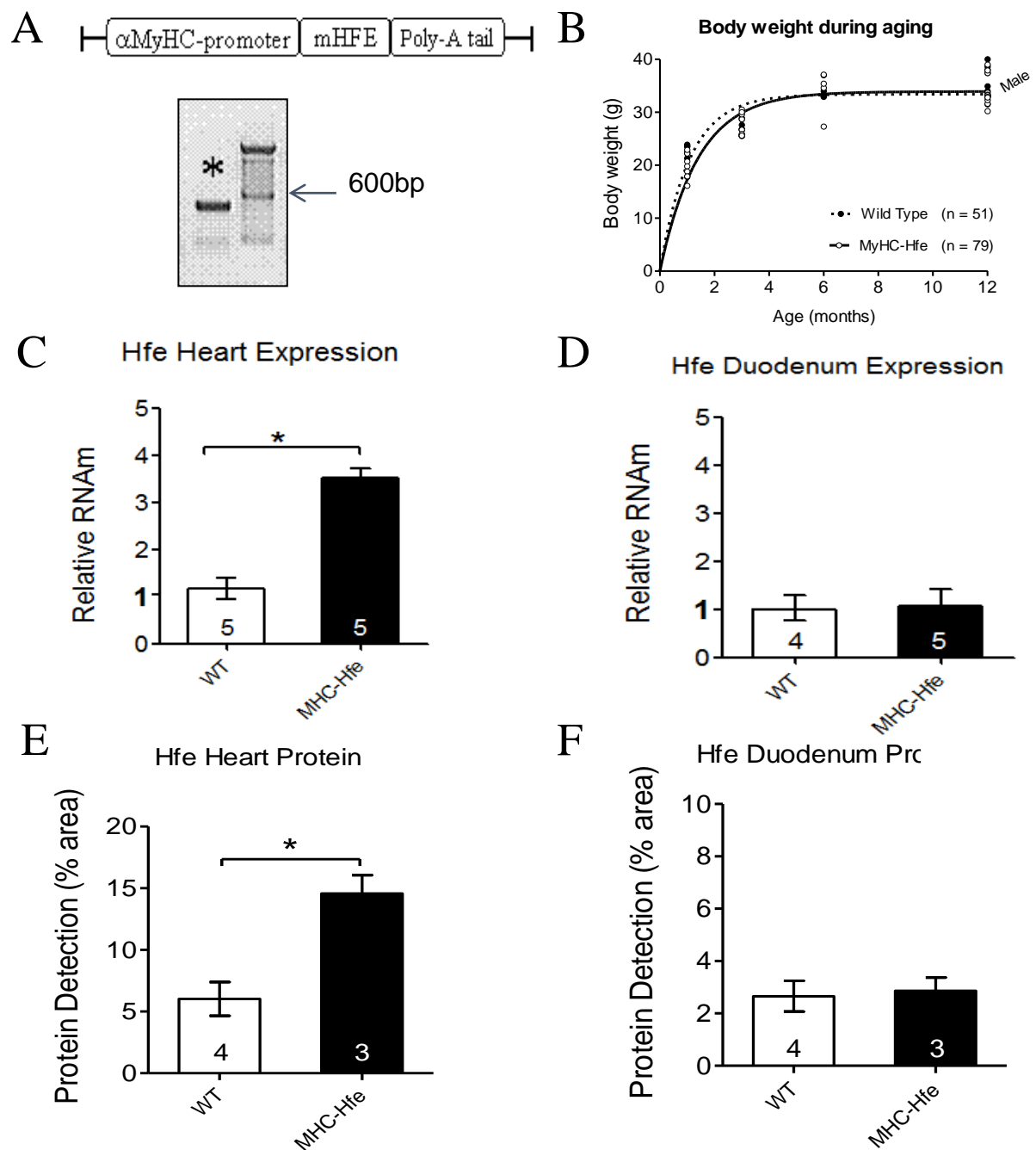


Figure 2. Transgenic animal MHC-Hfe characterization: (A) Genotyping for MYHC-HFE transgenic mice W, 600bp ladder; mice ear DNA sample (1uL), W, water; PC, positive control (plasmid Maxiprep sample). Positive animals for the transgene are indicated. (B) Body weight gain during aging in WT, and transgenic lines MHC-Hfe. (C) Real-time PCR analysis of Hfe transcript abundance in heart mice. (D) Real-time PCR analysis of Hfe transcript abundance in duodenum for WT, and transgenic lines MHC-Hfe. (E) Hfe protein measurements on heart in WT and MHC-Hfe mice. (F) Hfe protein measurements on duodenum for WT, and transgenic lines MHC-Hfe. * $P < 0.05$ MHC-Hfe vs. WT.

