

TESE

**PAPEL DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS SOBRE O
REMODELAMENTO CARDÍACO**

Juliana Oliveira Rangel

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

**PAPEL DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS SOBRE O
REMODELAMENTO CARDÍACO**

Autora: Juliana Oliveira Rangel
Orientador: Prof. Dr. Michael Everton Andrades
Co-orientadora: Dra. Nadine Clausell

*Tese submetida como requisito para
obtenção do grau de doutora ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Área de Concentração: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.*

Porto Alegre
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira Rangel, Juliana
Papel da Polarização do Macrófagos sobre a
Polarização de Macrófagos / Juliana Oliveira Rangel. -
- 2018.
89 f.
Orientador: Michael Everton Andrades.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Infarto Agudo do Miocárdio. 2. Produtos Finais
de Glicação Avançada. 3. Remodelamento Cardíaco. 4.
Polarização de Macrófagos. I. Andrades, Michael
Everton, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha amiga Graziela Hünning Pinto, que foi quem me indicou o Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Hospital de Clínicas para tentar o Doutorado quando eu ainda cursava o Mestrado. Contar com seu apoio sempre foi muito bom.

Em segundo lugar agradeço ao Michael Andrades, quem me oportunizou a participação no Laboratório e aceitou ser meu orientador. Com ele pude aprimorar meus conhecimentos prévios e aprender muito a respeito de todo processo que envolve a pesquisa científica de qualidade.

Em terceiro lugar, sou grata a todos meus amigos e família que estiveram ao meu lado durante esses quatro anos, sempre dando forças e ajudando a tornar esse caminho mais leve. Em especial, à Bianca Fracasso e Alessandra Gonçalves Machado, grandes amigas que fiz no Laboratório. É sempre muito bom encontrar pessoas com quem compartilhamos muitas afinidades e podemos sempre contar, e nas quais podemos confiar. O convívio com vocês foi maravilhoso.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os colegas e alunos do Laboratório que estiveram ao meu lado durante esse tempo, auxiliando nos experimentos ou tornando os dias de trabalho mais alegres.

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.*

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
CAPÍTULO 1	8
RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares	12
2.2 Remodelamento cardíaco	13
2.3 Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio	16
2.4 Inflamação e DCV	18
2.4.1 Inflamação no pós-IAM	19
2.5 Polarização de macrófagos	21
2.6 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).....	24
2.6.1 Moléculas anti-AGEs	26
2.6.2 AGEs e sua contribuição para as DCV	27
2.6.3 AGEs no processo inflamatório.....	30
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. HIPÓTESES	33
5. OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo geral	34
5.2 Objetivos específicos.....	34
6. REFERÊNCIAS	35
7. ARTIGO 1.....	40
CAPÍTULO 2	58
RESUMO	59
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	60
1.1 Importância clínica do ventrículo direito.....	60
1.2 Hipertrofia do VD: modelo adaptativo <i>versus</i> mal-adaptativo.....	61
1.3 Inflamação no VD.....	63
2. JUSTIFICATIVA.....	65
3. HIPÓTESE.....	66
4. OBJETIVO	67
5. REFERÊNCIAS	68
6. ARTIGO 2.....	70
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs – *Advanced Glycation end Products*

AMG – Aminoguanidina

CML – Carboximetil-lisina

CEL– Carboxietil-lisina

DCV – Doenças Cardiovasculares

FGF-9 – Fator de Crescimento de Fibroblasto

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IC – Insuficiência Cardíaca

IL – Interleucina

IRF5 – Fator Regulatório do Interferon-5

LPS – Lipopolissacarídeo

M1- Macrófago tipo 1

M2- Macrófago tipo 2

MMP-9 – Metaloproteinase de matriz-9

MGO – Metilglioxal

NF- κ B – Fator Nuclear- κ B

OMS – Organização Mundial da Saúde

RAGE – Receptor de AGE

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

TGF- β – Fator de Transformação de Crescimento- β

VE – Ventrículo Esquerdo

VD - Ventrículo Direito

CAPÍTULO 1

Efeito dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) sobre a polarização de macrófagos cardíacos após o infarto agudo do miocárdio em ratos *Wistar*.

RESUMO

Os níveis circulantes de metilglioxal (MGO) estão aumentados durante o diabetes, infarto agudo do miocárdio (IAM) e doenças inflamatórias. O MGO é um carbonil altamente reativo que gera produtos finais de glicação avançada (AGEs), uma classe de moléculas associada com sinalização inflamatória e insuficiência cardíaca (IC). Drogas anti-AGEs, como a aminoguanidina (AMG), são empregadas no contexto experimental com sucesso limitado. Apesar disso, dados referentes ao impacto de níveis aumentados de MGO *in vivo* na inflamação durante o infarto são insuficientes. Neste estudo, foi investigado se a administração de MGO *in vivo* poderia modular a polarização de macrófagos e o remodelamento cardíaco em 10 dias. Ratos *Wistar* machos de 90 dias de idade (n=68) foram randomicamente alocados nos seguintes grupos: *sham*, IAM, IAM + MGO, IAM + AMG. Diferentes subgrupos de animais foram seguidos por 2, 6 e 10 dias. Citocinas (IL-6, IL-1 β , TNF- α , e IL-10) foram analisadas em homogenato cardíaco e houve um aumento de 65% nos níveis de IL-6 no grupo tratado com MGO no dia 6. No entanto, a expressão de MRC1, um marcador de macrófago M2, aumentou 2x, indicando um direcionamento ao perfil M2. Em conformidade, um aumento de 51% na fibrose cardíaca foi detectado nos animais tratados com MGO, apesar de não serem encontradas diferenças na função cardíaca. Curiosamente, a AMG não protegeu contra o perfil M2 ou a fibrose cardíaca. Nossos resultados sugerem que o MGO pode predispor os macrófagos em direção ao fenótipo M2 e aumentar a fibrose depois de um evento de infarto agudo do miocárdio.

