

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**MICHELLE LOPES ARAÚJO CHRISTIE**

ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE LESÃO CARDÍACA INDUZIDA POR  
RESSECÇÃO APICAL E CRIOLEÇÃO EM CAMUNDONGOS NEONATOS

RIO DE JANEIRO

2019

**MICHELLE LOPES ARAÚJO CHRISTIE**

**ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE LESÃO CARDÍACA INDUZIDA POR  
RESSECÇÃO APICAL E CRIOLEÇÃO EM CAMUNDONGOS NEONATOS**

Volume único

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional: Formação para Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadoras: Danúbia Silva dos Santos

Regina Coeli dos Santos Goldenberg

RIO DE JANEIRO

2019

## Ficha Catalográfica

Christie, Michelle Lopes Araújo.

Estabelecimento dos modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção cardíaca induzida por ressecção apical e criolesão em camundongos neoatos. / Michelle Lopes Araújo Christie. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica, 2019.

xix. 68 f.: il.; 30 cm.

Orientadoras: Danúbia Silva dos Santos e Regina Coeli dos Santos Goldenberg.

Dissertação (mestrado profissional) -- UFRJ, / CCS, Instituto de Ciências Biomédicas, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f. 43-46.

1. Coração. 2. Regeneração. 3. Camundongos. 4. Eletrocardiografia. 5. Fibrose. 6. Pesquisa Biomédica - dissertação. I. Santos, Danúbia Silva dos. II. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. III. UFRJ, CCS Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR do INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro com auxílio das entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério da Saúde. Contou ainda com a colaboração do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

“Estabelecimento dos modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e  
criolesão em camundongos neonatos”

# MICHELLE LOPES ARAÚJO CHRISTIE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA  
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 24 de janeiro de 2019.

*Ronaldo af. Urbane Borges.*

DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)  
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)

*Danúbia Silva dos Santos*

DRA. DANÚBIA SILVA DOS SANTOS (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR

*Regina Coeli dos Santos Goldenberg*

DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – UFRJ) – 2º ORIENTADOR

*Adriana Bastos Carvalho*

DRA. ADRIANA BASTOS CARVALHO (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR

*Mariana Boechat de Abreu*

DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTOR – UFRJ)

*Pedro Leme Silva*

DR. PEDRO LEME SILVA (DOUTOR – UFRJ)

*Pedro M. P. Coelho*

DR. PEDRO MORENO PIMENTEL COELHO (DOUTOR – UFRJ)

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

Charles Chaplin

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por tudo que ele já fez na minha vida e por tudo que ainda tem feito, por me manter forte o suficiente para suportar todas as dificuldades enfrentadas. Por ter me proporcionado finalizar mais essa etapa e por todas as oportunidades que recebi durante esse percurso.

Aos meus pais, Laura e Deribaldo, por acreditarem em mim, pelo incentivo e pela educação que me proporcionaram ser quem eu sou hoje. Por todo esforço e renúncia que fizeram pra que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Enfim, vocês são a minha base. Amo vocês!

Aos meus irmãos, José Carlos e Bruna, por todo amor, carinho e companheirismo e por todos os momentos compartilhados. Vocês são muito importantes para mim!

Ao meu esposo Raphael, por estar em todos os momentos ao meu lado. Por ser paciente, conselheiro e amigo. Por ter feito parte desse trabalho, colocando a mão na massa junto comigo. Dedico esse trabalho à você. Te amo!

Aos meus familiares, a minha sogra Elisabeth e a minha cunhada Beatriz, por toda ajuda e força.

Quero deixar um agradecimento mais que especial às minhas orientadoras, Professora Regina e Dra. Danúbia, por serem pacientes, pelos conhecimentos transmitidos, por terem me proporcionado a oportunidade de realizar esse trabalho e acreditado em mim. Obrigada por tudo! Sou muito grata a vocês!!!

Aos professores Antonio Carlos e Adriana, por terem me recebido no laboratório e pelos conhecimentos que adquiri durante os seminários.

À todos os membros do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, por terem me recebido com carinho e pelo conhecimento trocado durante as discussões dos seminários. Em especial, à Tais e Karina, pelas dicas dadas para melhorar esse trabalho e aos amigos Ana Célia, Cíntia, Cibele, Raphaela e Marlon, por terem contribuído para que os dias ficassem mais leves.

Aos técnicos dos biotérios pela disponibilidade em me ajudar. Em especial, à Terezinha, por sua simpatia e por cuidar tão bem dos animais que foram utilizados neste trabalho.

À todos, os meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

CHRISTIE, MICHELLE LOPES ARAÚJO. **Estabelecimento dos modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A recente descoberta de que o coração de camundongos apresenta capacidade de regeneração até 7 dias após o nascimento abriu novas possibilidades para compreender os mecanismos envolvidos. O desenvolvimento de modelos robustos para avaliar a regeneração cardíaca em mamíferos é necessário para melhorar o nosso conhecimento neste campo promissor. Dessa forma, este estudo tem como objetivo estabelecer os modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e por criolesão em camundongos neonatos. Camundongos de 1 e 7 dia(s) de idade (P1 e P7) foram anestesiados e submetidos à ressecção apical (grupo RA) e criolesão (grupo CRIO). Foram realizadas as avaliações da função cardíaca por ecocardiograma (ECO) e da atividade elétrica por eletrocardiograma (ECG) 30 e 60 dias pós-operatório (pós-OP). As análises histológicas foram realizadas 2, 7, 21 e 60 dias após as lesões. No grupo RA, os camundongos P1 apresentaram redução significativa dos intervalos QT e QT corrigido (QTc) e aumento do percentual de fibras colágenas (7 e 60 dias pós-OP), quando comparado aos animais do grupo controle (grupo SHAM). Já os animais P7 apresentaram redução significativa da fração de ejeção (FE), aumento do percentual de fibras colágenas (21 dias pós-OP) e tecido cardíaco contendo fibras e núcleos desorganizados. No grupo CRIO, os camundongos P1 apresentaram redução significativa da FE, porém os valores encontrados ainda estão na faixa de normalidade ( $FE > 50\%$ ). Além disso, apresentaram aumento significativo do volume sistólico final (VSF), do volume diastólico final (VDF), do intervalo PR e do percentual de fibras colágenas (21 e 60 dias pós-OP) e redução significativa da frequência cardíaca (FC). Já os animais P7 apresentaram redução significativa da FE e da fração de mudança de área (FAC), aumento do VSF, do VDF e do percentual de fibras colágenas (7, 21 e 60 dias pós-OP) e tecido cardíaco contendo fibras e núcleos desorganizados. Esses resultados sugerem (1) que os corações de camundongos P1 do grupo RA mantêm a capacidade de regeneração e (2) que o tamanho da lesão pode ter influenciado negativamente a



regeneração dos corações dos animais P1 do grupo CRIO. Em contraste, os corações de camundongos P7 do grupo RA e CRIO não regeneraram. Para padronização dos protocolos, foram realizadas as documentações impressa (Procedimento Operacional Padrão - POP) e em vídeo. Em conclusão, ambos os modelos foram estabelecidos e devidamente documentados para utilização por alunos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro - e demais instituições de ensino e pesquisa.

Palavras-chave: regeneração cardíaca, modelos experimentais, ressecção apical, criolesão, ecocardiograma, eletrocardiograma, fibrose.

## ABSTRACT

CHRISTIE, MICHELLE LOPES ARAÚJO. **Establishment of cardiac injury models induced by apical resection and cryoinjury in neonatal mice.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The recent finding that the heart of mice has regenerative capacity up to 7 days after birth has opened new possibilities for understanding the mechanisms involved. The development of robust models to evaluate cardiac regeneration in mammals is mandatory to improve our knowledge in this promising field. In this regard, this study aims to establish of cardiac injury models induced by apical resection and by cryoinjury in neonatal mice. 1 and 7 days-old mice (P1 and P7) of BALB/c strain were anesthetized and submitted to cardiac apical resection (AR-group) or cardiac cryoinjury (CRYO-group). Cardiac function by echocardiogram (ECHO) and electrical activity by electrocardiogram (ECG) were evaluated 30 and 60 days postoperative (post-OP). Histological analyzes were performed 2, 7, 21 and 60 days after injuries. In the RA group, P1 mice showed significant reduction of QT and corrected QT (QTc) intervals and an increase percentage of collagen fibers (7 and 60 days post-OP), when compared with control-group (SHAM-group). P7 animals showed significant reduction in ejection fraction (EF), an increase in the percentage of collagen fibers (21 days post-OP) and cardiac tissue with disorganized fibers and nuclei. In the CRIO group, P1 mice showed significant reduction of EF, however, the values are still considered in the range normal ( $FE > 50\%$ ). In addition, they showed significant increase in end-systolic volume (ESV), end-diastolic volume (EVD), PR interval, and in the percentage of collagen fibers (21 and 60 days post-OP) and significant reduction in heart rate (HR). P7 animals showed significant reduction in FE and FAC, an increase in ESV, EDF and in the percentage of collagen fibers (7, 21 and 60 days post-OP), and cardiac tissue containing fibers and nuclei disorganized. Our results suggest (1) that the neonatal mice P1 hearts retain cardiac regeneration capacity after apical resection and (2) that the size of the injury may have negatively influenced the regeneration of P1 animals' hearts of the CRYO-group. In contrast, the hearts of P7 mice from the RA and CRYO-groups did not regenerate. For protocol standardization, printed (Standard Operating Procedure - POP)

and in video documentation were performed. In conclusion, both models were established and documented to be used by students of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics - Federal University of Rio de Janeiro - and other teaching and research institutions.

**Key words:** heart regeneration, experimental models, apical resection and cryoinjury, echocardiogram, electrocardiogram, fibrosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Esquema representativo da regeneração cardíaca entre coração adulto e neonatais.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Representação esquemática do modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3: Representação esquemática do modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4: Cronograma experimental.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 5: Imagens representativas do procedimento de indução da lesão cardíaca por ressecção apical em camudongos P1 e P7.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 6: Análise da taxa de sobrevivência dos animais.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 7: Análise da função cardíaca em camudongos P1 30 e 60 dias após ressecção apical.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 8: Análise da função cardíaca em camudongos P7 30 e 60 dias após a ressecção apical.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 9: Análise da atividade elétrica do coração de camudongos P1 30 e 60 dias após ressecção apical.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 10: Análise da atividade elétrica do coração de camudongos P7 30 e 60 dias após a ressecção apical.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 11: Coloração por picrossírius após ressecção apical.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 12: Quantificação de fibras de colágenos em camudongos P1 e P7 após a ressecção apical.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 13: Análise morfológica após ressecção apical.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 14: Imagens representativas do procedimento de indução da lesão cardíaca por criolesão em camudongos P1 e P7.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 15: Análise da taxa de sobrevivência dos animais.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 16: Análise da função cardíaca em camudongos P1 30 e 60 dias após a criolesão.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 17: Análise da função cardíaca em camudongos P7.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 18: Análise da atividade elétrica do coração de camudongos P1 30 e 60 dias após a criolesão.....</b>	<b>33</b>

<b>Figura 19: Análise da atividade elétrica do coração dos camudongos P7 30 e 60 dias após a criolesão. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 20: Coloração por picosirius após criolesão.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 21: Quantificação de fibras de colágenos em camudongos P1 e P7 após a criolesão. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 22: Análise morfológica após criolesão.. ....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P1 após a ressecção apical.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P7 após a ressecção apical.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P1 após ressecção apical.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 4. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P7 após ressecção apical.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 5. Percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 e P7 após ressecção apical.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P1 após criolesão.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P7 após criolesão.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 8. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P1 após criolesão.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 9. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P7 após criolesão.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 10. Percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 e P7 após criolesão.....</b>	<b>35</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Beta-Gal – Beta galactosidase

BrdU - nucleotídeo sintético

C<sup>14</sup> - carbono 14

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCS – Centro de Ciência da Saúde

CENABIO - Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais em Pesquisa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRIO – Criolêsão

D0- dia 0

D1- Derivação 1

D2- dia 2

D21- dia 21

D30- dia 30

D60- dia 60

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DS - Débito sistólico

ECG - Eletrocardiograma

ECO - Ecocardiograma

FAC - Fração de mudança de área

FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

FC - Frequência cardíaca

FE - Fração de ejeção

HE- hematoxilina e eosina

IBCCF – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

IM – Infarto do miocárdio

KI-67 - Marcador de proliferação / divisão celular

LDA – Ligadura da artéria coronária descendente anterior

MHz – megahertz

MIMS - espectrometria de massa de multi-isótopos

Modo-M – Modo unidimensional

P1- Neonato com 1 dia de idade

P7- Neonato com 7 dias de idade

PBS – tampão fosfatado de sódio

POP – Procedimento Operacional Padrão

Pós-OP – Pós-operatório

RA- Ressecção Apical

SD – desvio padrão

SHAM – Falso-operado

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VDF - Volume diastólico final

VSF - Volume sistólico final



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Regeneração cardíaca</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Regeneração cardíaca em camundongos: coração adulto versus coração neonatais</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1. Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.2. Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão</b> .....	<b>6</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1. Objetivos específicos</b> .....	<b>8</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1 Implementação dos modelos de ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos.</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.1. Seleção dos protocolos de lesão cardíaca</b> .....	<b>9</b>
<b>4.1.2. Elaboração do Procedimento Operacional Padrão</b> .....	<b>9</b>
<b>4.1.3. Elaboração da documentação em vídeo</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2. Animais</b> .....	<b>9</b>
<b>4.3. Procedimentos para indução da lesão cardíaca: ressecção apical e criolesão</b> ...	<b>10</b>
<b>4.3.1 Procedimento 1: anestesia para neonatos em P1 e P7</b> .....	<b>10</b>
<b>4.3.2. Procedimento 2: cirurgia para indução da lesão cardíaca por ressecção apical</b> .....	<b>10</b>
<b>4.3.3. Procedimento 3: cirurgia para indução da lesão cardíaca por criolesão</b> .....	<b>11</b>
<b>4.4. Grupos experimentais e cronograma experimental</b> .....	<b>12</b>

<b>4.5. Eletrocardiograma.....</b>	<b>13</b>
<b>4.6. Ecocardiograma.....</b>	<b>13</b>
<b>4.7. Histologia.....</b>	<b>14</b>
<b>4.7.1. Coloração por picrosírius .....</b>	<b>15</b>
<b>4.7.2. Coloração por hematoxilina e eosina .....</b>	<b>15</b>
<b>4.8. Análise estatística.....</b>	<b>16</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Protocolos de lesão cardíaca selecionados .....</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Procedimento Operacional Padrão .....</b>	<b>16</b>
<b>5.3. Documentação em vídeo.....</b>	<b>17</b>
<b>Parte I - Estabelecimento do modelo de lesão cardíaca por ressecção apical .....</b>	<b>17</b>
<b>5.4. Indução da lesão cardíaca por ressecção apical.....</b>	<b>17</b>
<b>5.5. Análise da função cardíaca por Ecocardiograma.....</b>	<b>19</b>
<b>5.6. Análise da atividade elétrica por Eletrocardiograma .....</b>	<b>22</b>
<b>5.7. Análises histológicas .....</b>	<b>24</b>
<b>5.7.1. Quantificação das fibras colágenas .....</b>	<b>24</b>
<b>5.7.2. Análise morfológica .....</b>	<b>27</b>
<b>Parte II - Estabelecimento do modelo de lesão cardíaca por criolesão.....</b>	<b>27</b>
<b>5.8. Indução da lesão cardíaca por criolesão.....</b>	<b>27</b>
<b>5.9. Análise da função cardíaca por Ecocardiograma.....</b>	<b>29</b>
<b>5.10. Análise da atividade elétrica por Eletrocardiograma .....</b>	<b>31</b>
<b>5.11. Análises histológicas .....</b>	<b>34</b>
<b>5.11.1. Quantificação das fibras colágenas .....</b>	<b>34</b>

<b>5.12. Análise morfológica .....</b>	<b>37</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo I - Certificado de aprovação do projeto pelo comitê de ética. ....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo II - POP do modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical.....</b>	<b>48</b>
<b>Anexo III - POP do modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão.....</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Regeneração cardíaca

Durante muito tempo acreditou-se que os cardiomiócitos de mamíferos adultos não possuíam capacidade proliferativa por serem células totalmente diferenciadas (FERNANDES; PERIN, 2007; VAN AMERONGEN *et al.*, 2008). Alguns pilares sustentavam esta teoria, tais como: 1) no coração adulto, os miócitos cardíacos perdem a capacidade proliferativa observada durante o desenvolvimento embrionário (ZAK, 1974); 2) ausência de relatos clínicos que demonstram regeneração cardíaca após a morte dos cardiomiócitos perdidos por lesão cardíaca (SOONPAA; FIELD, 1998); 3) a baixa incidência de tumores cardíacos primários em adultos, que pode estar relacionado a baixas taxas mitóticas (SOONPAA; FIELD, 1998; FERNANDES; PERIN, 2007) e 4) o aumento da massa dos cardiomiócitos na hipertrofia cardíaca ser causado pelo aumento no comprimento dessas células e não pelo aumento do seu número, como demonstrado em 1925 por Karsner e colaboradores (KARSNER *et al.*, 1925). Desta forma, esses resultados corroboraram a teoria de que o coração seria um órgão pós-mitótico, incapaz de possuir capacidade proliferativa (CARVALHO, AB; CARVALHO, ACC, 2010).

Na última década, essa teoria vem sendo questionada e alguns argumentos sustentam essa mudança de paradigma. Kajstura e colaboradores analisaram amostras histológicas de corações de pacientes transplantados acometidos por doença cardíaca isquêmica e cardiomiopatia dilatada idiopática, bem como de pacientes que vieram à óbito sem causas cardiovasculares. O tecido cardíaco foi marcado com com iodeto de propídio e  $\alpha$ -actina sarcomérica. Eles observaram que os corações de ambos os grupos apresentaram cardiomiócitos mitóticos (KAJSTURA *et al.*, 1998).

Nessa mesma linha de raciocínio, Beltrami e colaboradores analisaram amostras histológicas de corações de pacientes que faleceram entre quatro a 12 dias após infarto do miocárdio (IM). Essas amostras continham cardiomiócitos de áreas peri-infarto e de áreas mais distantes da lesão. As análises revelaram a existência da expressão de KI-67, um marcador de proliferação celular, em cerca de 4% dos cardiomiócitos das áreas peri-infarto e 1% dos cardiomiócitos de áreas mais distantes. Além disso, também foram observados alguns eventos como formação de eixos mitóticos, formação de anéis contráteis, cariocinese e citocinese, eventos que são característicos de divisão celular (BELTRAMI *et al.*, 2001).

Recentemente, Bergmann e colaboradores investigaram a idade dos cardiomiócitos humanos por datação do  $C^{14}$  (carbono 14) integrado ao DNA das células cardíacas. Esta

abordagem foi possível em função do aumento da concentração de  $C^{14}$  atmosférico resultante dos testes nucleares realizados durante a Guerra Fria. Assim, os pesquisadores compararam a concentração de  $C^{14}$  detectada nos cardiomiócitos com a concentração atmosférica existente no ano do nascimento do indivíduo. Desta forma, eles concluíram que os cardiomiócitos se renovam ao longo da vida e que essa renovação ocorre numa taxa de cerca de 1% por ano em indivíduos com idades próximas a 25 anos e que tende a diminuir para aproximadamente 0,45% em indivíduos com idades próximas a 75 anos. Isso significa que, cerca de 50% dos cardiomiócitos são renovados durante uma vida normal e os outros 50% restantes seriam os cardiomiócitos adquiridos desde o nascimento (BERGMANN *et al.*, 2009).

Estes resultados indicam que a proliferação dos cardiomiócitos pode ocorrer ao longo da vida tanto sob condições normais, com taxas proliferativas variando de acordo com a idade (BERGMANN *et al.*, 2009), quanto em condições patológicas (KAJSTURA *et al.*, 1998; BELTRAMI *et al.*, 2001). Entretanto, a taxa de proliferação de cardiomiócitos adultos é extremamente baixa e insuficiente para regenerar, por exemplo, um bilhão de células mortas em resposta à isquemia (LAFLAMME & MURRY, 2005).

Diante desse cenário, a necessidade de compreender os processos relacionados a regeneração cardíaca levou ao estudo deste processo em diferentes modelos animais, incluindo os camundongos (RUMYANTSEV, 1973; SOONPAA; FIELD, 1997; SOONPAA; FIELD, 1998; FLINK, 2002; POSS *et al.*, 2002; LEPILINA *et al.*, 2006; JOPLING *et al.*, 2010; WITMAN *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-ROSA & MERCADER, 2012; LIAO *et al.*, 2017).

## **1.2. Regeneração cardíaca em camundongos: coração adulto *versus* coração neonatais**

Em 1997, Soonpaa e Field investigaram a capacidade regenerativa do coração de camundongos adultos. Esse ensaio foi realizado por meio da incorporação de [3H] timidina em camundongos transgênicos que expressavam o gene repórter da beta-galactosidase (beta-Gal) localizado exclusivamente no núcleo do cardiomiócitos. A partir da detecção da atividade de beta-Gal, esses pesquisadores demonstraram que a taxa de proliferação dos cardiomiócitos foi em torno de 0,0006% e que tende a aumentar após a lesão do miocárdio para 0,0083%. (SOONPAA & FIELD, 1997; SOONPAA & FIELD, 1998). Resultados semelhantes foram observados em modelos de IM utilizando ratos (taxa de proliferação de 0,15% para 0,79% 40 dias após a lesão) (SOONPAA & FIELD, 1998). Com base nestes resultados, os autores demonstraram que há regeneração cardíaca em camundongos adultos, embora ela ocorra em frequência extremamente baixa (SOONPAA & FIELD, 1997; SOONPAA & FIELD, 1998).

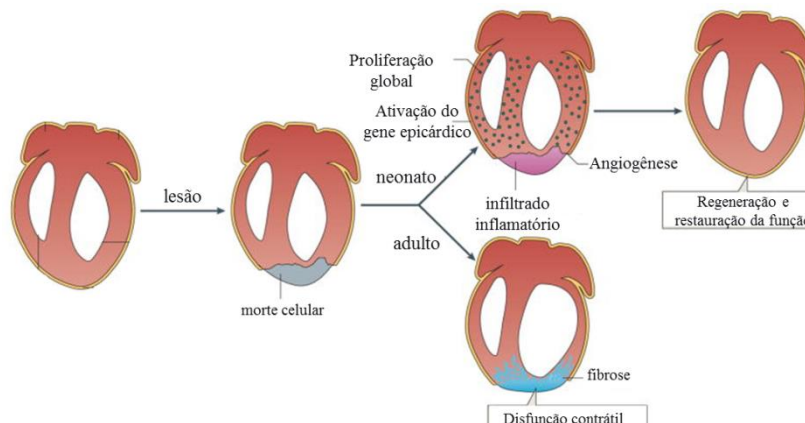
Já em 2013, Senyo e colaboradores utilizaram a espectrometria de massa de multi-isótopos (MIMS) e mapeamento genético com marcação de isótopos estáveis a fim de investigar o mecanismo responsável pela regeneração cardíaca. Para isso, camundongos transgênicos (MerCreMer/Zeg) foram submetidos ao IM por meio da ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior (LDA). Eles demonstraram que o processo de regeneração cardíaca foi mediado pela proliferação de cardiomiócitos pré-existentes, com taxa de renovação em torno de 5,5% ao ano em camundongos adultos jovens (~dois meses de idade) após o IM. Porém, essa taxa tende a diminuir para 2,6% ao ano em camundongos adultos idosos (~22 meses de idade) (SENYO *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram os dados publicados no trabalho de regeneração cardíaca realizado em peixe-zebra (JOPLING *et al.*, 2010).

