Andréa de Freitas Gonçalves Della Ripa

Influência da suplementação de zinco na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Titular. Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Chiuso Minicucci

Botucatu
2016

Andréa de Freitas Gonçalves Della Ripa

Influência da suplementação de zinco na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Titular. Leonardo Antonio Mamede Zornoff
Co-orientadora: Profa.Dra. Fernanda Chiuso Minicucci

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ripa, Andréa de Freitas Gonçalves Della.
Influência da suplementação de zinco na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio / Andréa de Freitas Gonçalves Della Ripa. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff
Coorientador: Fernanda Chiuso Minicucci
Capes: 40101002

1. Infarto do miocárdio. 2. Zinco no organismo. 3. Remodelação ventricular. 4. Stress oxidativo.

Palavras-chave: infarto; remodelação; zinco.

Dedicatória

Aos meus pais *José e Leda*, por sempre terem feito o melhor que podiam para me criar, por me ensinarem os reais valores da vida, por todo carinho e pelo incentivo que sempre deram à minha carreira profissional.

Ao meu irmão *Fabio*, que sempre foi e sempre será meu maior exemplo de dedicação, integridade, responsabilidade, persistência e superação.

Ao meu marido *Bruno*, por acreditar sempre em mim, por ser um grande incentivador dos meus sonhos e por ser o melhor companheiro que eu poderia ter.

Agradecimentos especiais

A *Deus*, por sempre me guiar e estar ao meu lado!

Ao meu orientador *Prof. Titular Leonardo A. M. Zornoff*, por mais uma vez ter me dado a chance de subir um degrau em minha carreira. Agradeço a orientação e oportunidade da realização desse trabalho.

Às minhas colegas de pós-graduação e amigas *Bruna* e *Priscila*, que desde o início sempre estiverem presentes, me ajudando tanto na execução do trabalho quanto na minha formação pessoal e profissional.

Meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

Aos Professores do grupo de pesquisa, *Prof. Dr. Marcos F. Minicucci*, *Profª Drª Paula S. A. Gaiolla, Profª Drª Bertha F. Polegato* e *Prof. Titular. Sérigo A. R. Paiva* por sempre colaborarem prontamente e pelos ensinamentos e sugestões durante todo o trabalho. Á *Profª* Paula agradeço também as contribuições no Exame Geral de Qualificação.

À *Drª Fernanda Chiuso Minicucci*, pela co-orientação do projeto.

À *Profª Drª Silméia Garcia Zanatti Bazan* pela realização dos exames ecocardiográficos.

Ao *Prof. Adj. Katashi Okoshi*, pela realização de alguns exames ecocardiográficos, pela sempre pronta colaboração e pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

.À *Profª Adj. Alexandrina Sartori* e a *Drª Larissa Lumi Ishikawa* do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências, pela colaboração nas análises referentes a inflamação.

À *Drª Maura e sua equipe*, do Hospital Amaral Carvalho, pela colaboração nas análises das células inflamatórias.

À *Profª Adj. Ana Angélica H. Fernandes*, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Biociências pela colaboração nas análises referentes ao estresse oxidativo.

Aos *colegas* de Pós-Graduação do laboratório, por terem compartilhado dificuldades, conquistas e crescimentos em diferentes momentos dessa trajetória.

Aos *Colaboradores* da Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX, da Pós-Graduação e da Biblioteca que auxiliaram nas diferentes e essenciais etapas do projeto.

Aos *amigos* e *familiares* que sempre estiveram torcendo por mim.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* pela bolsa de estudos (Processo nº 2013/06862-4) e auxílio financeiro (Processo nº 2012/14500-2).

Meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“É tempo de começar um trabalho novo
(ou, quem sabe, de trilhar novamente
caminhos já conhecidos ...)
com a certeza de quem está buscando
o melhor para si
e para os outros!

É tempo de recolher exemplos,
de colecionar, pacientemente,
modelos construtivos de valores humanos...
de provar diferentes experiências
com o fim de escolher
o que for mais importante!

É tempo de “fazer”,de “ser”,
de “crescer” na direção do ideal!

É tempo de identificar (e identificar-se)
de descobrir nos outros (e dentro de si)
a razão maior dessa caminhada
com decisivos passos
para o exercício pleno
da bela tarefa de educar gerações!
Comecemos, pois!”

Maria José Lins e Silva

Sumário

Sumário

Sumário ii
Resumo iv
Abstract vii
1. Introdução 1
2. Justificativa 10
3. Hipótese 12
4. Objetivos 14
5. Metodologia 16
5.1. Infarto do miocárdio experimental 16
5.2. Estudo ecocardiográfico inicial 17
5.3. Acompanhamento do período experimental 17
5.4. Acondicionamento dos animais 18
5.5. Estudo ecocardiográfico final 18
5.6. Estudo do coração isolado - Preparação de Langendorff - Avaliação funcional "*in vitro*" 21
5.7. Eutanásia e coleta de material biológico 22
5.8. Análise morfométrica 22
5.9. Expressão proteica de colágenos I e III 23
5.10. Metaloproteinase 26
5.11. Avaliação da expressão de proteínas ligadas ao estresse oxidativo 27
5.11.1. Fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2) 27
5.11.2. Glutationa Peroxidase 29
5.11.3. Heme oxigenase 29
5.12. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes 30
5.13. Determinação de Células T reguladoras (T_{reg}) no baço 31
5.14. Determinação de citocinas e TIMP no coração 32
5.15. Dosagem de Zinco 33
5.16. Análise estatística 34
6. Resultados 37
7. Discussão 52
8. Conclusão 64
Referências 66

Resumo

Resumo

O processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio está associado a pior prognóstico. Na fase aguda, a remodelação favorece a formação do aneurisma e predispõe o coração infartado à ruptura ventricular. Cronicamente, está associada com maior prevalência de arritmias malignas e disfunção ventricular, pois a região não infartada sofre alterações genéticas, estruturais e bioquímicas que vão resultar em deterioração da capacidade funcional do coração e morte. Portanto, estratégias que atenuam a remodelação resultam em melhora do prognóstico pós-infarto. Nesse sentido, o papel do zinco tem sido estudado como um fator importante.

No nosso protocolo, avaliamos os efeitos da suplementação de zinco nas alterações morfológicas e funcionais cardíacas após o infarto agudo do miocárdio em ratos, por meio do estudo de alguns dos principais mecanismos envolvidos no processo de remodelação cardíaca: hipertrofia e alterações da geometria ventricular, alterações funcionais, alterações ligadas ao colágeno, estresse oxidativo e inflamação. Nos nossos resultados, observamos que animais que receberam zinco (infartados e sham) tiveram diminuição da área sistólica e área diastólica do ventrículo esquerdo. Na avaliação da função sistólica, o zinco atenuou a diminuição da velocidade de encurtamento da parede posterior, induzida pelo infarto. Em variáveis funcionais obtidos por meio do ecocardiograma tissular, o infarto induziu disfunção diastólica (avaliado pela relação E/E'), com atenuação dessa alteração pelo zinco. No estudo do coração isolado, os animais infartados apresentaram menor pressão sistólica e menores valores de derivadas positiva e negativa de pressão, sem influência do zinco. Adicionalmente, o zinco induziu diminuição de IFN-γ, do TNF-α e da atividade da superóxido dismutase, associado com aumento da catalase, glutationa peroxidase, IL-10 e linfócitos totais. Não

houve alterações da suplementação com zinco nas avaliações de linfócitos T reguladores no baço, atividade das metaloproteinases 2 e 9 e nos valores do Nrf-2.

Assim, concluímos que o zinco atenuou variáveis associadas à remodelação cardíaca induzida pelo infarto em ratos, por modulação de alterações no estresse oxidativo e processo inflamatório.

Abstract

Abstract

The process of cardiac remodeling after myocardial infarction is associated with poor outcome. In the acute phase, remodeling promotes the formation of the aneurysm and predisposes to ventricular rupture. Chronically, it is associated with higher prevalence of malignant arrhythmias and ventricular dysfunction, because the non infarcted region undergoes genetic, structural and biochemical changes which will result in impairment of functional capacity of the heart and death. Therefore, strategies to attenuate remodeling result in improved prognosis after myocardial infarction. Thus, the role of zinc has been studied as an important factor.

In our protocol, we assessed the effects of zinc supplementation in cardiac morphological and functional changes after acute myocardial infarction in rats, through the study of some of the main mechanisms involved in cardiac remodeling process: hypertrophy and changes in ventricular geometry, functional changes, collagen amount, oxidative stress and inflammation. In our results, we found that animals that received zinc (infarcted and sham) decreased the left ventricular systolic and diastolic area. In the assessment of systolic function, zinc attenuated the decrease in the posterior wall shortening velocity in infracted rats. In functional variables obtained by tissue echocardiography, infarction induced diastolic dysfunction (estimated by the E/ E') was attenuated by zinc. In the study of isolated heart, infarcted animals had lower systolic blood pressure and lower values of positive and negative derivative of pressure without influence of zinc. Additionally, zinc induced a decrease of IFN-γ, TNF-α and superoxide dismutase activity associated with increased catalase, glutathione

peroxidase, IL-10 and total lymphocytes. There was no change with zinc supplementation in the evaluations of regulatory T lymphocytes in the spleen, activity of metalloproteinases 2 and 9 and Nrf-2 values.

Thus, we conclude that zinc attenuated variables associated with infarction induced cardiac remodeling in rats, by modulation changes in oxidative stress and inflammation.

1 Introdução

1. Introdução

As doenças cardiovasculares são umas das principais causas de morte no mundo. Segundo a *World Health Organization*, aproximadamente 17,5 milhões de pessoas morrem em todo o mundo em decorrência de doenças cardiovasculares, o que representa 31% do total de mortes[1]. No Brasil, em 2011, 30,8% das mortes por doenças do aparelho circulatório foram decorrentes de doenças isquêmicas do coração[2].

A insuficiência cardíaca, que pode ser uma consequência importante das doenças isquêmicas, é definida por alterações estruturais ou funcionais cardíacas que acarretam inadequado suprimento sanguíneo para atender as necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno venoso normal, ou fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento[3]. Existem diversos fatores causadores, entre eles, a isquemia e hipertensão arterial sistêmica. Dentre as alterações isquêmicas, podemos destacar as síndromes coronarianas agudas, principalmente o infarto do miocárdio (IM) com e sem supradesnivelamento do segmento ST. Estudos epidemiológicos mostraram que 40% dos IM com supradesnivelamento do segmento ST evoluem com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e 25% com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca[4].

Após o IM podem ocorrer alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada como a não infartada. Essas alterações são conhecidas com o nome de remodelação ventricular ou cardíaca. A remodelação cardíaca é definida como alterações genéticas, morfológicas e bioquímicas, que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e na função do coração em reposta a determinada agressão[5-8]. Entre as principais alterações do evento,

podemos citar alongamento dos miócitos, afilamento da parede ventricular, inflamação e reabsorção do tecido necrosado, formação de cicatriz, dilatação do ventrículo, hipertrofia do miócito, perda de miócitos, excessiva deposição de colágeno no interstício e apoptose[7].

O processo de remodelação após o IM é bastante complexo. A perda aguda de miócitos após o IM é acompanhada pela degradação do colágeno interfibrilar. A degradação do colágeno que ocorre pela ativação das metaloproteinases e das serina proteases promove o deslizamento dos miócitos necróticos e realinhamento dos mesmos em série[8-10]. Esse novo realinhamento leva à diminuição da espessura da parede e dilatação da cavidade do ventrículo esquerdo, processo definido como expansão do infarto[7-12].

Como consequência da expansão do infarto o ventrículo esquerdo perde a conformação elíptica e assume a forma esférica, causando elevação do estresse parietal diastólico e sistólico. O aumento do estresse parietal é importante estímulo para a síntese de unidades contráteis, preferencialmente em série[11]. Logo, cronicamente pode ocorrer aumento da relação do raio da cavidade/espessura da parede ventricular esquerda, alteração característica da hipertrofia excêntrica. Todas essas alterações também envolvem a região não infartada, e ativam os sistemas neuro-hormonais, como o sistema nervoso autônomo simpático e o renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)[12].

Embora o processo de remodelação possa levar à perda progressiva da função cardíaca, os mecanismos que levam a este processo não estão completamente elucidados. Entre os mecanismos envolvidos, podemos destacar modificações nas proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio; alterações das proteínas contráteis, em particular as isoformas da cadeia pesada da miosina; aumento da morte celular,

principalmente por apoptose; acúmulo de colágeno, resultando em fibrose; alterações das metaloproteases, em particular o aumento da atividade das metaloproteases 2 e 9; aumento do estresse oxidativo; déficit energético, com aumento da atividade da via glicolítica e diminuição na utilização de ácidos graxos livres; alteração na produção de citocinas inflamatórias e alterações da geometria ventricular[13-18]

A princípio, a remodelação ventricular tem como objetivo manter a função cardíaca. Cronicamente, entretanto, com a continuidade e/ou progressão do processo, pode ocorrer disfunção ventricular progressiva e morte[5-7]. Diversos fatores estão associados com a remodelação cardíaca após o IM e recentemente o papel do zinco nesses mecanismos tem sido estudado.