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente a cada 40 segundos, um americano tem um infarto agudo do miocárdio (IAM) (Benjamin, Blaha et al. 2017). O IAM, ou ataque cardíaco, é causado por um súbito bloqueio nas artérias coronárias que nutrem o músculo cardíaco, normalmente decorrente do processo aterosclerótico. Logo após essa isquemia, dá-se início um conjunto de alterações morfológicas, moleculares e funcionais no coração, processo nomeado remodelamento cardíaco (Anderson and Morrow 2017). Essas alterações irão se manifestar clinicamente como hipertrofia, aumento do volume do ventrículo esquerdo (VE), áreas de cicatriz, fibrose e infiltrado inflamatório. Esse processo fisiopatológico, que se desenvolve dentro de um período de meses a anos, é determinante para sobrevivência após o IAM e para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), que apesar de todos os avanços recentes no manejo clínico, ainda conta com uma proporção significativa de pacientes acometidos (Sutton and Sharpe 2000). Em virtude disso, o investimento na busca da compreensão dos mecanismos envolvidos com o remodelamento cardíaco, bem como de alternativas terapêuticas, são justificáveis e desejáveis.

O processo inflamatório, que se instala logo após o insulto isquêmico derivado do infarto, será coordenado inicialmente pelos neutrófilos, sendo os macrófagos a segunda linha de ação frente à isquemia (Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). Esses macrófagos possuem dois fenótipos opostos, sendo o M1, pró-inflamatório (também conhecido como classicamente ativado), a população inicialmente predominante (Hume 2015). Com o passar dos dias, o perfil M2 anti-inflamatório e angiogênico (ou alternativamente ativado) começa a ocupar o tecido cardíaco (Troidl, Mollmann et al. 2009). Essa polarização exerce

um papel crítico no curso clínico de diversas enfermidades, inclusive nas doenças cardiovasculares (Lindsey, Saucerman et al. 2016; Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). No entanto, ainda não está clara a importância do balanço dos perfis fenotípicos desses macrófagos no coração, e sua possível contribuição para o remodelamento cardíaco pós-infarto.

Diversos fatores podem guiar a polarização de macrófagos e desequilibrar o balanço em favor de um dos fenótipos, contribuindo com o remodelamento cardíaco (Courties, Heidt et al. 2014; Singla, Singla et al. 2015). Dentre eles, um possível agente polarizador são os AGEs, moléculas com potencial sinalizador e inflamatório (Jin, Yao et al. 2015), e que teriam capacidade de atuar sobre os macrófagos, uma vez que os mesmos expressam o receptor para essas moléculas (Lindsey, Cipollone et al. 2009). A relação dos AGEs com enfermidades já foi bastante explorada no contexto da infecção e do diabetes (van Zoelen, Achouiti et al. 2011; Singh, Bali et al. 2014). Na área da cardiologia, porém, essa relação se restringe a estudos de associação e há poucos trabalhos que investiguem os mecanismos inflamatórios dos AGEs.

Desta forma, este projeto teve como objetivo avaliar a influência dos AGEs no pós-IAM sobre a polarização dos macrófagos, e se o uso de um agente anti-AGE é capaz de modular esse efeito, atenuando o remodelamento patológico que leva ao desenvolvimento da IC. A expectativa é que se gere mais conhecimento acerca dos mecanismos moleculares básicos envolvidos no remodelamento do miocárdio e que esse conhecimento possa colaborar para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento das doenças isquêmicas do coração.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares

Dados da Organização Mundial da Saúde (2015) apontam que as doenças cardiovasculares (DCV), quando consideradas em conjunto, são a principal causa de morte mundial, contribuindo com cerca de 31% de todos os óbitos. Considerando apenas a doença arterial coronariana (DAC), a contribuição é de 43% (CVDs 2017). Mais de três quartos das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda. Das 16 milhões de mortes antes dos 70 anos devido a doenças não transmissíveis, 82% estão em países de baixa e média renda e 37% são causadas por DCV (CVDs 2017). Entretanto no Brasil, se observa uma redução nas taxas de mortalidade por DCV desde a década de 80. Mesmo assim, elas ainda representam uma das principais causas de internações no Sistema Único de Saúde (SUS) e o IAM foi a doença cardíaca com maior taxa de mortalidade (7%) em 2014 (Mansur, Favarato et al. 2001; DATASUS 2014). Ao considerar a América Latina, as DCV são responsáveis por cerca de 1 milhão de mortes por ano, e a DAC é causa de 42,5% dessas perdas (Fernando, Pamela et al. 2014).

A DAC é a principal causa do ataque cardíaco, cujo mecanismo subjacente envolve a aterosclerose. Uma das possíveis complicações consequentes ao infarto está a IC, problema de saúde pública crescente e com uma alta prevalência mundial (Sanchis-Gomar, Perez-Quilis et al. 2016). Nos Estados Unidos (EUA), as projeções ainda mostram que a prevalência da IC irá aumentar 46% até 2030 (Rosamond and Johnson 2017). Essa ascensão na incidência da IC é resultado de intervenções pós-IAM mais efetivas, envelhecimento da população e melhoria no diagnóstico (Hegarová and Málek

2013). Adicionalmente, ela constitui a principal causa de hospitalização entre adultos na América, sendo já considerada como uma nova epidemia, afetando cerca de 50% da população sul-americana. O panorama se agrava ao considerar que perto de 50% de todos os pacientes internados com IC retornam ao hospital dentro de 90 dias após a alta hospitalar, e que essa readmissão é um dos principais fatores de risco para morte nesta síndrome (Chen-Scarabelli, Saravolatz et al. 2015).