Embora a regeneração cardíaca em camundongos adultos seja um evento raro, o mesmo não ocorre em camundongos neonatos e em idade gestacional. O mecanismo regenerativo que predomina nessa fase foi descrito pelo grupo de Drenckhahn. Esses pesquisadores observaram que a capacidade regenerativa dos corações de camundongos na metade do período gestacional era ativada após danos celulares que ocasionavam comprometimento no funcionamento da cadeia respiratória. Os embriões de camundongos exibiam cerca de 50% das células cardíacas comprometidas, entretanto, o tecido cardíaco regenerou progressivamente até o nascimento. Com esses resultados, os autores concluíram que o coração fetal regenera-se recuperando cerca de 50% do tecido cardíaco após um dano. Este grupo sugere que o coração embrionário/fetal possui capacidade para se adaptar a outros tipos de lesões teciduais como, por exemplo, exposição a toxinas, desnutrição materna ou mesmo isquemia durante a gestação (DRENCKHAHN *et al.*, 2008).

Além disso, Porrello e colaboradores observaram que a capacidade regenerativa do coração de camundongos é preservada até sete dias após o nascimento (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram dados publicados pelo grupo de Soonpaa, que demonstrou baixo percentual de células em mitoses no décimo dia após o nascimento (SOONPAA *et al.*, 1996).

É importante destacar que o coração mantém a plasticidade de crescimento durante a vida embrionária e fetal em resposta a diferentes fatores ambientais (escassez de nutrientes, alterações no tamanho da ninhada, alterações na carga mecânica, volume e fluxo sanguíneo). Essa plasticidade provavelmente é perdida durante a vida pós-natal (PORRELLO; OLSON, 2014).

Recentemente, Xin e colaboradores descreveram o mecanismo regenerativo no coração de camundongos neonatos e adultos após lesão (Figura 1). Esses pesquisadores observaram que, em camundongos com um dia de vida (P1), a morte celular induz intensa resposta inflamatória que leva a ativação de genes epicárdicos específicos, proliferação celular e angiogênese. Consequentemente, ocorre a regeneração da área lesionada e restauração da função cardíaca em até três meses. No entanto, em camundongos adultos, a morte celular induz o recrutamento/ativação de miofibroblastos, promovendo a substituição dos cardiomiócitos perdidos por tecido fibroso rico em colágeno. Visto que o tecido cicatricial não apresenta características contráteis, o mecanismo regenerativo - neste caso - leva à disfunção cardíaca (XIN *et al.*, 2013). Esses resultados demonstram claramente a existência de uma "janela privilegiada" para regeneração, na qual a proliferação celular é idade-dependente. Entretanto, os mecanismos envolvidos para explicar esse fenômeno ainda não foram completamente elucidados (SANTORO & SAHARA, 2015).



**Figura 1: Esquema representativo da regeneração cardíaca entre coração adulto e neonatais.** Adaptado de: XIN *et al.*, 2013.

Desta forma, diversos grupos de pesquisadores desenvolveram diferentes modelos experimentais para o estudo do processo de regeneração cardíaca (RUMYANTSEV, 1973; SOONPAA; FIELD, 1997; SOONPAA; FIELD, 1998; FLINK, 2002; POSS *et al.*, 2002; LEPILINA *et al.*, 2006; JOPLING *et al.*, 2010; WITMAN *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-ROSA & MERCADER, 2012; LIAO *et al.*, 2017), incluindo os modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e por criolesão utilizando camundongos (PORRELLO *et al.*, 2011; POLIZZOTTI *et al.*, 2016).

### **1.2.1. Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical**

Em 2011, Porrello e colaboradores realizaram a ressecção de aproximadamente 15% do ápice do ventrículo esquerdo de camundongos com um dia de idade (P1). Após 21 dias, eles observaram que o coração havia se regenerado (PORRELLO *et al.*, 2011).

A regeneração vista em camundongos neonatos em P1 ocorre de forma semelhante ao que foi observado em peixe-zebra (POSS *et al.*, 2002). No primeiro dia, ocorre a formação de um grande coágulo sanguíneo que circunda todo o ápice acompanhado de intensa resposta inflamatória. No sétimo dia, esse coágulo foi completamente reabsorvido. Ademais, foi observado, na área lesionada, a presença de matriz extracelular epicárdica. Após 21 dias, o coágulo foi completamente substituído por cardiomiócitos (ausência de tecido fibroso). Neste período, os vasos sanguíneos presentes no miocárdio lesionado haviam se regenerado. Além disso, os pesquisadores observaram a presença de mitose, citocinese e desorganização do sarcômero, eventos que estão relacionados com a proliferação dos cardiomiócitos sete dias após a ressecção apical.

Porrello e colaboradores também realizaram o exame de ecocardiograma (ECO) dois meses após a lesão cardíaca induzida por ressecção apical. Eles observaram que a função cardíaca dos camundongos operados em P1 foi preservada (PORRELLO *et al.*, 2011).

Entretanto, camundongos com sete dias de idade (P7) que foram submetidos ao mesmo procedimento não conseguiram regenerar o coração e desenvolveram fibrose, similar ao que ocorre em corações de mamíferos adultos (PONTES; LEÃES, 2004; HOLMES *et al.*, 2005; TALMAN; RUSKOAHO, 2016). Além disso, não foram encontrados sinais de mitose, citocinese ou desorganização do sarcômero, confirmando que os cardiomiócitos desses animais não estavam se proliferando (PORRELLO *et al.*, 2011). Após esses resultados, os pesquisadores concluíram que os corações de camundongos neonatos possuem potencial para regenerar até a primeira semana de vida, no entanto, após esse período ele perde a sua capacidade regenerativa (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013).

Outro grupo de pesquisadores utilizando o mesmo modelo de lesão cardíaca em camundongos C57Bl/6 (inbred) obtiveram resultados diferentes. Inicialmente, eles observaram intensa resposta inflamatória três horas após a lesão, juntamente com o aumento de pró-colágeno e fibronectina. Em seguida, observaram que o peso dos corações reduziram cerca de 14% durante todo estudo. Os resultados das análises indicaram que o ápice foi curado, porém não foi substituído por tecido viável - com cardiomiócitos necessários para recuperar o ápice removido pela cirurgia e dar ao coração tamanho e massa normais. Além



disso, eles observaram a formação de cicatriz fibrótica e um extenso remodelamento na área lesionada (ANDERSEN *et al.*, 2014).

Um provável motivo dos resultados conflitantes entre os grupos de Porrello e Andersen poderia estar relacionado com o tamanho da lesão. Por isso, Bryant e colaboradores investigaram a regeneração cardíaca produzindo lesões moderadas e grandes (10% e 20%, respectivamente). O grupo observou que os corações submetidos a ressecção apresentaram cardiomiócitos com maior atividade proliferativa quando comparado com o grupo falso-operados, independente do tamanho da lesão. Além disso, eles investigaram se a retração cirúrgica poderia induzir uma resposta proliferativa, visto que a mesma foi realizada por Andersen e não foi realizada por Porrello (PORRELLO *et al.*, 2011; ANDERSEN *et al.*, 2014; BRYANT *et al.*, 2015). O resultado demonstrou que houve um aumento de fibrose intersticial e na atividade proliferativa dos cardiomiócitos nos corações que haviam sido retraídos quando comparado com os corações em que não houve a retração (grupos ressecionado e controle) (BRYANT *et al.*, 2015). Portanto, ainda são necessários novos estudos para compreender as limitações do processo de reparo e de regeneração cardíaca após ressecção apical.

### **1.2.2. Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão**

O potencial regenerativo do coração foi também investigado utilizando o modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão. Esse modelo é produzido através de sonda metálica (*cryoprobes*), que é submetida ao resfriamento em nitrogênio líquido e, em seguida, colocada sobre o coração por alguns segundos para induzir a lesão cardíaca (POLIZZOTTI *et al.*, 2016).

Em 2005, Van den Bos e colaboradores ao comparar o modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão e o modelo de LDA em camundongos adultos, observaram que a mortalidade total dos animais após os procedimentos foi significativamente menor na criolesão. Esses pesquisadores também observaram que o tamanho da lesão cardíaca induzida por criolesão foi reprodutível, diferente do que foi observado após a lesão produzida por LDA, apresentando tamanhos variados. Além disso, as lesões produzidas pela criolesão levaram a disfunção e modesto remodelamento após oito semanas, comprovando que as alterações funcionais e histológicas foram semelhante ao modelo de LDA (VAN DEN BOS *et al.*, 2005).

Já em 2008, Van Amerongen e colaboradores utilizaram esse modelo em camundongos com 12 semanas de idade. Para indução da lesão cardíaca, os pesquisadores utilizaram uma

sonda de 3 mm de diâmetro, que foi colocada sobre o coração durante 10 segundos. Diferente dos resultados obtidos pelo grupo de Van den Bos, os pesquisadores observaram redução significativa da área lesionada e aumento da expressão de KI-67 e da incorporação do BrdU (nucleotídeo sintético) durante a síntese de DNA 14 dias após a lesão, confirmando a proliferação de cardiomiócitos (VAN AMERONGEN *et al.*, 2008).

Em 2015, Darehzereshki e colaboradores utilizaram o modelo de criolesão em camundongos com um dia de vida e através de sondas metálicas de tamanhos diferentes induziram lesões transmuralis e não-transmuralis. Os pesquisadores observaram que os diferentes tamanhos de lesões cardíacas induziram respostas reparadoras e regenerativas diferentes (DAREHZERESHKI *et al.*, 2015). Além disso, os corações com lesões não-transmuralis conseguiram se regenerar, com redução ou até desaparecimento do tecido cicatricial. Entretanto, os corações com lesões transmuralis não conseguiram se regenerar, o que resultou na cicatrização da lesão e posterior disfunção cardíaca (DAREHZERESHKI *et al.*, 2015).

Outros pesquisadores também utilizaram o modelo de criolesão para induzir lesão cardíaca em camundongos neonatos e observaram a formação de cicatrizes grandes e persistentes. Além disso, marcações raras para cardiomiócitos foram encontradas no espaço subendocárdico dos ventrículos. Porém, não foi observada diferença significativa no número de cardiomiócitos, nos diferentes tempos analisados, e entre animais operados e falso-operados, sugerindo que não houve contribuição do epicárdio em gerar cardiomiócitos (MIZUTANI *et al.*, 2016).

Assim, é importante ressaltar que alguns fatores podem interferir na gravidade da lesão e com isso gerar resultados diversos, tais como (1) a idade do animal (P1 ou P7); (2) o tempo em que o coração é submetido ao congelamento; (3) a quantidade de aplicações (pode ser mais de uma aplicação); (4) o diâmetro da sonda metálica utilizada; e (5) o material que compõe a sonda (POLIZZOTTI *et al.*, 2016). Dessa forma, ainda são necessários estudos a fim de compreender melhor o processo de regeneração cardíaca que ocorre após a criolesão.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Por tudo o que foi exposto, ressaltamos a importância da utilização dos modelos de ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos a fim de compreender os processos de regeneração cardíaca e responder perguntas que, até então, não foram respondidas por esses modelos e por outros como o LDA. O estabelecimento de ambos os modelos experimentais resultará - para nossa Instituição, bem como outras instituições de ensino e pesquisa – em uma ferramenta versátil de estudo que poderá ser difundida e aplicada em inúmeros projetos.

## **3. OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objetivo estabelecer os modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **3.1. Objetivos específicos**

- ❑ Implementar os modelos de ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos com 1 e 7 dias de idade:
  - Elaborar o Procedimento Operacional Padrão (POP) e documentar em vídeo o procedimento cirúrgico a fim de padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução do mesmo.
  - Determinar a taxa de sobrevivência dos camundongos neonatos após a ressecção apical e criolesão.
  - Avaliar a função cardíaca e atividade elétrica dos animais 30 e 60 dias após a ressecção apical e criolesão.
  - Avaliar o percentual de fibrose e alterações morfológicas 2, 7, 21 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Implementação dos modelos de ressecção apical e criolesão em camundongos neonatos**

#### **4.1.1. Seleção dos protocolos de lesão cardíaca**

A revisão exploratória da literatura foi realizada a partir de consultas à base de dados PubMed. As palavras-chave utilizadas para busca foram: *neonatal mouse heart regeneration*, *cryoinjury*, *surgical resection* e *cardiac regenerative potential*. A seleção dos protocolos de lesão cardíaca induzida por criolesão e ressecção apical foi realizada pela aluna de pós-graduação do Mestrado Profissional, sob aprovação das orientadoras do presente estudo.

#### **4.1.2. Elaboração do Procedimento Operacional Padrão**

A elaboração do POP para os modelos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão teve como objetivo padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução de etapas fundamentais do procedimento cirúrgico.

Os POPs foram elaborados seguindo um modelo já utilizado no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular (anexos II e III). A linguagem utilizada nos POPs foi simples e objetiva para o completo entendimento e familiarização por parte dos pesquisadores que utilizarão a técnica. Os documentos foram revisados por três alunos, selecionados aleatoriamente, a fim de garantir a qualidade final dos procedimentos. A aprovação dos POPs foi realizada pelas orientadoras do presente estudo.

#### **4.1.3. Elaboração da documentação em vídeo**

A documentação em vídeo demonstrando protocolos experimentais com recursos simples pode ser utilizada como ferramenta autodidata que auxiliará os grupos de pesquisa a reproduzir o procedimento cirúrgico.

A produção dos vídeos foi dividida em três fases: 1) filmagem do passo a passo dos protocolos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e criolesão, com uma câmera digital; 2) elaboração de um roteiro didático em forma de legenda e 3) edição do material áudio-visual obtido, utilizando o software Windows® Movie Maker versão 2.1.

As gravações foram realizadas no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, durante a execução dos experimentos do presente estudo.

## **4.2. Animais**

Neste trabalho foram utilizados camundongos neonatos da linhagem *Balb/c*, com 1 e 7 dias de idade (P1 e P7, respectivamente), de ambos os sexos, obtidos do Biotério Multiusuário de Pequenos Roedores, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF -

UFRJ). Os animais foram mantidos com as mães, antes e depois do procedimento cirúrgico, no biotério em ambiente com temperatura controlada (23°C), acesso livre a ração e água e exposição diária a um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas.

Este trabalho seguiu as normas estabelecidas no Guia de Cuidado do Uso de Animais de Laboratório (DHHS Publicação No. (NIH) 85-23, revisado em 1996, *Office of Science and Health Reports*, Bethesda, MD 20892) e foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais em Pesquisa, do Centro de Ciências e Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de referência A24/17-015-17.

### **4.3. Procedimentos para indução da lesão cardíaca: ressecção apical e criolesão**

#### **4.3.1 Procedimento 1: anestesia para neonatos em P1 e P7**

Os camundongos neonatos em P1 e P7 foram anestesiados por indução à hipotermia, como descrito na literatura (PHIFER; TERRY, 1986). Para isso, foram necessários recipiente com gelo e alguns pedaços de gaze. A gaze serviu como uma barreira de proteção para a pele dos neonatos. Os animais foram colocados sobre a gaze no recipiente com gelo durante 3 a 5 min e, em seguida, transferidos para uma plataforma fria (bolsa de gelo) coberta com papel interfolha para que permanecessem em plano anestésico durante todo procedimento cirúrgico. Os animais em P7 apresentaram uma resistência maior ao gelo comum por isso foram usados bolsas de gelo. O plano anestésico foi aferido pela ausência de responsividade de reflexos nas patas estimulados com uma pinça, como descrito na literatura (POLIZZOTTI *et al.*, 2015). Após a confirmação da ausência de reflexos foi dado início ao procedimento cirúrgico.

#### **4.3.2. Procedimento 2: cirurgia para indução da lesão cardíaca por ressecção apical**

Antes de iniciar o procedimento cirúrgico foi realizada a assepsia da região torácica com álcool 70%. Em seguida, foi feita uma incisão na pele de aproximadamente 0,5 cm com uma tesoura pequena e a musculatura foi divulsionada com auxílio de uma pinça curva pequena até que as costelas fossem visualizadas. Para ter acesso ao coração, foi feita uma incisão no quarto espaço intercostal ou no espaço intercostal que estivesse mais próximo do coração. Após a visualização do coração, foi realizada uma pressão com os dedos, do lado direito do tórax do animal, para externalizá-lo. Logo em seguida, com auxílio de uma tesoura oftalmológica foi feita a ressecção (corte) de parte do ventrículo esquerdo, cerca de 10 à 20% do tecido apical (Figura 2). Após a ressecção, o espaço intercostal, a musculatura e a pele foram suturados, com pontos chuleio simples, utilizando o fio prolene 6-0 (Johnson&Johnson

do Brasil) para os neonatos em P1 e o fio de nylon- monofilamento (Procure) para animais em P7. No final da cirurgia, os animais foram colocados sobre uma cama aquecida (*T/Pump professional*) à 36,5°C - 38°C, por 15 a 20 min, para término do plano anestésico e recuperação da temperatura corporal. Para a analgesia dos camundongos, foi administrado tramadon - cloridrato de tramadol (Cristália®) na dose de 20 mg/kg. Os animais foram limpos, sem vestígios de sangue e devolvidos a mãe.

Ressecção Apical  
(Grupo RA)



**Figura 2: Representação esquemática do modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical.** A área tracejada demonstra o local da ressecção do ápice do coração dos camundongos do grupo RA, utilizando uma tesoura. Adaptado de PORRELLO e OLSON, 2014.

#### 4.3.3. Procedimento 3: cirurgia para indução da lesão cardíaca por criolesão

Antes de iniciar o procedimento cirúrgico foi realizada a assepsia da região torácica com álcool 70%. Em seguida, foi feita uma incisão na pele de, aproximadamente, 0,5 cm com uma tesoura pequena e a musculatura foi divulsionada com auxílio de uma pinça curva pequena até que as costelas fossem visualizadas. Uma sonda metálica com cerca de 1 mm de diâmetro foi colocada em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 20 s. Enquanto a sonda congelava, foi feita uma incisão no quarto espaço intercostal ou no espaço intercostal que estivesse mais próximo do coração. Após a visualização do coração, foi realizada uma pressão com os dedos, do lado direito do tórax do animal, para externalizá-lo. Logo em seguida, a sonda congelada foi colocada sobre o ventrículo esquerdo, próximo ao ápice, por 10 s para indução da criolesão (Figura 3). Após a lesão, o espaço intercostal, a musculatura e a pele foram suturados, com pontos chuleio simples, utilizando o fio prolene 6-0 (Johnson&Johnson do Brasil) para os neonatos em P1 e o fio de nylon- monofilamento (Procure) para animais em P7. No final da cirurgia, os animais foram colocados sobre uma cama aquecida (*T/Pump professional*) à 36,5°C - 38°C, por 15 a 20 min, para término do plano anestésico e recuperação da

temperatura corporal. Para a analgesia dos camundongos, foi administrado tramadon - cloridrato de tramadol (Cristália®) na dose de 20 mg/kg. Os animais foram limpos, sem vestígios de sangue, e devolvidos a mãe.

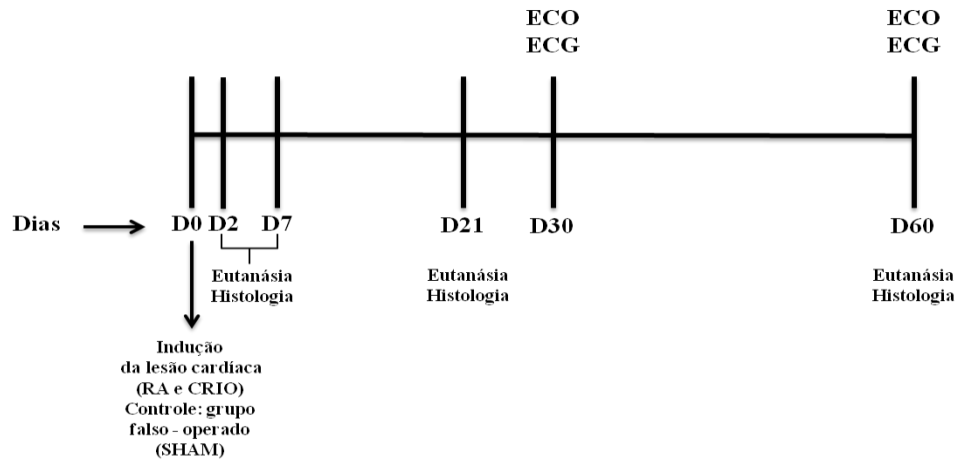


**Figura 3: Representação esquemática do modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão.** A área azul demonstra o local do congelamento realizado pela sonda metálica (cryoprobos) no coração de camundongos do grupo CRIO. Adaptado de PORRELLO e OLSON, 2014.

#### 4.4. Grupos experimentais e cronograma experimental

Neste trabalho, foram utilizados dois grupos experimentais para cada modelo de lesão cardíaca em camundongos neonatos com P1 e P7: 1) animais submetidos à ressecção apical ou criolesados, que passaram pelo procedimento cirúrgico e foram submetidos à lesão e 2) animais controle (ou SHAM), que passaram somente pelo procedimento cirúrgico e, portanto, não foram submetidos à lesão.

Os dois grupos foram avaliados em pontos temporais distintos, determinados para estudar as alterações funcionais e morfológicas presentes nas fases de regeneração cardíaca. As alterações funcionais foram avaliadas 30 e 60 dias pós-operatório (pós-OP). Já as alterações morfológicas foram avaliadas 2, 7 e 21 e 60 dias pós-OP. O cronograma experimental das pode se observado na Figura 4.



**Figura 4: Cronograma experimental.** O estudo foi iniciado realizando a indução da lesão cardíaca por ressecção apical (RA) ou criolesão (CRIO) em D0. Animais falso-operados foram utilizados como controle (SHAM). As avaliações da função cardíaca por ecocardiograma (ECO) e da atividade elétrica por eletrocardiograma (ECG) foram realizadas 30 e 60 dias após a lesão (D30 e D60, respectivamente). Já as análises histológicas foram realizadas 2, 7, 21 e 60 dias após o início do protocolo (D2, D7, D21 e D60 respectivamente).