Zinco

O zinco é um essencial metal de transição, um dos elementos-traço mais abundantes no organismo, envolvido na formação ou agindo como cofator de mais de 3000 proteínas humanas com papéis enzimáticos, reguladores e estruturais, participando de diversos processos como defesa antioxidante, ações no sistema imune, crescimento e desenvolvimento[19, 20]. Seu papel estrutural é dado pela participação na formação espacial de enzimas e proteínas e estabilizando o DNA. Como catalisador de mais de 300 enzimas, é considerado um ácido de Lewis com capacidade de receber elétrons, e pode ser encontrado em diversas classes enzimáticas como RNA polimerases, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, carboxipeptidases, superóxido dismutase, anidrase carbônica além de ter participação em ligações intracelulares para os receptores de células T, as quais são necessárias para sua ativação e desenvolvimento. Como papel regulador, atua nas sinapses, síntese proteica, replicação de ácidos nucleicos, divisão celular, ação hormonal, funcionamento de linfócitos e fibroblastos[21].

Seus principais alimentos fonte são mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos[20]. A ingestão adequada de zinco vai de 8 a 11 mg/dia para mulheres e homens adultos, respectivamente[22]. No organismo, a maior parte do zinco encontra-se nos músculos e ossos, porém não há grandes reservas para períodos prolongados de escassez.

A absorção é mais eficiente na presença de aminoácidos cisteína e histidina, fosfatos, ácidos orgânicos e, em contrapartida, os fitatos dificultam sua biodisponibilidade[20]. A absorção do zinco ocorre principalmente no jejuno, e é regulada pela metalotioneína, uma metaloproteína que se liga ao zinco, cobre e outros íons divalentes[23, 24]. Existem várias outras proteínas transportadoras de zinco no meio extracelular, do interior de vesículas intracelulares e no citoplasma. Quanto a metalotioneína, ela liga-se ao zinco e controla a sua concentração. Quanto mais zinco disponível, maior a produção da mesma, por meio da ação de zinco nos fatores de transcrição formando a metalotioneína. Quando o zinco está em baixa concentração, há o desligamento da metalotioneína e liberação do zinco para a célula[25]. O zinco é excretado principalmente pelo trato gastrointestinal e aproximadamente 10% pela urina. Normalmente, os níveis séricos de zinco regulam sua excreção urinária.

O zinco é essencial para a atividade de diversas enzimas como a enzima conversora da angiotensina, a superóxido dismutase e as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). Além disso, esse metal tem papel fundamental na estrutura das membranas celulares, e na estabilização das estruturas de RNA, DNA e ribossomos[23, 24].

A deficiência de zinco, cada vez mais encontrada em países em desenvolvimento[26], pode ocorrer devido a sua baixa ingestão, síndromes má-absortivas como doenças inflamatórias intestinais, aumento das perdas pelo trato gastrointestinal e

urinárias, e uso de medicações como diuréticos e inibidores da enzima de conversão da angiotensina [20, 27]. As concentrações séricas e plasmáticas de zinco não necessariamente se correlacionam com seus níveis intracelulares[24]. Como a medida de suas concentrações em eritrócitos, leucócitos, cabelos e ossos não é tão prática, a concentração sérica da superóxido dismutase tem sido utilizada como marcador indireto do *status* do zinco. Sinais e sintomas de sua deficiência incluem perda do paladar e apetite, perda de cabelo, alterações imunológicas, úlceras de decúbito[28] e acrodermatite enteropática[29, 30].

Os indivíduos idosos e pacientes com insuficiência cardíaca apresentam risco aumentado de deficiência de zinco[24]. Recentemente a ativação do SRAA está sendo associada ao aumento da perda urinária de zinco, com consequente redução da sua concentração sérica e da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), que tem esse metal divalente como cofator[31, 32]. Além desse mecanismo, a translocação do zinco para os locais de lesão celular e o uso de medicações como diuréticos e inibidores da enzima conversora da angiotensina, parecem ser os principais responsáveis pela associação das reduções das concentrações séricas de zinco encontradas em modelos experimentais e clínicos de insuficiência cardíaca[24, 33].

Entre os mecanismos sugeridos para a influência do *status* do zinco na remodelação cardíaca destacam-se a interferência com a atividade das MMPs e o aumento do estresse oxidativo e, consequentemente, do processo inflamatório[24, 31]. As MMPs são uma família de enzimas zinco-dependentes, com mais de 25 tipos identificadas, responsáveis pela desnaturação e degradação do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular. O equilíbrio entre a produção e degradação do colágeno é dependente da ativação das MMPs e de seus inibidores teciduais os TIMPs. Alterações do *status* do zinco podem interferir com a atividade dessas enzimas, no

entanto o exato papel da deficiência de zinco e de sua suplementação na atividade das MMPs e no processo de remodelação cardíaca ainda não é bem compreendido[31, 34].

Relevância clínica das alterações de zinco

A deficiência de zinco também está relacionada ao aumento do estresse oxidativo, principalmente devido à redução da atividade da SOD[35]. Esse aumento do estresse oxidativo pode levar à lesão miocárdica com exposição de proteínas intracelulares, e consequente ativação de resposta imune inata pela ativação de receptores *Toll-like*, do complemento e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)[36]. A ativação da resposta imune inata leva inicialmente ao aumento de citocinas e à invasão da área infartada por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos. Em uma fase mais tardia da resposta imunológica, ocorre a infiltração de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ na área infartada[37]. Trabalhos experimentais evidenciaram que esses linfócitos podem causar lesão miocárdica tanto *in vivo*, como em cultura de cardiomiócitos[38, 39]. Além disso, nessa fase também é detectada a presença de autoanticorpos específicos contra antígenos cardíacos como troponina I, miosina e cardiolipina no soro de pacientes após o IM[40]. A presença desses autoanticorpos leva à lesão cardíaca e correlaciona-se com a deterioração da função cardíaca[41].

Recentemente, uma nova linhagem de células T, conhecidas como T reguladoras (T_{reg}), caracterizadas por expressarem CD4, CD25 e Foxp3, vem apresentando um papel fundamental na regulação da imunidade inata e adaptativa, em situações fisiológicas e patológicas[42]. A função supressora das células T_{reg} é mediada através da interação direta com as células alvo e pela secreção de citocinas como a IL-10 e o TGF-β (fator de

crescimento transformador beta)[43]. Estudos experimentais mostraram que a ativação das células T_{reg} leva à melhora da cicatrização após o IM[44]. Além disso, a redução do recrutamento de células T_{reg} para a área infartada está associada à intensificação da remodelação ventricular[45]. No entanto, a influência da suplementação de zinco no número de células T_{reg} ainda não foi estudada.

Em metanálise publicada por Liu *et al.*[46], foi mostrada associação significativa entre deficiência de zinco e infarto do miocárdio, porém mais estudos sobre o entendimento das causas dessas associações ainda são necessários para o entendimento do processo.

Suplementação de zinco

A eficácia da suplementação em aumentar o zinco intracelular e melhorar as defesas antioxidantes já foi mostrada em modelo de lesão cardíaca induzida por infusão de aldosterona e ingestão de sódio[33]. Gandhi *et al*. mostraram nesse modelo que a suplementação com $ZnSO_4$ prevenia a redução da concentração sérica de zinco causada pelo excesso de aldosterona, e a queda da atividade da SOD. Além disso, houve aumento do zinco no citoplasma dos cardiomiócitos, bem como redução de biomarcadores do estresse oxidativo e da formação de fibrose miocárdica[33]. Os efeitos cardioprotetores da suplementação de zinco também foram mostrados em modelos de diabetes induzidos por estreptozotocina, de isquemia-reperfusão e após infusão de isoproterenol[47-49]. Neste último estudo, Chvapil *et al.* administraram zinco parenteral em ratos que eram submetidos à lesão cardíaca por infusão de isoproterenol, sendo que a administração prévia de zinco reduziu o grau de necrose miocárdica[49]. No entanto, o

papel da suplementação do zinco na remodelação cardíaca após o IM ainda é pouco estudado.

Os dados e comentários expostos anteriormente permitem elaborar a hipótese de que a suplementação de zinco pode atenuar a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. Entre outros mecanismos fisiopatológicos, acreditamos que a redução do estresse oxidativo, do processo inflamatório, e o aumento das células T_{reg} possam estar envolvidos nas ações do zinco nesse modelo.

2 Justificativa

2. Justificativa

Considerando que o infarto do miocárdio é altamente prevalente em todo o mundo, a identificação do papel do zinco como modulador do processo de remodelação cardíaca torna-se relevante, podendo levar a importantes estratégias terapêuticas e repercussões clínicas.

3 Hipótese

3. Hipótese

A suplementação do zinco atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos.

4 Objetivos

4. Objetivos

Avaliar a influência da suplementação de zinco no processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio experimental em ratos.

5 Metodologia

5. Metodologia

O protocolo experimental do trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da nossa instituição, estando em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 280 ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Inicialmente, foram divididos em 2 grupos: Grupo Sham, que sofreu infarto fictício (cirurgia simulada), e Grupo Infarto, que sofreu infarto experimental, conforme descrito a seguir.

5.1. Infarto do miocárdio experimental

O infarto agudo do miocárdio foi produzido de acordo com método inicialmente descrito por Heimburger e modificado por Pfeffer *et al*[50-52]. Após anestesia com cloridrato de quetamina (70mg/kg) por via intramuscular, foi realizada toracotomia esquerda entre o 4^{o} e o 5^{o} espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronária esquerda ligada a, aproximadamente, 2 mm da origem, com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. Em seguida o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado. Para os animais sham, o procedimento foi o mesmo, porém sem a ligação da coronária.

5.2. Estudo ecocardiográfico inicial

Após 3 a 5 dias da realização do procedimento cirúrgico de indução do infarto, foi realizado um estudo ecocardiográfico inicial para avaliar áreas sistólica e diastólica e fração de variação da área em todos os animais, além da medida do tamanho do infarto nos animais induzidos à oclusão da coronária, com objetivo de garantir a homogeneidade entre os grupos de observação. A descrição do procedimento está no item 5.5.

5.3. Acompanhamento do período experimental

Após o estudo ecocardiográfico inicial, os animais foram novamente subdivididos, para resultar em 4 grupos experimentais de observação, com duração de 3 meses. A alocação dos animais em grupos experimentais foi feita da seguinte forma:

a) Grupo Sham dividido em dois novos grupos:
   - *Grupo Sham Controle (SC):* Animais Sham que receberam aplicação intraperitoneal de solução salina, em dias alternados.
   - *Grupo Sham Zinco (SZ):* Animais Sham que receberam suplementação de zinco (sulfato de zinco, 5 mg/kg) intraperitoneal, em dias alternados.

b) Grupo Infarto dividido em dois novos grupos

- *Grupo Infarto Controle (IC):* Animais Infartados que receberam aplicação de solução salina intraperitoneal, em dias alternados.
- *Grupo Infarto Zinco (IZ):* Animais infartados que receberam suplementação de zinco (sulfato de zinco, 5 mg/kg) intraperitoneal, em dias alternados.

5.4. Acondicionamento dos animais

Os animais foram acondicionados no biotério em gaiolas com 2 ou 3 animais, com livre acesso a água e ração. A temperatura foi mantida a 22 ± 2°C e a umidade controlada. Os ciclos de luz (claro/escuro) foram de 12 horas. Os animais eram pesados uma vez por semana, durante todo o período experimental.

5.5. Estudo ecocardiográfico final

O conjunto de variáveis obtidas por meio do estudo ecocardiográfico possibilitou avaliar a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca (como massa miocárdica e dimensão de câmara cardíaca). A maior vantagem desse método é o seu caráter não invasivo, sendo realizado em circunstâncias muito próximas às fisiológicas dos animais.

O equipamento utilizado possui configuração técnica específica que possibilita a avaliação dos fluxos sanguíneos intracardíacos e das dimensões das estruturas dos corações dos animais.

Após 3 a 5 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para assegurar que não havia diferenças entre os grupos e para aferição do tamanho do infarto. No final dos três meses de acompanhamento, foi realizado novo estudo ecocardiográfico.

Nos dois momentos, tanto no estudo inicial quanto o final, o procedimento foi o mesmo. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg), por via intraperitoneal. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo, para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento Vivid S6 da General Electric Medical Systems (Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz.

A avaliação do fluxo transvalvar mitral foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz. A função diastólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($TRIV/(R\text{-}R)^{0,5}$).

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor, com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. As espessuras

diastólicas das paredes do VE também foram avaliadas pelo modo-M. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 200 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography*[53] e já validadas no modelo de ratos infartados. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e as espessuras da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas (AD) e sistólicas (AS) da cavidade ventricular esquerda foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, no plano paraesternal eixo menor ao nível dos músculos papilares. A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a fração de variação de área (FVA=AD-AS/AD x 100) e velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos.

A avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico (índice de Tei). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' média (E/E').