Assim, além do inestimável valor de vidas perdidas, obviamente as DCV, especialmente o IAM, também exercem um impacto negativo significativo sobre a economia do país, seja pelo custo do tratamento ou pela saída de indivíduos da população economicamente ativa (Pazos-Lopez, Peteiro-Vazquez et al. 2011; Siqueira, Siqueira-Filho et al. 2017). Dessa maneira, a busca incansável por maior conhecimento de mecanismos básicos envolvidos nessa doença é essencial para a criação de novos alvos terapêuticos que auxiliem a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos afetados pelas DCV.

2. 2 Remodelamento cardíaco

O IAM decorre da obstrução das artérias coronárias, diminuindo ou impedindo a chegada de suprimento aos cardiomiócitos, podendo levar à morte celular com perda de tecido viável e sobrecarga de trabalho do tecido sadio. Em consequência da morte celular, inicia-se uma resposta inflamatória associada à produção de espécies reativas de oxigênio (Frangogiannis 2014; McAlindon, Bucciarelli-Ducci et al. 2015). Conjuntamente, esses processos resultam em necrose e apoptose de cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e dilatação ventricular, levando à reestruturação da câmara cardíaca. À reunião dessas alterações moleculares, celulares e intersticiais é

dados o nome de remodelamento cardíaco (Opie, Commerford et al. 2006; D'Elia, D'Hooge et al. 2015), processo descrito pela primeira vez há 35 anos (Hochman and Bulkley 1982). O remodelamento pode ser descrito como fisiológico ou patológico; ou, alternativamente, classificado como adaptativo ou mal-adaptativo. O remodelamento fisiológico é uma alteração compensatória nas dimensões e função do coração em resposta a estímulos fisiológicos como exercício, gravidez, o próprio crescimento ou ainda à hipóxia (Shimizu and Minamino 2016). Clinicamente, as mudanças associadas ao remodelamento patológico se manifestam como alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração e, apesar de ocorrer para suprir o débito cardíaco, é associado ao aumento das taxas de mortalidade (Sutton and Sharpe 2000; Opie, Commerford et al. 2006; D'Elia, D'Hooge et al. 2015). Todas essas modificações histopatológicas e inflamatórias no miocárdio irão induzir a falência progressiva do coração, podendo acarretar o desenvolvimento da síndrome de IC, associada à significativa morbidade e mortalidade, e via final de muitas doenças cardiovasculares (Cohn, Ferrari et al. 2000; Opie, Commerford et al. 2006).

A IC é uma síndrome clínica complexa caracterizada pela ineficiência do coração em bombear o sangue nas quantidades necessárias para o funcionamento adequado do organismo. Há muitas causas associadas ao seu desenvolvimento: cardiomiopatias, hipertensão, doenças valvares, entre outras. Porém, uma das principais é a doença arterial coronariana, que leva ao infarto e o conseqüente enfraquecimento cardíaco (Pazos-Lopez, Peteiro-Vazquez et al. 2011; Inamdar and Inamdar 2016). Como resultado, as câmaras cardíacas podem responder se estendendo para se contrair com mais força, tornando suas paredes mais grossas, e bombeando mais rápido. Inicialmente, essas mudanças

podem mascarar o problema, mas não solucionam, e o remodelamento continua e piora até que esses processos substitutivos não funcionem mais (Azevedo, Polegato et al. 2016). Nesse estágio, geralmente o indivíduo experimenta sintomas como fadiga, problemas respiratórios, edema, intolerância ao exercício, entre outros. Muitas vezes, o último recurso terapêutico pode ser o transplante cardíaco, intervenção rara, cara e de risco. Por isso, novas opções de tratamentos para o IAM e suas consequências são requeridas (Pazos-Lopez, Peteiro-Vazquez et al. 2011). Convencionalmente, o objetivo primordial da terapia para IC é melhorar o função da bomba cardíaca. No geral, o tratamento inclui recomendações como modificação de dieta, prescrição de atividade física, diuréticos, inotrópicos, beta-bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), entre outros (Opie, Commerford et al. 2006; Metra and Teerlink 2017).

Apesar de, ao longo dos últimos anos, haver inovações na administração farmacológica assim como o uso de dispositivos implantáveis de ressincronização e desfibrilação cardíacos, pacientes cardiopatas ainda apresentam elevada taxa de mortalidade (Pazos-Lopez, Peteiro-Vazquez et al. 2011). Sabe-se que 40% dos pacientes morrem no período de um ano após a primeira hospitalização por insuficiência cardíaca (Liu and Eisen 2014), e em 5 anos essa taxa sobe para cerca de 50% (Chen-Scarabelli, Saravolatz et al. 2015). Os sobreviventes continuam vivendo um intenso processo de fibrose, inflamação e remodelamento eletrofisiológico, apresentando mau prognóstico, uma vez que esse processo está associado à disfunção ventricular progressiva e arritmias malignas (Azevedo, Polegato et al. 2016). Em virtude disso, novas metodologias com intuito de inibir ou mesmo evitar o curso de desenvolvimento

de doenças cardiovasculares, como por exemplo a terapia anti-inflamatória, têm sido testadas com graus variáveis de sucesso, e devem continuar sendo exploradas (Heymans, Hirsch et al. 2009; Ridker and Luscher 2014).

2. 3 Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio

A utilização de modelos experimentais tem fornecido informações importantes sobre a morfologia, bioquímica, eletrofisiologia e propriedades mecânicas do miocárdio infartado. Além disso, são úteis no estabelecimento de terapias experimentais, antes que possam ser transpostas para humanos (Hearse and Sutherland 2000).