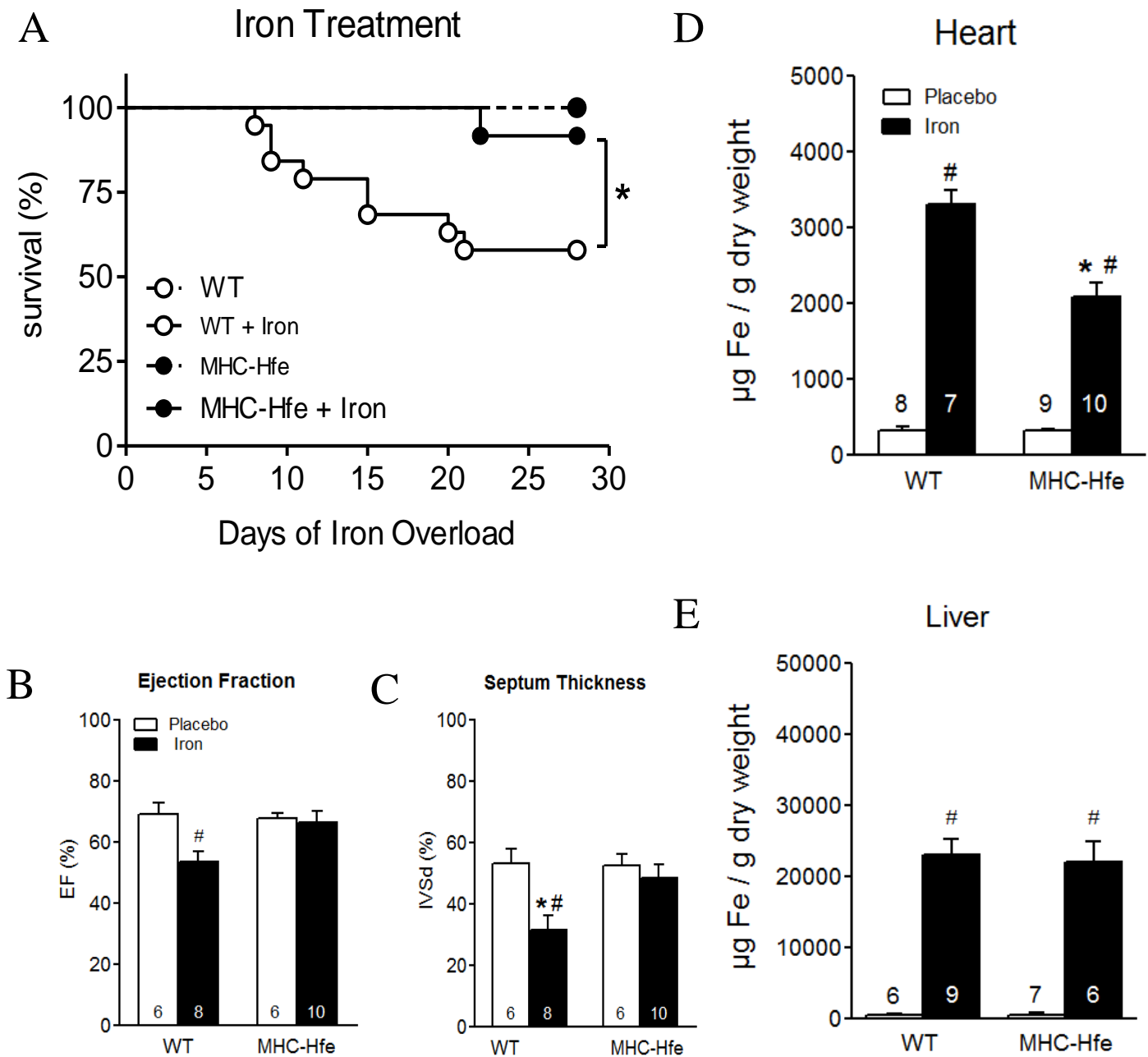


Figure 3. Results observed after iron overload treatment: (A) Kaplan-Meier survival curve of mice subjected to chronic iron treatment. * $P < 0.05$ WT + iron vs. MHC-Hfe + iron. Teste Log-rank (Mantel-Cox). (B) Ejection Fraction for WT, and transgenic lines MHC-Hfe with iron overload. (C) Septum Thickness in MHC-Hfe and Wt mice. # $P < 0.05$ iron vs. Placebo; * $P < 0.05$ MHC-Hfe vs. WT. ANOVA 2-ways followed by Bonferroni post-hoc test. Quantitative analysis of iron accumulation in the heart tissue (D) and iron accumulation in the liver tissue (E) by atomic absorption spectrometry. # $P < 0.05$ iron vs. Placebo; * $P < 0.05$ MHC-Hfe vs. WT. ANOVA 2-ways followed by Bonferroni pos-hoc test.