5.6. Estudo do coração isolado - Preparação de Langendorff - Avaliação funcional "*in vitro*"

Após a realização do segundo ecocardiograma, 10 animais de cada grupo receberam tiopental (50 mg/kg) e heparina (1000 UI) por via intraperitoneal e foram ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, as carótidas ligadas, a aorta cateterizada com cânula de metal número 15 e foi iniciada a perfusão miocárdica retrógrada com solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 $MgSO_4$; 2,5 $CaCl_2$; 1,15 NaH_2PO_4; 25 $NaHCO_3$; 11 glicose. A solução acima foi acrescida de manitol, na concentração de 8 mmol, para assegurar maior preservação miocárdica. Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sacks Elektronik-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg. A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO_2, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500-600 mmHg, à temperatura de 37^o C, pH entre 7,3 e 7,4. O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do VE puncionado com agulha, para drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de látex, atado ao tubo de polietileno PE 90, foi colocado na cavidade ventricular. A outra extremidade do tubo de polietileno foi conectada a uma torneira de 3 vias, sendo uma das vias acoplada a um transdutor de pressão (Stathan P23 XL) e a outra, a seringa contendo água, que permitiu a variação do volume do balão intracavitário. A musculatura atrial direita, compreendendo o nódulo sinoatrial foi extirpada e um eletrodo de marcapasso artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca entre 200-250. Por meio da preparação descrita, foram obtidas curvas de

Starling com infusão de líquido no balão, que permitiu variar a pressão diastólica no VE de 0 a 25 mmHg, através de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se as pressões sistólica e diastólica correspondente a cada variação de volume. Nesta preparação, em que o coração opera em condições isovolumétricas, a pressão desenvolvida (pressão sistólica menos a pressão diastólica) foi utilizada como indicadora da capacidade contrátil. Foram registradas também, a primeira derivada positiva de pressão e a derivada negativa de pressão. Esses índices são utilizados, respectivamente, como parâmetros de função sistólica e diastólica do VE.

5.7. Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram anestesiados com dose excessiva de tiopental. O coração foi dissecado e o VE foi seccionado anel mediano cortado de 4 a 6 mm da ponta para confecção de lâminas histológicas e o restante foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado a -80° C. O sangue foi coletado, centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o soro armazenado a -80°C. Todos os tubos utilizados foram desmineralizados em solução de ácido nítrico 20%.

5.8. Análise morfométrica

Após coleta do coração, um anel do VE de aproximadamente 3 mm, seccionado de 4 a 6 mm ponta do VE, foi retirado e colocado em formol tamponado (formol a 10%) por no máximo 24 horas[54, 55]. Depois, foram lavados em água corrente, armazenados em

álcool 70% e inclusos em parafina. Posteriormente foram completadas as etapas para coloração com Hematoxilina-eosina e Picrosirius red.

Foram realizados cortes histológicos de 4 µm nos blocos de parafina e, os mesmos, corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para que posteriormente fossem aferidas as áreas seccional transversa dos miócitos (ASM). Empregou-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador com programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de Picrosirius red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para determinação do tamanho do infarto. Este foi calculado pela soma do comprimento endocárdico e epicárdico do segmento infartado, em relação à soma do comprimento endocárdico e epicárdico total do ventrículo esquerdo. Para este trabalho, excluímos os infartos menores que 35%, uma vez que nosso objetivo foi estudar os efeitos na remodelação e apenas infartos moderados/grandes resultam em alterações morfológicas e funcionais cardíacas [56].

5.9. Expressão proteica de colágenos I e III

A expressão das proteínas colágeno I e colágeno III foi realizada pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

a) Extração das proteínas miocárdicas

Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 mL de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford[57] utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

b) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris – HCl 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β-mercaptoetanol 200 mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCl 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCl 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C com 50 µg de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 30 minutos a 50 V e 2,5 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%).

c) Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1 M pH 8,0, NaCl 5 M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, em agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0 e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1,5 horas em agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodetecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas no analisador de imagens. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH.

Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal e repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas (já normalizadas) foram então normalizadas pelo GAPDH (já normalizado), para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

d) Anticorpos primários utilizados

- Colágeno I, goat policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-8784). Diluição utilizada de 1:100.
- Colágeno III, mouse monoclonal (Abcam, ab6310). Diluição utilizada: 1:5000.
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology,Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada 1:10000.

e) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology,Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology,Inc, Europe, sc-2020). Diluição utilizada: 1:5000.

5.10. Metaloproteinase

A atividade da metaloproteinase foi avaliada pelo método de zimografia. Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X, 10 mM $CaCl_2$, inibidor de protease (P8340, Sigma). Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 200 µl deste tampão. As amostras foram trituradas a 21.000 rpm e centrifugadas a 12000 rpm, por 20 minutos, a 4^{o}C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford[57] e a concentração final ajustada para 5 mg/µl. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris,

pH 6,8; glicerol e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato *Bio-Rad mini-protean*, a 100 V por 1,5 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 14 horas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de $CaCl_2$, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação, o gel foi corado com *Comassie blue* 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Os géis foram fotografados no analisador de imagens *Image Quant LAS 4000* (GE *Healthcare Life Sciences*) e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel.

5.11. Avaliação da expressão de proteínas ligadas ao estresse oxidativo

5.11.1. Fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2)

A expressão do Nrf-2 foi realizada pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

a) Extração das proteínas miocárdicas

Fragmentos de aproximadamente 60 mg de tecido do VE foram homogeneizados com 500µl de tampão de extração (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl2, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,05% NP40) manualmente com bastão de vidro, aguardado 10 minutos e centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado (fração citoplasmática) e o pellet ressuspendido com tampão (5 mM HEPES, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 26% glicerol (v/v)) adicionado a NaCl, homogeneizado. Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do Nrf2. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford[57] utilizando-se a curva de BSA Protein Standard como padrão.

b) Eletroforese em gel

Realizada com a mesma metodologia utilizada para as proteínas de colágeno já descrita anteriormente (ver item 5.9), com as seguintes diferenças: gel de resolução utilizado de 10% e corrida a 100 V por 2 horas e 20 minutos.

c) Transferência e identificação das proteínas

Realizada com a mesma metodologia utilizada para os colágenos, já descrita anteriormente.

d) Anticorpos primários utilizados

- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada: 1:5000.
- Nrf-2, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-722). A diluição utilizada foi de 1: 400.

e) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004). A diluição utilizada foi de 1: 8000.

5.11.2. Glutationa Peroxidase

A extração das proteínas e execução da metodologia foi a mesma utilizada para os colágenos, já descrita acima.

a) Anticorpos primários utilizados

- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada: 1:5000.
- Glutationa Peroxidase (Abcam, ab22604). A diluição utilizada foi de 1: 400.

b) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004). A diluição utilizada foi de 1: 5000.

5.11.3. Heme oxigenase

A extração das proteínas e execução da metodologia foi a mesma utilizada para os colágenos, já descrita acima.

a) Anticorpos primários utilizados

- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada: 1:5000.
- Heme oxigenase mouse monoclonal (Abcam, ab13248). A diluição utilizada foi de 1: 1000.

b) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.

5.12. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para avaliação por espectrofotometria, amostras de aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas a 10000 rpm, durante 15 minutos a 4^0C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidroperóxido de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes.

As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (µQuant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes utilizados foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

a) Determinação da atividade da glutationa peroxidase (GSH Px)

Foi determinada a partir da oxidação do $NADPH_2$ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutationa reduzida, azida sódica, EDTA, glutationa redutase, a qual catalisa a redução da glutationa oxidada[58].

b) Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo $NADH_2$ e fenazina metassulfato[59].

5.13. Determinação de Células T reguladoras (T_{reg}) no baço

Após os animais fazerem o estudo ecocardiográfico, foram anestesiados, eutanasiados e o baço foi coletado. Em seguida, o baço foi macerado com 1 ml de meio RPMI incompleto e colocado essa suspensão celular em tubo Falcon de 15 ml e completado o volume com meio RPMI incompleto (com gentamicina) até 7 ml e então centrifugado a 300 g, 10 minutos, 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram lisadas, por ressuspensão do pellet de baço em 5 ml de tampão de lise, incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi completado volume com meio RPMI incompleto até 15 ml. Centrifugado novamente a 300 g, 10 minutos, 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI completo (10% SBF e 1% L-glutamina). Foi contado o número de células, com corante Turk.

a) Marcação $CD4^+CD25^+$

A marcação de CD4 e CD25 foi feita em tubo para citometria protegido da luz (papel laminado). Foram utilizadas $2{,}5x10^6$ células em um volume total de 100 µl + 0,5

µg (1 µl) anticorpo CD4-FITC + 0,25 µg (1,3µl) anticorpo CD25-APC, incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Para o controle isotípico foi utilizado 75 µl de células ($2,5x10^6$ células) + 20 µl (1 µg) anti –FITC + 5 µl (0,5 µg) anti-APC. Após a marcação foi colocado 1 ml de tampão AutoMacs Running Buffer – Miltenyi Biotec e centrifugado a 450 g, 10minutos, 4° C. O sobrenadante foi desprezado e então iniciada a marcação com Foxp3.

b) Marcação do Foxp3

O pellet foi ressuspenso e adicionado 1ml de tampão de permeabilização/ fixação e então, incubado a 4° C no escuro. Após etapas de lavagens e centrifugações, foi adicionado 1 µl (0,2 µg) de anticorpo anti-Foxp3-PE. Para o controle isotípico utilizou-se 95 µl tampão de permeabilização + 5 µl anti - PE. Incubação no escuro. Após lavagens e novas centrifugações, as amostras estavam prontas e foram lidas em citômetro de fluxo.

5.14. Determinação de citocinas e TIMP no coração

Para avaliação pelo método ELISA sanduíche, foi feita a extração da proteína do tecido do VE adicionando 1 ml de tampão de extração RIPA (NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich) a aproximadamente 80mg de tecido. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em

alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford[57] utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

Nesse extrato proteico foi avaliada a concentração de TNF-α, IFN-γ, IL-10 e TIMP. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-TNF-α ou anti-IFN-γ ou anti-IL-10 ou anti-TIMP de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionada 300 μL da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de TNF-α, IFN-γ, IL-10 e TIMP, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-TNF-α ou anti-IFN-γ ou anti-IL-10 ou anti-TIMP de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluído 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H_2SO_4 16% e a leitura realizada em 492 nm.

5.15. Dosagem de Zinco

O sangue dos animais foi coletado, centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o soro armazenado a -80°C. Posteriormente, em uma pequena fração do soro foi

feita a dosagem de zinco, pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica (CHAMA), em laboratório externo ao nosso centro de pesquisa.

5.16. Análise estatística

Quando os dados apresentaram distribuição normal, eles foram apresentados em média ± erro padrão. Caso não tenham tido distribuição normal, foram transformados e também expressos em média ± erro padrão.

Para comparação do tamanho do infarto, foi utilizado o teste t de Student. Nas demais variáveis, a comparação entre os grupos foi feita pelo teste ANOVA de duas vias. Cabe ressaltar que neste teste, é feita inicialmente a comparação da influência dos fatores de forma independente: fator infarto (I) e fator zinco (Z). Após esta primeira comparação, havendo interação entre os fatores, foi realizado o pós-teste de Holm-Sidak para verificação da diferença entre os grupos. Nesse caso, a comparação foi feita entre os grupos infartados (IC e IZ), os grupos sham (SCxSZ), os que receberam zinco (IZxSZ) e os que receberam ração padrão (ICxSC).

Os resultados são apresentados em tabelas, onde letras diferentes indicam diferenças entre os grupos. A representação na forma de figuras ilustra algumas diferenças entre os grupos experimentais, adotando o sinal (*) como indicativo da comparação que apresentou diferença. Quando não houve interação entre os grupos experimentais, mas houve diferença significativa entre os fatores de forma independente, as figuras foram apresentadas mostrando a comparação desses fatores (zinco e controle, infarto e sham), também adotando o sinal (*) da diferença.

O pacote estatístico utilizado foi o *SigmaStat* for *Windows* versão 3.5 (Systat Software, Inc) e os gráficos foram elaborados no programa *SigmaPlot* for *Windows* versão 11.0 (Systat Software, Inc).

Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

6 Resultados

6.Resultados

Acompanhamento durante o período experimental

Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos animais (Tabela 1).

Após 48 horas da cirurgia, a mortalidade dos animais infartados foi 27,7%, com 125 animais sobreviventes. No grupo não infartado, todos os animais sobreviveram. Durante o seguimento, 7 animais do grupo IC e 6 animais do grupo IZ morreram. Para as avaliações propostas no trabalho, utilizamos animais com infartos maiores que 35%, totalizando assim o número de animais indicado nas tabelas.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados do ecocardiograma estão na tabela 1. Podemos observar que, conforme o esperado, o infarto induziu piora significante das variáveis funcionais, considerando as variáveis de função sistólica e as de função diastólica. Nesse sentido, o zinco pode ter atenuado a disfunção cardíaca induzida pelo infarto, uma vez que encontramos diminuição de área sistólica com o uso do zinco, porém de forma isolada. Em variáveis funcionais obtidos por meio do ecocardiograma tissular. podemos obervar que o infarto induziu importante disfunção diastólica e o zinco atenuou isso, por exemplo como observado no na relação E/E’ (Figuras 1 a 7).

Coração isolado

No estudo do coração isolado, realizado após o estudo ecocardiográfico final, encontramos alterações apenas nos animais infartados, com diminuição das derivadas positiva e negativa e também da pressão sistólica, porém sem influência do zinco (tabela 2)

Morfometria

Quanto ao tamanho do infarto, não houve diferença entre os grupos (IC=42,6%±6,5; IZ=40,6%±5,3; p=0,691). O infarto aumentou a área do miócito, avaliado histologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina, porém, sem interferência do zinco, (SC=236,3±15,7; SZ=216,1±16; IC=392±16; IZ=388±15,7; p(I)<0,001; p(Z)=0,756; p(IxZ)=0,664).