#### 4.5. Eletrocardiograma

Para a realização do eletrocardiograma (ECG), os animais foram anestesiados com os anestésicos Cloridrato de Xilazina (Syntec®), na dose de 20 mg/Kg, e Cloridrato de Quetamina (Syntec®), na dose de 80 mg/Kg, para a colocação de três eletrodos de aço inoxidável com diâmetro de 0,60 mm e 1,5 cm de comprimento. Os eletrodos foram colocados no tecido subcutâneo dos animais com auxílio de uma agulha de 21G (0,80 x 30 mm), nas seguintes regiões: (1) na região acima da pata traseira, (2) na linha axilar sobre a pata esquerda e (3) na linha axilar sobre a pata direita. Após a redução do efeito da anestesia, o registro eletrocardiográfico foi realizado na derivação convencional de D1, utilizando o aparelho BIO AMP da ADInstruments calibrado na velocidade de 50 mm/s e voltagem de 20 mm = 1 mV. Os registros foram obtidos por meio do programa Axoscope (Axon Instruments, Inc) e analisados no programa LabChart v8.1.5 (ADInstruments). O ECG foi realizado nos tempos de 30 e 60 dias pós-OP.

#### 4.6. Ecocardiograma

Para a realização do ecocardiograma (ECO), os animais foram anestesiados com uma mistura de gás isoflurano 1,5% (Cristália®) e O<sub>2</sub>. Após a perda do reflexo postural, os animais foram fixados à plataforma e o focinho foi devidamente posicionado na saída do sistema de anestesia para mantê-los sedados durante todo o procedimento. Antes do início do exame, foi feita uma tricotomia da região precordial com objetivo de melhorar a janela acústica. Em seguida, foi aplicado o gel para ultrassom (Carbogel®) sobre a região precordial, para estabelecer o acoplamento acústico entre a sonda e o tecido. O aparelho que foi utilizado



para realização do ECO foi o *VisualSonics Vevo 770* com transdutor eletromecânico de 17,5 MHz. Durante todo o procedimento, as frequências cardíaca e respiratória e a temperatura corporal dos animais foram monitoradas. O ECO foi realizado nos tempos de 30 e 60 dias pós-OP.

Para a obtenção das imagens de eixo curto (1, 2, 3 e 4), o transdutor foi posicionado transversalmente ao tórax, na região paraesternal. As imagens de eixo curto foram realizadas iniciando-se da base do coração em direção ao ápice. As imagens do eixo longo do coração (distância entre a via de saída da aorta e o ápice do coração) foram obtidas posicionando o transdutor na região do paraesternal, com uma angulação de 45° em relação ao esterno. Tanto imagens de eixo curto como as do eixo longo foram obtidas no modo bidimensional para calcular as medidas cardíacas através do método de Simpson. Os parâmetros que foram avaliados são: volume diastólico final (VDF), volume sistólico final (VSF), débito sistólico (DS), fração de mudança de área (FAC) e fração de ejeção (FE).

O modo unidimensional (modo-M) foi utilizado a fim de analisar estruturalmente as paredes anterior e posterior do coração e auxiliar no diagnóstico da lesão cardíaca.

A eutanásia foi realizada no final dos tempos analisados. Para isso, foi ministrado doses dupla ou tripla dos anestésicos xilazina (40-60 mg/kg) e ketamina (160-240 mg/kg) com objetivo de cessar os batimentos cardíacos. Em seguida os corações foram retirados lavados em PBS e armazenados em tampão formalina por pelo menos 48 horas.

#### **4.7. Histologia**

Os corações separados para a histologia foram armazenados em tampão formalina (Vetec Química Fina) a 10% (v/v), por no mínimo 48 h, para posterior processamento das amostras. Antes de iniciar o processamento, as amostras foram lavadas por 10 min com água corrente, para retirada do excesso do tampão formalina. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica crescente (álcool I, II e III; Vetec Química Fina) de concentrações 70%, 90% e 100% respectivamente, por 30 min cada uma. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em série de xilol (xilol I e II; Vetec Química Fina) por 15 min cada. O xilol permite o clareamento do tecido e melhor penetração da parafina no tecido. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para recipientes contendo parafina líquida (parafina I e II; Histopar) e mantidas dentro da estufa (60 °C), com duração de 30 min cada banho. Em seguida, o material foi colocado em uma forma metálica para ser totalmente preenchida com parafina líquida, processo denominado inclusão. Os blocos foram resfriados, desenhados e cortados no micrótomo (Leica RM2125 RTS). Os cortes obtidos foram

cortes escalonados (tamanhos diferentes) do plano transversal do coração com espessura de 5 µm cada. Após realização dos cortes, as lâminas foram montadas e coradas com picrossírius (Sigma-Aldrich) e hematoxilina e eozina (HE) (Sigma-Aldrich).

#### **4.7.1. Coloração por picrossírius**

Para realização da coloração, as lâminas foram colocadas na estufa a 60 °C, por um período de 20 min, a fim de retirar o excesso de parafina dos cortes. Os cortes foram submetidos a três banhos de xilol (I, II e III) por 5 min cada. O material foi hidratado em uma série decrescente de álcool (100%, 100%, 90% e 70%) por 5 min cada. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada durante 5 min. Em seguida, os cortes foram incubados em ácido pícrico saturado por 30 min e lavados em água destilada por 20 min. Logo após esta etapa, foi realizada a incubação dos cortes em solução de ácido fosfomolibdico 0,2% (Vetec Química Fina) durante 1 min e posterior incubação na coloração de picrossírius durante 1 h e 30 min. Os cortes foram incubados em ácido clorídrico 0,01N (Vetec Química Fina) durante 2 min e depois lavados em água destilada. Os cortes foram desidratados em uma série crescente de álcool (70%, 90%, 100% e 100%), com duração de 5 min cada. Em seguida, o material foi clarificado em série de xilol (I, II e III) durante 5 min. No final, as lâminas foram montadas com entellan e visualizadas no microscópio óptico de campo claro (EVOS-AGM) para obtenção de quatro fotos de cada animal para posteriores análises no programa *Image-Pro Plus 7.0.1*. O programa *Image-Pro Plus 7.0.1* quantificou os pixels de cor amarela como sendo a área viável e os pixels de rosa-vermelho como área fibrótica de todo o corte transversal do coração (ventrículos direito e esquerdo).

#### **4.7.2. Coloração por hematoxilina e eosina**

Para realização da coloração, as lâminas foram colocadas na estufa a 60 °C, por um período de 20 min, a fim de retirar o excesso de parafina dos cortes. Os cortes foram submetidos a três banhos de xilol (I, II e III) por 5 min cada. O material foi hidratado em uma série decrescente de álcool (100%, 100%, 90% e 70%) por 5 min cada. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada durante 1 min e incubados na coloração hematoxilina por 8 min. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada durante 5 min. Após, os cortes foram mergulhados rapidamente em álcool clorídrico (95% álcool, 1% HCl) e incubados na coloração eosina por 4 min. O material foi lavados em água destilada rapidamente. Em seguida, os cortes foram desidratados em uma série crescente de álcool (70%, 90%, 100% e 100%), com duração de 5 min cada. O material foi clarificado em série

de xilol (I, II e III) durante 5 min. No final, as lâminas foram montadas com entellan e visualizadas no microscópio óptico de campo claro (EVOS-AGM) para obtenção das fotos.

#### **4.8. Análise estatística**

A escolha do teste estatístico foi feita de acordo com as características das variáveis envolvidas. Desta forma, foi utilizado o teste Análise de Variância (ANOVA) para 2 vias com o pós-teste Bonferroni, a fim de avaliar as diferenças entre grupos (SHAM e RA; SHAM e CRIO) nos tempos de 30 e 60 dias pós-OP. Já nas análises histológicas foi utilizado o Teste t de *Student* a fim de avaliar as diferenças entre grupos (SHAM e RA; SHAM e CRIO) nos pontos temporais distintos (2, 7, 21 e 60 dias pós-OP). Os resultados foram considerados significativos quando o grau mínimo de significância foi de 95% (valor de p menor que 0,05). As análises estatísticas foram realizadas no *software* Graphpad Prism Project (versão 6.0).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Protocolos de lesão cardíaca selecionados**

Os protocolos selecionados na literatura para o desenvolvimento desse trabalho foram:

- Protocolo de indução da lesão cardíaca por ressecção apical: "Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice". *Nature Protocols* (MAHMOUD *et al.*, 2014).
- Protocolo de indução da lesão cardíaca por criolesão: "A cryoinjury model in neonatal mice for cardiac translational and regeneration research". *Nature Protocols* (POLIZZOTTI *et al.*, 2015).

### **5.2. Procedimento Operacional Padrão**

Os POPs dos modelos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão (Anexos II e III, respectivamente) foram cuidadosamente elaborados para minimizar a ocorrência de desvios na execução do procedimento cirúrgico. Nesses documentos, os tópicos abordados foram: (1) objetivo; (2) campo de aplicação; (3) responsabilidades dos experimentadores e da coordenadora do laboratório; (4) condições de biossegurança; (5) definições do modelo; e (6) procedimentos. Os POPs também contém imagens representativas demonstrando o passo a passo do procedimento para indução da lesão.

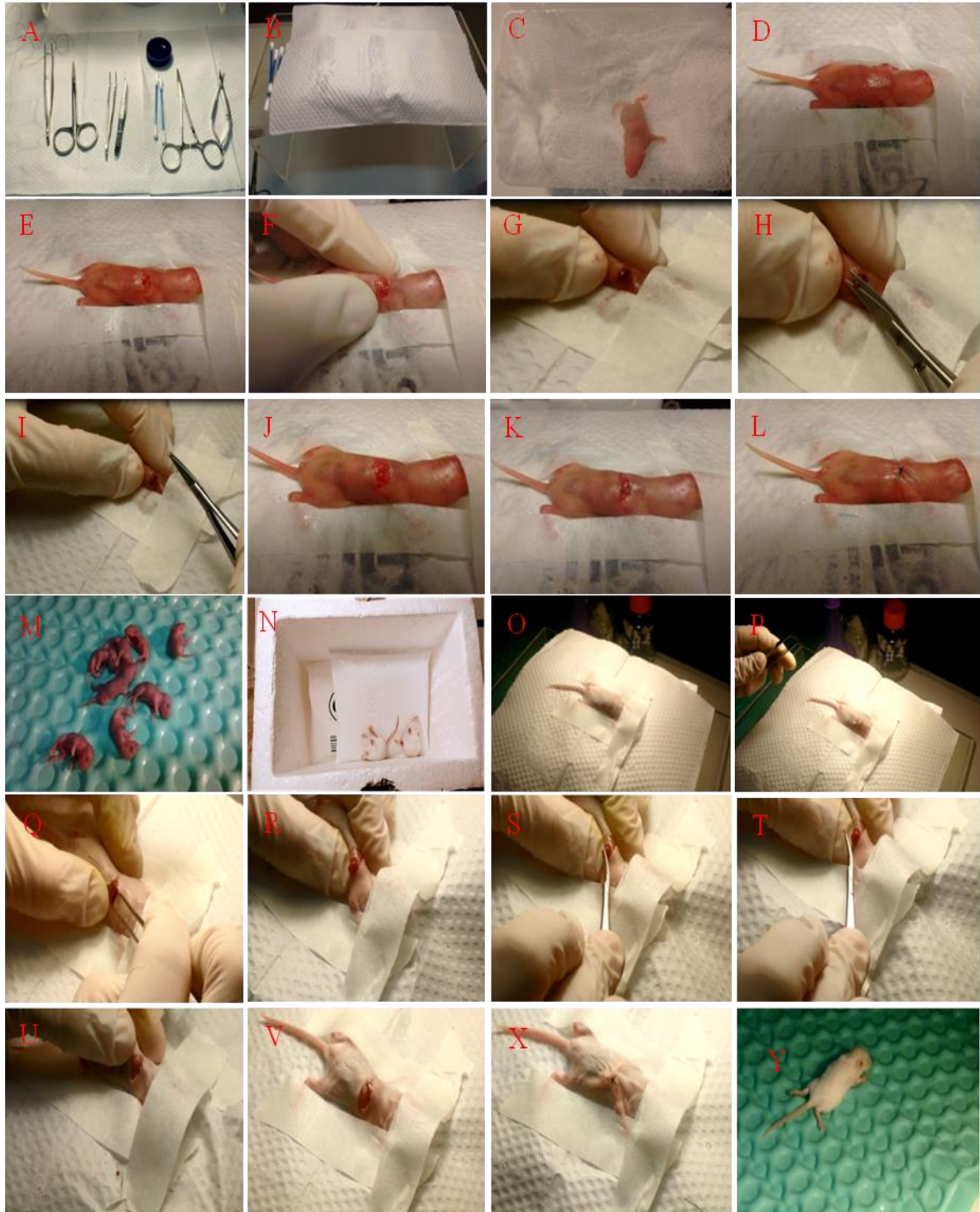
### **5.3. Documentação em vídeo**

Os vídeos demonstrando o protocolo experimental referente aos modelos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão em camundongos P1 e P7 foram cuidadosamente elaborados e editados, apresentando duração de 9 min e 11 s e 10 min e 08 s, respectivamente. Esse documento contém (1) objetivo, (2) campo de aplicação e (3) lista de material utilizada. Além disso, legenda simples e objetiva foi adicionada às imagens para auxiliar os grupos de pesquisa a reproduzir o procedimento cirúrgico.

## **Parte I - Estabelecimento do modelo de lesão cardíaca por ressecção apical**

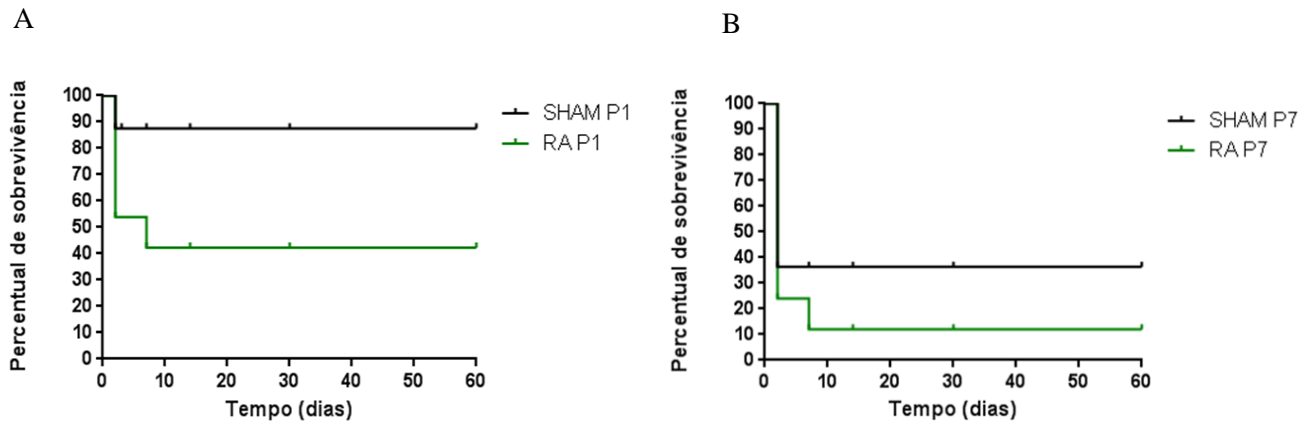
### **5.4. Indução da lesão cardíaca por ressecção apical**

A Figura 5 contém imagens representativas dos materiais utilizados e dos procedimentos realizados para a indução da lesão cardíaca por ressecção apical. O tempo necessário para o camundongo P1 ou P7 entrar em plano anestésico induzido por hipotermia foi de, aproximadamente, 3 a 5 min. Para a execução das etapas do procedimento cirúrgico - desde a incisão da pele e da musculatura até a sutura de ambos os tecidos - cerca de 7 a 10 min foram necessários. Após a cirurgia, o animal permaneceu na cama aquecida para recuperação da temperatura corporal por, aproximadamente, 15 a 20 min. Dessa forma, o tempo total, por animal, necessário para execução de todas as etapas para indução da lesão cardíaca por ressecção apical variou de 25 a 35 min.



**Figura 5: Imagens representativas do procedimento de indução da lesão cardíaca por ressecção apical em camundongos P1 e P7.** Materiais utilizados no procedimento cirúrgico (A). Mesa acrílica contendo uma bolsa de gelo coberta por papel interfolha e hastes flexíveis (B). Camundongos P1 e P7 anestesiados por hipotermia (C e N). Animais em decúbito dorsal, com patas e cabeças fixadas com fita crepe (D e O). Incisão da pele e da musculatura intercostal (E, F, P e Q). Exteriorização do coração (G e R). Corte do ápice do coração (H, I, S e T). O coração é inserido na caixa torácica (J e U). (K, L, V e X) Sutura dos músculo intercostal e da pele (K, L, V e X). Camundongos posicionados na cama aquecida para recuperação da temperatura corporal (M e Y).

A análise da sobrevivência dos animais foi realizada após o procedimento cirúrgico. Como resultado, foi possível observar que 88% dos animais do grupo SHAM P1 (n=8), 46% dos animais grupo RA P1 (n=26), 36% dos animais do grupo SHAM P7 (n=11) e 12% dos animais do grupo RAP7 (n=25) sobreviveram até o término do período analisado (Figura 6).



**Figura 6: Análise da taxa de sobrevivência dos animais.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando que (A) 88% dos animais do grupo SHAM P1 (n=8) e 42% dos animais do grupo RA P1 (n=26) e (B) 36% dos animais do grupo SHAM P7 (n=11) e 12% dos animais do grupo RA P7 (n=25) sobreviveram até 60 dias após o procedimento cirúrgico.

### 5.5. Análise da função cardíaca por Ecocardiograma

A análise por ECO foi realizada a fim de verificar alterações na função cardíaca de camundongos P1 e P7 em resposta à ressecção apical. Os parâmetros avaliados foram: fração de ejeção (FE), débito sistólico (DS), fração de mudança de área (FAC), volume sistólico final (VSF) e volume diastólico final (VDF). As médias e os desvios padrões desses parâmetros estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P1 após a ressecção apical.**

Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical				
Dias pós-OP	P1			
	30 dias		60 dias	
ECO	SHAM Média ± SD (n=6)	RA Média ± SD (n=11)	SHAM Média ± SD (n=6)	RA Média ± SD (n=11)
FE (%)	67,40 ± 4,25	60,52 ± 7,45	59,79 ± 9,42	58,25 ± 10,06
DS (µL)	32,53 ± 2,50	31,71 ± 6,90	34,43 ± 7,16	34,40 ± 5,76
FAC (%)	55,53 ± 6,95	51,07 ± 14,47	50,20 ± 13,12	51,95 ± 15,22
VSF(µL)	15,98 ± 3,82	20,51 ± 4,74	23,54 ± 8,67	25,21 ± 8,16
VDF(µL)	48,51 ± 5,72	52,22 ± 7,82	57,97 ± 10,41	59,61 ± 7,89

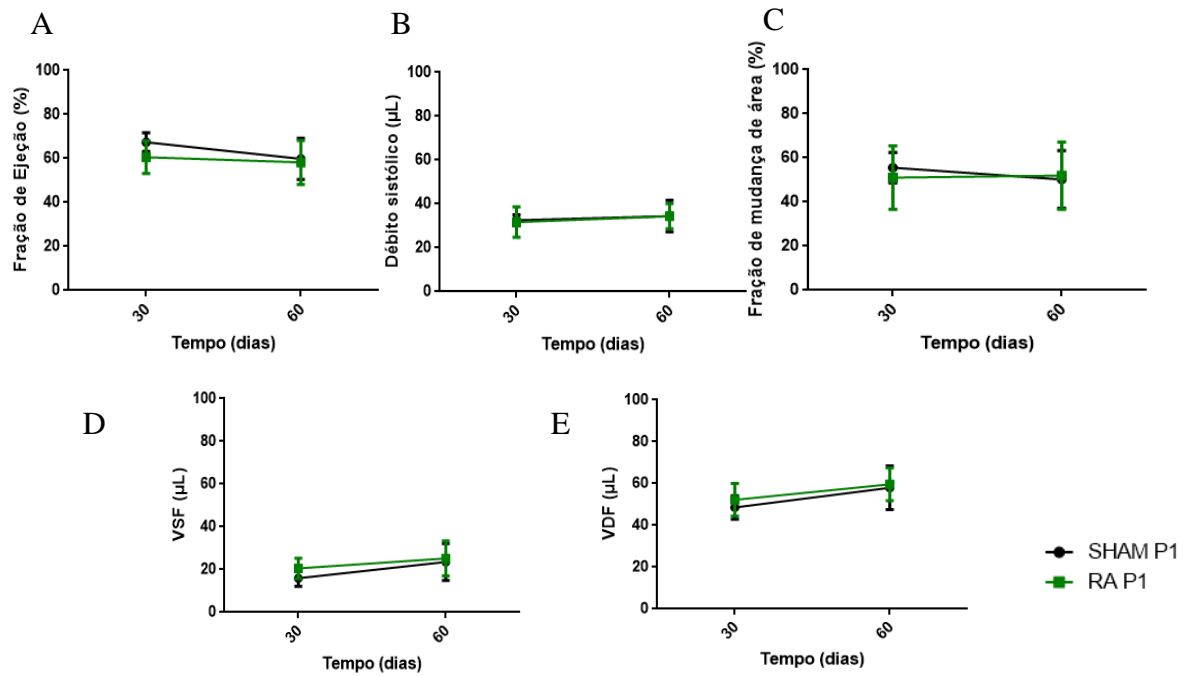
SD = desvio-padrão; FE = fração de ejeção; DS = débito sistólico; FAC - fração de mudança de área; VSF = volume sistólico final; VDF = volume diastólico final. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações.

**Tabela 2. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P7 após a ressecção apical.**

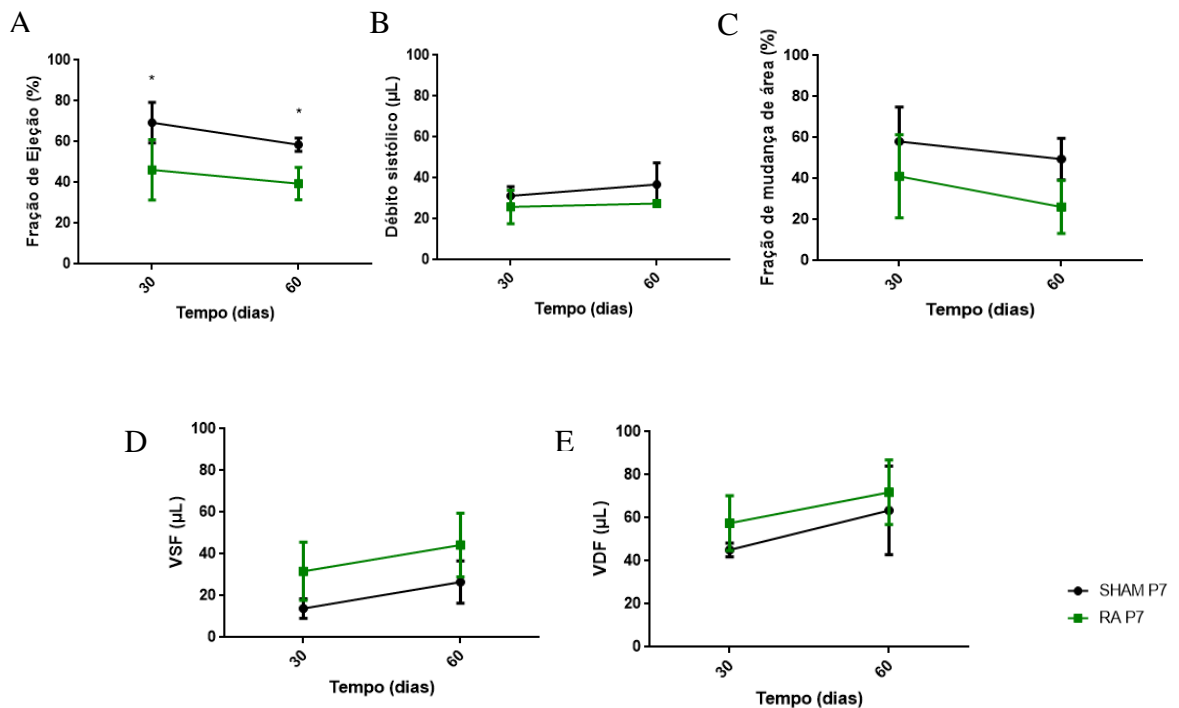
Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical				
Dias pós-OP	P7			
	30 dias		60 dias	
ECO	SHAM Média ± SD (n=4)	RA Média ± SD (n=3)	SHAM Média ± SD (n=4)	RA Média ± SD (n=3)
FE (%)	69,39 ± 9,96	46,22 ± 14,82*	58,54 ± 3,25	39,46 ± 7,91*
DS (µL)	31,28 ± 4,52	25,88 ± 8,13	36,89 ± 10,63	27,58 ± 0,77
FAC (%)	58,12 ± 16,76	41,11 ± 20,29	49,53 ± 10,16	26,21 ± 12,91
VSF(µL)	13,85 ± 4,70	31,75 ± 13,97	26,57 ± 10,15	44,27 ± 15,25
VDF(µL)	45,13 ± 3,13	57,56 ± 12,80	63,46 ± 20,55	71,85 ± 15,02

SD = desvio-padrão; FE = fração de ejeção; DS = débito sistólico; FAC - fração de mudança de área; VSF = volume sistólico final; VDF = volume diastólico final. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. (\*) Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo SHAM.