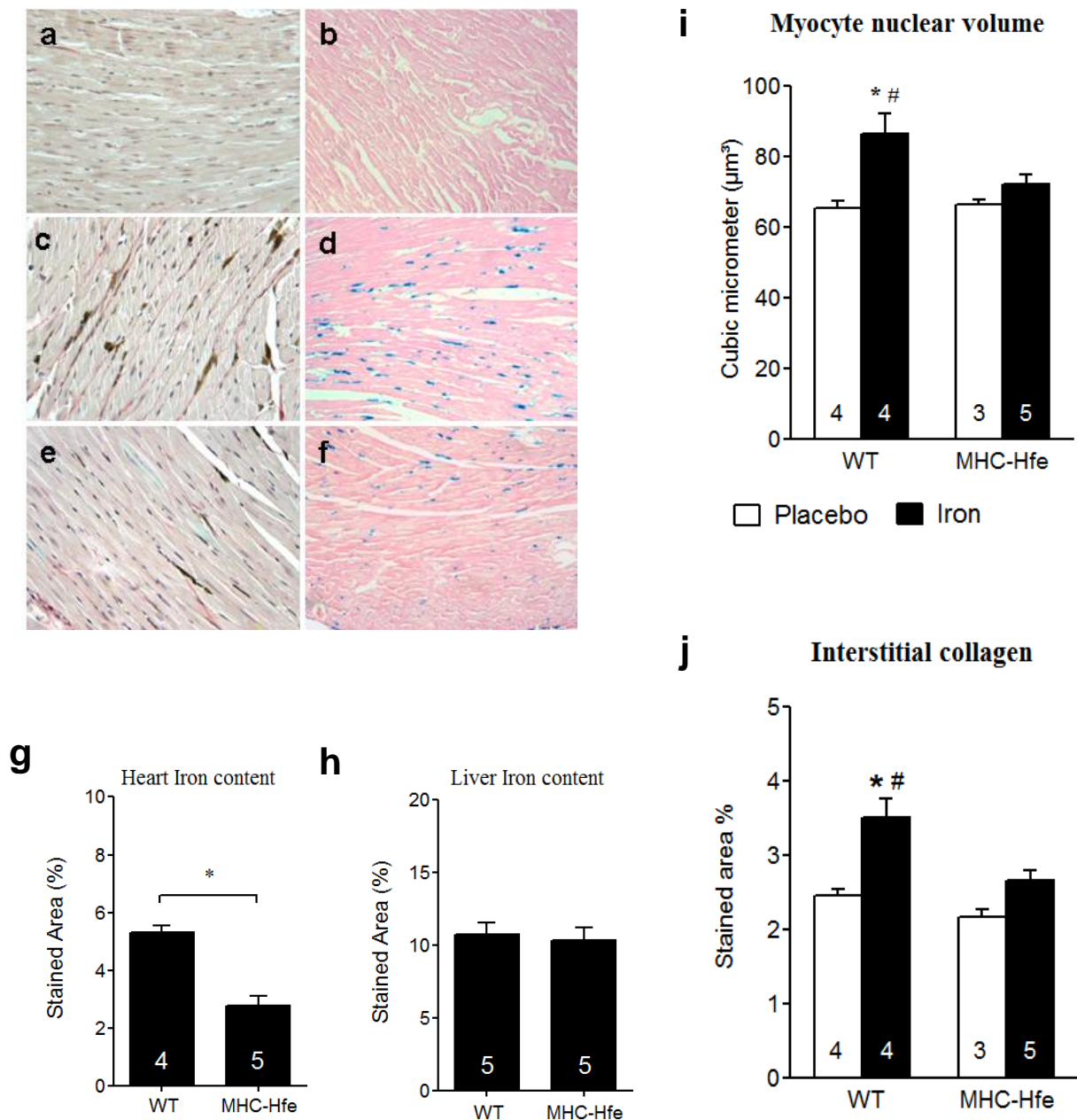


Figure 4. Structural parameters after iron overload treatment: Photomicrographs of stained myocardium with picosirius for marking interstitial collagen in WT (a), WT + iron (c) and MHC-Hfe + iron (e). Photomicrographs of stained myocardium with Prussian blue for marking accumulation of iron tissue in WT (b), WT + iron (d) and MHC-Hfe + iron (f). Measurements in charts: myocyte nuclear volume (i), interstitial collagen (j), iron accumulation in heart (g) and iron accumulation in liver (h). # $P < 0.05$ Iron vs. Placebo; * $P < 0.05$ MHC-Hfe vs. WT. ANOVA 2-ways followed by Bonferroni post-hoc test to nuclear volume and interstitial collagen; Student t test to iron deposition (g and h).

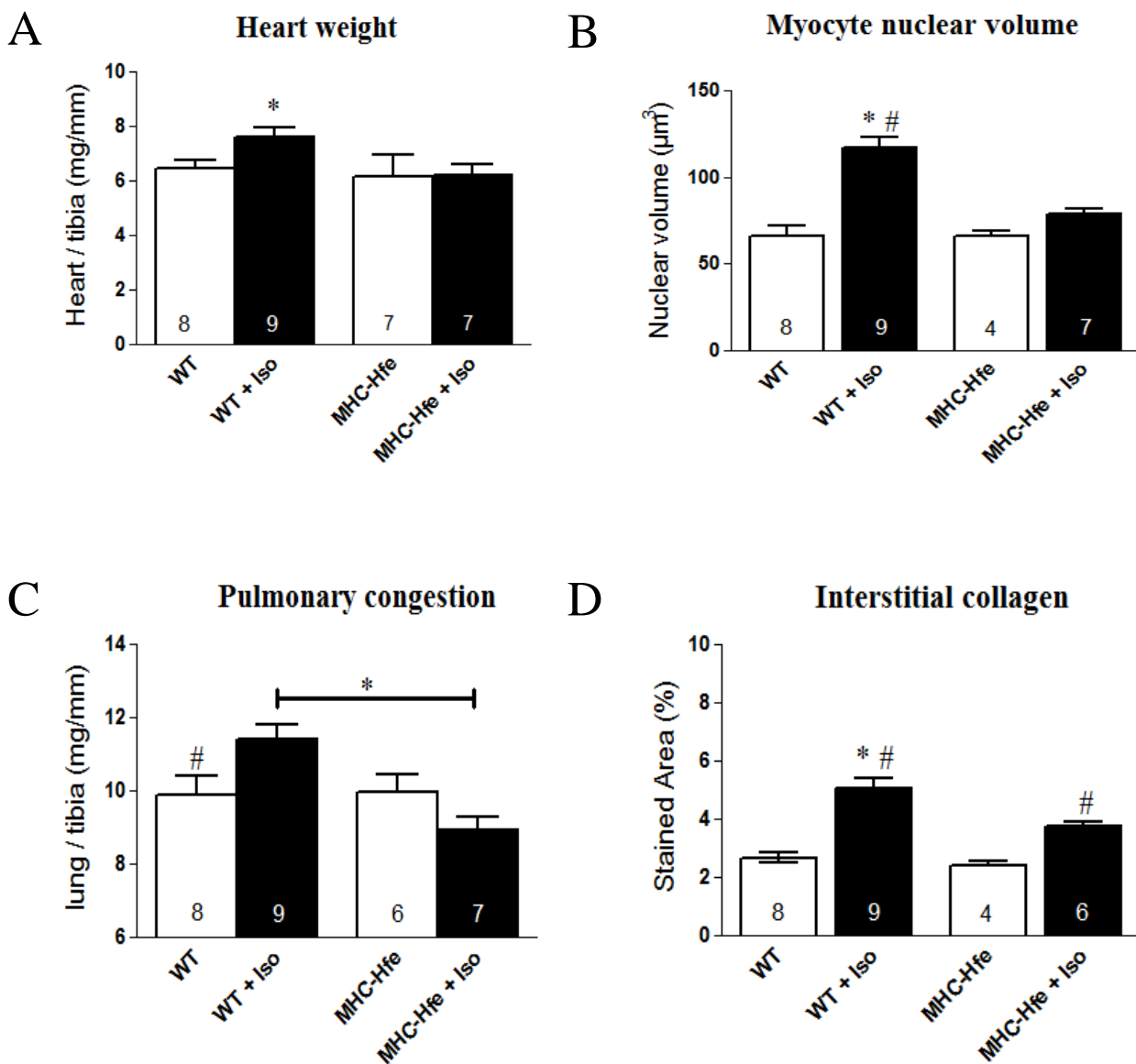


Figure 5. Structural and physiological parameters of chronic isoproterenol treatment in the heart weight (A) and lung weight (C) indexed by the length of the tibia, suggestive of cardiac hypertrophy and pulmonary congestion, respectively. Quantitative analysis of isoproterenol treatment in the myocyte nuclear volume (B) and in the heart interstitial collagen by microscopy. These parameters indicate increased hypertrophy and cardiac fibrosis, respectively * $P < 0.05$ MHC-Hfe vs WT, # $P < 0.05$ Iso vs Placebo. ANOVA 2-ways followed by Bonferroni post-hoc test.