Colágeno

Na tabela 3 estão apresentados os valores de expressão proteica dos colágenos I e III. Encontramos maior expressão de Colágenos I e III nos animais infartados, porém não houve interferência da suplementação de zinco nos grupos estudados (figuras 8 e 9)

Na tabela 8 estão apresentados os resultados da atividade de metaloproteinase 2. Não encontramos nenhuma diferença entre os grupos nessa técnica. Na tabela 6 encontra-se o resultado da avaliação do TIMP-1, que também não apresentou diferença nos valores encontrados.

Avaliação do estresse oxidativo

A atividade de alguns fatores ligados ao estresse oxidativo estão apresentados na tabela 5. Nos animais sham, a suplementação de zinco diminuiu a peroxidação lipídica, porém esse resultado não foi observado nos animais infartados. A catalase se mostrou diminuída nos animais infartados, e o zinco, de forma independente, aumentou sua atividade. A enzima superóxido dismutase (SOD) houve interação entre os fatores, onde os animais infartados que receberam a suplementação de zinco tiveram menor atividade de superóxido dismutase em relação aos infartados controle. A glutationa peroxidase apareceu diminuída nos animais infartados e o zinco, de forma isolada, aumentou sua atividade.

Na tabela 4 estão apresentados os dados de expressão de proteínas antioxidante Nrf2, glutationa e hemeoxigenase. Não encontramos diferenças para o Nrf2, porém, a expressão da glutationa foi maior isoladamente nos animais suplementados com zinco e a heme oxigenase foi maior nos animais sham suplementados com zinco, porém esse comportamento não foi observado nos animais infartados (Figuras 10 e 11).

Avaliação da inflamação

Na tabela 6, os dados são referentes as citocinas. Os animais infartados apresentaram menores valores de IFN-γ e níveis mais elevados de IL-10, porém sem interferência do zinco. Porém, os animais que foram suplementados com zinco, independente de serem infartados ou sham, tiveram níveis menores de TNF-α.

Os resultados mostrados na tabela 7 são referentes à dosagem de células T reguladoras no baço. Nos nossos resultados, encontramos que o infarto aumentou a quantidade de células Treg no baço, assim como a quantidade de linfócitos totais. O zinco, isolado, aumentou a quantidade de CD4+ nos animais infartados, porém não observamos efeitos da suplementação em relação as células T_{reg}.

Dosagem de zinco

O zinco dosado no soro ficou aumentado em todos os animais suplementados, independente do infarto (SC=99,1±4,29; SZ=103,1±3,7; IC=100±4,29; IZ=114,8±4,29; p(I)=0,145; p(Z)=0,034; p(IxZ)=0,21), mostrando eficiência da suplementação (Figura 12).

Tabela 1. Variáveis ecocardiográficas.

Variável	SC=50	SZ=50	IC=32	IZ=30	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Peso (Kg)	0,38 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,28 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,056	0,409	0,258
DDVE (mm)	7,5 ± 0,2	7 ± 0,3	9,4 ± 0,2	9 ± 0,2	<0,001	0,08	0,874
DSVE (mm)	3,7 ± 0,4	3,1 ± 0,4	6,7 ± 0,2	6,2 ± 0,2	<0,001	0,112	0,925
EDSIV (mm)	1,62 ± 0,05	1,7 ± 0,05	1,4 ± 0,03	1,4 ± 0,03	<0,001	0,333	0,059
AE (mm)	5,5 ± 0,1	4,9 ± 0,1	6,2 ± 0,1	5,7 ± 0,1	<0,001	<0,001	0,524
AE/PC (mm/kg)	10 ± 0,5	14 ± 0,5	16 ± 0,5	14 ± 0,3	0,002	0,006	0,986
E (cm/s)	$66,2 \pm 3^{a}$	78 ± 3^{b}	$72,8 \pm 2^{a}$	$69,9 \pm 2^{a}$	0,791	0,127	0,012
A (cm/s)	43,3 ± 3,4	57,1 ± 3,4	52,7 ± 2	55,4 ± 2	0,190	0,005	0,05
E/A	1,56 ± 0,13	1,4 ± 0,13	1,525 ± 0,09	1,3 ± 0,09	0,801	0,211	0,917
VEPP (mm/s)	55,6 ± 2,5	64 ± 2,5	36 ± 1,6	39,2 ± 1,6	<0,001	0,01	0,245
TRIV (ms)	31,2 ± 1,6	30,2 ± 1,6	37,2 ± 1	36,2 ± 1	<0,001	0,464	0,991
TDE (ms)	51,9 ± 2,6	43,1 ± 2,7	51,2 ± 1,8	48,8 ± 1,8	0,245	0,014	0,179
FC (bpm)	267 ± 11^{a}	356 ± 11^{b}	287 ± 8^{a}	294 ± 8^{a}	0,033	<0,001	<0,001
Área Diastólica (mm^2)	50,8 ± 4,7	40,1 ± 4,7	79,4 ± 3,2	74,9 ± 3,2	<0,001	0,057	0,43
Área Sistólica (mm^2)	22,6 ± 3,7	11,2 ± 3,7	50,1 ± 2,6	44 ± 2,6	<0,001	0,007	0,401
FVA	57,8 ± 12,9	73,8 ± 12,9	24,2 ± 8,9	42,9 ± 8,9	0,003	0,111	0,899
Índice Tei	0,63 ± 0,06	0,45 ± 0,07	0,94 ± 0,04	0,82 ± 0,04	<0,001	0,011	0,599
E/E' média	13,2 ± 1	11,9 ± 1	17,6 ±0,7	15,5 ± 0,7	<0,001	0,052	0,598

SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. PC: Peso corporal; DDVE: Diâmetro diastólico do VE; DSVE: Diâmetro sistólico do VE; AE: átrio esquerdo; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; VEPP: Velocidade de encurtamento da parede posterior; TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; TDE: Tempo de desaceleração da onda E mitral; FC: Frequência cardíaca; FVA: fração de variação da área; Índice de Tei ou também conhecido por Índice de Performance Miocárdica (avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica; E/E'média. Nas comparações, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 2. Estudo do coração isolado (valores máximos).

	SC (n=8)	SZ (n=8)	IC (n=7)	IZ (n=7)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Pressão sistólica (mmHg)	163±7,4	153±7,4	90,1±8,1	83±8,1	<0,001	0,66	0,705
+dP/dt (mmHg/s)	2725±222,3	2850±222,3	1350±253,1	1450±222,3	<0,001	0,54	0,541
-dP/dt (mmHg/s)	1675±131	1875±131	875±155	975±155	<0,001	0,555	0,88

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina; SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco; IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. +dP/dt e –dP/dt: primeira derivada e derivada negativa, respectivamente. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 3. Expressão proteica dos colágenos I e III.

	SC (n=6)	SZ (n=6)	IC (n=7)	IZ (n=7)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Colágeno I (unidades arbitrárias)	0,217±0,05	0,27±0,05	0,32±0,04	0,42±0,04	0,023	0,133	0,675
Colágeno III (unidades arbitrárias)	1,11±0,187	0,779±0,202	1,186±0,149	1,45±0,156	0,042	0,841	0,091

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina; SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco; IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 4. Expressão proteica de proteínas antioxidantes

	SC (n=8)	SZ (n=8)	IC (n=8)	IZ (n=8)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Nrf2(unidades arbitrárias)	0,841±0,143	1,06±0,135	1,05±0,143	1,069±0,143	0,466	0,391	0,466
Glutationa peroxidase (unidades arbitrárias)	3,75±0,451	4,64±0,53	3,5±0,422	4,73±0,39	0,858	0,027	0,705
Heme oxigenase (unidades arbitrárias)	0,2±0,07[a]	0,39±0,05[b]	0,32±0,05[a]	0,226±0,05[a]	0,404	0,245	0,036

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina; SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco; IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 5. Estresse oxidativo.

	SC (n=10)	SZ (n=10)	IC (n=10)	IZ (n=10)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Catalase (µmol/g)	98,3±4,82	103,1±4,82	60,65±4,82	76,6±4,82	<0,001	0,04	0,259
Superóxido dismutase (nmol/mg)	10,4±0,88[b]	12±0,88[b]	19,1±0,88[a]	14±0,88[b]	<0,001	0,059	<0,001
Glutationa peroxidase (nmol/mg)	42,5±2,3	48,6±2,3	33,3±2,3	43,1±2,3	0,003	0,002	0,429

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. Nas comparações, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 6. Determinação de TNF-α, IFN-γ, IL-10 e TIMP-1

	SC (n=10)	SZ (n=10)	IC (n=10)	IZ (n=10)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
TNF-α	0,773±0,07	0,526±0,06	0,654±0,07	0,441±0,06	0,159	0,003	0,815
IFN-γ	0,601±0,05	0,53±0,05	0,507±0,06	0,378±0,05	0,044	0,096	0,624
IL-10	1,319±0,08	1,397±0,08	1,696±0,085	1,532±0,08	0,003	0,606	0,148
TIMP-1	1,508±0,08	1,557±0,11	1,572±0,12	1,747±0,09	0,247	0,306	0,561

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; IFN-γ: interferon gama; IL-10: interleucina 10; TIMP-1 Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 7. Células sistema imunológico – baço.

	SC (n=10)	SZ (n=10)	IC (n=10)	IZ (n=10)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
Linfócitos	87015±1490,5	84506±1490,5	88673,1±1490,5	89777±1490,5	0,026	0,64	0,233
CD4+	24614,2±1178,6	22937±1178,6	22865,2±1178,6[a]	26312±1178,6[b]	0,495	0,458	0,036
CD4+CD25+ Foxp3+	6,72±0,09	6,69±0,09	6,93±0,09	7,01±0,09	0,01	0,808	0,557

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. Nas comparações, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos. Dados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 8. Atividade de metaloproteinases.

	SC (n=7)	SZ (n=7)	IC (n=7)	IZ (n=6)	p(I)	p(Z)	p(IxZ)
MMP-2 inativa	0,914±0,087	0,88±0,087	1±0,087	1,04±0,09	0,172	0,987	0,691
MMP-2 ativa intermediária	0,996±0,43	1,01±0,043	0,97±0,043	0,992±0,046	0,606	0,667	0,949
MMP-2 ativa	0,983±0,251	1,137±0,251	1±0,251	1,3±0,271	0,616	0,318	0,679

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco. I: Infarto; S: Sham; Z: zinco; C: Controle. Dados expressos em média ± erro padrão.

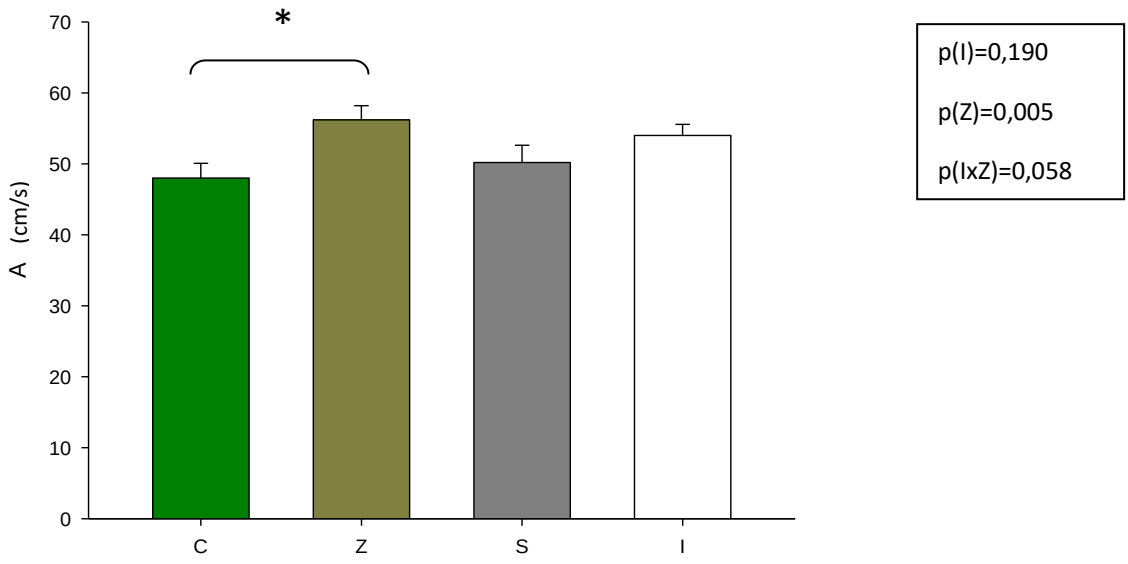

Figura 1. Onda A: variável com influência do fator zinco de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