Os resultados mostraram que não houve diferença nos parâmetros avaliados entre os camundongos P1 dos grupos RA e SHAM (Figura 7). Já os camundongos P7 do grupo RA apresentaram redução significativa da FE quando comparado aos animais do grupo SHAM. No entanto, não foram observadas diferenças no DS, na FAC, no VSF e no VDF (Figura 8).



**Figura 7: Análise da função cardíaca em camudongos P1 30 e 60 dias após ressecção apical.** Não foram observadas diferenças na fração de ejeção (A), débito sistólico (B), fração de mudança de área (C), volume sistólico final (VSF) (D) e volume diastólico final (VDF) (E). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. Valores representados pela média ± desvio-padrão.



**Figura 8: Análise da função cardíaca em camudongos P7 30 e 60 dias após a ressecção apical.** Foi observada redução significativa da fração de ejeção entre os camudongos P7 do grupo RA e grupo SHAM (A). No entanto, não foram observadas diferenças no débito sistólico (B), na fração de mudança de área (C), no volume sistólico final (VSF) (D) e no volume diastólico final (VDF) (E). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações: (\*)  $p < 0,05$ . Valores representados pela média ± desvio-padrão.



### 5.6. Análise da atividade elétrica por Eletrocardiograma

A análise por ECO foi realizada para verificar alterações da atividade elétrica dos corações de camundongos P1 e P7 30 e 60 dias após a ressecção apical. Os parâmetros eletrocardiográficos avaliados foram: frequência cardíaca (FC), duração da onda P e os intervalos RR, PR, QRS, QT e QT corrigido (QTc). As médias e os desvios padrões desses parâmetros estão sumarizados nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P1 após ressecção apical.**

Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical				
Dias pós-OP	P1			
	30 dias		60 dias	
	SHAM Média ± SD (n=7)	RA Média ± SD (n=12)	SHAM Média ± SD (n=7)	RA Média ± SD (n=12)
ECG				
FC (bpm)	195,86 ± 21,96	193,44 ± 93,74	233,95 ± 51,75	202,18 ± 40,30
Duração da Onda P (s)	0,019 ± 0,002	0,019 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,017 ± 0,002
Intervalo RR (s)	0,351 ± 0,049	0,366 ± 0,099	0,316 ± 0,065	0,320 ± 0,067
Intervalo PR (s)	0,038 ± 0,003	0,041 ± 0,006	0,035 ± 0,004	0,037 ± 0,005
Intervalo QRS (s)	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,013 ± 0,002
Intervalo QT (s)	0,044 ± 0,002	0,042 ± 0,003	0,045 ± 0,002	0,040 ± 0,005*
Intervalo QTc (s)	0,077 ± 0,004	0,074 ± 0,013	0,086 ± 0,008	0,073 ± 0,012*

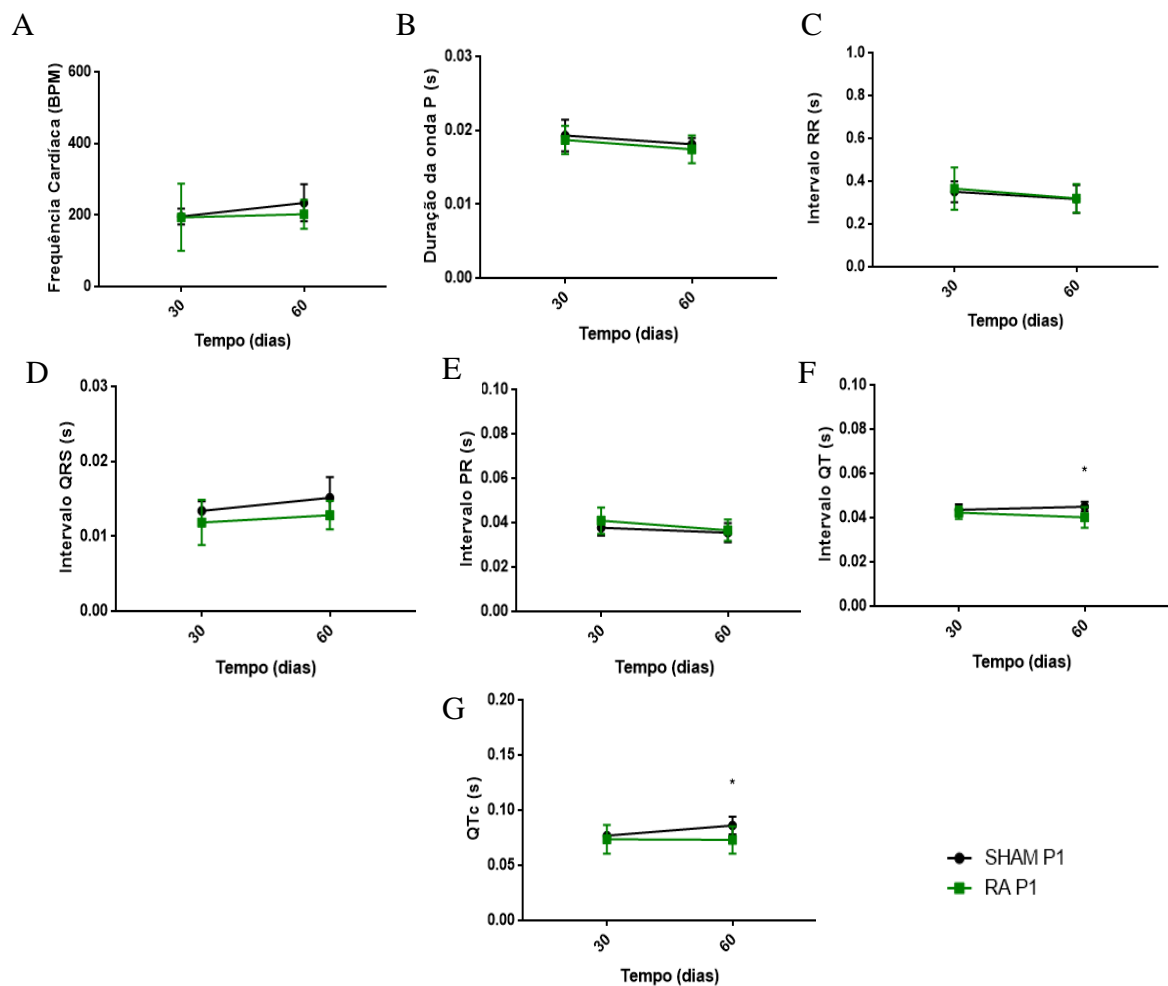
SD = desvio-padrão; FC = frequência cardíaca. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. (\*) Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo SHAM.

**Tabela 4. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P7 após ressecção apical.**

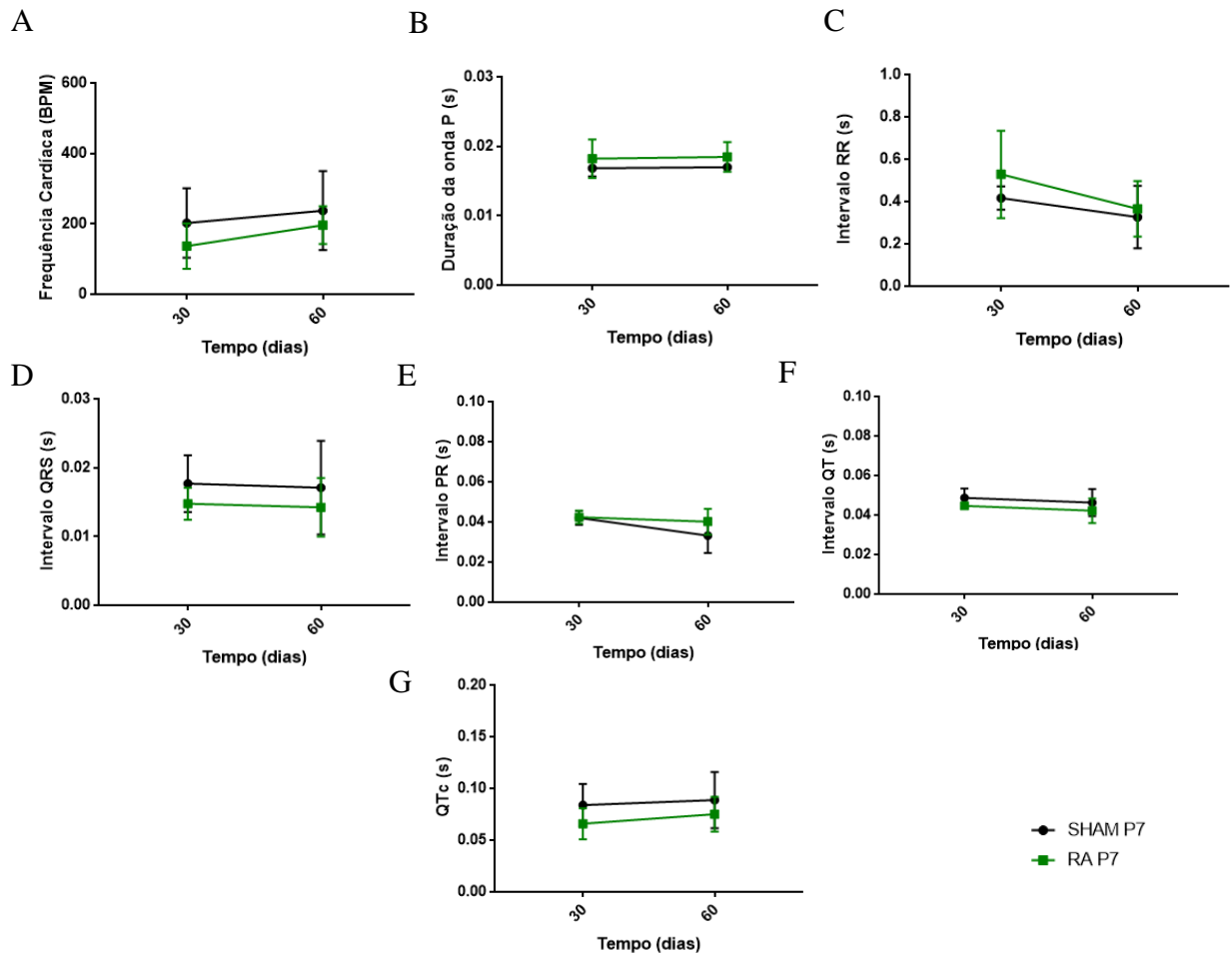
Modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical				
Dias pós-OP	P7			
	30 dias		60 dias	
	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=3)	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=3)
ECG				
FC (bpm)	202,43 ± 98,56	136,73 ± 64,73	237,32 ± 112,24	196,40 ± 53,48
Duração da Onda P (s)	0,017 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,017 ± 0,00	0,018 ± 0,002
Intervalo RR (s)	0,416 ± 0,055	0,528 ± 0,206	0,327 ± 0,147	0,365 ± 0,131
Intervalo PR (s)	0,042 ± 0,003	0,042 ± 0,003	0,033 ± 0,009	0,040 ± 0,006
Intervalo QRS (s)	0,018 ± 0,004	0,015 ± 0,002	0,017 ± 0,007	0,014 ± 0,004
Intervalo QT (s)	0,049 ± 0,005	0,045 ± 0,001	0,046 ± 0,007	0,042 ± 0,006
Intervalo QTc (s)	0,084 ± 0,020	0,066 ± 0,015	0,089 ± 0,027	0,075 ± 0,017

SD = desvio-padrão; FC = frequência cardíaca. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações.

Com relação à análise da atividade elétrica do coração dos animais P1, foi possível observar redução significativa dos intervalos QT e QTc dos camundongos do grupo RA quando comparado aos do grupo SHAM, apenas 60 dias após a lesão (Figura 9). Quanto à análise da atividade elétrica do coração dos animais P7, não foram observadas alterações dos parâmetros avaliados (Figura 10).



**Figura 9: Análise da atividade elétrica do coração de camundongos P1 30 e 60 dias após ressecção apical.** Não foram observadas alterações na frequência cardíaca (A), na duração da onda P (B) e nos intervalos RR (C), QRS (D) e PR (E). No entanto, foi observada redução significativa dos intervalos QT (F) e QTc (G) dos camundongos do grupo RA 60 dias após a lesão, quando comparado aos do grupo SHAM. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações: (\*)  $p < 0,05$ . Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

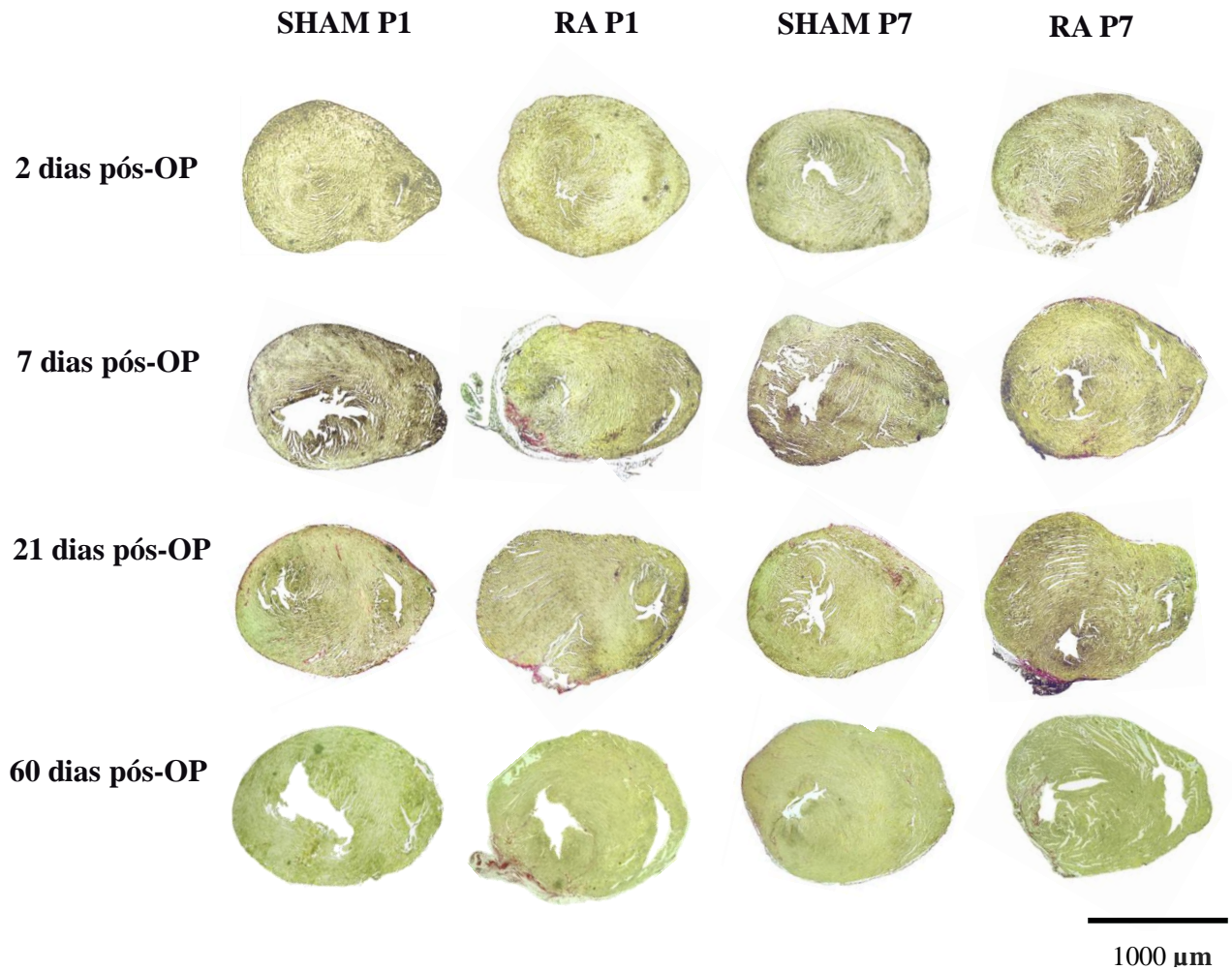


**Figura 10: Análise da atividade elétrica do coração de camudongos P7 30 e 60 dias após a ressecção apical.** Não foram observadas alterações na frequência cardíaca (A), na duração da onda P (B) e nos intervalos RR (C), QRS (D), PR (E), QT (F) e QTc (G). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

## 5.7. Análises histológicas

### 5.7.1. Quantificação das fibras colágenas

A coloração tecidual por picrossirius foi realizada a fim de comparar a área miocárdio ocupada por fibras colágenas após a ressecção apical entre os grupos de animais. Essa coloração evidencia a presença de cicatriz fibrótica por meio da pigmentação avermelhada das fibras de colágenos, enquanto a área viável permanece amarelada (Figura 11). As médias e os desvios padrões referente ao percentual de fibras de colágenos estão sumarizados na Tabela 5.



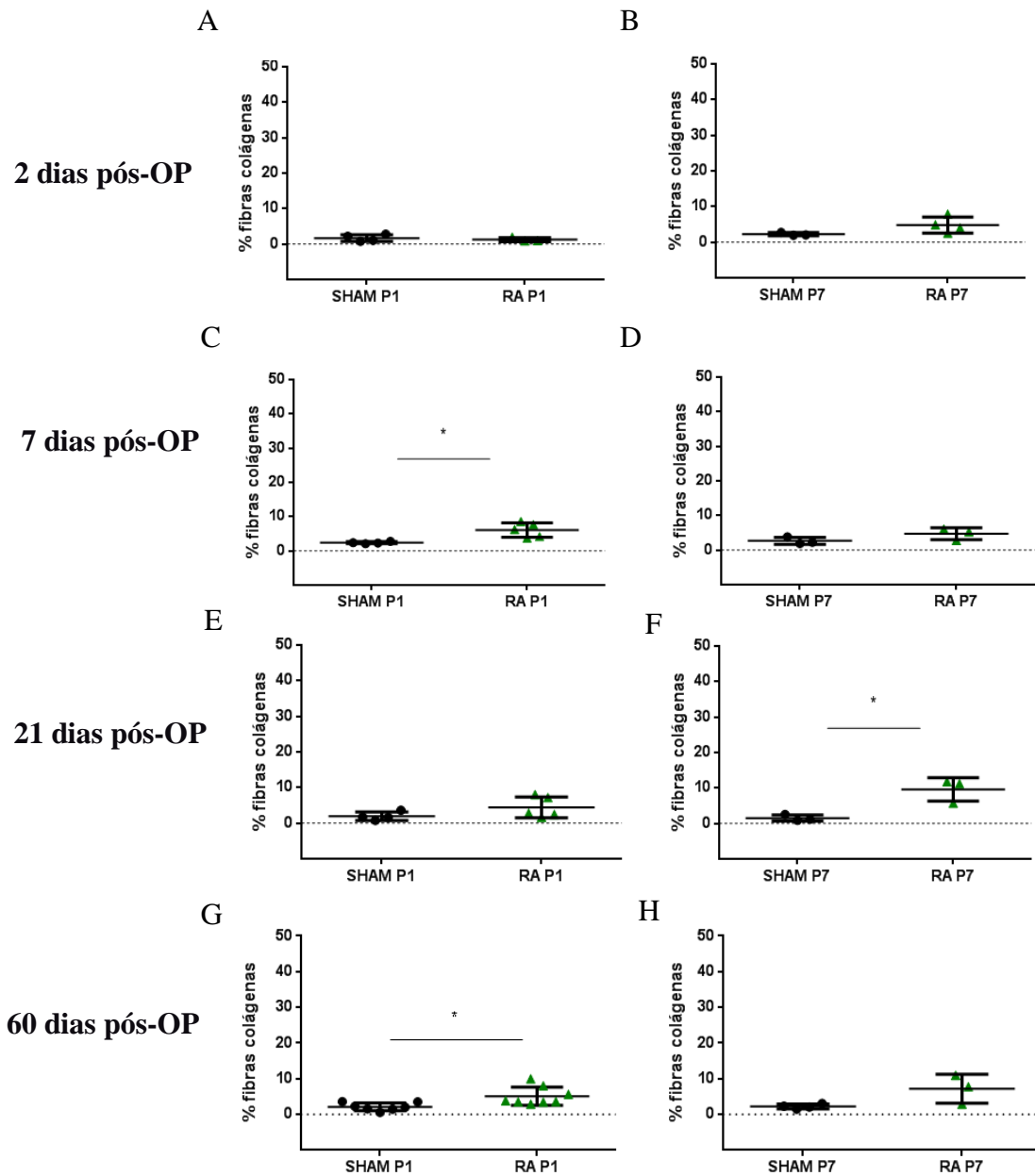
**Figura 11: Coloração por picrosirius após ressecção apical.** Imagens representativas de cortes histológicos dos corações dos camundongos P1 e P7 dos grupos RA e SHAM, 2, 7, 21 e 60 dias pós-operatório (pós-OP). A região amarelada corresponde ao tecido viável e a região rosa à avermelhada corresponde à deposição de colágeno. Aumento 4X.