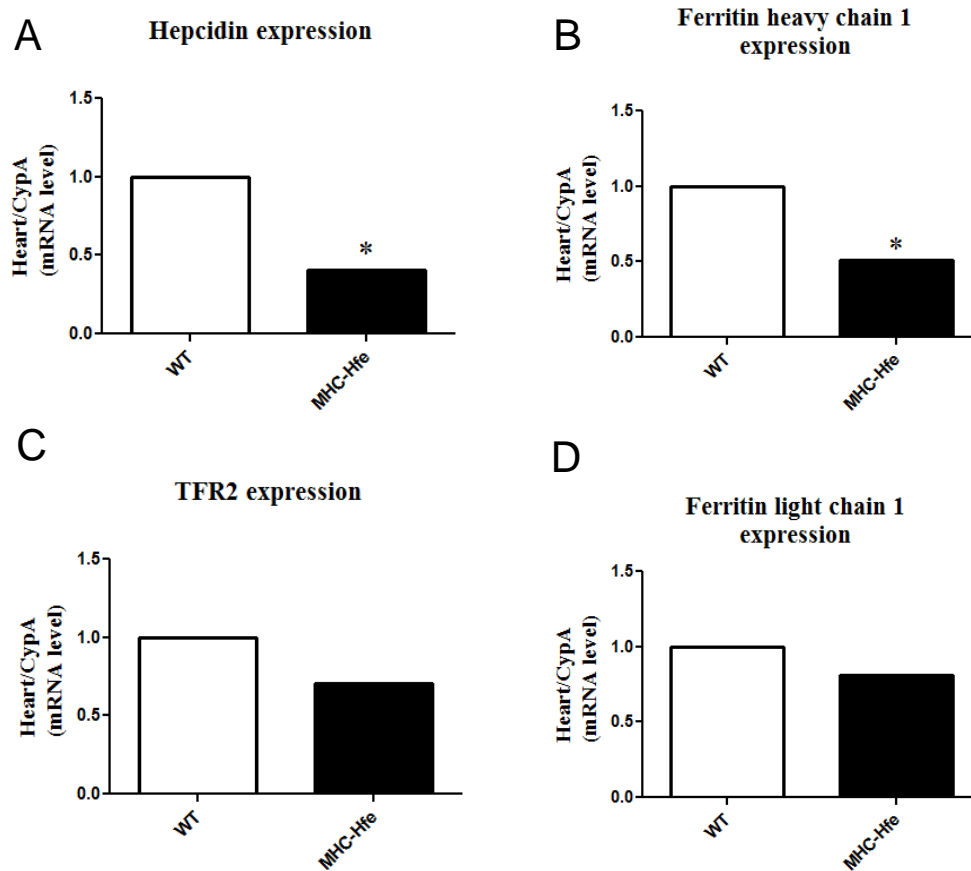


Figure 6. Expression of genes related to iron metabolism in the heart, without treatment: (A) Hepcidin expression gene in the heart * $P < 0.05$ WT vs MHC-Hfe. (B) Ferritin heavy chain 1 expression gene in the heart * $P < 0.05$ WT vs MHC-Hfe. Student t test. (C) Transferrin receptor 2 expression gene in the heart. (D) Ferritin light chain 1 expression gene in the heart.