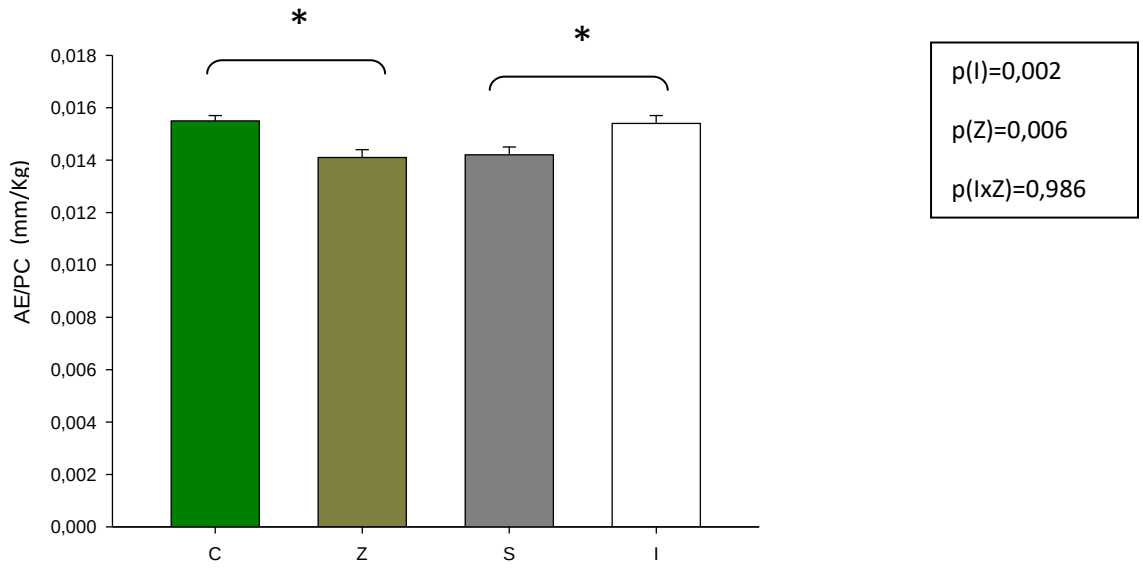

Figura 2. Relação entre átrio esquerdo e peso corporal: variável com influência do fator zinco e fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

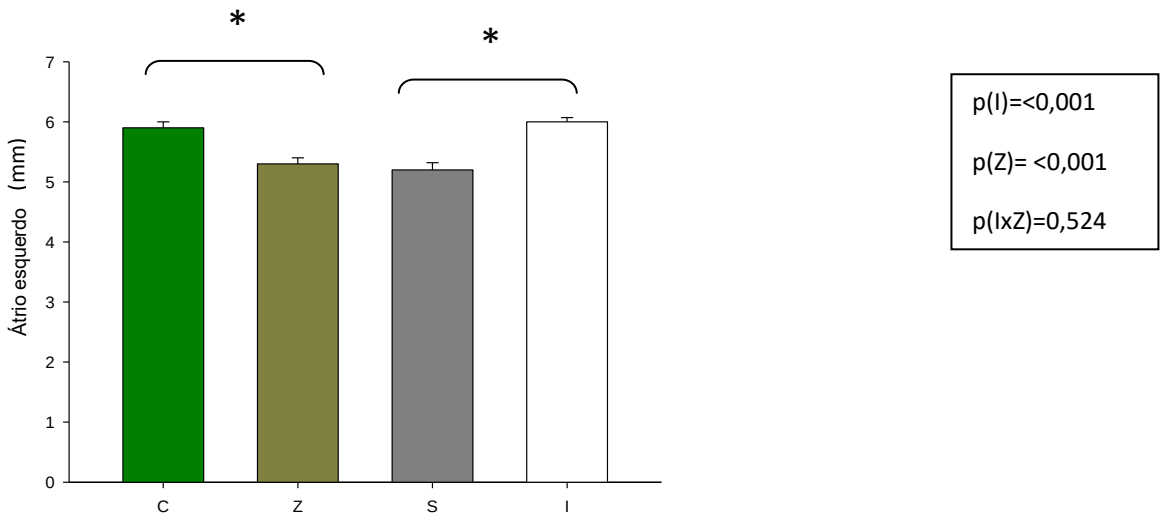

Figura 3. Átrio esquerdo: variável com influência do fator zinco e fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

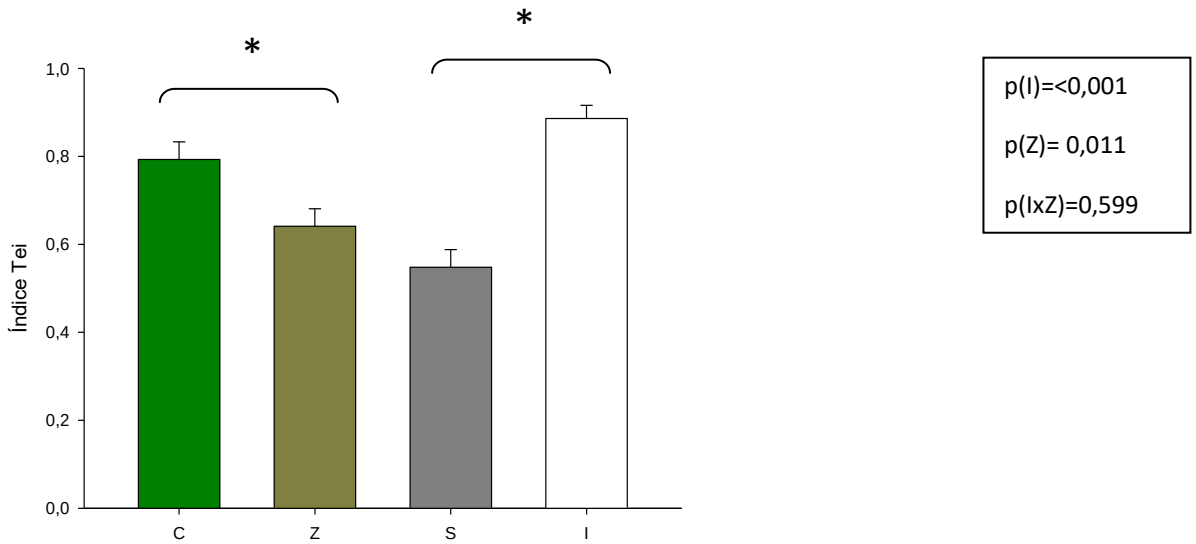

Figura 4. Índice Tei: variável com influência do fator zinco e fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

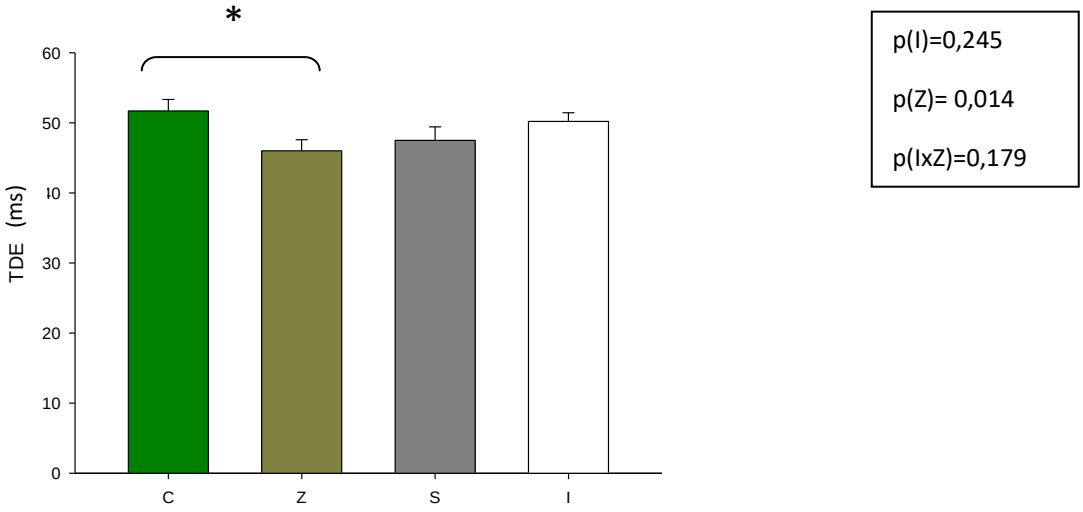

Figura 5. Tempo de desaceleração da onda E : variável com influência do fator zinco de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

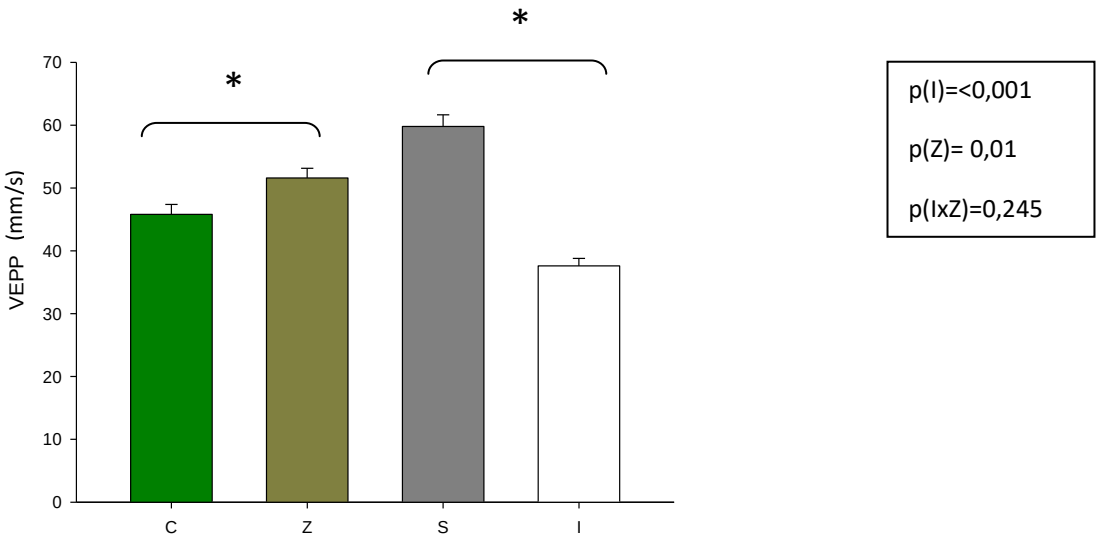

Figura 6. Velocidade de encurtamento da parede posterior. variável com influência do fator zinco de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

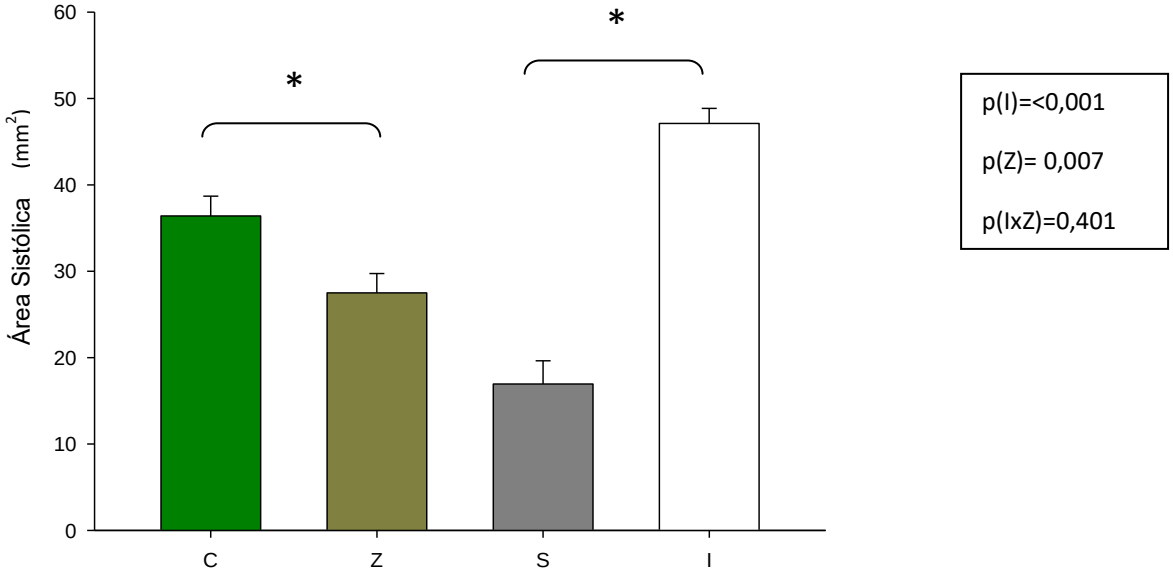

Figura 7. Área sistólica: variável com influência do fator zinco e do fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

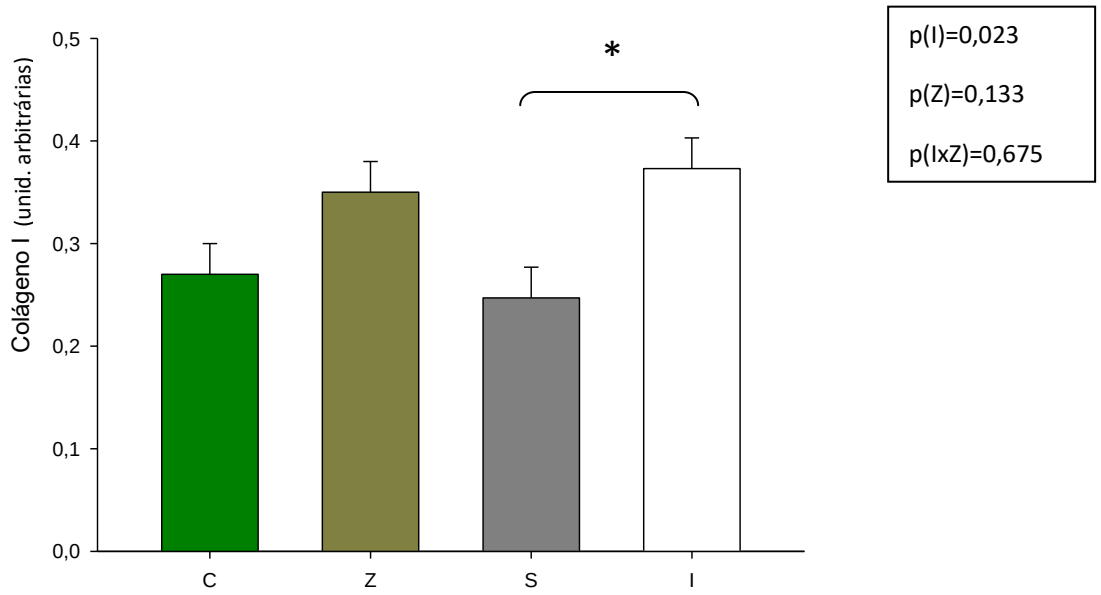

Figura 8. Colágeno I: variável com influência do fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