**Tabela 5. Percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 e P7 após ressecção apical**

Dias pós-OP	Fibras Colágenas			
	P1		P7	
	SHAM Média ± SD	RA Média ± SD	SHAM Média ± SD	RA Média ± SD
2 dias	1,682 ± 0,9393 (n=4)	1,267 ± 0,5801 (n=3)	2,238 ± 0,4269 (n=3)	4,822 ± 2,255 (n=4)
7 dias	2,375 ± 0,2862 (n=4)	6,077 ± 2,109* (n=5)	2,660 ± 1,033 (n=3)	4,713 ± 1,717 (n=3)
21 dias	1,929 ± 1,209 (n=4)	4,414 ± 2,952 (n=5)	1,539 ± 0,8659 (n=3)	9,597 ± 3,346* (n=3)
60 dias	2,139 ± 1,097 (n=7)	5,110 ± 2,575* (n=8)	2,238 ± 0,6687 (n=4)	7,207 ± 4,058 (n=3)

SD = desvio-padrão. Teste t de *Student* não-pareado. (\*) Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo SHAM.

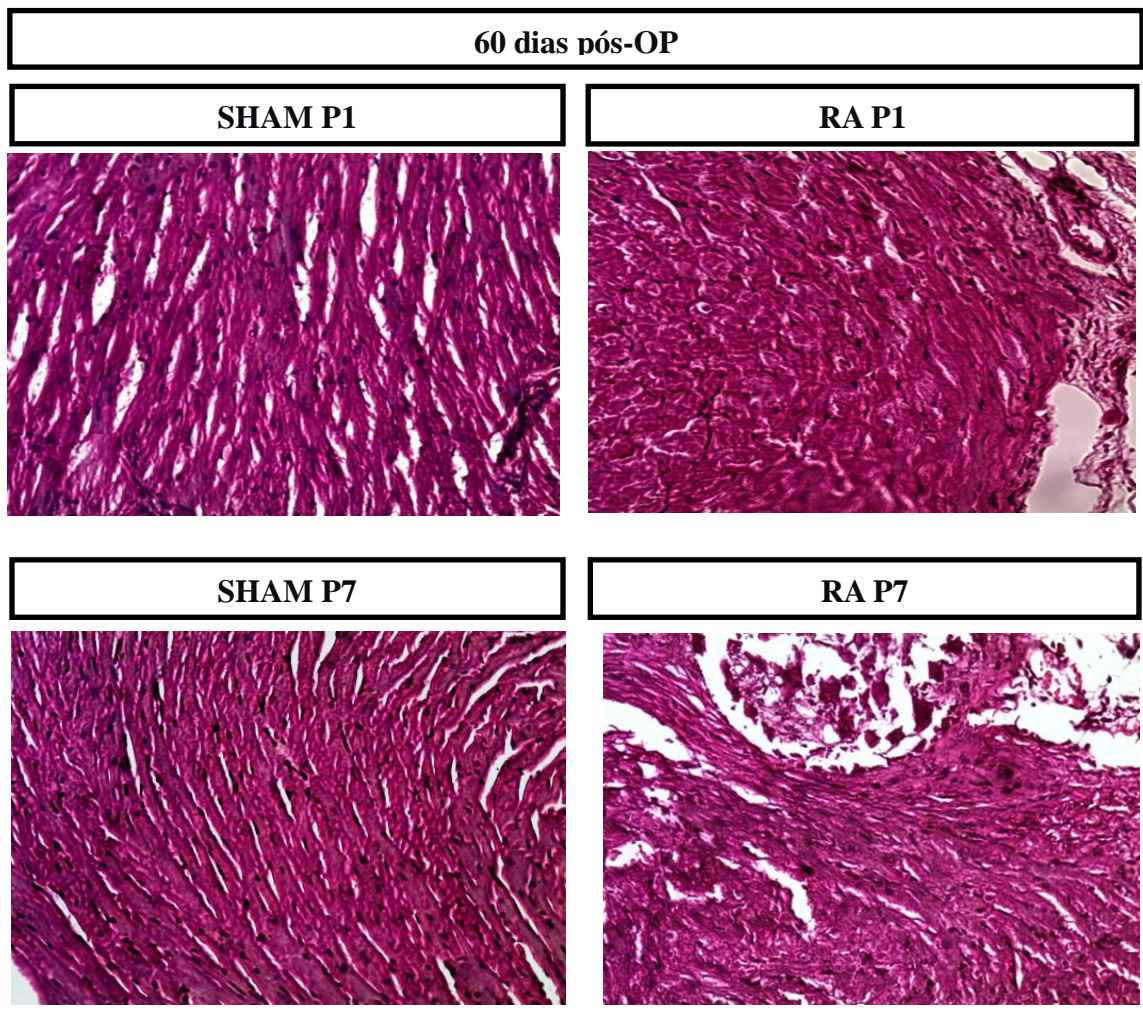
Como resultado, foi possível observar aumento do percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 7 e 60 dias após a lesão e no coração dos camundongos P7 21 dias após a ressecção, quando comparado aos animais do grupo SHAM (Figura 12).



**Figura 12: Quantificação de fibras de colágenos em camundongos P1 e P7 após a ressecção apical.** Foi observado aumento significativo no percentual de fibras colágenas no coração dos animais P1 7 e 60 dias pós-operatório (pós-OP) (C e G) e no coração dos animais P7 21 dias pós-OP (F) do grupo RA, quando comparado aos camundongos do grupo SHAM. Não foi observada diferença desse parâmetro nas demais condições analisadas (A, B, D, E e H). Teste t de Student não-pareado: (\*)  $p < 0,05$ . Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

### 5.7.2. Análise morfológica

A coloração do tecido cardíaco por HE foi realizada para verificar alterações morfológicas após a ressecção apical. A análise revelou a presença de tecido de granulação e de fibras musculares e núcleos desorganizados apenas no coração dos camundongos P7 do grupo RA (Figura 13).



100 µm

**Figura 13: Análise morfológica após ressecção apical.** Imagens representativas de cortes histológicos dos corações dos camundongos P1 e P7 dos grupos RA e SHAM, corados com HE, 60 dias após a lesão por ressecção apical. Aumento de 40X.

## Parte II - Estabelecimento do modelo de lesão cardíaca por criolesão

### 5.8. Indução da lesão cardíaca por criolesão

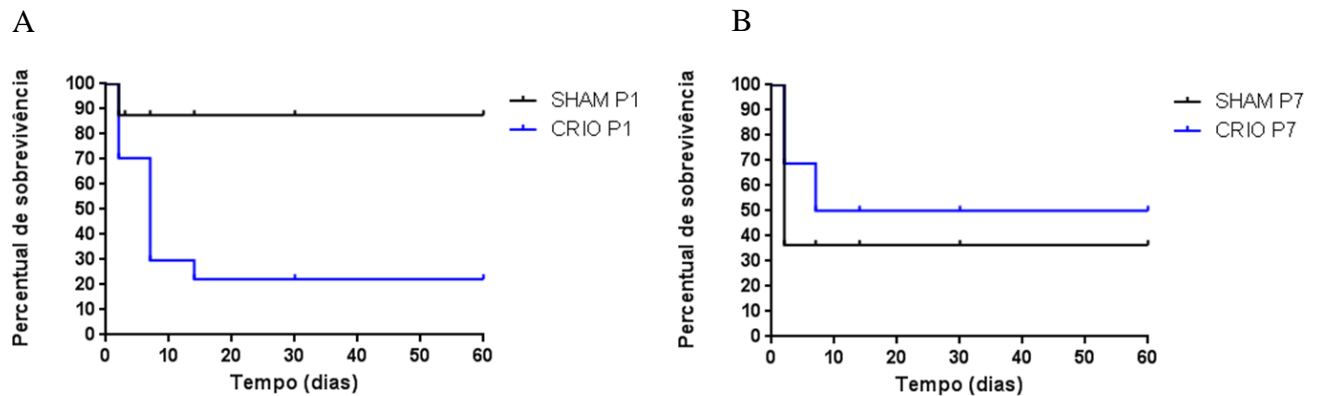
A Figura 14 contém imagens representativas dos materiais utilizados e dos procedimentos realizados para a indução da lesão cardíaca por criolesão. O tempo total necessário para execução de todas as etapas para indução da lesão cardíaca por criolesão

variou de 25 a 35 min, semelhante ao tempo gasto no modelo de ressecção apical (anestesia: 3 a 5 min; procedimento cirúrgico: 7 a 10 min; recuperação da temperatura corporal: 15 a 25 min).



**Figura 14: Imagens representativas do procedimento de indução da lesão cardíaca por criolesão em camundongos P1 e P7.** Materiais utilizados no procedimento cirúrgico (A). Mesa acrílica contendo uma bolsa de gelo coberta por papel interfolha e hastas flexíveis (B). Camundongos P1 e P7 anestesiados por hipotermia (C e N). Animais em decúbito dorsal, com patas e cabeças fixadas com fita crepe (D e O). Incisão da pele e da musculatura intercostal (E, F, P e Q). Exteriorização do coração (G e R). Indução da criolesão e confirmação da lesão pela presença de uma área esbranquiçada (H, I, S e T). O coração é inserido na caixa torácica (J e U). (K, L, V e X) Sutura dos músculo intercostal e da pele (K, L, V e X). Camundongos posicionados na cama aquecida para recuperação da temperatura corporal (M e Y).

A análise da sobrevivência dos animais foi realizada após o procedimento cirúrgico. Como resultado, foi possível observar que 88% dos animais do grupo SHAM P1 (n=8), 22% dos animais grupo CRIO P1 (n=27), 36% dos animais do grupo SHAM P7 (n=11) e 50% dos animais do grupo CRIOP7 (n=16) sobreviveram até o término do período analisado (Figura 15).



**Figura 15: Análise da taxa de sobrevivência dos animais.** Curva de Karplan-Meier demonstrando que (A) 88% dos animais do grupo SHAM P1 (n=8) e 22% dos animais do grupo CRIO P1 (n=27) e (B) 36% dos animais do grupo SHAM P7 (n=11) e 50% dos animais do grupo CRIO P7(n=16) sobreviveram até 60 dias após o procedimento cirúrgico.

### 5.9. Análise da função cardíaca por Ecocardiograma

A análise por ECO também foi realizada para verificar alterações na função cardíaca de camundongos P1 e P7 em resposta à criolesão. As médias e os desvios padrões referentes à FE, DS, FAC, VDF e VSF estão sumarizados nas Tabelas 6 e 7.



**Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P1 após criolesão.**

Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão				
Dias pós-OP	P1			
	30 dias		60 dias	
ECO	SHAM Média ± SD (n=6)	CRIO Média ± SD (n=6)	SHAM Média ± SD (n=6)	CRIO Média ± SD (n=6)
FE (%)	67,40 ± 4,25	57,36 ± 4,83*	59,79 ± 9,42	51,01 ± 3,60*
DS (µL)	32,53 ± 2,50	40,78 ± 8,41	34,43 ± 7,16	37,26 ± 8,51
FAC (%)	55,53 ± 6,95	44,56 ± 6,82	50,20 ± 13,12	42,51 ± 9,13
VSF(µL)	15,98 ± 3,82	30,26 ± 6,44*	23,54 ± 8,67	36,69 ± 12,27*
VDF(µL)	48,51 ± 5,72	71,07 ± 12,95*	57,97 ± 10,41	73,95 ± 20,33

SD = desvio-padrão; FE = fração de ejeção; DS = débito sistólico; FAC - fração de mudança de área; VSF = volume sistólico final; VDF = volume diastólico final. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. (\*) Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo SHAM.

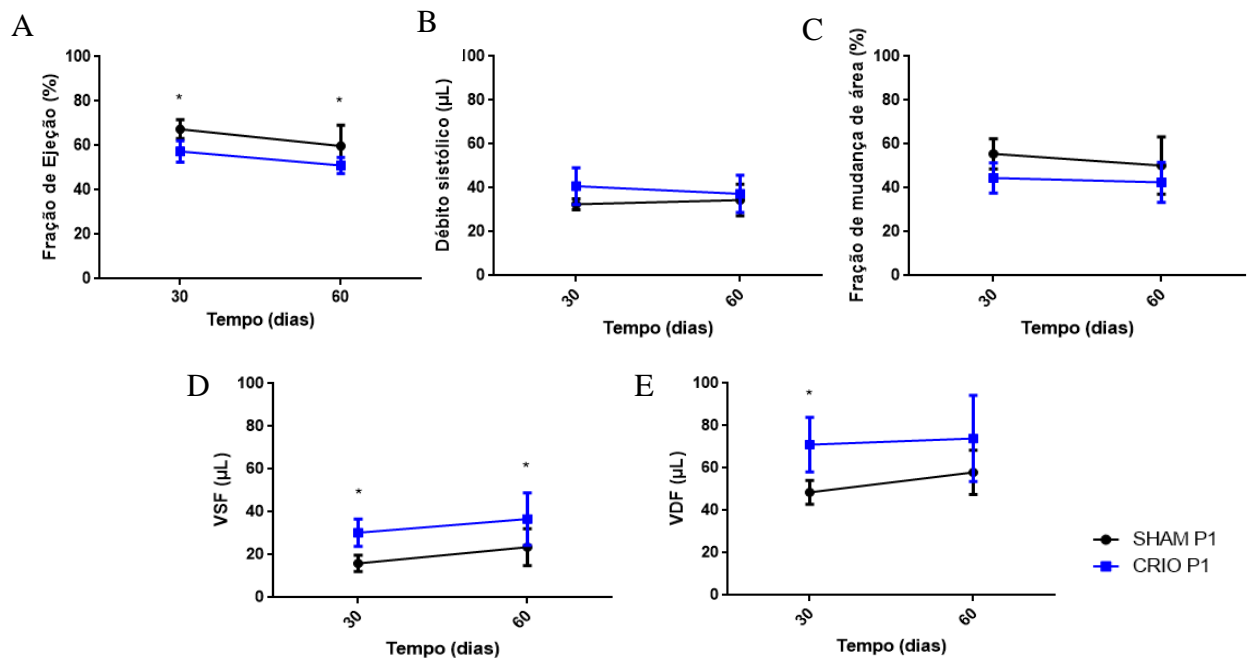
**Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos dos camundongos P7 após criolesão.**

Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão				
Dias pós-OP	P7			
	30 dias		60 dias	
ECO	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=9)	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=9)
FE (%)	69,39 ± 9,96	45,88 ± 12,17***	58,54 ± 3,25	42,26 ± 5,90*
DS (µL)	31,28 ± 4,52	30,78 ± 10,86	36,89 ± 10,63	25,18 ± 3,71
FAC (%)	58,12 ± 16,76	38,83 ± 15,06*	49,53 ± 10,16	33,92 ± 10,04
VSF(µL)	13,85 ± 4,70	35,73 ± 9,23***	26,57 ± 10,15	34,97 ± 7,14
VDF(µL)	45,13 ± 3,13	66,51 ± 14,03*	63,46 ± 20,55	60,15 ± 8,76

SD = desvio-padrão; FE = fração de ejeção; DS = débito sistólico; FAC - fração de mudança de área; VSF = volume sistólico final; VDF = volume diastólico final. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. (\*) e (\*\*\*) Significativamente diferentes em relação ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,001$ ), respectivamente.

Como resultado, foi possível observar redução significativa da FE dos camundongos P1 do grupo CRIO 30 e 60 dias após lesão, quando comparado aos animais do grupo SHAM. Porém os valores encontrados ainda estão na faixa de normalidade ( $FE > 50\%$ ). Além disso, esses animais apresentaram aumento significativo do VSF (30 e 60 dias pós-OP) e do VDF (60 dias pós-OP) quando comparado ao grupo controle. Quanto aos demais parâmetros, não foram observadas diferenças nos tempos analisados (Figura 16).

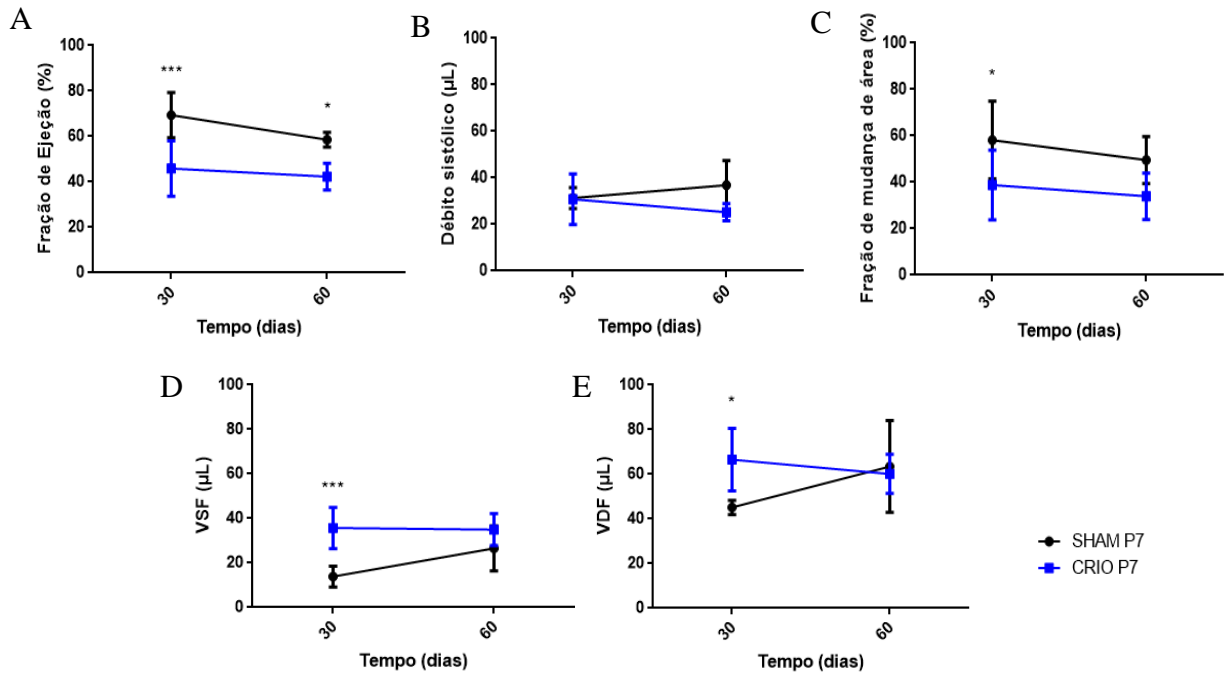
Os camundongos P7 do grupo CRIO também apresentaram redução significativa da FE nos tempos avaliados, quando comparado ao grupo SHAM. No entanto, os valores de FE encontrados foram abaixo de 40%, demonstrando que esses animais apresentaram disfunção cardíaca. Além disso, foi possível observar aumento significativo do VSF, do VDF e da FAC 30 dias após a criolesão (Figura 17).



**Figura 16: Análise da função cardíaca em camundongos P1 30 e 60 dias após a criolesão.** Foi observada redução significativa da fração de ejeção entre os camundongos P1 do grupo RA e grupo SHAM, porém os valores encontrados ainda estão na faixa de normalidade (A). Os animais P1 do grupo RA apresentaram aumento significativo do VSF (D) e VDF (E). No entanto, não foram observadas diferenças no débito sistólico (B) e na fração de mudança de área (C). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações: (\*)  $p < 0,05$ . Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

### 5.10. Análise da atividade elétrica por Eletrocardiograma

A análise por ECO também foi realizada para verificar alterações da atividade elétrica dos corações de camundongos P1 e P7 após 30 e 60 dias após a criolesão. As médias e os desvios padrões desses parâmetros estão sumarizados nas Tabelas 8 e 9.



**Figura 17: Análise da função cardíaca em camundongos P7.** Foi observada redução significativa da fração de ejeção (A) e aumento significativo da FAC (C), VSF (D) e VDF (E) entre os camundongos P1 do grupo RA e grupo SHAM. Não foi observada diferença no débito sistólico (B). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações: (\*)  $p<0,05$ ; (\*\*\*)  $p<0,001$ . Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

**Tabela 8. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P1 após criolesão.**

Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão				
Dias pós-OP	P1			
	30 dias		60 dias	
ECG	SHAM Média $\pm$ SD (n=7)	CRIO Média $\pm$ SD (n=6)	SHAM Média $\pm$ SD (n=7)	CRIO Média $\pm$ SD (n=6)
FC (bpm)	195,86 $\pm$ 21,96	229,79 $\pm$ 52,55	233,95 $\pm$ 51,75	160,83 $\pm$ 31,79**
Duração da Onda P (s)	0,019 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,002
Intervalo RR (s)	0,351 $\pm$ 0,049	0,322 $\pm$ 0,092	0,316 $\pm$ 0,065	0,387 $\pm$ 0,077
Intervalo PR (s)	0,038 $\pm$ 0,003	0,034 $\pm$ 0,003	0,035 $\pm$ 0,004	0,042 $\pm$ 0,004*
Intervalo QRS (s)	0,013 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,003	0,019 $\pm$ 0,006
Intervalo QT (s)	0,044 $\pm$ 0,002	0,046 $\pm$ 0,003	0,045 $\pm$ 0,002	0,048 $\pm$ 0,008
Intervalo QTc (s)	0,077 $\pm$ 0,004	0,087 $\pm$ 0,008	0,086 $\pm$ 0,008	0,078 $\pm$ 0,011

SD = desvio-padrão; FC = frequência cardíaca. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações. (\*) e (\*\*) Significativamente diferentes em relação ao grupo SHAM ( $p<0,05$ ) e ( $p<0,01$ ), respectivamente.

Tabela 9. Parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos P7 após criolesão.

Modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão				
Dias pós-OP	P7			
	30 dias		60 dias	
ECG	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=8)	SHAM Média ± SD (n=4)	CRIO Média ± SD (n=8)
FC (bpm)	202,43 ± 98,56	214,13 ± 43,60	237,32 ± 112,24	180,79 ± 42,34
Duração da Onda P (s)	0,017 ± 0,001	0,019 ± 0,003	0,017 ± 0,00	0,018 ± 0,002
Intervalo RR (s)	0,416 ± 0,055	0,328 ± 0,036	0,327 ± 0,147	0,385 ± 0,055
Intervalo PR (s)	0,042 ± 0,003	0,039 ± 0,004	0,033 ± 0,009	0,038 ± 0,005
Intervalo QRS (s)	0,018 ± 0,004	0,016 ± 0,003	0,017 ± 0,007	0,016 ± 0,004
Intervalo QT (s)	0,049 ± 0,005	0,046 ± 0,003	0,046 ± 0,007	0,045 ± 0,004
Intervalo QTc (s)	0,084 ± 0,020	0,084 ± 0,008	0,089 ± 0,027	0,078 ± 0,013

SD = desvio-padrão; FC = frequência cardíaca. Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações.

Os resultados mostraram redução significativa na frequência cardíaca (FC) e aumento no intervalo PR dos camundongos P1 do grupo quando comparado ao grupo SHAM, apenas 60 dias após a criolesão (Figura 18). Já nos camundongos P7, não foram observadas alterações dos parâmetros analisados (Figura 19).