O modelo de infarto que tem sido empregado de forma bastante disseminada na literatura científica e que foi empregado neste trabalho, tem etiologia isquêmica, e é adquirido por meio da ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda (Fishbein, Maclean et al. 1978). Ele foi descrito pela primeira vez por Heimbürger (Heimbürger 1946) e com o passar dos anos foi modificada por outros pesquisadores até a técnica atual (Johns and Olson 1954). Essa metodologia gera uma área de isquemia no ventrículo esquerdo, que apresenta um processo inflamatório e vem a ser substituída por fibrose (Figura 1). É um modelo que foi extensivamente caracterizado no passado (Fishbein, Maclean et al. 1978; Pfeffer, Pfeffer et al. 1979) e que contribuiu significativamente na definição do captopril como droga antirremodelamento no pós-IAM (Pfeffer, Pfeffer et al. 1985).

Apesar da alta variabilidade do tamanho da lesão isquêmica gerada por esse modelo (5 a 40% da circunferência do ventrículo esquerdo), explicada pela habilidade do pesquisador na indução do IAM e por variações anatômicas da artéria coronária, o método possui algumas vantagens. Entre elas está a rapidez

da cirurgia, que é capaz de gerar um modelo representativo de todas as etapas do infarto: necrose, cicatrização e remodelamento cardíaco. Todas essas alterações morfológicas e funcionais, incluindo alterações hemodinâmicas e as disfunções sistólicas e diastólicas, são bastante semelhantes ao processo que ocorre no ser-humano (Zornoff, Paiva et al. 2009).

Mesmo assim, recentemente há um importante debate sobre como tornar os modelos animais mais relevantes para a biologia humana (Perrin 2014). Sem dúvida, uma das maneiras de atingir esse objetivo é por meio do rigor científico na pesquisa experimental, como por exemplo, o uso de randomização, cegamento e cálculo de tamanho amostral (Bodiga, Eda et al. 2014), métodos esses utilizados nesse trabalho.

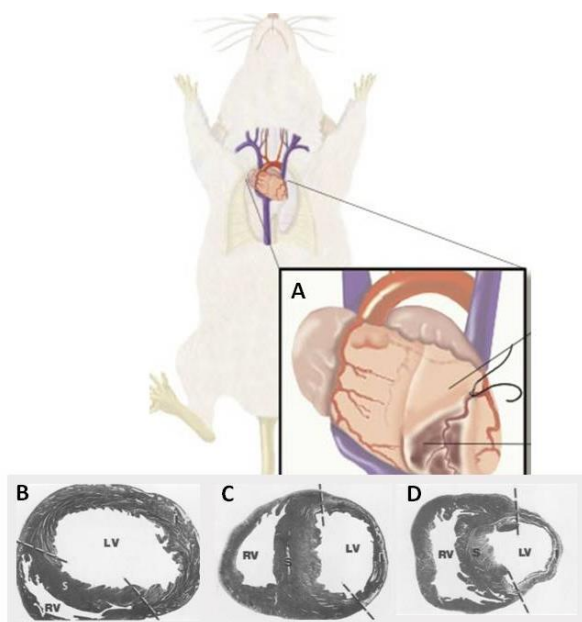


Figura 1 - do IAM induzido coronária esquerda.

Modelo esquemático por ligadura da descendente anterior

figura apresenta uma visão transtorácica do coração, acessado pelo afastamento da 2ª e 3ª costelas esquerdas. Em (A) é possível ver a ligadura com a área de infarto. Cortes transversais de coração de rato 1 dia (B), 4 dias (C) e 21 dias (D) após o IAM. Percebe-se o afinamento das paredes na região infartada, delimitada pelas linhas tracejadas. LV – ventrículo esquerdo. RV – ventrículo direito. Adaptado de (Fishbein, Maclean et al. 1978).

2. 4 Inflamação e DCV

A maior parte dos dados provenientes de experimentos epidemiológicos observacionais e da ciência básica defende a ideia na qual a inflamação exerce papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose (Libby 2012). Múltiplos tipos celulares, entre eles os macrófagos, estão implicados no processo aterogênico, bem como quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão. Por isso, a manipulação da resposta inflamatória fundamenta o uso de tratamentos com foco nas vias inflamatórias, potenciais alvos na prevenção de doenças cardiovasculares (Libby, Ridker et al. 2002). Entretanto, quando se tenta uma transposição dos dados da experimentação básica existe um conflito, evidenciado pelos resultados muitas vezes desapontadores dos estudos clínicos.

Assim, as terapias anti-inflamatórias que são testadas e usadas enfrentam grandes desafios. Essas terapias podem ser classificadas em duas categorias, com foco no seu potencial antiaterogênico: aquelas que têm como alvo central a via da IL-1, IL-6 e TNF- α , e aquelas que não tem. Muitos desses tratamentos não obtiveram sucesso nos desfechos pretendidos, trazendo alguns efeitos inesperados (Funk and FitzGerald 2007; Martinez-Gonzalez and Badimon 2007; Listing, Strangfeld et al. 2008; Setoguchi, Schneeweiss et al. 2008). Um exemplo desse inconveniente é que muitas medicações anti-inflamatórias parecem aumentar os níveis de colesterol (Kraakman, Dragoljevic et al. 2016). Uma das possíveis razões levantadas para essas falhas é a falta de rigor científico nos estudos de experimentação básica, o que prejudica a medicina translacional (Perrin 2014). Outra hipótese é que o uso de uma única molécula

alvo nos ensaios clínicos pode não ser suficiente, frente à complexidade da interação do sistema inflamatório com o sistema cardiovascular.

Assim, a extrapolação de dados provenientes de modelos animais para o manejo da saúde humana requer cautela. Ainda faltam evidências consistentes que provem que a interferência nos processos inflamatórios possa ser uma estratégia segura, justificando a continuidade de estudos básicos nessa área.

2.4.1 Inflamação no pós-IAM

O sistema inflamatório é redundante: ao mesmo tempo em que pode ser prejudicial, é também um sistema compensatório, crucial para sobrevivência. O processo inflamatório que se instaura logo após o IAM é responsável pela coordenação dos processos de cicatrização, recuperação e remodelamento que se seguem (Frangogiannis 2014).