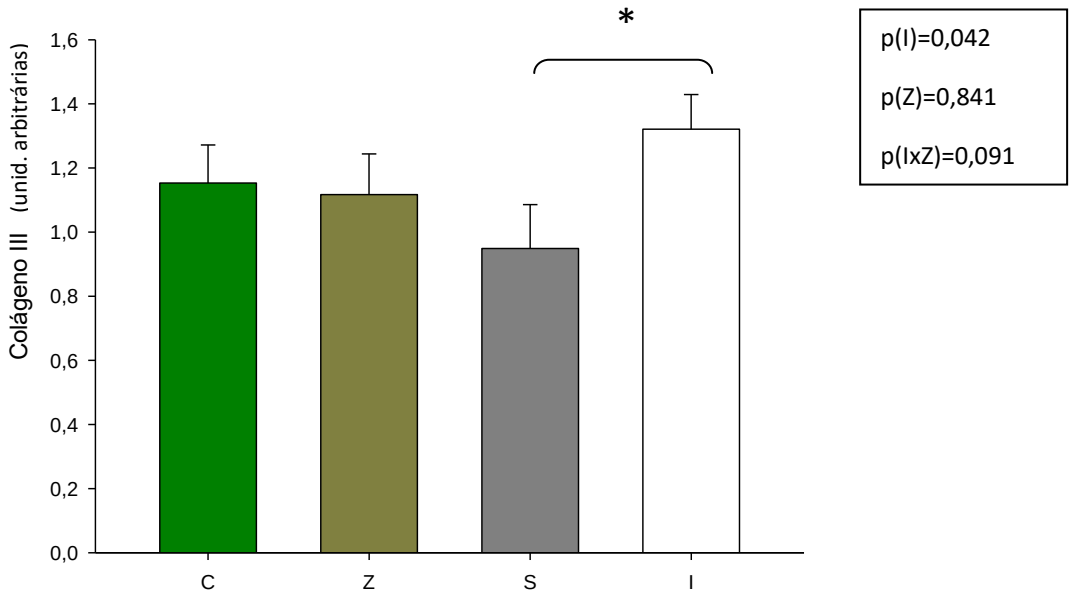

Figura 9 Colágeno III: variável com influência do fator infarto de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

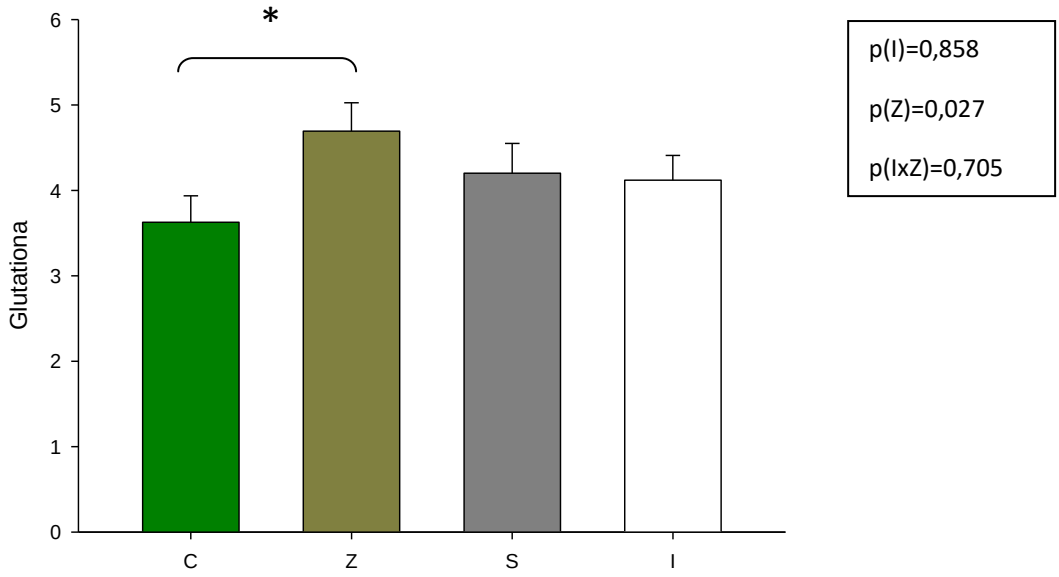

Figura 10: Glutationa: variável com influência do fator zinco de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

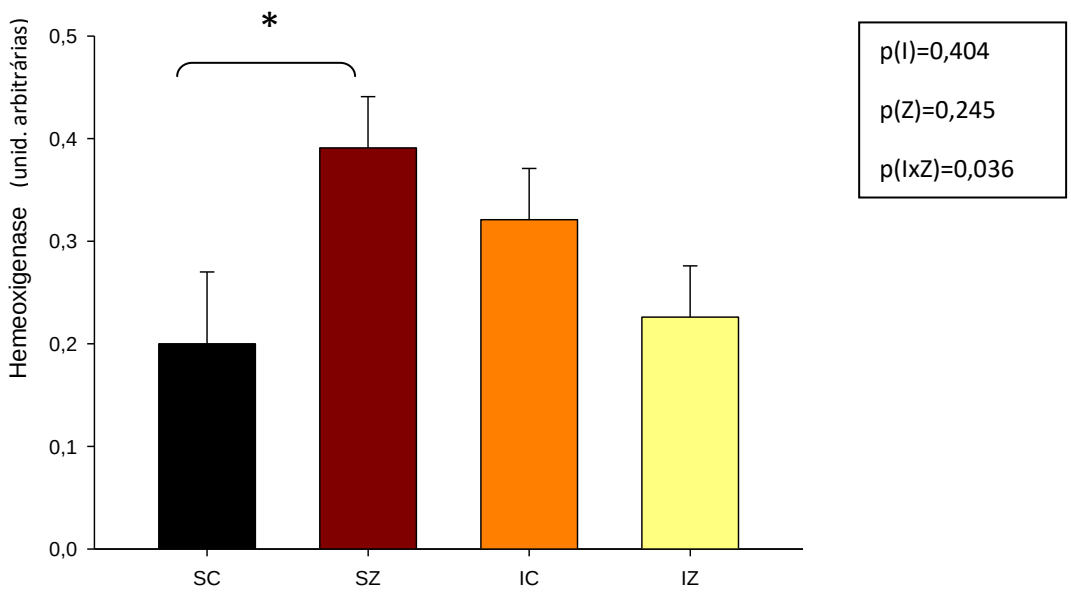

Figura 11. Hemeoxigenase. Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam solução salina, SZ: Animais sham que receberam suplementação de zinco, IC: animais infartados que receberam solução salina; IZ: animais infartados que receberam suplementação de zinco.. (*) Diferença estatisticamente significante.

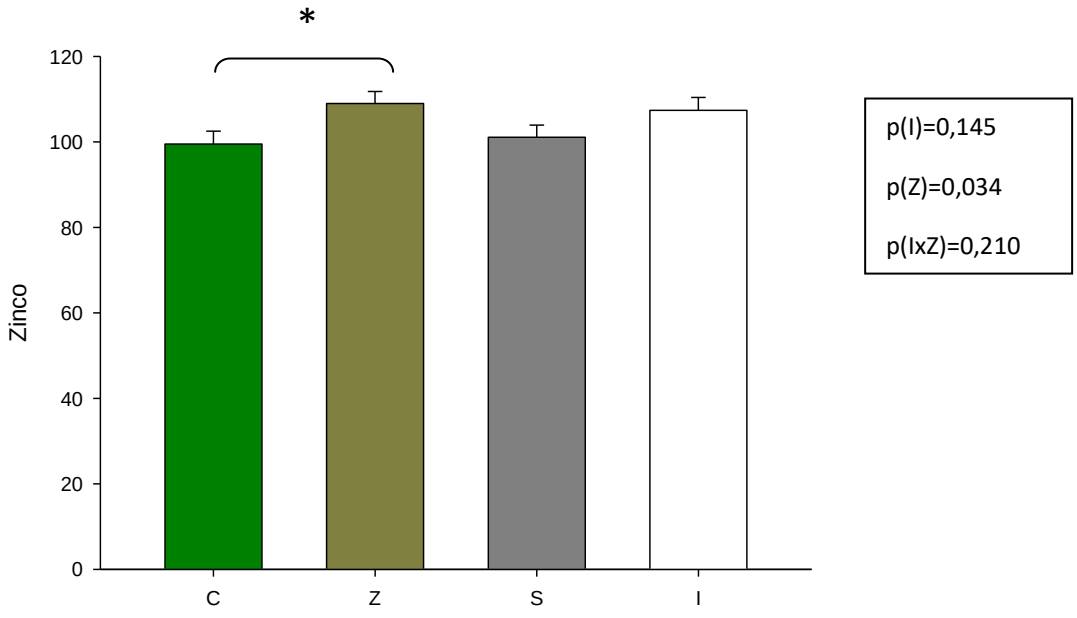

Figura 12. Dosagem de zinco sérico: variável com influência do fator zinco de forma independente. Dados expressos em média ± erro padrão. C: todos os animais que receberam solução salina; Z: todos os animais que receberam suplementação de zinco; S: todos os animais sham; I: todos os animais infartados. (*) Diferença estatisticamente significante.

7 Discussão

7.Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de zinco na remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio. A partir dos dados apresentados, pode-se sugerir que variáveis associadas ao processo de remodelação foram atenuadas pela suplementação de zinco.

O processo de remodelação é bastante complexo. Ao sofrer uma injúria, o coração pode passar por diversas alterações para tentar manter suas funções frente às novas condições impostas. No caso de agressão por isquemia, como no infarto do miocárdio, podem ocorrer alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a área infartada quanto a não infartada. Esse conjunto de alterações é conhecido como remodelação cardíaca, que envolve variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestarão clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração[7, 12, 60].

Inicialmente, a remodelação tem o objetivo de manter a função do coração. No entanto, caso esse processo se cronifique, pode ocorrer a deterioração progressiva da capacidade funcional[7]. O melhor conhecimento dos mecanismos responsáveis pela disfunção ventricular após o infarto do miocárdio é relevante, pois permite a elaboração de estratégias que modulem o processo de remodelação. Dentre os novos fatores que possam modular o processo de remodelação cardíaca secundária a diversos estímulos encontra-se o zinco.

No nosso trabalho, inicialmente observamos as alterações morfofuncionais induzidas pelo infarto para podermos estudar os processos de remodelação. Quanto as variáveis morfológicas, o infarto resultou em aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos do VE conforme esperado. O resultado encontrado na análise da área seccional dos miócitos está em concordância com essa suposição, pois foi observado aumento da área dos miócitos nos animais infartados em relação ao grupo sham. Cabe ressaltar que apesar da remodelação ser evento extremamente complexo, após o infarto, esse processo é reconhecido clinicamente, por aumento da cavidade ventricular esquerda ou por evidências de hipertrofia cardíaca. Assim, podemos observar que nosso protocolo foi eficiente para a indução de remodelação após o infarto experimental.

Para indução da remodelação após o infarto, Minicucci *et al*. mostraram que para observar alterações morfológicas, funcionais e anormalidades clínicas, é necessário área infartada de pelo menos 36%, 38% e 40% respectivamente [56]. Por isso, optamos por utilizar em nosso protocolo animais com área de infarto avaliado pela análise histológica maior que 35%.

Na interpretação de nossos resultados morfofuncionais, é importante observar que a maioria dos nossos dados está baseada nos achados do estudo ecocardiográfico. Martinez *et al.,* utilizando metodologia semelhante à utilizada em nosso estudo, mostraram a acurácia do uso do estudo ecocardiográfico para analisar alterações morfológicas e funcionais cardíacas no modelo de ratos submetidos ao infarto experimental. Utilizando ratos infartados após 6 meses de observação, os autores mostraram alterações do ventrículo esquerdo compatíveis com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, variáveis morfológicas e funcionais cardíacas estiveram associadas com achados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca, como congestão pulmonar, hipertrofia ventricular direita, derrame pleuropericárdico e trombo em átrio

esquerdo. Finalmente, achados ecocardiográficos como menor velocidade de encurtamento da parede posterior, menor relação E/A, maior tempo de desaceleração da onda E, maior tempo de relaxamento isovolumétrico e menor fração de ejeção foram fatores de predição de insuficiência cardíaca, nesse modelo[61].

A atenuação das alterações induzidas pelo infarto pode ser consequência da atuação do zinco em outras vias ligadas ao sistema cardiovascular. Os efeitos cardioprotetores do zinco, segundo a literatura, podem ser devido aos efeitos antioxidantes nos cardiomiócitos, atuação no processo inflamatório, formação da cicatriz e manutenção de células tronco, importantes para melhora da função cardíaca[62].