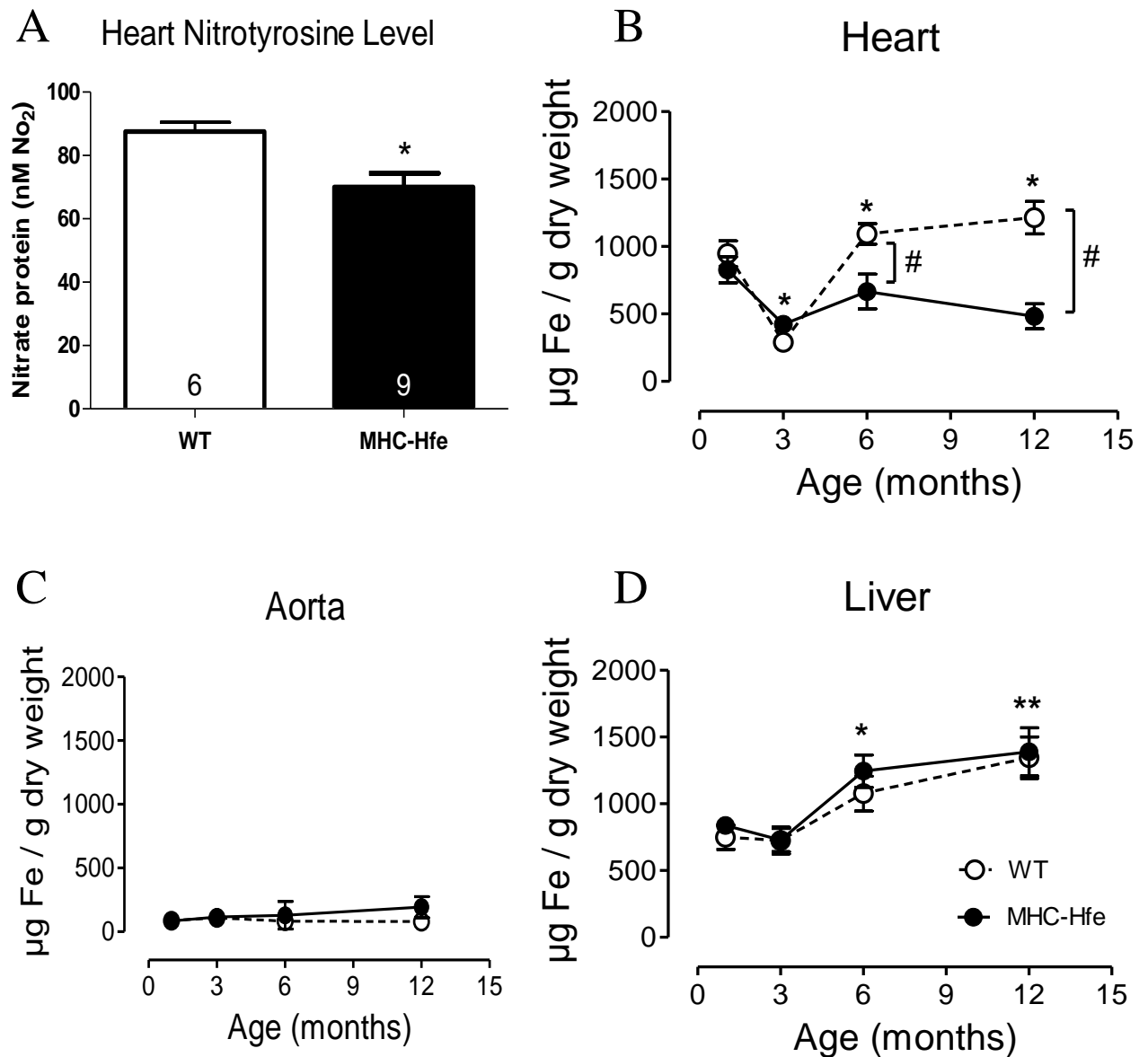


Figure 7. Oxidative stress assessment at the third month and iron accumulation during aging: (A) Heart nitrotyrosine level as a measure of oxidative stress. WT vs MHC-Hfe mice * $p < 0.01$. (B) MHC-Hfe overexpression in the heart protects against spontaneous iron accumulation during aging. # $p < 0.05$ WT vs MHC-Hfe. (C and D) Spontaneous iron accumulation during aging in aorta and liver, respectively WT and MHC-Hfe mice * $p < 0.05$ month vs month. Student t test.

SUPPLEMENTARY

Cox Proportional Hazards model for mortality in 318 patients with different etiologies prospectively followed-up in a tertiary care center InCor, São Paulo, Brazil

Variable	Hazard Ratio	p - Value
<i>Hfe</i> mutation	1.81	0.04
Age, years	1.00	0.83
Gender, female	0.53	0.09
Idiopathic, yes	1.23	0.44
NYHA	1.33	0.09
LVEF, %	0.95	0.01
Creatinine, serum	1.20	0.58
Ethnicity	-	0.59

Table 1. NYHA= New York Heart Association; Functional classification of degree of heart failure. LVEF = Left Ventricle Ejection Fraction.

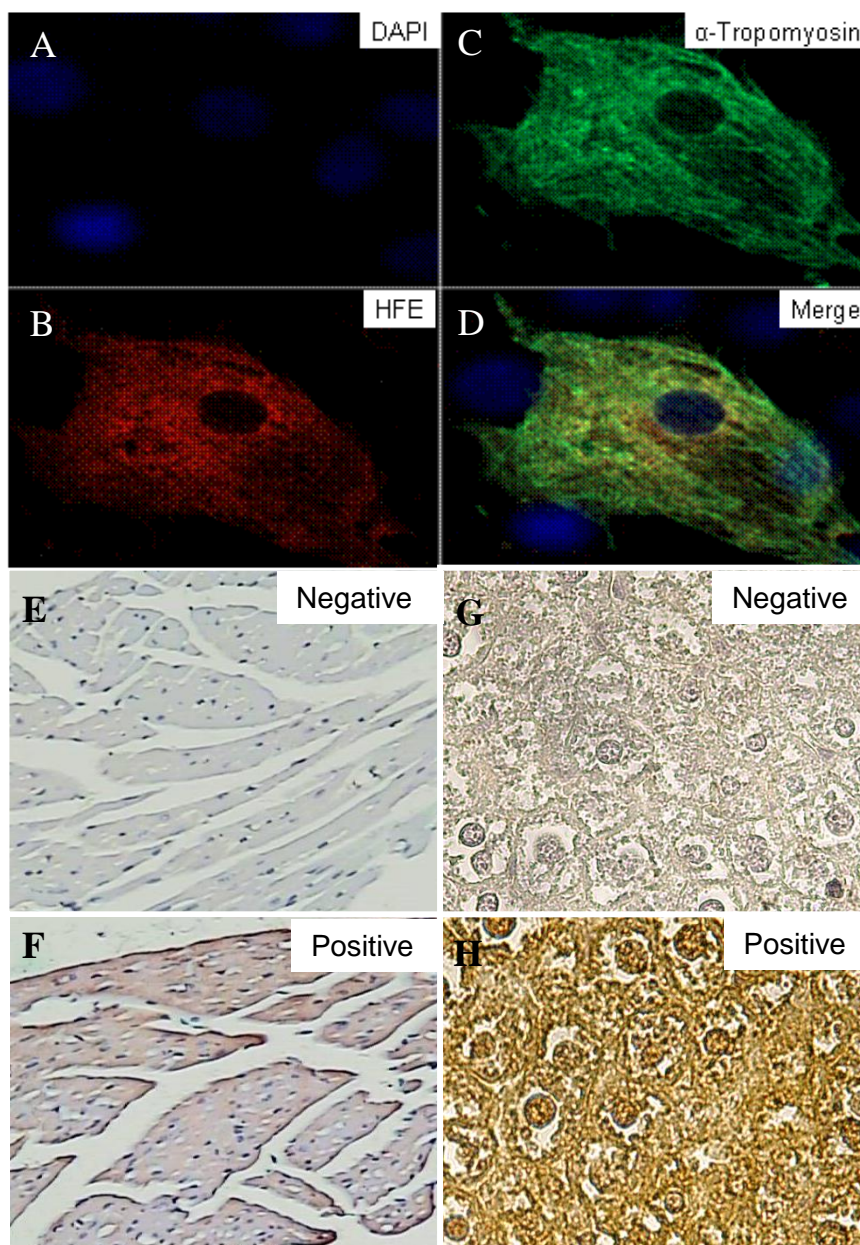


Figure 1. *Hfe* gene is normally expressed in different tissues: The first four figures represent a primary culture of cardiac cells by immunofluorescence: (A) Labeling with blue-DAPI (marking the cell nucleus); (B) Labeling with red-Hfe protein; (C) Labeling with green- α -Tropomyosin protein; (D) Labeling with merge of three markings: blue, red and green. The four figures below represent immunohistochemistry in histological tissues (100x magnification): (E) Negative reaction just with secondary antibody in the heart; (F) Positive reaction with anti-Hfe with primary and secondary antibodies in the heart; (G) Negative reaction just with secondary antibody in the liver; (H) Positive reaction with anti-Hfe with primary and secondary antibodies in the liver (100x magnification).