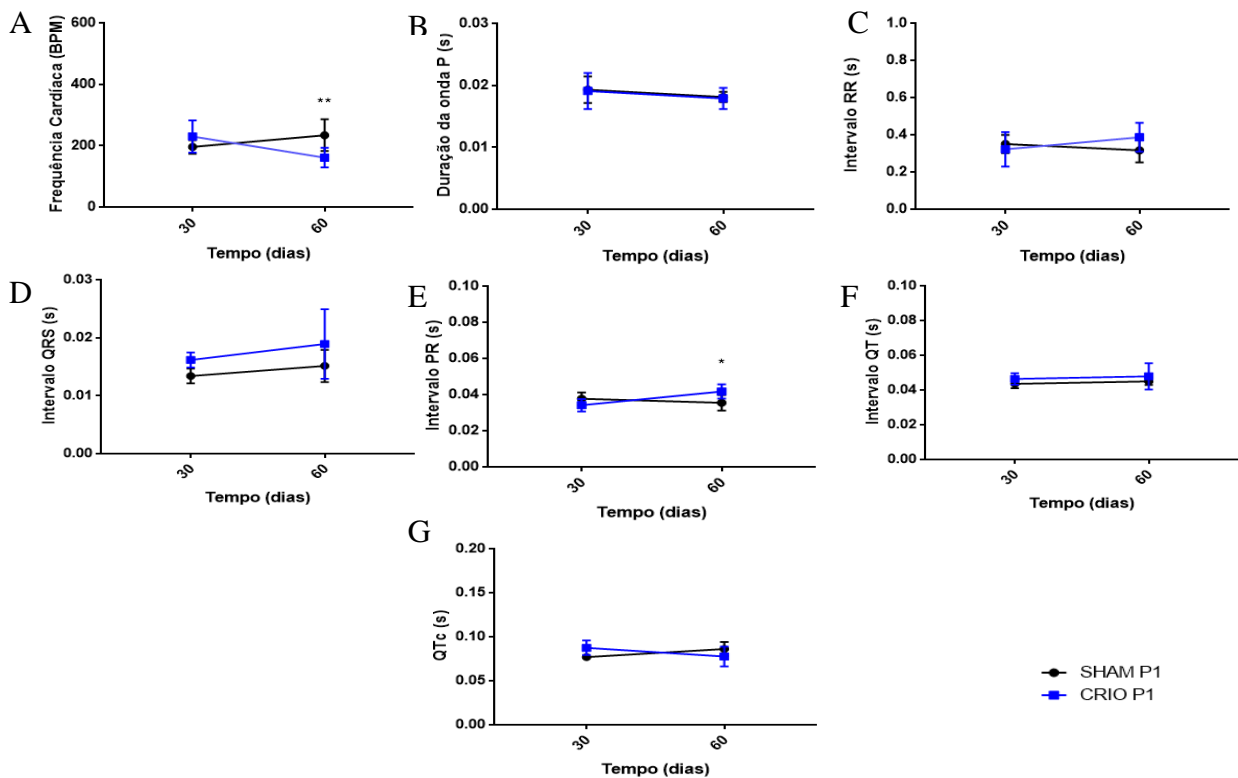
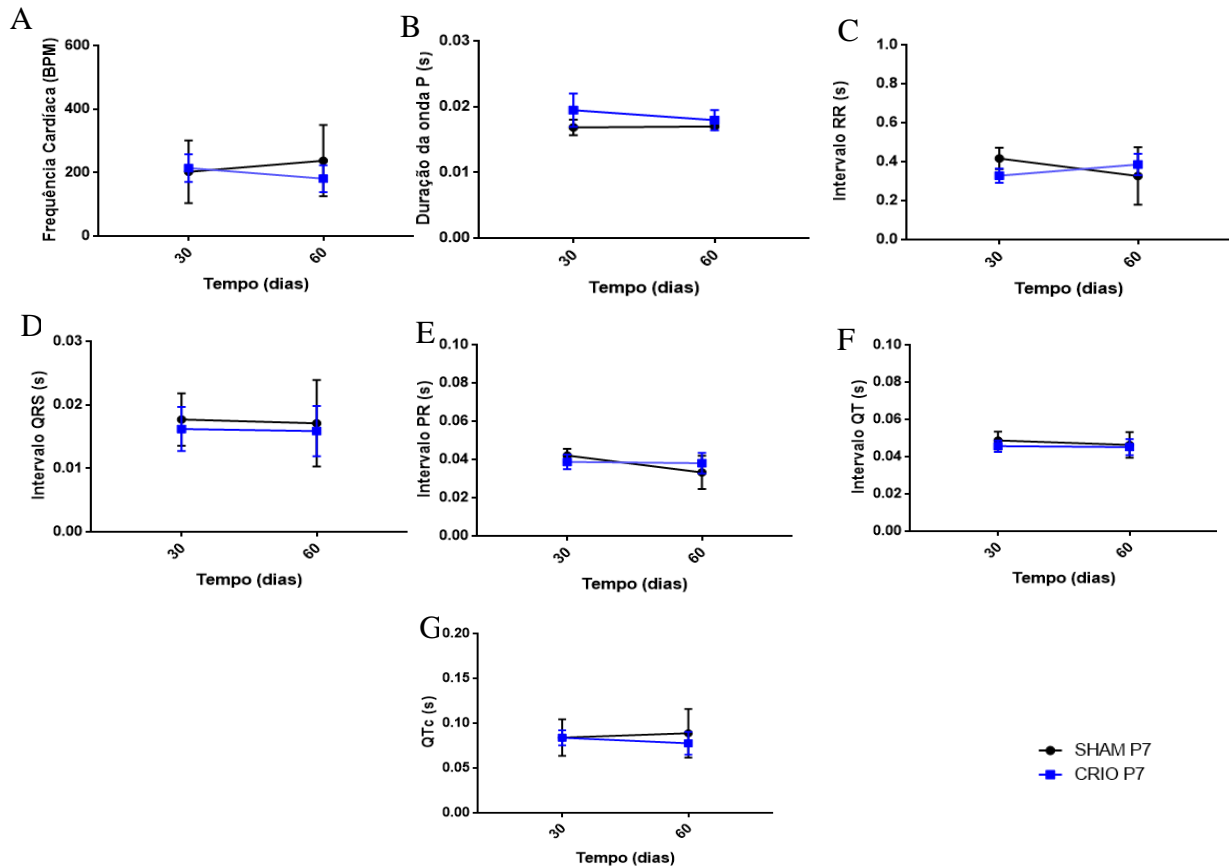


Figura 18: Análise da atividade elétrica do coração de camundongos P1 30 e 60 dias após a criolesão. Foi observada redução significativa da frequência cardíaca (A) e aumento significativo do intervalo PR (E) apenas 60 dias após a lesão. Não foram observadas alterações na duração da onda P (B) e nos intervalos RR (C), QRS (D), QT (F) e QTc (G). Teste *two way* ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ .



**Figura 19:** Análise da atividade elétrica do coração dos camundongos P7 30 e 60 dias após a criolesão. Não foram observadas alterações na frequência cardíaca (A), na duração da onda P (B) e nos intervalos RR (C), QRS (D), PR (E), QT (F) e QTc (G). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni múltiplas comparações.

## 5.11. Análises histológicas

### 5.11.1. Quantificação das fibras colágenas

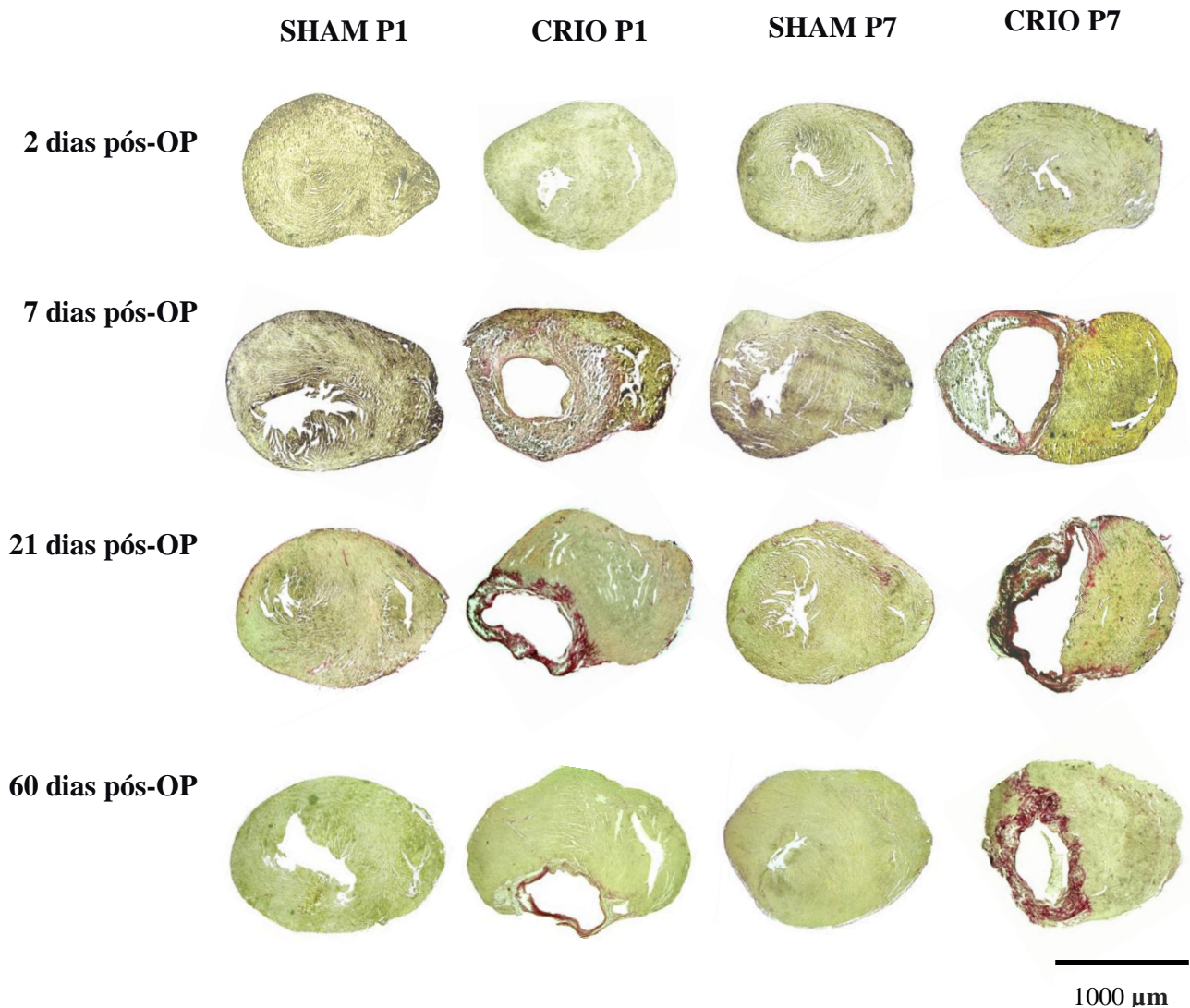
A coloração tecidual por picrosirius também foi realizada após a criolesão, a fim de verificar a presença de cicatriz fibrótica na área lesionada (Figura 20). As médias e os desvios padrões referente ao percentual de fibras de colágenos estão sumarizados na Tabela 10.

Como resultado, foi possível observar aumento significativo do percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 21 e 60 dias após a lesão e no coração dos camundongos P7 7, 21 e 60 dias após a criolesão, quando comparado aos animais do grupo SHAM (Figura 21).

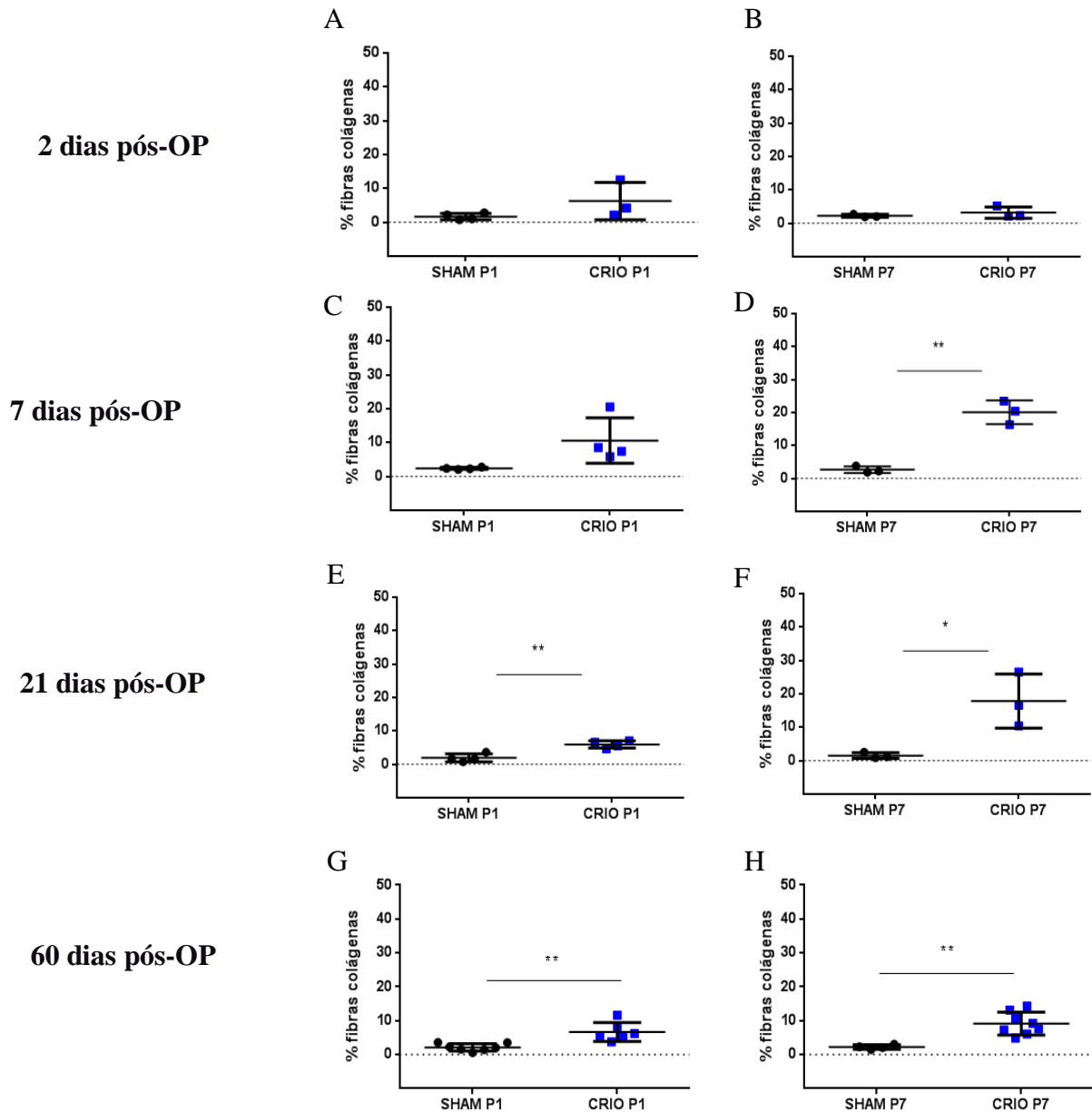
**Tabela 10. Percentual de fibras colágenas no coração dos camundongos P1 e P7 após criolesão**

Fibras Colágenas				
Dias pós-OP	P1		P7	
	SHAM Média ± SD	CRIO Média ± SD	SHAM Média ± SD	CRIO Média ± SD
2 dias	1,682 ± 0,9393 (n=4)	6,282 ± 5,512 (n=3)	2,238 ± 0,4269 (n=3)	3,216 ± 1,680 (n=3)
7 dias	2,375 ± 0,2862 (n=4)	9,160 ± 3,936 (n=4)	2,660 ± 1,033 (n=3)	20,07 ± 3,590** (n=3)
21 dias	1,929 ± 1,209 (n=4)	5,945 ± 1,056** (n=4)	1,539 ± 0,8659 (n=3)	17,84 ± 8,117* (n=3)
60 dias	2,139 ± 1,097 (n=7)	6,688 ± 2,760** (n=6)	2,238 ± 0,6687 (n=4)	9,151 ± 3,354** (n=8)

SD = desvio-padrão. Teste t de *Student* não-pareado. (\*) e (\*\*) Significativamente diferentes em relação ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ), respectivamente.



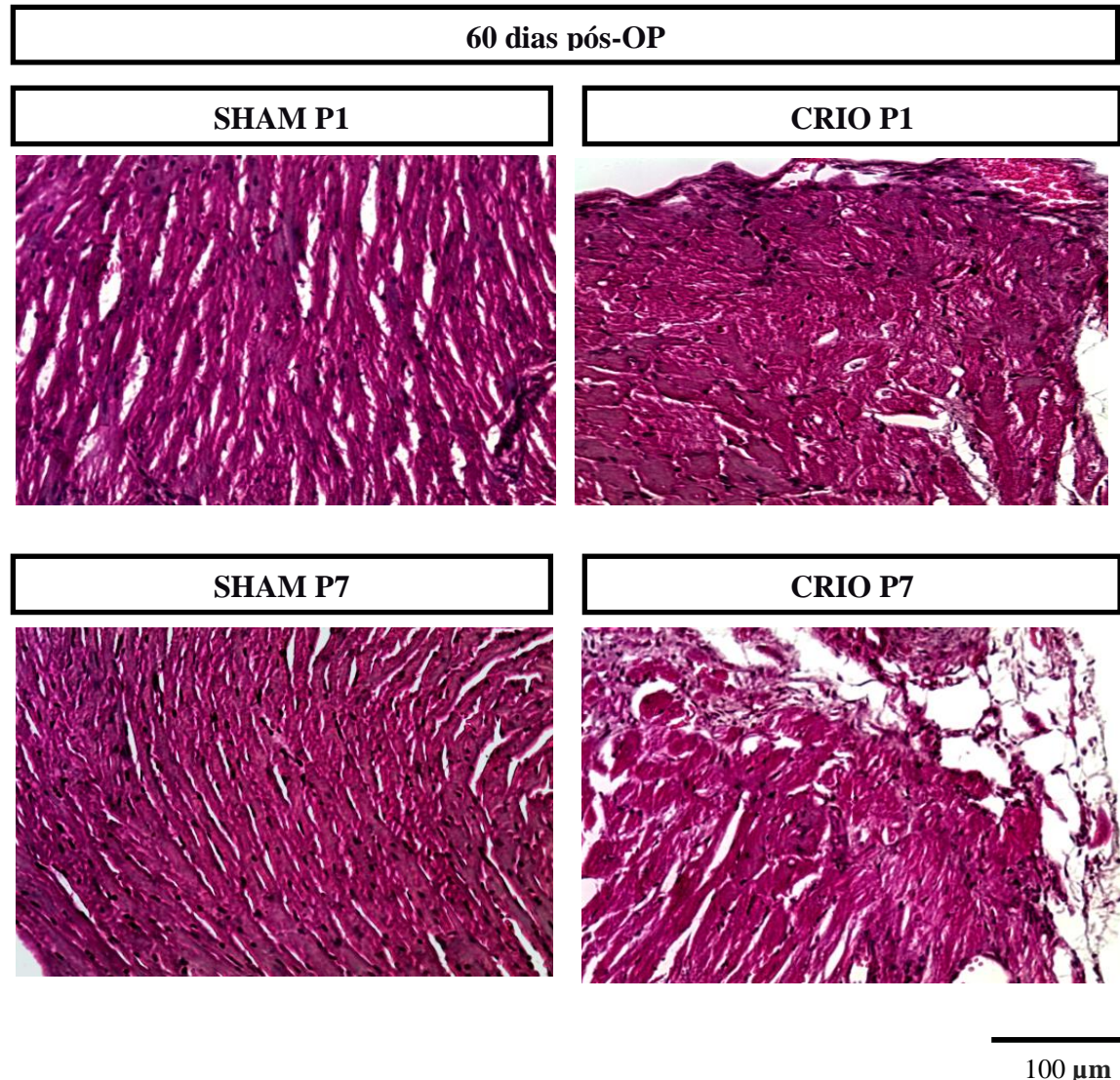
**Figura 20: Coloração por picrosirius após criolesão.** Imagens representativas de cortes histológicos dos corações dos camundongos P1 e P7 dos grupos CRIO e SHAM, 2, 7, 21 e 60 dias pós-operatório (pós-OP). A região amarelada corresponde ao tecido viável e a região rosa à avermelhada corresponde à deposição de colágeno. Aumento 4X.



**Figura 21: Quantificação de fibras de colágenos em camundongos P1 e P7 após a criolesão.** Foi observado aumento significativo do percentual de fibras colágenas no coração dos animais P1 21 e 60 dias pós-operatório (pós-OP) (E e G) e no coração dos animais P7 7, 21 e 60 dias pós-OP (F) do grupo RA, quando comparado aos camundongos do grupo SHAM. Não foi observada diferença desse parâmetro nas demais condições analisadas (A, B, D, E e H). Teste t de Student não-pareado: (\*)  $p < 0,05$ . Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

### 5.12. Análise morfológica

A coloração do tecido cardíaco por HE também foi realizada a fim de avaliar alterações morfológicas em resposta à criolesão. Como resultado, as imagens revelaram a presença de tecido de granulação e de fibras musculares e núcleos desorganizados no coração dos camundongos P7 após a criolesão (Figura 22).



**Figura 22: Análise morfológica após criolesão.** Imagens representativas de cortes histológicos dos corações dos camundongos P1 e P7 dos grupos CRIO e SHAM, corados com HE, 60 dias após a lesão por ressecção apical. Aumento de 40X.

## 6. DISCUSSÃO

Os modelos de lesão cardíaca induzida por ressecção apical e criolesão tem sido amplamente utilizados a fim de compreender melhor os processos envolvidos na regeneração cardíaca em mamíferos (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013; POLIZZOTTI *et al.*, 2016 DAREHZERESHKI *et al.*, 2015).



Porrello e colaboradores demonstraram que os corações de camundongos da linhagem ICR/CD-1 com 1 dia de vida apresentam capacidade regenerativa, a qual é perdida 7 dias após o nascimento (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013). Outros pesquisadores também avaliaram o potencial regenerativo do coração de camundongos de outras linhagens. No entanto, os resultados foram controversos (ANDERSEN *et al.*, 2014; BRYANT *et al.*, 2015; DAREHZERESHKI *et al.*, 2015; POLIZZOTTI *et al.*, 2015; MIZUTANI *et al.*, 2016).

Diante desse cenário, o desenvolvimento de modelos robustos para avaliar os mecanismos que estão por trás dessa "janela privilegiada" para regeneração que cerca o desenvolvimento dos mamíferos e melhorar o nosso conhecimento nessa área foi a grande motivação deste trabalho.

No presente estudo, estabelecemos os modelos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão em camundongos com 1 e 7 dias de vida.

Após intensa busca na literatura, os protocolos escolhidos para o desenvolvimento desse trabalho foram "*Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice*" (MAHMOUD *et al.*, 2014) e "*A cryoinjury model in neonatal mice for cardiac translational and regeneration research*" (POLIZZOTTI *et al.*, 2015), onde encontramos a compilação de técnicas utilizadas com resultados comprovados por diferentes grupos e aperfeiçoamento de algumas etapas que representaram grandes desafios para outros grupos de pesquisa (STRUNGS *et al.*, 2013; ANDERSEN *et al.*, 2014; BRYANT *et al.*, 2015; DAREHZERESHKI *et al.*, 2015).

Embora descritos por diferentes grupos, os modelos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão não tinham sido ainda estabelecidos no IBCCF. As adaptações realizadas ao longo desse processo foram baseadas na experiência prévia que adquiri durante a elaboração da minha monografia na graduação ("*Avaliação morfo-funcional do infarto do miocárdio em ratos Wistar*") e em pesquisas bibliográficas.