A suplementação de zinco levou a diminuição da cavidade ventricular esquerda. Houve aumento da velocidade de encurtamento da parede posterior e diminuição do Índice Tei. Esses dados sugerem que o coração dos animais suplementados dilatou menos e teve melhora da função cardíaca.

Embora em outro modelo de agressão, um estudo mostrou melhora no relaxamento do VE pelo zinco em animais pré-diabéticos, por meio da atuação desse mineral nas proteínas ligadas ao trânsito de cálcio, resultando em carga de cálcio intracelular menor[63]. Em estudo com administração de zinco associada a ácido acetilsalicílico (AAS) prévia a lesão isquêmica por isoproterenol em animais, foi observada melhora da contratilidade cardíaca e menor infiltração de células inflamatórias em comparação ao grupo que foi tratado previamente apenas com AAS, mostrando efeitos benéficos do mineral no infarto agudo, provavelmente pela indução de enzimas antioxidantes e da citocina anti-inflamatória TGF-β_1[64].

Diversos mecanismos, como inflamação, alterações de matriz extracelular e estresse oxidativo, estão envolvidos no processo de remodelação cardíaca e podem, em diferentes intensidades, modular esse processo. Uma alteração importante que ocorre após os processos de agressões cardíacas é referente ao colágeno e matriz extracelular (MEC). A MEC tem papel estrutural, servindo de suporte a cardiomiócitos e vasos do coração, e também tem função de mediar a comunicação intercelular e trocas metabólicas[65]. No entanto, em situações de estresse cardíaco, a MEC pode se alterar, e assim interferir em processos inflamatórios, *turnover* de proteínas, reparo tecidual e regeneração, o que está associado ao processo de remodelação cardíaca e, caso se perpetue, pode alterar funções contráteis do coração como observado quando há aumento da fibrose[65].

O interstício cardíaco é composto por diversas substâncias e tecido conectivo formado principalmente por colágeno (I a IV) e pequenas quantidades de fibronectina, laminina e elastina[66], periostina, fibromodulina e ácido hialurônico[67]. Os produtos de degradação da MEC podem modular o processo de inflamação e reparo cardíaco[65], como por exemplo, fragmentos da clivagem de fibronectina podem ser pró-inflamatórios e modular a ação de miofibroblastos[68]. O colágeno maduro depositado na MEC e com *cross-link* é bastante resistente à degradação e muito estável[66], que tem a participação da família de enzimas lisil oxidase para sua formação, induzidas pela hipóxia e TGF-β[69]. No entanto, as metaloproteinases (MMP) são enzimas que degradam o colágeno e são secretadas na matriz extracelular sob a forma de pró-enzimas, que é sua forma latente. Sua ativação depende da sua clivagem. Inicialmente, o colágeno intacto e proteoglicanos são degradados pelas MMP-1 e MMP-13 em fragmentos menores, que então, são degradados pelas MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), que são produzidas por infiltrados linfocitários e células locais[65, 70]. Aceita-se que após o infarto,

as MMP-2 e a MMP-9 têm fundamental importância no processo de remodelação. Esse fato pode ser observado porque as MMP aumentam após o IM, ao mesmo tempo em que estudos mostraram que sua inibição/deleção reduz o processo de remodelação. Para haver o equilíbrio entre MMP e TIMP e se mantenha o *turnover* do colágeno, existem os TIMPS, em especial o TIMP-1, que são inibidores das MMPs, e a relação MMP/TIMP, embora ainda incerta, permanece como uma promessa de biomarcador da evolução pós injúria na prática clínica[65]. Os produtos de degradação da MEC podem modular o processo de inflamação e reparo cardíaco[65], como por exemplo, fragmentos da clivagem de fibronectina podem ser pró-inflamatórios e modular a ação de miofibroblastos[68].

A alteração da MEC variam conforme o período após a agressão. Segundo Li *et al.*[65], em roedores, pode-se considerar o período agudo até 48 horas, período proliferativo entre 2 e 5 dias e a maturação um mês após o infarto.

Nos nossos resultados, encontramos aumento da deposição do colágeno apenas nos animais infartados e não encontramos alterações das metaloproteinases e TIMP-1 resultado semelhante a estudo já realizado[71], e não houve a participação do zinco nessas variáveis.

Outro mecanismo envolvido no processo de remodelação cardíaca são as alterações que induzem o estresse oxidativo, que podem alterar tanto a morfologia quanto a função do coração. As espécies reativas (ERs) são moléculas que possuem um elétron desemparelhado no último orbital, tendo assim a característica de poder interagir eletronicamente com outros elementos, podendo ser formadas no coração ou em outros tecidos por diversos mecanismos, provenientes, por exemplo, do sistema xantina oxidase, NADPH oxidase, citocromo P450, entre outros[17]. As ERs podem agredir

miócitos e podem dessa forma estar associados a indução da cascata de inflamação por induzir a ativação de citocinas inflamatórias[72, 73]. Essas ERs podem interagir tanto na membrana celular quanto no núcleo, afetando estruturas como DNA e RNA, o que pode induzir a danos celulares e alteração na transcrição de proteínas, além de outras alterações em processos como a síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos, ativação de metaloproteinases, apoptose, hipertrofia de miócitos e expressão de genes do período fetal[16, 17]. Existem evidências do papel do estresse oxidativo e das ERs no processo de remodelação cardíaca em diferentes modelos de agressão. Em modelos experimentais de infarto do miocárdio e de isquemia-reperfusão já foi demonstrado aumento de ERs com consequente estresse oxidativo[74, 75]. Em estudo realizado por Bolli *et al.*, foi mostrada a associação entre ERs e a disfunção contrátil do músculo cardíaco após períodos de isquemia[76]. Em estudos mais recentes, foi demonstrado que os processos isquêmicos podem levar a importantes disfunções mitocondriais, como diminuição do tamanho, aumento do número, alteração na distribuição, perda das cristas, o que poderiam levar a alteração da regulação das ERs[77].

Em situações normais, as células possuem sistemas antioxidantes para conter o acumulo de ERs. Fazem parte desses complexos enzimáticos como a catalase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase (SOD), que reduzem as ERs até a formação de água, além de antioxidantes não enzimáticos como a vitamina E, vitamina C, beta caroteno e ácido úrico [17, 78]. A SOD converte o radical superóxido à peróxido de hidrogênio, e este, posteriormente é convertido em água pela catalase e glutationa peroxidase. Adicionalmente, fator importante na sinalização do estresse oxidativo é o fator nuclear eritróide 2, o Nrf-2. O Nrf-2 é um fator presente no citoplasma celular que atua na resposta primária à citotoxidade e ao estresse oxidativo. Frente a agentes agressores, o Nrf-2 se dissocia da proteína Keap 1 e dirige-se ao núcleo onde estimula a

produção de proteínas antioxidantes, uma vez que se liga na região promotora de genes-alvo e então codifica proteínas como glutationa, glutationa peroxidase, glutationa S-transferase, NAD(P)H quinona-redutase-1, heme oxigenase-1, glutationa redutase e tioredoxina[79-81]. Depois de ligar-se ao núcleo, ele volta ao citoplasma onde é degradada[79, 82]. Agudamente, a ativação do Nrf-2 é benéfico[83, 84], porém, estudo mostrou que sua ativação crônica pode levar a miocardiopatia[85].

Encontramos que os animais infartados que receberam a suplementação de zinco tiveram menor atividade de SOD que os animais infartados controle. Quanto a atividade de catalase e glutationa, os animais infartados tiveram redução nessa atividade enquanto os animais suplementados tiveram aumento da atividade, porém sem interferência entre os fatores. Isso pode mostrar que, por algum mecanismo, a SOD já está diminuindo sua atividade enquanto as duas outras enzimas ainda estão aumentadas em relação ao controle, no momento da avaliação, uma vez que os animais suplementados com zinco tiveram maior atividade de catalase e glutationa.

Nos nossos resultados, não encontramos alteração na expressão do Nrf-2, porém entre as enzimas controladas por ela, a glutationa foi mais expressa nos animais que foram suplementados em relação aos controles, não havendo interação entre os fatores. Quanto a heme oxigenase, encontramos que os animais sham suplementados com zinco tiveram maior expressão que os sham controle e também maior que os animais infartados com suplementação. Embora o Nrf-2 não tenha apresentado alteração no nosso estudo, o fato de as enzimas por ele controladas terem se alterado pode indicar que, em algum momento, ele tenha sido ativado e no momento da avaliação já não tenha mais sido diferente, ou também outros sistemas podem estar envolvidos no controle do estresse oxidativo. Além da via estudada, outros sistemas também podem interferir na resposta ao estresse, dependendo do agente que indutor do estresse, tempo de duração e

intensidade, os sistemas ativados podem ser diferentes, como o Nfr-2 ou NF-κB ou até, em processos mais intensos, serem bloqueados e ativados então os estímulos apoptóticos[86].

Um último mecanismo estudado foi o processo de inflamação, que após o infarto, desempenha papel importante na sinalização, reparo e funções do coração. Muitas vias estão ligadas ao processo inflamatório, como a própria liberação do conteúdo intracelular dos miócitos no momento da injúria; a retirada de células mortas além de promover ativar diversas vias ligadas à formação do tecido de cicatrização, ativação do sistema complemento, ativação de membros da família Toll-like receptor (TLR), especialmente o TLR-4, ativação do NF-κB formação de espécies reativas [87]. Porém, caso a inflamação seja descontrolada, pode intensificar a remodelação ventricular e aumentar as chances de levar o coração à falência, por desregular processos como degradação de matriz extracelular (fibrose) e apoptose[87]. Os neutrófilos tem papel importante no inicio da inflamação, pois liberam compostos oxidantes e proteases que sinalizam outras células necessárias ao processo inflamatório[88]. Existem diversos mecanismos para que a inflamação seja controlada por mecanismos de *down regulation* da cascata inflamatória, porém eles ainda são pouco conhecidos[87].

Dentre as células inflamatórias envolvidas no processo estão as células T. Elas podem ter diversas subpopulações, como as T helper (T_H) e células T reguladoras (T_{reg}), dependendo do estímulo recebido durante a diferenciação sofrida a partir das células T *naive* na periferia ou a partir do timo[89]. As células T_{reg} são caracterizadas por expressarem os marcadores CD4+CD25+FOXP3+.

O marcador FOXP3 é específico das células $T_{reg,}$ e tem papel importante na maturação e função da célula[90]. As células T_{reg} podem suprimir a atividade de proliferação de outras células T e de citocinas regulanda por vias diretas ou indiretas[89].

As células T_{reg} produzem citocinas com propriedades supressoras, como TGF-β e IL-10. A atividade supressora atinge células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e altera suas produções de IFN-γ, suprimindo ação de células dendríticas e produção de citocinas. As células T que são resistentes à supressão de TGF-β induzem ao processo de autoimunidade. O TGF pode exercer a atividade anti-inflamatória por desativar macrófagos, inibir citocinas pró-inflamatórias e síntese de moléculas de adesão[91], preservar matriz de colágeno, inibir proteases que degradam matriz extracelular e estimular produção de TIMP-1[88, 92].

Em estudo clínico, pacientes com síndromes coronarianas agudas apresentaram menor frequência e função de células T_{reg} quando comparados a pacientes com coronárias normais[93] e, em modelos animais, a infusão de células T_{reg} levou a diminuição do tamanho do infarto e atenuação da disfunção cardíaca[94]. Nas doenças isquêmicas, como no IM, as células T_{reg} inibem o recrutamento de células pró-inflamatórias como neutrófilos, monócitos linfócitos T $CD4^+$ e suprime ação local de TNF-α e IL-1β e diminui ação citotóxica de linfócitos $CD8^{+}$[36], podendo ser importante alvo terapêutico[95]. Em estudo experimental, Sharir *et al.*[96] mostraram que as células T_{reg} migram do baço para os locais de injúria cardíaca, podendo desempenhar importante papel na inflamação local. Verificaram que as células T_{reg} isoladas de infarto experimental são disfuncionais nas suas propriedades supressivas. Já quando inocularam células T_{reg} exógenas, houve atenuação da remodelação, porém sua remoção não teve efeito[96]

Quanto a ação do zinco nas células T_{reg}, estudo mostrou que a Sirt-1, uma enzima que atua em processos de regulação celular e combate a agentes estressores, afeta negativamente a estabilidade do Foxp3[97], e o zinco, por sua vez, pode inibir a ativação do Sirt-1[98]. Foi o que Rosenkranz *et al.*[99] observaram em estudo clínico com suplementação de zinco oral por 10 dias e, após isolamento de células periféricas mononucleares, observaram que o zinco induziu a inibição de Sirt-1 levando a estabilidade das células T_{reg}, o que seria benéfico do ponto de vista de melhorar a tolerância imunológica[99].