Phenotypic characterization of WT and MHC-Hfe animals at different ages (1, 3, 6 e 12 months) according to biometric, hematologic and biochemical parameters related to iron metabolism

	1 Month		3 Months		6 Months		12 Months	
	WT	MHC-Hfe	WT	MHC-Hfe	WT	Mhc-Hfe	WT	MHC-Hfe
RV/BW (mg/g)	0.85±	0.88±	0.83±	0.81±	0.82±	0.76±	0.75±	0.79±
	0.08	0.05	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0.02
LV/BW (mg/g)	3.23±	2.76±	2.81±	2.97±	2.90±	3.03±	2.88±	3.04±
	0.09	0.02	0.03	0.09	0.06	0.10	0.08	0.06
Water lung %	78.09±	78.90±	78.60±	78.70±	78.20±	78.40±	78.30±	78.50±
	0.20	0.10	0.20	0.20	0.20	0.10	0.30	0.20
Hemoglobin (mg/dL)	13.10±	13.50±	12.90±	12.60±	12.80±	13.00±	12.80±	11.50±
	0.20	0.20	0.10	0.10	0.20	0.50	0.10	0.60
RBCs (10⁶/mm³)	8.62±	9.08±	8.84±	8.80±	8.82±	9.28±	8.98±	7.73±
	0.13	0.06	0.05	0.08	0.13	0.27	0.16	0.39
Leukocytes (10³/mm³)	3.47±	2.74±	3.14±	3.70±	2.17±	2.23±	2.70±	1.22±
	0.54	0.42	0.15	0.44	0.15	0.35	0.34	0.26
Serum Iron (µg/dL)	243.00±	215.00±	213.00±	192.00±	191.00±	207.00±	198.00±	190.00±
	12.00	17.00	15.00	13.00	15.00	9.00	4.00	10.00
Transferrin Saturation %	59.80±	57.10±	58.30±	56.70±	59.40±	56.90±	56.50±	52.80
	1.90	5.70	1.10	1.50	2.10	2.60	1.90	±1.80

Table 2. RV = Right Ventricle; LV = Left Ventricle; BW = Body Weight. RBCs = Red Blood Cells.

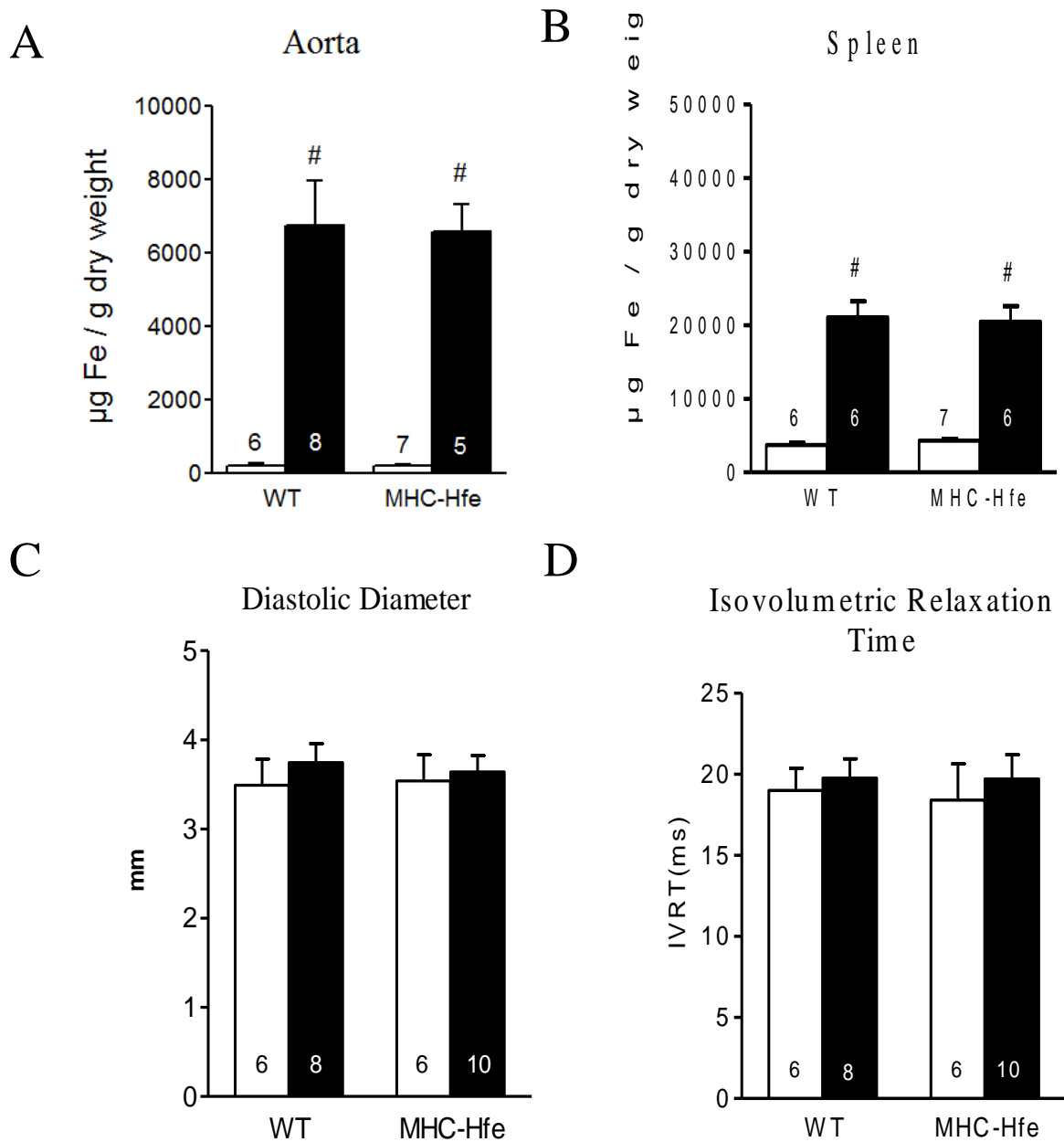


Figure 2. Effects of chronic iron overload treatment. (A and B) Iron content in WT, and transgenic lines MHC-Hfe by atomic absorption spectrometry into the aorta and spleen, respectively. # $P < 0.05$ Iron vs. Placebo. ANOVA 2-ways followed by Bonferroni post-hoc test. (C) Cardiac function for diastolic parameters by Diastolic Diameter. (D) Cardiac function for systolic parameters by Isovolumetric Relaxation Time. Both as measured by echocardiography.