Sabe-se que, em modelo animal de IAM, o processo de infiltração de neutrófilos se inicia imediatamente após o evento isquêmico, com pico na primeira semana após o IAM (Troidl, Mollmann et al. 2009). Outro importante tipo celular atuante nesse processo são os macrófagos, células do sistema imune inato que residem e se acumulam em todos os órgãos, saudáveis e doentes, e sua ocupação no tecido pode mudar em horas ou meses (Gordon and Taylor 2005; Martinez and Gordon 2014). Alguns fenótipos são prevalentemente inflamatórios, enquanto outros favorecem o reparo tecidual. Uma dicotomia tem sido proposta para ativação de macrófagos: clássica *versus* alternativa, também conhecida como M1 e M2, respectivamente (Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). Especificamente no processo pós-isquêmico, existe uma prevalência inicial de macrófagos M1, responsáveis pelo processo de fagocitose de restos celulares oriundos de necrose e apoptose. Esses macrófagos produzem

citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), radicais livres e tem alto potencial microbicida. Contudo, em excesso podem ter efeito danoso sobre o tecido sadio (Hulsmans, Sam et al. 2016; Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). Em modelos animais, o fenótipo M1 começa a ser substituído após cerca de 5 dias pelos macrófagos M2 (Troidl, Mollmann et al. 2009; Wang, Yang et al. 2012; Liu, Zhang et al. 2015). Esse fenótipo é responsável pelo processo cicatricial, promovendo a síntese de colágeno e resolvendo o processo inflamatório (Figura 2). Com a resolução da inflamação, acontece um retorno a condições basais com a desativação dos macrófagos (Troidl, Mollmann et al. 2009; Mantovani, Biswas et al. 2013; Nahrendorf and Swirski 2013).

Apesar de essa dicotomia ser didática, esse conceito de polarização de macrófagos M1/M2 é derivado de estudos *in vitro*. Porém, um amplo número de estudos sustenta o conceito de diversidade de fenótipos intermediários entre os polos M1 e M2 quando avaliados *in vivo* (Nahrendorf and Swirski 2013; Hulsmans, Sam et al. 2016). Entretanto, é importante que haja um equilíbrio entre esses perfis fenotípicos, sob pena de agravamento desse processo de remodelamento, pois tanto a ativação persistente do fenótipo pró-inflamatório quanto a superativação do fenótipo pró-fibrótico pode ser prejudicial (Troidl 2009; Hulsmans, Sam et al. 2016).

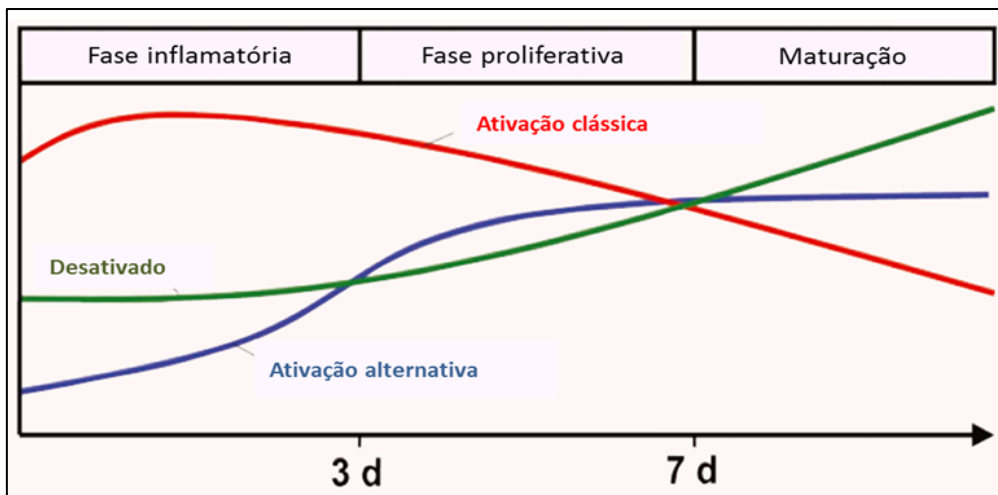


Figura 2 - Cinética de polarização de macrófagos após um evento isquêmico.

Adaptado de Troidl et. al., 2009.

2.5 Polarização de macrófagos

Os macrófagos têm duas origens, e a mais conhecida é a partir dos monócitos da circulação sanguínea, gerados na medula óssea e baço, frente a uma situação inflamatória (Nahrendorf and Swirski 2013; Italiani and Boraschi 2015). Outra fonte, menos explorada, é aquela iniciada ainda na vida embrionária e que permanece nos tecidos, fonte essa que originou o conceito de macrófagos residentes (Italiani and Boraschi 2015). Assim diversidade e plasticidade são duas características marcantes do seu comportamento (Sica and Mantovani 2012).

A ideia de uma polarização dessas células se originou na década de 90 com a descoberta de um diferente tipo de macrófago, que tinha sua expressão gênica induzida por IL-4 (Stein, Keshav et al. 1992). Esse tipo contrastava com a ativação clássica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e INF- δ , que favorece a diferenciação para o fenótipo M1, pró-inflamatório. O novo perfil foi denominado com a terminologia de “ativação alternativa”, favorecendo o fenótipo anti-inflamatório M2 (Stein, Keshav et al. 1992; Martinez and Gordon 2014).

Alguns anos mais tarde, uma nova classificação foi baseada na polarização das células T (Th1-Th2), que também apresentam um metabolismo diferencial. Assim nasceu o conceito M1-M2 (Mills, Kincaid et al. 2000). Essa proposição dualística, de um M1 clássico e a ativação alternativa de M2, deve ser vista como um espectro, com os dois fenótipos representando dois extremos de um estado dinâmico de mudança de ativação de macrófagos (Martinez and Gordon 2014).