Em virtude dos resultados controversos observados nos estudos de regeneração cardíaca, optamos pela elaboração das documentações impressa (POP) e em vídeo, a fim de minimizar a ocorrência de desvios na execução de etapas fundamentais do procedimento cirúrgico. O POP foi elaborado seguindo um modelo já utilizado no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular. Para a documentação em vídeo, utilizamos como base nos vídeos publicados na literatura (CHABLAIS & JAZWINSKA, 2012; XIONG & HOU, 2016). Preocupados em garantir o entendimento por pesquisadores de posse desse material, adicionamos às imagens uma legenda simples e objetiva.

Para indução da lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão, os camundongos P1 e P7 precisavam ser anestesiados. Diferente do que foi observado em camundongos P1, os

animais P7 apresentaram resistência à anestesia induzida por hipotermia quando colocados sobre o gelo comum - material que foi descrito nos protocolos que utilizamos como base (MAHMOUD *et al.*, 2014; POLIZZOTTI *et al.*, 2015). Para resolver esse problema, utilizamos uma bolsa de gelo em gel. Após, observamos que o tempo total necessário para execução de todas as etapas variou de 25 a 35 min. Essa faixa temporal foi semelhante ao que foi observada pelos grupos de Mahmoud e Polizzotti (MAHMOUD *et al.*, 2014; POLIZZOTTI *et al.*, 2015). Assim, os protocolos foram reproduzidos dentro do tempo esperado. A análise da sobrevivência revelou que, 60 dias após o procedimento cirúrgico, 42% dos animais do grupo RA P1 e 12% dos animais do grupo no grupo RA P7 sobreviveram. Com relação aos animais submetidos a criolesão, 22% dos animais do grupo CRIO P1 e 50% dos animais do grupo CRIO P7 sobreviveram. Já os animais do grupo SHAM, 88% no grupo SHAM P1 e 36% no grupo SHAM P7 sobreviveram. De acordo com a literatura, a sobrevivência após 24 horas do procedimento é de 70% a 90%, entretanto a canibalização reduz para 60% a 70% (MAHMOUD *et al.*, 2014; PORRELLO *et al.*, 2011). Segundo Mahmoud e colaboradores, alguns fatores podem influenciar diretamente na sobrevivência tais como: quantidade de tecido ressecionado, canibalização da mãe e variação da temperatura antes e após a cirurgia (MAHMOUD *et al.*, 2014).

Em seguida, para caracterização dos modelos, inicialmente avaliamos a função cardíaca dos camundongos P1 e P7 30 e 60 dias após a lesão.

No grupo RA, nossos resultados demonstraram que a função cardíaca dos camundongos P1 foi preservada (Figura 6). Os mesmos resultados foram observados por Porrello e colaboradores, 60 dias após o corte de 15% do ápice do coração de camundongos P1 (PORRELLO *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram também observados por esse grupo 21 dias após a indução do IM por LDA (PORRELLO *et al.*, 2013). Assim, esses resultados sugerem que os corações de camundongos P1 do grupo RA mantêm a capacidade regenerativa, de modo a restaurar a função cardíaca.

Já os camundongos P7 apresentaram redução significativa da FE 30 e 60 dias após a ressecção apical (Figura 7). Esses resultados foram semelhantes aos dados publicados por Porrello e colaboradores (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013). Portanto, a disfunção cardíaca observada nesses animais sugerem que os corações dos camundongos P7 do grupo RA não regeneraram.

No grupo CRIO, camundongos P1 apresentaram redução significativa da FE 30 e 60 dias após a criolesão. Porém, observamos que os valores encontrados ainda estão na faixa de normalidade (FE>50%) (Figura 14). Darehzereshki e colaboradores demonstraram disfunção

sistólica nos animais P1 após a indução de lesões transmuralis, aplicando uma sonda de 2 mm de diâmetro sobre o coração durante 5 s. No entanto, esses pesquisadores não observaram alteração da função cardíaca quando a sonda foi aplicada durante 1s (lesão não-transmural) (DAREHZERESHKI *et al.*, 2015). Já Polizzotti e colaboradores, utilizando sondas de tamanho diferente (0,5 e 1,5 mm) e aplicando-as durante 1 s, observaram disfunção cardíaca apenas quando a sonda maior foi utilizada (POLIZZOTTI *et al.*, 2015; POLIZZOTTI *et al.*, 2016). No presente trabalho, utilizamos uma sonda de 1 mm aplicada sobre o coração durante 10 s. Portanto, nossos resultados sugerem que o tamanho da lesão produzido influenciou negativamente a regeneração dos corações desses animais.

Já os camundongos P7 apresentaram redução significativa da FE (~ 40%), bem como alteração de outros parâmetros ecocardiográficos (FAC, VSF e VDF) (Figura 15). Esses resultados foram semelhantes aos dados publicados em camundongos e ratos (VAN DEN BOS *et al.*, 2005; CIULLA *et al.*, 2004). Portanto, a disfunção cardíaca observada nesses animais sugerem que os corações dos camundongos P7 do grupo CRIO não regeneraram.

Considerado um exame complementar importante de diagnóstico na clínica para identificar lesões miocárdicas, realizamos também as análises por ECG. Até o momento, nosso trabalho é o único da literatura que avaliou a atividade elétrica do coração de camundongos neonatos após lesão cardíaca por ressecção apical.

Com relação ao grupo RA, nossos resultados demonstraram redução significativa dos intervalos QT e QTc dos camundongos P1 apenas 60 dias após a ressecção apical (Figura 8). Já os animais P1 do grupo CRIO apresentaram redução significativa da FC e aumento do intervalo PR (Figura 16). No entanto, não foram observadas alterações dos parâmetros eletrocardiográficos nos camundongos P7 de ambos os grupos (Figura 9 e 17). Diante desses resultados, uma análise mais aprofundada deve ser realizada para tentar compreender as alterações observadas no ECG dos animais P1.

Em seguida, realizamos análises histológicas 2, 7, 21 e 60 dias após ressecção apical e criolesão para quantificação de fibras colágenas e identificação de alterações morfológicas.

No grupo RA, nossos resultados demonstraram aumento significativo do percentual de fibras colágenas nos corações dos camundongos P1 7 e 60 dias pós-OP (Figura 11) e nos corações dos camundongos P7 21 dias pós-OP. Porrello e colaboradores também observaram a presença de fibras colágenas no coração de camundongos P1 7 dias após a ressecção apical. O mesmo resultado foi observado em camundongos P1 após a indução do IM por LDA. Entretanto, os pesquisadores não observaram tecido cicatricial a partir do 21º dia após a lesão,

diferente do que foi observado nesse trabalho (PORRELLO *et al.*, 2011; PORRELLO *et al.*, 2013).

Com relação a análise morfológica, a coloração por HE revelou a presença de tecido de granulação e de fibras musculares e núcleos desorganizados apenas no coração dos camundongos P7 (Figura 12), semelhante ao que foi observado na literatura (PORELLO *et al.*, 2011).

No grupo CRIO, nossos resultados demonstraram aumento significativo do percentual de fibras colágenas no coração de camundongos P1 21 e 60 dias pós-OP e no coração dos camundongos P7 7, 21 e 60 dias pós-OP (Figura 19). Darehzereshki e colaboradores também observaram tecido fibrótico 21, 60 e 120 dias após a criolesão em camundongos P1. Além disso, após análise morfométrica, o grupo relatou que a quantidade de tecido fibrótico encontrada no coração dos camundongos neonatos após a criolesão é semelhante à observada em camundongo adulto após o infarto do miocárdio experimental (DAREHZERESHKI *et al.*, 2015). Outros pesquisadores também relataram presença de fibrose 7, 30 dias e até 7 meses após a criolesão induzida por sonda metálica de 1,5 mm (POLIZZOTTI *et al.*, 2016).

No presente trabalho, o percentual de fibrose observado no coração dos camundongos P7 foi semelhante ao valor observado pelo grupo de Van den Bos em camundongos adultos, após a produção de lesão transmural induzida pela criolesão (VAN DEN BOS *et al.*, 2005). Ademais, nós observamos afinamento da parede ventricular após a criolesão. Esses resultados corroboram os dados publicados na literatura (CIULLA *et al.*, 2004; POLIZZOTTI *et al.*, 2016). O afinamento é consequência do deslizamento das miofibrilas realinhando os miócitos - característica observada no remodelamento cardíaco (ZORNOFF; SPADARO, 1997).

Por fim, com relação a análise morfológica, a coloração por HE revelou a presença de tecido de granulação e fibras cardíacas e núcleos desorganizados na área de borda da lesão (Figura 20). Os mesmos resultados foram observados pelo grupo do Strungs (STRUNGS *et al.*, 2013).

Em suma, acreditamos que os protocolos de lesão cardíaca por ressecção apical e criolesão desenvolvidos nesse trabalho contribuem para utilização futura em inúmeros projetos que visam compreender os mecanismos de regeneração cardíaca que ainda não foram elucidados.

## 7. CONCLUSÃO

• As documentações impressa e em vídeo, de ambos os modelos, foram elaboradas com sucesso e os protocolos foram padronizados.

• A função cardíaca dos camundongos em P1 do grupo RA foi preservada.

• Os camundongos em P1 do grupo CRIO apresentaram alterações na função cardíaca, sugerindo que o tamanho da lesão influenciou negativamente a regeneração dos corações desses animais.

• A função cardíaca dos camundongos em P7 do grupo RA e CRIO se mostrou prejudicada.

Portanto, ambos os modelos foram estabelecidos poderão ser utilizados por alunos e pesquisadores do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro – e demais instituições de ensino e pesquisa.

## 8. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D.C.; JENSEN, C.H.; BAUN, C.; HYDSTEN, S.; ZEBROWSKI, D.C.; ENGEL, F.B.; SHEIKH, S.P. Persistent scarring and dilated cardiomyopathy suggest incomplete regeneration of the apex resected neonatal mouse myocardium- A 180 days follow up study. **J Mol Cell Cardiol.** 90;47-52. 2016.

ANDERSEN, D.C.; GANESALINGAM, S.; JENSEN, C.H.; SHEIKH, S.P. Do neonatal mouse hearts regenerate following heart apex resection? **Stem Cell Reports.** v.2. p.406-413.2014.

BELTRAMI, A.P.; URBANEK, K.; KAJSTURA, J.; YAN, S.-M.; FINATO, N.; BUSSANI, R.; NADAL-GINARD, B.; SILVESTRI, F.; LERI, A.; BELTRAMI, C.A.; ANVERSA, P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **N Engl J Med.** v.344. p.1750–1757.2001.

BERGMANN, O.; BHARDWAJ, R.D.; BERNARD, S.; ZDUNEK, S.; BARNABÉ-HEIDER, F.; WALSH, S.; ZUPICICH, J.; ALKASS, K.; BUCHHOLZ, B.A.; DRUID, H.; JOVINGE, S.; FRISÉN, J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science.** v.324(5923). p.98–102.2009.

BRYANT, D.M.; O'MEARA, C.C.; HO, N.N.; GANNON, J.; CAI, L.; LEE, R.T. A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection. **J Mol Cell Cardiol.** v.79. p.315–318.2015.

CARVALHO, A.B.; CARVALHO, A.C.C. Heart regeneration: Past, present and future. **World J Cardiol.** v.2(5). p.107–111.2010.

CHABLAIS, F., JAŻWIŃSKA, A. Induction of Myocardial Infarction in Adult Zebrafish Using Cryoinjury. **J. Vis. Exp.**(62), e3666, doi:10.3791/3666. 2012.

CHOI, W.-Y.; POSS, K.D. Cardiac Regeneration. **Curr Top Dev Biol.** Jul 100:319-344.2012.

CIULLA, M.M.; PALIOTTI, R.; FERRERO, S.; BRAIDOTTI, P.; ESPOSITO, A.; GIANELLI, U.; CIOFFI, U.; BULFAMANTE, G.; MAGRINI, F. Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats. **J Surg Res.** 116: 91–97, 2004.

DAREHZERESHKI, A.; RUBIN, N.; GAMBA, L.; KIM, J.; FRASER, J.; HUANG, Y.; BILLINGS, J.; MOHAMMADZADEH, R.; WOOD, J.; WARBURTON, D.; KAARTINEN, V.; LIEN, C.-L. Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury. **Dev Biol.** v.399. p.91-99.2015.

DRENCKHAHN, J.-D.; SCHWARZ, Q.P.; GRAY, S.; LASKOWSKI, A.; KIRIAZIS, H.; MING, Z.; HARVEY, R.P.; DU, X.-J.; THORBURN, D.R.; COX, T.C. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. **Dev Cell.** v.15. p.521–533.2008.

FERNANDES, M.R.; PERIN, E.C. Regeneração Cardíaca. Coração: um Órgão Pós-Mitótico?. **Rev Bras Cardiol Invas.** v.15(1). p.61-69.2007.

FLINK, I.L. Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum*: confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled nuclei. **Anat Embryol (Berl).** Jun;205(3):235-44.2002

GONZÁLEZ-ROSA, J.M; MERCADER, N. Cryoinjury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish. **Nat Protoc.** v.7. n.4. p.782-788.2012.

HOLMES, J.W.; BORG, T.K.; COVELL, J.W. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. **Annu Rev Biomed Eng.** v.7. p.223-53.2005.

JOPLING, C; SLEEP, E; RAYA, M; MARTÍ, M; RAYA, A; BELMONTE, J.C.I. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. **Nature.** v.464/25. p.606-611.2010.

KAJSTURA, J.; LERI, A.; FINATO, N.; DI LORETO, C.; BELTRAMI, C.A.; ANVERSA, P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95:8801–8805.1998.

KARSNER, H.T; SAPHIR, O; TODD, TW. The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy. **Am J Pathol.** v.1. p.351–372.1925.

LAFLAMME, M.A.; MURRY, C.E. Regenerating the heart. **Nat Biotechnol.** 23:845–856.2005.

LIAO, S.; DONG, W.; LV, L.; GUO, H.; YANG, J.; ZHAO, H.; HUANG, R.; YUAN, Z.; CHEN, Y.; FENG, S.; ZENG, X.; HUANG, J.; HUANG, W.; QI, X.; CAI, D. Regeneração do coração em adultos de *Xenopus tropicalis* após ressecção apical. **Cell Biosci.** Dez s13578-017-0199-6.2017.

MAHMOUD, A.I; PORRELLO, E. R.; KIMURA, W.; OLSON, E.N.; SADEK, H.A. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. **Nat Protoc.** Feb; 9(2): 305–311.2014.

MIZUTANI, M.; WU, J.C.; NUSSE, R. Fibrosis of the neonatal mouse heart after cryoinjury is accompanied by Wnt signaling activation and epicardial-to-mesenchymal transition. **J Am Heart Assoc.**2016.

PHIFER, C.B.; TERRY, L.M. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. **Physiol Behav.** 38:887–890.1986.

POLIZZOTTI, B.D.; et al. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. **Sci Transl Med.** 7:281ra245.2015.

POLIZZOTTI, B.D.; GANAPATHY, B.; HAUBNER, B.J.; PENNINGER, J.M.; KUHN, B. A cryoinjury model in neonatal mice for cardiac translational and regeneration research. **Nat Protoc.** v.11. p.542-552.2016.

PONTES, M.R.N; LEÃES, P.E. Remodelamento Ventricular: dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. **Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul.** n.03. p.1-7.2004.

PORRELLO, E.R; MAHMOUD, A.I; SIMPSON, E; HILL, J.A; RICHARDSON, J.A; OLSON, E.N; SADEK, H.A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. **Science.** v.331. p.1078-1080.2011.

PORRELLO, E.R; MAHMOUD, A.I; SIMPSON, E; JOHNSON, B.A.; GRINSFELDER, D.; CANSECO, D.; MAMMEN, P.P; ROTHERMEL, B.A.; OLSON, E.N.; SADEK, H.A. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad USA.* Jan 2; 110(1): 187-192. 2013.

PORRELLO, E.R; OLSON, E.N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. **Stem Cell Res.** v.13. p.556-570.2014.

POSS, K.D; WILSON, L.G; KEATING, M, T. Heart regeneration in zebrafish. **Science.** v.298. p.2188-2190.2002.

RUMYANTSEV, P.P. Post-injury DNA synthesis, mitosis and ultrastructural reorganization of adult frog cardiac myocytes. An electron microscopic-autoradiographic study. **Z Zellforsch Mikrosk Anat.** May 23;139(3):431-50.1973.

SANTORO, F.; SAHARA, M. A specified therapeutic window for neuregulin-1 to regenerate neonatal heart muscle. **Ann Transl Med.** Oct; 3(17):249.2015

SENYO, S.E; STEINHAUSER, M.L; PIZZIMENTI, C.L; YANG, V.K; CAI, L; WANG, M; WU, T-D; GUERQUIN-KERN, J-L; LECHENE, C.P; LEE, R.T. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. **Nature.** v. 493. p.433-437.2013.

SOONPAA, M.H.; KIM, K.K.; PAJAK, L.; FRANKLIN, M.; FIELD, L.J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. **Am J Physiol.** 271:H2183-H2189.1996.

SOONPAA, M.H; FIELD, L.J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. **Am J Physiol.** v.272. p.H220-H226.1997.

SOONPAA, M.H; FIELD, L.J. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. **Circ Res.** v.83.p.15-26.1998.

STRUNGS, E.G.; ONGSTAD, E.L.; O'QUINN, M.P.; PALATINUS, J.A.; JOURDAN, J.; GOURDIE, R.G. Cryoinjury Models of the Adult and Neonatal Mouse Heart for Studies of Scarring and Regeneration. **Methods in Molecular Biology.** Sep. vol. 1037. 2013.



TALMAN, V.; RUSKOAHO, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. **Cell Tissue Res.** Sep; 365(3):563-81. 2016.

VAN AMERONGEN, M.J.;HARMSSEN, M.C.; PETERSEN, A.H. ; POPA, E.R. VAN LUYN, M. J.A. Cryoinjury: a model of myocardial regeneration. **Cardiovascular Pathology.** 17 (2008) 23– 31.

VAN DEN BOS, E.J.; MEES, B.M.E.; de WAARD, M.C.; de CROM, R.; DUNCKER, D.J. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.289. p.H1291–H1300.2005.

WITMAN, N.; MURTUZA, B.; DAVIS, B.; ARNER, A.; MORRISON, J.I. Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. **Dev Biol.** Jun 1;354(1):67-76.2011.

XIN, M.; OLSON, E.N.;BASSEL-DUBY, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. **Nat Rev Mol Cell Biol.** Aug; 14(8): 529–541. 2013.

XIONG, J.; HOU, J. Apical Resection Mouse Model to Study Early Mammalian Heart Regeneration. **J Vis Exp.** Jan 23;(107):e53488. 2016.

ZAK, R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. **Circ Res.** 35:17–26.1974.

ZORNOFF, L.A.M; SPADARO, J. Remodelação Ventricular após Infarto Agudo do Miocárdio. Conceitos, Fisiopatologia e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Cardiol.** v. 68, n. 6, p. 453-460. abr. 1997.

## 9. ANEXOS

### Anexo I - Certificado de aprovação do projeto pelo comitê de ética.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Saúde - CCS**

Rio de Janeiro, 02 de outubro de 2017

Prezada Professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Avaliação morfo-funcional do modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão em camundongos neonatos e adultos.”**, protocolo nº **A24/17-015-17**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº8.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **27/09/2017**.

<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência do Projeto</b>	<b>Até 10/04/2018</b>
<b>Espécie/linhagem</b>	<b><i>Mus musculus/ Balb/c</i></b>
<b>Nº de animais</b>	<b>175 animais</b>
<b>Peso/idade</b>	<b>1-40g / 0-4 meses</b>
<b>Sexo</b>	<b>Machos e fêmeas</b>
<b>Origem</b>	<b>Biotério Multiusuário de Pequenos Roedores - CCS- bloco G - 2º andar - sala 48 - UFRJ</b>

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

## **Anexo II - POP do modelo de lesão cardíaca por ressecção apical**

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: <u>3</u>
		PÁGINA: 1 /9

## ÍNDICE

1. OBJETIVO .....	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....	1
3. RESPONSABILIDADES.....	1
4. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA .....	1
5. DEFINIÇÕES .....	2
6. PROCEDIMENTOS.....	2
6.1. Recomendações de segurança .....	2
6.2. Materiais e equipamentos utilizados.....	2
6.3. Experimento.....	4

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: <u>3</u>
		PÁGINA: 1 / 9

## 1. OBJETIVO

Descrever o procedimento necessário para a realização do modelo de lesão cardíaca induzida por ressecção apical em camundongos neonatos com 1 e 7 dias de idade (P1 e P7, respectivamente).

## 2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Esse procedimento, desenvolvido no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular (LCCM), aplica-se aos alunos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e demais Instituições de Ensino e Pesquisa que objetivam estudar o processo de regeneração cardíaca.

## 3. RESPONSABILIDADES

### - Experimentadores

- Submeter à Comissão de Ética do Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) o projeto ou piloto antes de iniciar qualquer experimento com manipulação animal.
- Separar os materiais e equipamentos necessários (tópico 6.2) para a realização da cirurgia, bem como verificar a disponibilidade de uso da sala cirúrgica.
- Garantir que o material cirúrgico esteja em condições de uso.
- Verificar, juntamente com os bioteristas, a data de nascimento dos camundongos.
- Garantir que a cama aquecida (*T/Pump professional*) funcione em condições adequadas de temperatura (36,5 °C - 38 °C).
- Após a realização da cirurgia, garantir: (1) a lavagem do material cirúrgico; (2) o desligamento e a limpeza da cama aquecida e (3) o armazenamento dos materiais e equipamentos utilizados.

### - Coordenadora do laboratório

- Verificar, com o aluno, a aprovação do projeto ou piloto junto ao CEUA.
- Conferir, com o aluno, a disponibilidade dos materiais antes de iniciar o procedimento cirúrgico.

## 4. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: <u>3</u>
		PÁGINA: 1 / 9

A antissepsia das mãos e o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) são medidas preventivas simples contra zoonoses - doenças infecciosas transmitidas de animais para humanos (ANDRADE, A, 2012). Para a realização do procedimento descrito neste documento, os EPIs recomendados são: óculos, máscara, touca, luva, calçado fechado e jaleco.

#### Referências Bibliográficas:

ANDRADE, A. Biossegurança em biotérios [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 381-387. Acesso em: 16/09/2018. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-47.pdf>

## 5. DEFINIÇÕES

O modelo de lesão cardíaca por ressecção apical, inicialmente desenvolvido em peixe-zebra (POSS *et al*, 2002), foi aplicado a camundongos neonatos (PORRELLO *et al*, 2011). Este modelo consiste na remoção de 15% do ápice do ventrículo esquerdo do coração de camundongos neonatos e tem sido amplamente utilizado no estudo do processo de regeneração cardíaca.

#### Referências Bibliográficas:

POSS, K.D; WILSON, L.G; KEATING, M, T. Heart regeneration in zebrafish. **Science**. v.298. p.2188-2190.2002.