Effects of iron overload on WT and MHC-Hfe animals according to biometric, hematological and serum iron parameters

	Placebo		Iron Overload	
	WT	MHC-Hfe	WT	MHC-Hfe
Serum iron ($\mu\text{g/dL}$)	213.80 \pm 5.10	189.90 \pm 3.30	613.20 \pm 64.10 [#]	561.40 \pm 16.80 [#]
Transferrin Sat. (%)	58.30 \pm 1.00	55.70 \pm 1.00	94.00 \pm 1.60 [#]	97.90 \pm 0.50 [#]
RBCs ($10^6/\text{mm}^3$)	8.83 \pm 0.05	8.80 \pm 0.08	7.92 \pm 0.44 [#]	8.03 \pm 0.15 [#]
Hemoglobin (mg/dL)	12.60 \pm 0.20	12.10 \pm 0.40	12.10 \pm 0.20	11.80 \pm 0.30
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	3.14 \pm 0.86	3.70 \pm 0.45	3.54 \pm 0.76	5.51 \pm 1.84
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	1160.00 \pm 125.00	1026.00 \pm 96.00	1345.00 \pm 100.00	1298.00 \pm 66.00
Body mass (g)	26.00 \pm 0.40	25.90 \pm 0.30	27.90 \pm 0.40	27.10 \pm 0.40
Tibia length (mm)	14.40 \pm 0.40	14.40 \pm 0.40	14.20 \pm 0.40	14.50 \pm 0.30
Heart mass (mg/mm)	5.25 \pm 0.06	5.32 \pm 0.07	6.14 \pm 0.12 [#]	5.45 \pm 0.15
Lung mass (mg/mm)	10.37 \pm 0.32	10.26 \pm 0.25	11.83 \pm 0.25 [#]	10.66 \pm 0.25
Spleen mass (mg/mm)	6.63 \pm 0.19	6.56 \pm 0.20	9.49 \pm 0.32 [#]	9.33 \pm 0.55 [#]
Liver mass (mg/g body)	108.80 \pm 3.80	108.50 \pm 3.70	195.90 \pm 5.80 [#]	186.90 \pm 8.20 [#]

Table 3. Values are mean \pm standard error of mean. *P<0.05 WT vs MHC-Hfe. #P<0.05 Placebo vs Iron overload. Analyzed by 2-way ANOVA completely randomized followed by Bonferroni's post hoc test. N=6-10 per group.

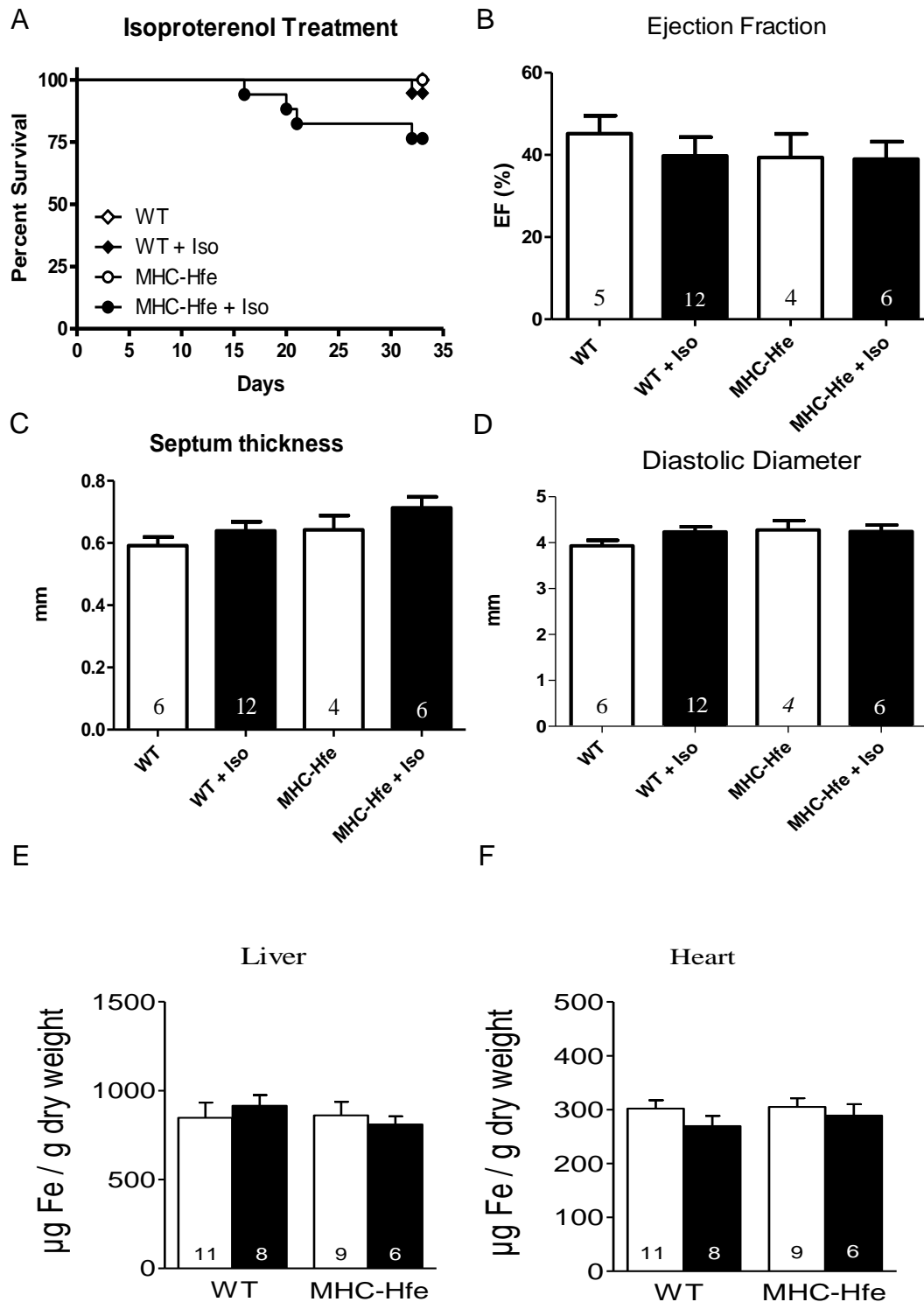


Figure 3. Effects of chronic isoproterenol treatment on different parameters: (A) Kaplan-Meier survival curve. Echocardiography parameters: (B) Ejection fraction. (C) Septum Thickness. (D) Diastolic Diameter. Iron status in different organs by atomic absorption spectrometry: (E) Iron content in the liver. (F) Iron content in the heart. The charts contain values for WT and MHC-Hfe mice with or without iron treatment.