A polarização de macrófagos tem sido foco de estudo em diversas patologias, sendo explorada no câncer, na sepse, na síndrome metabólica, e nas doenças cardiovasculares (Sica and Mantovani 2012). Considerando as DCV, são crescentes na literatura abordagens que visam à modulação da polarização dos macrófagos, uma vez que essa estratégia pode exercer importantes efeitos sobre o remodelamento cardíaco (Courties, Heidt et al. 2014; Liu, Zhang et al. 2015; Jung, Ma et al. 2017). Ao considerar a característica plástica dessas células imunes, ainda é um desafio identificar corretamente o perfil fenotípico do macrófago (Martinez and Gordon 2014). A diferenciação desses macrófagos se baseia nas diferenças entre os estímulos que os ativam, marcadores de expressão gênica, fatores de transcrição, citocinas e quimiocinas secretadas (Glass and Natoli 2016). Na tabela a seguir podem ser vistos as principais características que diferenciam M1 de M2.

Tabela 1. Marcadores de M1 e M2.

	M1	M2
--	----	----

Estimulação/Ativação	IFN- δ TNF- α LPS	IL-4 IL-13 IL-10 glicorticoides
Expressão (Receptores ou enzimas)	CD86 CD80 TLR2 TLR4 iNOS	CD163 CD206 (MRC1) TLR1 TLR8 SR
Citocinas produzidas	IL-6 IL-1 β TNF- α IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1ra
Quimiocinas indutoras	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCR2 CCL17 CCL22 CCL24
Genes	CD86 iNOS MCP-1 IL-6 IL-1 β TNF- α IL-12 IL-12p40 IL-23 Marco Socs3 Nos2 Il12b Ido1 CD80 Ccr7 Cxl10	Arg-1 CD206 (MRC1) CD163 IL-10 TGF- β IL-1RA Ym1 Fizz1 Socs2 IRF4 Chia Chi3l1 Chi3l2 Cxcl13 Ccl12 Ccl24 IL-4R
Fatores de Transcrição	STAT1 NFk-B AP1 IRF9 IRF3 IRF5 HIF-1 α	STAT6 HIF-2 α PPAR- δ KLF4
miRs	miR-155	miR-124

(Murray and Wynn 2011; Tugal, Liao et al. 2013; Martinez and Gordon 2014; Murray, Allen et al. 2014)

Atualmente, a identificação dessas células tem avançado com técnicas mais específicas, como análises funcionais de transcriptoma, metaboloma e

epigenética, revelando o espectro de estados ativados de macrófagos (Xue, Schmidt et al. 2014; Zhou, Yang et al. 2017).

Concluindo, recentemente a dicotomia M1/M2 tem sofrido críticas, sendo considerada simplista, uma vez que não abrange todo esse espectro da população de macrófagos (Nahrendorf and Swirski 2016). No entanto, esta visão com dois polos principais simplifica o processo de identificação dos macrófagos sem excluir a existência de outros subtipos.

2.6 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

Os AGEs (do inglês *Advanced Glycation End-Products*) são um grupo heterogêneo de moléculas formadas por reações não-enzimáticas de açúcares reduzidos com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, conhecida como reação de Maillard (Ott, Jacobs et al. 2014). Basicamente, a via clássica dessa reação, também conhecida como glicação, inicia com a ligação entre uma amina primária (presente nas proteínas) com grupamentos carbonil (derivados da glicose ou outros açúcares reativos), originando as bases de Schiff. Após rearranjos moleculares, novas estruturas mais estáveis surgem: são os produtos de Amadori. A ação de radicais livres sobre esses produtos conduzem à formação dos AGEs (Ramasamy, Vannucci et al. 2005; Singh, Bali et al. 2014). Outro mecanismo alternativo de formação de AGEs inclui a chamada via do "estresse carbonílico", na qual a peroxidação lipídica ou a via glicolítica geram compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como o metilglioxal e glioxal (Dhar, Desai et al. 2010). O metilglioxal (MGO) constitui um dos principais precursores na formação dos AGEs (Dhar, Dhar et al. 2011). A sua concentração plasmática fisiológica é de 1-3 μM e a administração intraperitoneal de 17 mg/Kg

em ratos é capaz de duplicar os valores basais por pelo menos 2 horas. Interessantemente, essa abordagem aumenta as concentrações cardíacas desse composto glicante por pelo menos 3 horas (Dhar, Desai et al. 2010). Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que a infusão contínua de MGO (60 mg/Kg/dia durante 28 dias) foi capaz de elevar a concentração plasmática de MGO e carboximetil-lisina (CML) (Dhar, Dhar et al. 2011). Desta forma, a infusão de MGO é uma ferramenta interessante para aumentar artificialmente as concentrações de AGEs no organismo.

Existe uma grande variedade de AGEs que podem ser classificados de acordo com sua capacidade de produzir autofluorescência e ligações cruzadas, como por exemplo a CML, carboxietil-lisina (CEL) e pentosidina (Nagai, Hayashi et al. 2002). Devido à grande heterogeneidade dos AGEs, às vezes pode ser difícil identificar qual ou quais grupos estão exercendo seus efeitos biológicos *in situ*, de modo que alvos menos investigados podem estar atuando e não serem detectados (Blackburn, Vulesevic et al. 2017). A origem primordial dessas moléculas é endógena, sendo produzidos contínua e lentamente pelo metabolismo humano sob condições fisiológicas (Vlassara, Cai et al. 2002). Entretanto, é o seu excesso que apresentará um risco. Os AGEs se acumulam no corpo humano conforme envelhecimento, e sua deposição é acelerada em uma variedade de condições patológicas, como IC crônica, insuficiência renal e o diabetes mellitus, sendo essa última um fator de risco para eventos isquêmicos cardíacos (Meerwaldt, Hartog et al. 2005; Vouillarmet, Maucort-Boulch et al. 2013). Estudos sugerem que a dieta com alimentos fritos ou assados e o fumo são outros fatores associados à formação e acúmulo desses produtos,

constituindo uma importante fonte exógena dessas moléculas (Vlassara, Cai et al. 2002).