PORRELLO, E.R; MAHMOUD, A.I; SIMPSON, E; HILL, J.A; RICHARDSON, J.A; OLSON, E.N; SADEK, H.A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. **Science**. v.331. p.1078-1080.2011.

## 6. PROCEDIMENTOS

### 6.1. Recomendações de segurança

É recomendável, aos experimentadores, o uso de EPIs durante todo o procedimento cirúrgico e durante manuseio dos animais no biotério.

### 6.2. Materiais e equipamentos utilizados

- EPIs para o experimentador.
- Recipiente com gelo.
- Pedacos de gaze.

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 / 9

- Bolsa de gelo.
- Papel interfolha.
- Mesa cirúrgica.
- Recipiente com álcool 70%.
- Fita adesiva.
- Hastes flexíveis com pontas de algodão (cotonetes).
- Material cirúrgico: 1 tesoura pequena, 3 pinças curvas (2 pequenas e 1 grande) e pinça hemostática reta média (porta agulha) e tesoura oftálmica pequena (castroviejo).
- Fio de sutura prolene 6-0 (Johnson&Johnson do Brasil).
- Fio de Nylon - monofilamento 5-0 (Procure).
- Cama aquecida (*T/Pump professional*) à 38 °C.

- Na Figura 1, alguns dos materiais e equipamentos utilizados durante o procedimento de indução da lesão cardíaca por ressecção apical.

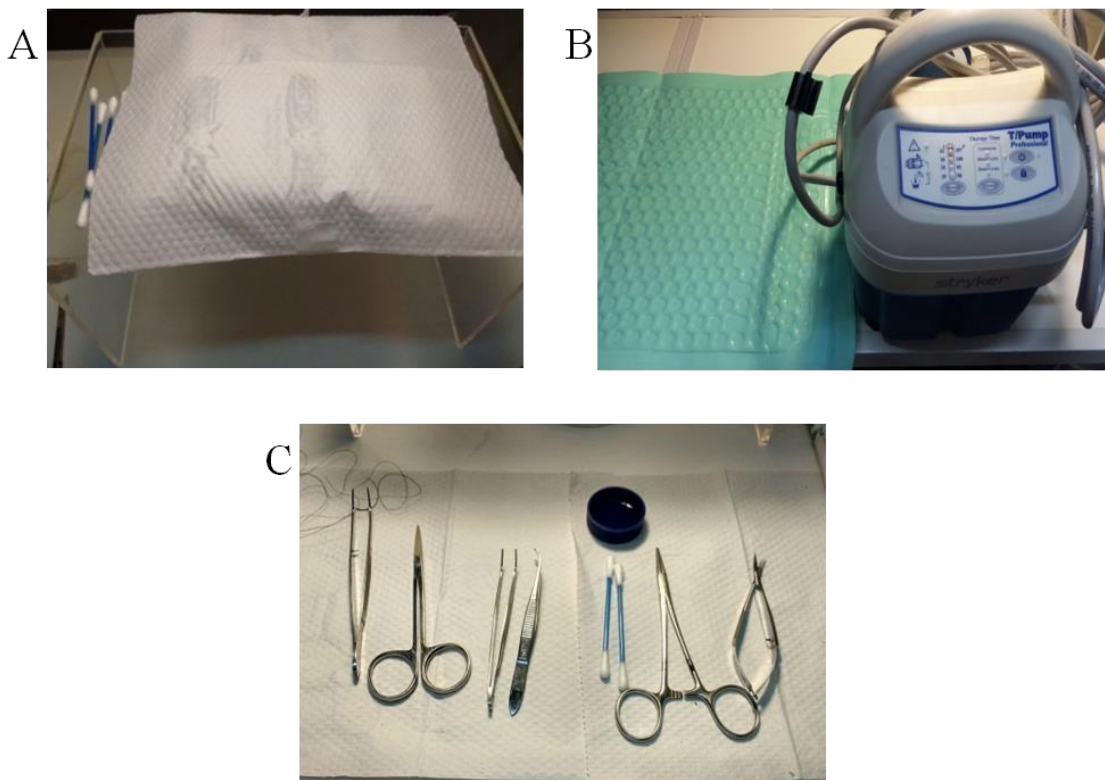


Figura 1: Materiais e equipamentos utilizados no procedimento cirúrgico: (A) mesa acrílica com uma bolsa de gelo coberta por papel interfolha e hastes flexíveis com ponta de algodão; (B) cama aquecida; (C) fio de nylon 5-0, 1 pinça curva grande, 1 tesoura pequena, 2 pinças curvas pequenas, hastes flexíveis com ponta de algodão, tampa contendo álcool 70%, pinça hemostática pequena e tesoura oftálmica (castroviejo).

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 / 9

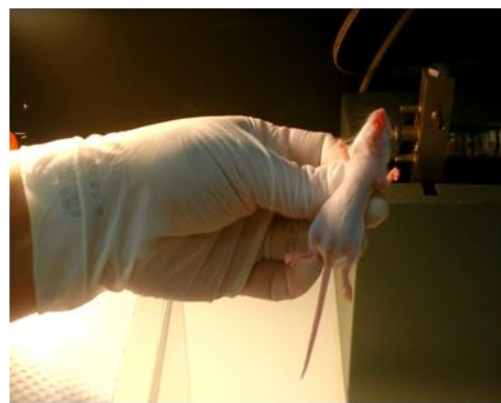
### 6.3. Experimento

- Neste tópico, as figuras demonstram cada etapa do procedimento para a indução da lesão cardíaca por ressecção apical em camundongos P1 (à esquerda) e P7 (à direita).

1- Colocar o camundongo em P1 em recipiente com gelo comum coberto com gaze (para evitar a ocorrência de queimaduras) e o camundongo em P7 em recipiente maior (isopor de 1,5 L) contendo uma bolsa de gelo.



2- Observar a perda postural e a falta de movimentos do camundongo ao tocá-lo. A ausência de movimentos indica que o animal entrou em plano anestésico induzido por hipotermia. O tempo necessário para o camundongo P1 ou P7 entrar em plano anestésico induzido por hipotermia foi de, aproximadamente, 3 a 5 min.





LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 / 9

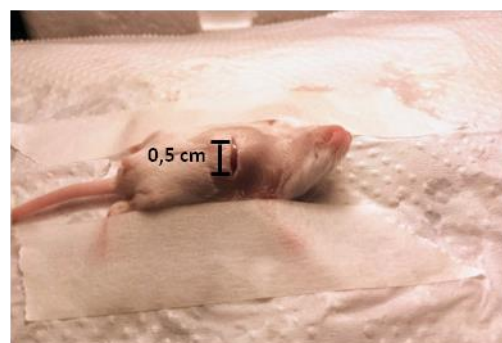
3- Em seguida, colocar o camundongo em decúbito dorsal sobre a bolsa de gelo coberta com papel interfolha a fim de manter o camundongo anestesiado durante o procedimento cirúrgico. Fixar as patas e a cabeça com fita adesiva.



4- Fazer a antisepsia da pele, na região do tórax próximo às patas dianteiras, com uma haste flexível umedecida com álcool 70%.



5- Com auxílio da tesoura pequena e pinça curva pequena, fazer uma incisão na pele do lado esquerdo de, aproximadamente, 0,5 cm.



LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 / 9

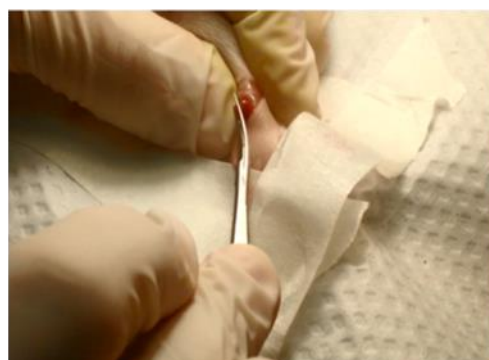
6- Com auxílio da pinça curva, divulsionar o músculo intercostal localizado entre quarta e quinta costelas.



7- Pressionar levemente o lado direito do tórax para exteriorização do coração pela incisão do lado esquerdo.



8- Utilizando a tesoura oftalmológica (castroviejo), realizar a ressecção de, aproximadamente, 15% do tecido apical do coração. Atenção: ressecção acima de 25% do tecido cardíaco poderá ocasionar a morte do animal por hemorragia.



LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 / 9

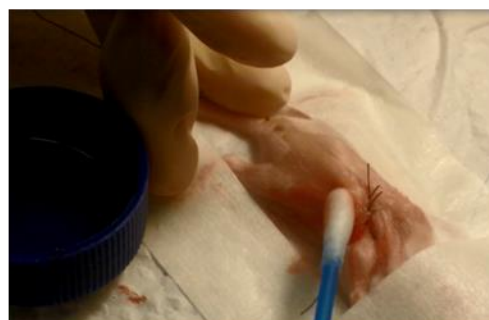
9- Com uma haste flexível, estancar o sangramento e inserir o coração na cavidade torácica.



10- Com auxílio da tesoura hemostática, da pinça curva pequena e do fio prolene 6-0 (P1) ou nylon preto 5-0 (P7) fechar a musculatura intercostal e a pele com pontos chuleio simples.



11- Utilizando haste flexível umedecida com álcool 70%, remover o sangue da pele e do pêlo do animal, para impedir o canibalismo ao retornar ao biotério.



LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR RESSECÇÃO APICAL</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: <u>3</u>
		PÁGINA: 1 /9

12- Remover a fita adesiva utilizada na fixação do camundongo. Colocar o animal na cama aquecida para recuperação da temperatura e movimentos corporais.



### **Anexo III - POP do modelo de lesão cardíaca por criolesão**

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR</u> <u>CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

## ÍNDICE

1. OBJETIVO .....	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....	1
3. RESPONSABILIDADES.....	1
4. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA .....	1
5. DEFINIÇÕES .....	2
6. PROCEDIMENTOS.....	2
6.1. Recomendações de segurança .....	2
6.2. Materiais e equipamentos utilizados.....	3
6.3. Experimento.....	4

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

## 1. OBJETIVO

Descrever o procedimento necessário para a realização do modelo de lesão cardíaca induzida por criolesão em camundongos neonatos com 1 dia e 7 dias de idade (P1 e P7, respectivamente).

## 2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Esse procedimento, desenvolvido no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular (LCCM), aplica-se aos alunos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e demais Instituições de Ensino e Pesquisa que objetivam estudar o processo de regeneração cardíaca.

## 3. RESPONSABILIDADES

### - Experimentadores

- Submeter à Comissão de Ética do Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) o projeto ou piloto, antes de iniciar qualquer experimento com manipulação animal.
- Separar os materiais e equipamentos necessários (tópico 6.2) para a realização da cirurgia, bem como verificar a disponibilidade de uso da sala cirúrgica.
- Garantir que o material cirúrgico esteja em condições de uso.
- Verificar, juntamente com os bioteristas, a data de nascimento dos camundongos.
- Garantir que a cama aquecida (*T/Pump professional*) funcione em condições adequadas de temperatura (36,5 °C - 38 °C).
- Após a realização da cirurgia, garantir: (1) a lavagem do material cirúrgico; (2) o desligamento e a limpeza da cama aquecida e (3) o armazenamento dos materiais e equipamentos utilizados.

### - Coordenadora do laboratório

- Verificar, com o aluno, a aprovação do projeto ou piloto junto ao CEUA.
- Conferir, com o aluno, a disponibilidade dos materiais antes de iniciar o procedimento cirúrgico.

## 4. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

A antissepsia das mãos e o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) são medidas preventivas simples contra zoonoses - doenças infecciosas transmitidas de animais para humanos (ANDRADE, A, 2012). Para a realização do procedimento descrito neste documento, os EPIs recomendados são: óculos, máscara, touca, luva, calçado fechado e jaleco.

#### Referências Bibliográficas:

ANDRADE, A. Biossegurança em biotérios [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 381-387. Acesso em: 16/09/2018. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-47.pdf>

## 5. DEFINIÇÕES

O modelo de lesão cardíaca por criolesão, inicialmente desenvolvido em camundongos adultos (VAN DEN BOSS *et al*, 2005), foi aplicado a camundongos neonatos (DAREHZERESHKI *et al*, 2015). Para induzir a lesão cardíaca, a sonda (cryoprobes) é submetida ao resfriamento em nitrogênio líquido e, em seguida, colocada sobre o coração por alguns segundos, causando a lesão no miocárdio (POLIZZOTTI *et al.*, 2016). Esse modelo tem sido amplamente utilizado nos estudos de regeneração cardíaca (POLIZZOTTI *et al.*, 2016).

#### Referências Bibliográficas:

DAREHZERESHKI, A; RUBIN, N.; GAMBA, L.; KIM, J.; FRASER, J.; HUANG, Y.; BILLINGS, J.; MOHAMMADZADEH, R.; WOOD, J.; WARBURTON, D.; KAARTINEN, V.; LIEN, C-L. Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury. **Dev Biol.** v.399. p.91-99.2015.

POLIZZOTTI, B.D.; GANAPATHY, B.; HAUBNER, B.J.; PENNINGER, J.M.; KUHN, B. A cryoinjury model in neonatal mice for cardiac translational and regeneration research. **Nat Protoc.** v.11. p.542-552.2016.

VAN DEN BOS, E.J.; MEES, B.M.E.; de WAARD, M.C.; de CROM, R.; DUNCKER, D.J.A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.289. p.H1291–H1300.2005.

## 6. PROCEDIMENTOS

### 6.1. Recomendações de segurança



LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

É recomendável, aos experimentadores, o uso de EPIs durante todo o procedimento cirúrgico e durante manuseio dos animais no biotério.

## 6.2. Materiais e equipamentos utilizados

- EPIs para o experimentador.
- Recipiente com gelo.
- Pedacos de gaze.
- Bolsa de gelo.
- Papel interfolha.
- Mesa cirúrgica.
- Recipiente com álcool 70%.
- Fita adesiva.
- Hastes flexíveis com pontas de algodão (cotonetes).
- Material cirúrgico: 1 tesoura pequena, 3 pinças curvas (2 pequenas e 1 grande) e pinça hemostática reta média (porta agulha).
- Sonda metálica 1 mm de diâmetro - pinça de aço inoxidável com ponta reta, com extremidade posterior (local de apoio) isolada com fita adesiva. O isolamento é necessário para evitar queimadura do experimentador ao manipular a sonda.
- Galão contendo nitrogênio líquido (-196 °C).
- Tubo de 50 mL, com barbante amarrado na ponta, para facilitar o manuseio de pequenas quantidades de nitrogênio líquido.
- Isopor pequeno (para permitir maior durabilidade do nitrogênio líquido).
- Cronômetro (*timer*) previamente programado em 12 segundos.
- Fio de sutura prolene 6-0 (Johnson&Johnson do Brasil).
- Fio de Nylon - Monofilamento 5-0 (Procure).
- Cama aquecida (*T/Pump professional*) à 38 °C.

- Na Figura 1, alguns dos materiais e equipamentos utilizados durante o procedimento de indução da lesão cardíaca por criolesão.

LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

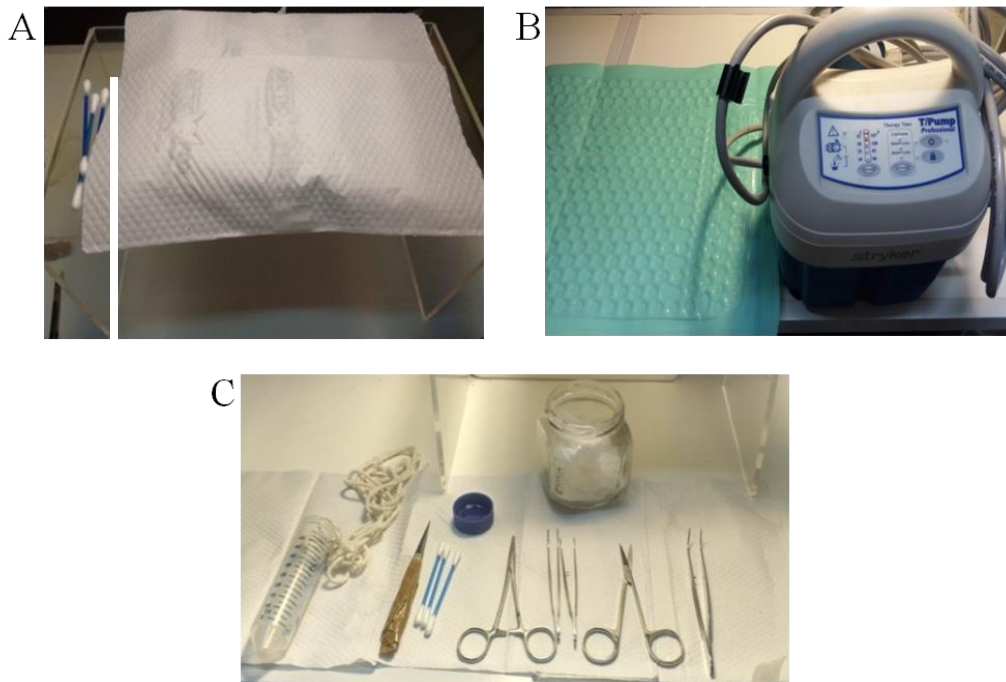


Figura 1: Materiais e equipamentos utilizados no procedimento cirúrgico: (A) mesa acrílica com uma bolsa de gelo coberta por papel interfolha e hastes flexíveis com ponta de algodão; (B) cama aquecida; (C) tubo de 50 mL pra coletar nitrogênio, sonda metálica, tampa contendo álcool 70%, gaze, hastes flexíveis com ponta de algodão, 1 pinça hemostática pequena, 2 pinças curvas pequenas, 1 tesoura pequena e 1 pinça curva grande

### 6.3. Experimento

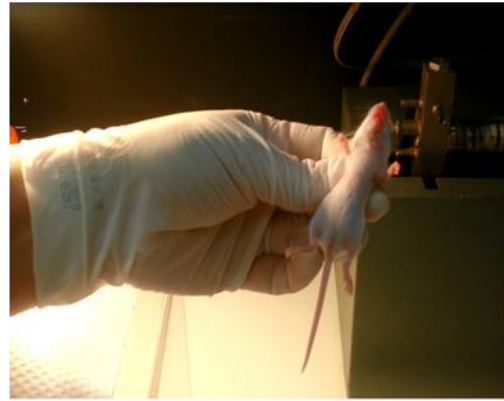
- Neste tópico, as figuras demonstram cada etapa do procedimento para a indução da lesão cardíaca criolesão em camundongos P1 (à esquerda) e P7 (à direita).

- 1- Colocar o camundongo P1 em recipiente com gelo comum coberto com gaze (para evitar a ocorrência de queimaduras) e o camundongo em P7 em recipiente maior (isopor de 1,5 L) contendo uma bolsa de gelo.



LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO  <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

2- Observar a perda postural e a falta de movimentos do camundongo ao tocá-lo. A ausência de movimentos indica que o animal entrou em plano anestésico induzido por hipotermia. O tempo necessário para o camundongo P1 ou P7 entrar em plano anestésico induzido por hipotermia foi de, aproximadamente, 3 a 5 min.



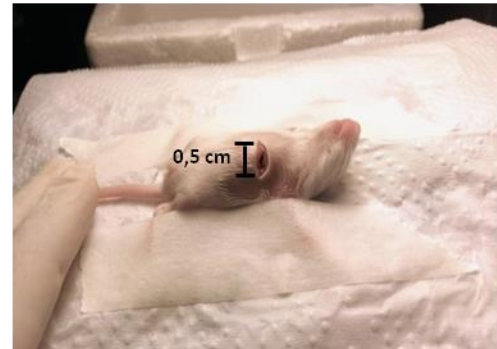
3- Em seguida, colocar o camundongo em decúbito dorsal sobre a bolsa de gelo coberta com papel interfolha a fim de manter o camundongo anestesiado durante o procedimento cirúrgico. Fixar as patas e a cabeça com fita adesiva.



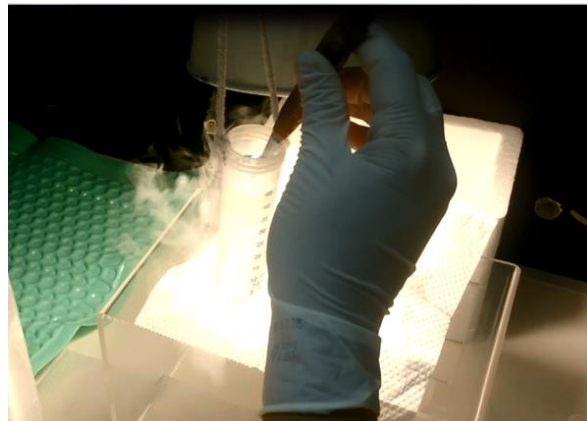
4- Fazer a antissepsia da pele, na região do tórax próximo às patas dianteiras, com uma haste flexível umedecida com álcool 70%.



5- Com auxílio da tesoura pequena e pinça curva pequena, fazer uma incisão na pele do lado esquerdo de, aproximadamente, 0,5 cm.



6- Colocar a sonda metálica em nitrogênio líquido (-196 °C) para resfriamento.



7- Com auxílio da pinça curva, divulsionar o músculo intercostal localizado entre quarta e quinta costelas.



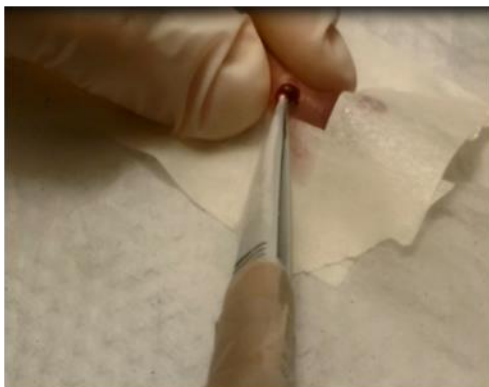
LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO <u>MODELO DE LESÃO CARDÍACA POR CRIOLESÃO</u>	POP - LCCM
		REVISÃO: 3
		PÁGINA: 1 /10

8- Pressionar levemente o lado direito do tórax para exteriorização do coração pela incisão do lado esquerdo.



9- Com cuidado, retirar a sonda do recipiente contendo nitrogênio líquido (remover o excesso de nitrogênio líquido). Aplicar a sonda sobre a região do ápice do ventrículo esquerdo durante 10 segundos. Importante: não realizar qualquer movimento durante a indução da lesão.

Atenção: o tempo pode variar de acordo com o tamanho da lesão desejado para o estudo.



10- Ao término do tempo cronometrado, remover a sonda. Observar a presença de uma área esbranquiçada (ponta da seta).



11- Com auxílio da pinça curva ou da haste flexível, inserir o coração na cavidade torácica.



12- Com auxílio da tesoura hemostática, da pinça curva pequena e do fio prolene 6-0 (P1) ou nylon preto 5-0 (P7) fechar a musculatura intercostal e a pele com pontos chuleio simples.



13- Utilizando haste flexível umedecida com álcool 70%, remover o sangue da pele e do pêlo do animal, para impedir o canibalismo ao retornar ao biotério.



14- Remover a fita adesiva utilizada na fixação do camundongo. Colocar o animal na cama aquecida para recuperação da temperatura e movimentos corporais.