REFERENCES

1. Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M.C., Fullan, A., et al. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399-408.
2. Ajioka, R.S., Levy, J.E., Andrews, N.C., and Kushner, J.P. 2002. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood* 100:1465-1469.
3. Bothwell, T.H., and MacPhail, A.P. 1998. Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic, and clinical aspects. *Semin Hematol* 35:55-71.
4. Brandhagen, D.J., Fairbanks, V.F., and Baldus, W. 2002. Recognition and management of hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician* 65:853-860.
5. de Valk, B., Witlox, R.S., van der Schouw, Y.T., and Marx, J.J. 2000. Biochemical expression of heterozygous hereditary hemochromatosis. *Eur J Intern Med* 11:317-321.
6. Santos, P.C., Krieger, J.E., and Pereira, A.C. 2012. Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci* 13:1497-1511.
7. Santos, P.C., Dinardo, C.L., Cancado, R.D., Schetttert, I.T., Krieger, J.E., and Pereira, A.C. 2012. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34:311-316.
8. Edison, E.S., Bajel, A., and Chandy, M. 2008. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol* 81:411-424.
9. Pierre, J.L., and Fontecave, M. 1999. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biomaterials* 12:195-199.
10. Kremastinos, D.T., and Farmakis, D. 2011. Iron overload cardiomyopathy in clinical practice. *Circulation* 124:2253-2263.
11. Levy, J.E., Montross, L.K., Cohen, D.E., Fleming, M.D., and Andrews, N.C. 1999. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 94:9-11.
12. Pantopoulos, K. 2008. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol* 14:6893-6901.
13. Fleming, R.E., Holden, C.C., Tomatsu, S., Waheed, A., Brunt, E.M., Britton, R.S., Bacon, B.R., Roopenian, D.C., and Sly, W.S. 2001. Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2707-2711.
14. Miranda, C.J., Makui, H., Soares, R.J., Bilodeau, M., Mui, J., Vali, H., Bertrand, R., Andrews, N.C., and Santos, M.M. 2003. Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. *Blood* 102:2574-2580.
15. Rodrigues, P., Lopes, C., Mascarenhas, C., Arosio, P., Porto, G., and De Sousa, M. 2006. Comparative study between Hfe^{-/-} and beta2m^{-/-} mice: progression with age of iron status and liver pathology. *Int J Exp Pathol* 87:317-324.
16. Bahram, S., Gilfillan, S., Kuhn, L.C., Moret, R., Schulze, J.B., Lebeau, A., and Schumann, K. 1999. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13312-13317.
17. Turoczi, T., Jun, L., Cordis, G., Morris, J.E., Maulik, N., Stevens, R.G., and Das, D.K. 2003. HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res* 92:1240-1246.

18. Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, J., Fei, Y., Brunt, E.M., Ruddy, D.A., Prass, C.E., et al. 1998. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2492-2497.
19. Bartfay, W.J., Dawood, F., Wen, W.H., Lehotay, D.C., Hou, D., Bartfay, E., Luo, X., Backx, P.H., and Liu, P.P. 1999. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res* 43:892-900.
20. Pereira, A.C., Cuoco, M.A., Mota, G.F., da Silva, F.F., Freitas, H.F., Bocchi, E.A., Soler, J.M., Mansur, A.J., and Krieger, J.E. 2001. Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 88:388-391.
21. Tuomainen, T.P., Kontula, K., Nyysönen, K., Lakka, T.A., Helio, T., and Salonen, J.T. 1999. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 100:1274-1279.
22. Bartfay, W.J., Hou, D., Brittenham, G.M., Bartfay, E., Sole, M.J., Lehotay, D., and Liu, P.P. 1998. The synergistic effects of vitamin E and selenium in iron-overloaded mouse hearts. *Can J Cardiol* 14:937-941.
23. Iaccarino, G., Dolber, P.C., Lefkowitz, R.J., and Koch, W.J. 1999. Bbeta-adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy: regulation by beta- but not alpha1-adrenergic stimulation. *Hypertension* 33:396-401.
24. Christe, M., Jin, N., Wang, X., Gould, K.E., Iversen, P.W., Yu, X., Lorenz, J.N., Kadambi, V., Zuckerman, S.H., and Bloem, L.J. 2004. Transgenic mice with cardiac-specific over-expression of MLK7 have increased mortality when exposed to chronic beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 37:705-715.
25. Gao, S., Ho, D., Vatner, D.E., and Vatner, S.F. 2011. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 1:71-83.
26. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.
27. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
28. Smyth, J.W., Vogan, J.M., Buch, P.J., Zhang, S.S., Fong, T.S., Hong, T.T., and Shaw, R.M. 2012. Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin 43 vesicles to the plasma membrane. *Circ Res* 110:978-989.
29. Ahsan, H. 2013. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol*.
30. Gerdes, A.M., Liu, Z., and Zimmer, H.G. 1994. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience* 5:203-208.
31. Fleming, R.E., and Ponka, P. 2012. Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 366:348-359.
32. Schmidt, P.J., Toran, P.T., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J., and Andrews, N.C. 2008. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 7:205-214.
33. Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., and Enns, C.A. 1999. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem* 274:9022-9028.
34. Goswami, T., and Andrews, N.C. 2006. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem* 281:28494-28498.

35. Robb, A., and Wessling-Resnick, M. 2004. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 104:4294-4299.
36. Johnson, M.B., and Enns, C.A. 2004. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* 104:4287-4293.
37. Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N.M., Stafsnes, M., Fecchi, K., Parolini, I., Malavasi, F., Peschle, C., Sargiacomo, M., et al. 2006. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 119:4486-4498.
38. Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-2093.
39. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loreal, O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819.
40. Merle, U., Fein, E., Gehrke, S.G., Stremmel, W., and Kulaksiz, H. 2007. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148:2663-2668.
41. Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Hentze, M.W. 2008. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 28:197-213.
42. Eisenstein, R.S. 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 20:627-662.
43. Zhang, G.X., Kimura, S., Nishiyama, A., Shokoji, T., Rahman, M., Yao, L., Nagai, Y., Fujisawa, Y., Miyatake, A., and Abe, Y. 2005. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 65:230-238.