Apesar de a relação dos AGEs com as doenças renais e com o diabetes estar melhor esclarecida, ainda se buscam informações que estabeleçam o papel dos AGEs no processo de desenvolvimento e evolução das doenças cardíacas.

2.6.1 Moléculas anti-AGEs

Os AGEs possuem potencial de sinalização celular, geralmente ligados à sinalização pró-inflamatória. O papel de efetor, e não apenas de biomarcador, fica mais claro quando moléculas anti-AGE conseguem minimizar a disfunção diastólica e sistólica, tanto em modelos animais quanto em humanos, principalmente no cenário da diabetes e do envelhecimento (Asif, Egan et al. 2000; Chang, Hsu et al. 2004; Hartog, Voors et al. 2007).

Uma molécula que foi testada nesse sentido é o alagebrium, também conhecido como ALT-711, que age quebrando as ligações cruzadas entre as proteínas glicadas (Little, Zile et al. 2005). Infelizmente os resultados promissores em animais nunca foram replicados em estudos humanos e, alegando razões financeiras, a empresa responsável decidiu terminar os ensaios clínicos com essa molécula. Entretanto, o surgimento de novos análogos dessa molécula tem trazido resultados promissores na área da cardiologia pré-clínica (Dhar, Udumula et al. 2016), podendo suscitar novos investimentos. Outra droga experimental anti-AGE, investigada para o tratamento da nefropatia diabética, é a aminoguanidina (AMG) ou pimagedina. Infelizmente a AMG teve o mesmo destino da ALT-711, pois falhou em provar eficácia e segurança adequada para a terapia em seres humanos (Thornalley 2003), embora tenha resultado em

efeitos positivos sobre desfechos cardiovasculares em estudos experimentais com diabetes: melhora da elasticidade arterial, redução da expressão de RAGE e molécula pró-fibrótica, e menor hipertrofia e complacência vascular (Yamagishi, Nakamura et al. 2008). A AMG reage com os produtos de Amadori ou compostos dicarbonis, como o MGO, impedindo sua conversão em AGEs (Thornalley et al. 2000). Geralmente, em modelos experimentais os pesquisadores optam por administrá-la na água de beber, dada sua meia-vida muito curta (1,4 h) e a não alteração de preferência da bebida pelo animal. Outro agente anti-glicação é o GLY-230 (Glycadia 2007), que mostrou efeito benéfico em homens diabéticos ao reduzir os níveis de albumina glicada e a excreção de albumina pela urina (Kennedy, Solano et al. 2010).

Considerando a gama de resultados experimentais favoráveis ao sistema cardiovascular, não é possível negligenciar os benefícios que essas terapias podem trazer ao ser humano. Dessa maneira, é primordial a continuidade na busca de moléculas análogas a esses compostos, com o intuito de auxiliar o tratamento das DCV.

2.6.2 AGEs e sua contribuição para as DCV

No miocárdio, a presença e o acúmulo de AGEs afetam tanto as estruturas intracelulares e extracelulares, quanto a função dos diferentes tipos celulares cardíacos. Assim, a glicação das proteínas causada pelos AGEs pode contribuir com o processo de remodelamento através de dois aspectos principais. Primeiro, os AGEs por meio da interação com seu receptor (RAGE-do inglês, *Receptor for AGE*), contribuem para indução do processo inflamatório (ativação da via NF- κ B), e fibrótico (via TGF- β) (Hartog, Voors et al. 2007; Neviere, Yu et al. 2016). Além disso, a ligação com RAGE também estimula o

estresse oxidativo. A expressão do RAGE cardíaco ocorre predominantemente no endotélio vascular e nos capilares mas também é expresso nos cardiomiócitos e nos macrófagos (Lindsey, Cipollone et al. 2009; Donaldson, Taatjes et al. 2010). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram a importante função das interações do eixo AGE-RAGE que prejudicam a função cardíaca (Hegab, Gibbons et al. 2012; Willemsen, Hartog et al. 2012). Segundo, eles se associam ao desenvolvimento de disfunção cardíaca através de sua produção endógena em diversos modelos animais (Lindsey, Cipollone et al. 2009, Hartog, Voors et al. 2007). Os AGEs se acumulam no interstício do miocárdio entre os cardiomiócitos, o que pode afetar as propriedades fisiológicas de proteínas da matriz extracelular das células cardíacas, como o estímulo da transcrição de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (Zhang, Banker et al. 2011), e também acabam por afetar negativamente o endotélio. Ainda, a formação de ligações cruzadas entre proteínas estruturais, como o colágeno e a elastina, promove um prejuízo na elasticidade do tecido. Assim, por meio da indução do estresse oxidativo, da inflamação e de alterações estruturais e funcionais em proteínas cardíacas, os AGEs exercem um importante papel no desenvolvimento e progressão das DCV, contribuindo negativamente para o processo de remodelamento cardíaco (Neviere, Yu et al. 2016). Um resumo da ação dos AGEs sobre o sistema cardiovascular pode ser visto na figura a seguir (Figura 3).