Existem várias citocinas envolvidas no processo inflamatório. A IL-10 pode ter diversos alvos, porém monócitos e macrófagos são alvo importante, podendo inibir a produção de IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-12 podendo dessa forma exercer atividade supressora da inflamação. A IL-10 tem papel na formação de matriz extracelular, pois pode modular a expressão de metaloproteinases e seus inibidores[88]; pode ser utilizada como um biomarcador no infarto, sendo importante citocina inflamatória na regulação da resposta imune e poderia ser utilizada na prática clínica em situações como miocardite [100] e na fase aguda do infarto[101]. O TNF-α pode iniciar a cascata de citocinas como também pode induzir sinal citoprotetor capaz de prevenir ou postergar o desenvolvimento de apoptose dos miócitos após o infarto em modelo agudo de isquemia miocárdica[102]. Outros mostraram que o aumento sustentado de TNF pode ter papel importante na reparação do tecido, pois também é encontrado na região não infartada[88]

No nosso trabalho, avaliamos as células T_{reg} no baço por citometria de fluxo. Encontramos maior número de linfócitos totais nos animais infartados. Quando avaliamos apenas a marcação $CD4^+$, observamos aumento nos animais infartados que receberam zinco em relação aos animais infartados controle. Encontramos mais células

T_{reg} e também maior produção de IL-10 nos animais infartados, porém, não houve influência da suplementação do zinco. Cabe ressaltar que o fato do número de células T_{reg} ter aumentado no baço de animais na fase crônica do infarto é um dado ainda inédito na literatura. Tal fato pode mostrar a participação das células T_{reg} no processo tardio de remodelação após o infarto.

No coração, avaliamos a atividade de citocinas e observamos que o infarto diminuiu a atividade de IFN-γ e aumentou IL-10. O zinco diminuiu a atividade de TNF-α nos grupos de animais suplementados, indiferente do fator infarto. Cabe ressaltar que quanto à atividade inflamatória, avaliamos as citocinas cardíacas e as células T_{reg} no baço. Embora em locais distintos, acreditamos que por se tratar de um órgão essencial na regulação das células T, o baço pode ser um indicador favorável da disponibilização de células T_{reg} para o coração.

8 Conclusão

8.Conclusão

O zinco atenua variáveis associadas à remodelação cardíaca induzida pelo infarto em ratos, por modulação de alterações no estresse oxidativo e processo inflamatório.

Referências

Referências

1. World Health Organization. Cardiovascular disease, 2012. Avaiable from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
2. Ministério da Saúde. Datasus. . Available at: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?db2012.def. Accessed 01/19/2016.
3. Bocchi EA, Braga FGM, Ferreira SMA, al e. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1):1-71.
4. Albert NM, Lewis C. Recognizing and managing asymptomatic left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Crit Care Nurse.* 2008;28(2):20-37.
5. 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;3:371-378.
6. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captropil therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 1985;57:84-95.
7. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-582.
8. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após o infarto do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol.* 1997;68:453-460.
9. Sun Y. Myocardial repair/remodeling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* 2009;81:498-490.
10. Matsubara BB, Zornoff LAM. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64:559-563.
11. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vivo model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 1992;267:10551-10560.
12. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81:1161-1172.
13. Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-262.
14. Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 1997;192(1):87-93.
15. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ. Res.* 2002;90:520-530.
16. Takimoto E, Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension.* 2007;49:241-248.
17. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):500-508.
18. Ashrafian H, Frenneaux M, Opie L. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation.* 2007;116:434-448.
19. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key of life. *Adv Nutr.* 2013;4:82-91.
20. Mafra D, Cozzolino SMF. The importance of zinc in human nutrition. *Rev Nutr.* 2004;17(1):79.
21. Yuyama LKO, Yonekura L, Aguiar JPL, Rodrigues MLCF, Cozzolino SMF. Zinco. *Biodisponibilidade de Nutrientes*: Manole; 2009:616-643.

22. *Estados Unidos. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromiun, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc*. Washington: National Academy Press; 2001.
23. Sandstrom B. Bioavailability of zinc. *Eur J Clin Nutr.* 1997;1:S17-S19.
24. Cohen N, Golik A. Zinc balance and medications commonly used in the management of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2006;11:19-24.
25. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr.* 2000;130:1455S-1458S.
26. Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr.* 2000;130:1344-1349.
27. Golik A, Zaidenstein R, Dishi V, Blatt A, Cohen N, Cotter G, Berman S, Weissgarten J. Effects of captopril and enalapril on zinc metabolism in hypertensive patients. *J Am Coll Nutr.* 1998;17(1):75-78.
28. Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ.* 2003;326:409-410.
29. Macdonald JB, Connolly SM, DiCaudo DJ. Think zinc deficiency: acquired acrodermatits enteropathica due to poor diet and common medications. *Arch Dermatolol.* 2012;148(8):961-963.
30. Ogawa Y, Kawamura T, Shimada S. Zinc and skin biology. *Arch Biochem Biophys.* 2016:ahead of print.
31. Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev.* 2011;16:23-34.
32. Sun Y, Ramires FJA, Weber KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res.* 1997;35:138-147.
33. Gandhi MS, Deshmukh PA, Kamalov G, Zhao T, Zhao W, Whaley JT, Tichy JR, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Causes and consequences of zinc dyshomeostasis in rats with chronic aldosteronism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;52:245-252.
34. Jong S, Veen TAV, Bakker JM, Vos MA, Rijen HVV. Biomarkers of myocardial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57:522-535.
35. Kamalov G, Deshmukh PA, Baburyan NY, Gandhi MS, Johnson PL, Ahokas RA, Bhattacharya SK, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Coupled calcium and zinc dyshomeostasis and oxidative stress in cardiac myocytes and mitochondria of rats with chronic aldosteronism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;53:414-423.
36. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:232.
37. Jankowski M, Bissonauth V, Gao L, Gangal M, Wang D, Danalache B, Wang Y, Stoyanova E, Cloutier G, Blaise G, Gutkowska J. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:205-218.
38. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, Battler A, Eldar M, Hasin D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2141-2149.
39. Maisel A, Cesario D, Baird S, Rehman J, Haghighi P, Carter S. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998;82:458-463.
40. Doesch AO, Mueller S, Nelles M, Konstandin M, Celik S, Frankenstein L, Goeser S, Kaya Z, Koch A, Zugck C, Katus HA. Impact of troponin I-autoantibodies in chronic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:25-35.
41. Leuschner F, Li J, Goser S, Reinhardt L, Ottl R, Bride P, Zehelein J, Pfitzer G, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Kaya Z. Absence of auto-antibodies against cardiac troponin I predicts improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29(29):1949-1955.

42. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:8-27.

43. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:523-532.

44. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of CD4+ T Lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2012;125(1652-1663).

45. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2010;176:2177-2187.

46. Liu B, Cai Z-Q, Zhou Y-M. Deficient zinc levels and myocardial infarction. *Biol Trace Elem Res.* 2015;165:41-50.

47. Karagulova G, Yue Y, Moreyra A, Boutjdir M, Korichneva I. Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:517-525.

48. Wang J, Song Y, Elsherif L, Song Z, Zhou G, Prabhu SD, Saari JT, Cai L. Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation. *Circulation113.* 2006:544-554.

49. Chvapil M, Owen JA. Effect of zinc on acute and chronic isoproterenol induced heart injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1977;9(151-159).

50. Heimburger R. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg.* 1946;52:677-689.

51. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, al e. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.

52. Zornoff L, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000(95):208-214.

53. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ. Recomendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjuntion with the European Association of Echocardiography, a branch of European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18:1440-1463.

54. Paiva S, Zornoff L, Okoshi M, Okoshi K, Cicogna A, Campana A. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol.* 2003:225-228.

55. Zornoff L, Matsubara L, Matsubara B, Okoshi M, Okoshi K, Pai-Silva M, Carvalho R, Cicogna A, Padovani C, Novelli E, Novo R, Campana A, Paiva S. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicol Sci.* 2006;90:259-266

56. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SAR, Zornoff LAM. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol.* 2011;151(2):242-243.

57. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

58. Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver gluthatione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 1974;358:251-261.

59. Ewing JF, Janero D. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Annal Chem.* 1995;232:243-248.

60. Cohn JN, Ferrari R, N S. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-582.

61. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira Jr SA, Campos DH, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551.

62. Lee SR, Noh SJ, Pronto JR, Jeong YJ, Kim HK, Song IS, Xu Z, Kwon HY, Kang SC, Sohn E-H, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. The critical roles of zinc: beyond impact on myocardial signaling. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015;19:389-399.

63. Maret W. Zinc and human disease. *Met Ions Life Sci.* 2013;13:389-414.

64. Korkmaz S, Atmanli A, Li S, Radovits T, Hegedüs P, Barnucz E, Hirschberg K, Loganathan S, Yoshikawa Y, Yasui H, Karck M, Szabó G. Superiority of zinc complex of acetylsalicylic acid to acetylsalicylic acid in preventing postischemic myocardial dysfunction. *Exp Biol and Med.* 2015;240:1247-1255.

65. Li A-H, Liu PP, Villarreal FJ, Garcia RA. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives. *Circ Res.* 2014;114:916-927.

66. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracelular matrix remodeling and ventricular function. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery.* 2006;30:604-610.

67. Zamilpa R, Lindsey ML. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: Causes and consequences. *Journal of molecular and Cellular Cardiology.* 2010;48:558-563.

68. Arslan F, Smeets MB, VIs PWR, Karper JC, Quax PH, Bongartz LG, Peters JH, Hoefer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, Kleijn DP. Lack of fibronectin-EDA promotes suvival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circ Res.* 2011;108:582-592.

69. González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snabel J, López-Cabrera M, Erler JT, Hanemaaijer R, Lara-Pezzi E, Rodríguez-Pascual F. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2016;109:67-78.

70. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction : pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000;101:2981-2988.

71. Gonçalves AF, Congio LH, Santos PP, Rafacho BPM, Pereira BLB, Claro RFT, Costa NA, Chiuso-Minicucci F, Azevedo PS, Polegato BF, Okoshi K, Pereira EJ, Okoshi MP, Paiva SAR, Zornoff LAM, Minicucci MF. Pamidronate attenuates diastolic dysfunction induced by myocardial infarction associated with changes in geometric patterning. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:259-269

72. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 2000;4:315-323.

73. Dallas NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;3:446-456.

74. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol.* 1996;148:291–300.

75. Kinugawa S, Tsutsui H, S SH, Ide T, Suematsu N, Satoh S. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodelling and failure after experimental myocardial infraction in mice: Role of oxidative stress. *Circ Res.* 2000;87:392-398.

76. Bolli R, Jeroudi M, Patel B, Aruoma O, Halliwell B, Lai E. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial “stunning” is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 1989;65:607-622.

77. Liu T, Chen L, Kim E, Tran D, Phinney BS, Knowlton AA. Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure. *Life Sciences.* 2014;101:27-36.
78. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1287-1312.
79. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
80. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis in critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:443-453.
81. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-1207.
82. Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, Fahl WE, Shugar D, Liu J, Qu W, Collins S, Waalkes MP. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(12):1797–1806.
83. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer. DJ. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.* 2009;105(365-374).
84. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:576–586.
85. Rajasekaran NS, Varadharaj S, Khanderao GD, Davidson CJ, Kannan S, Firpo MA, Zweier JL, Benjamin IJ. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:957–971.
86. Lushchak VI. Adaptative response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011;153(2):175-190.
87. Christia P, Frangogiannis NC. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:986-995.
88. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53:32-47.
89. Meng X, Yang J, Dong M, Zhang K, Tu E, Gao Q, Chen W, Zhang C, Zhang Y. Regulatory T cells in cardiovascular disease. *Nat Cardiol.* 2015:1-13.
90. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-336.
91. Dobaczewiski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:600-606.
92. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012;92:635-688.
93. Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4+CD25+ regulatory t cells in pacients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2006;27:2530-2537.
94. Matsumoto K, Ogawa M, Suzuki J, Hirata Y, Nagal R, Isobe M. Regulatory T lymphocytes attenuate myocardial infarction-induced ventricular remodeling in mice. *Int Heart J.* 2011;52:382-387.
95. Wang Y-p, Xie Y, Ma H, Su S-a, Wang Y-d, Wang J-a, Xiang M-x. Regulatory T lymphocytes in myocardial infarction: a promising new therapeutic target. *Int J Cardiol.* 2016;203:923-928.
96. Sharir R, Semo J, Shimoni S, Ben-Mordechai T, Landa-Rouben N, Maysel-Auslender S, Shaish A, Entin-Meer M, Keren G, George J. Experimental myocardial infarction induces

altered regulatory T cell hemostasis, and adoptive transfer attenuates subsequent remodeling. *Plos One.* 2014;9(12):1-24.

97. Kwon H-S, Lim HW, Wu J, Schnölzer M, Verdin E, Ott M. Three novel acetylation sites in the Foxp3 transcription factor regulate the suppressive activity of regulatory T cells *J Immunol.* 2012;188:2712-2721.

98. Chen L, Feng Y, Zhou Y, Zhu W, Shen X, Chen K, Jiang H, Liu D. Dual role of Zn2+ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity os SIRT1. *J Inorganic Biochemistry.* 2010;104:180-185.

99. Rosenkranz E, Metz CHD, Maywald M, Hilgers R-D, Webels I, Plümäkers B, Rink L. Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures. *Mol Nutr Food Res.* 2015:1-11.

100. Izumi T, Nishii M. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute myocarditis Interleukin-10. *Herz.* 2012;37:627-631.

101. Ammirati E, Cannistraci CV, Cristell NA, Vecchio V, Palini AG, Tornvall P, Paganoni AM, Miendlarzewska EA, Sangalli LM, Monello A, Pernow J, Björnstedt-Bennermo M, Marenzi G, Hu D, Uren NG, Cianflone D, Ravasi T, Manfredi AA, Maseri A. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2012;111(10):1336-1348.

102. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Nati Acad Sci U S A.* 1999;97(10):5456-5461.