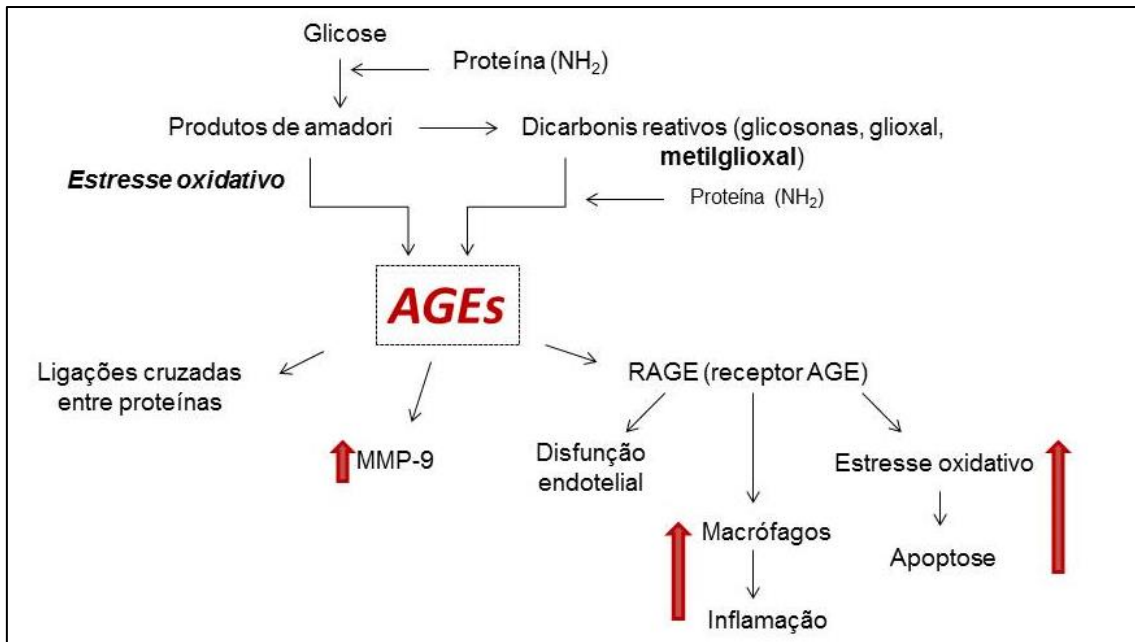


Figura 3. Formação e ação dos Produtos Finais de Glicação Avançada sobre o sistema cardiovascular.

A partir de estudos clínicos sabe-se que os AGEs estão aumentados em pacientes pós-IAM, e a sua concentração é preditora independente de desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Raposeiras-Roubin, Rodino-Janeiro et al. 2012). Além disso, níveis elevados de CML e pentosidina, dois importantes AGEs na área clínica, foram associados à maior chance de hospitalização, sendo que apenas a CML, teve associação com um maior risco de mortalidade em pacientes com IC (Willemsen, Hartog et al. 2012). Em modelo animal, os AGEs também foram associados à piora da função cardíaca após o IAM, sendo esse efeito mais pronunciado no grupo diabetes e infartado (Cao, Chen et al. 2014). Interessantemente, a terapia tradicional no manejo da IC (bloqueadores de receptores de AngII e iECA) também promovem a redução de AGEs (Miyata and van Ypersele de Strihou 2003), criando uma ligação bastante interessante, porém pouco estudada, entre o manejo farmacológico tradicional e o metabolismo de AGEs.

Apesar do conhecimento sobre os efeitos dos AGEs sobre alguns desfechos cardíacos, até o momento não há um estudo de intervenção onde a associação entre AGEs e remodelamento cardíaco fique demonstrado de forma clara. Assim, é válido manter esforços em direção a melhor compreensão dessa interação.

2.6.3 AGEs no processo inflamatório

Os AGEs exercem um importante papel no desenvolvimento e progressão das doenças crônicas, através da indução do estresse oxidativo e da inflamação. O acúmulo de proteínas glicadas pode comprometer a função normal de órgãos, enrijecer as artérias, e causar problemas vasculares. Essas ações combinadas causam muitas complicações no diabetes e no envelhecimento (Nedic, Rattan et al. 2013).

Os AGEs têm atividade sinalizadora sobre diversos tipos celulares. A resposta, porém, depende do tipo de glicação bem como do tipo celular em questão. Linhagens de macrófago em cultura, quando estimulados por AGE, ativam NF- κ B e produzem TGF- β e TNF- α (Cohen, Ziyadeh et al. 2002; Fan, Subramaniam et al. 2003). Células endoteliais e tumorais, também podem sinalizar a ativação de outros mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e PCR) por meio da interação com o RAGE (Nedic, Rattan et al. 2013). Essas ações podem ser associadas ao macrófago M1, que tipicamente é caracterizado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, também foi demonstrado que os AGEs podem estimular a secreção de VEGF por macrófagos (Urata, Yamaguchi et al. 2002), uma atividade típica de macrófagos alternativamente ativados.

Estudos atuais sugerem diversos fatores com potencial de indução da polarização dos macrófagos implicados no remodelamento cardíaco, dentre eles

o fator regulatório do interferon-5 (IRF5) (Courties, Heidt et al. 2014), fator de crescimento de fibroblasto (FGF-9) (Singla, Singla et al. 2015), receptor mieloide dos mineralocorticoides (Usher, Duan et al. 2010) e fator induzido por hipóxia (HIF) (Ikeda, Ichiki et al. 2013). Recentemente, um estudo *in vitro* verificou que os AGEs também têm o potencial de induzir a polarização, em direção ao perfil M1 (Jin, Yao et al. 2015). A hipótese deste trabalho é de que o mesmo ocorra *in vivo*, em um modelo experimental de IAM em que há uma substancial infiltração de macrófagos, e que isso contribua para o processo de remodelamento cardíaco.

Dentro de todo esse contexto, considerando o importante papel dos AGEs sobre o processo inflamatório e as DCV, tem-se a necessidade de aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação dos AGEs com os macrófagos, e suas consequências para o sistema cardiovascular.

3. JUSTIFICATIVA

O remodelamento cardíaco é o maior determinante para sobrevida depois do IAM, e têm sido fortemente associado com desfechos clínicos em numerosos estudos clínicos de IC. Além disso, apesar de todos os esforços no seu manejo clínico, com o declínio da mortalidade através das terapias atuais, ela ainda apresenta uma alta taxa. Somado a isso, os elevados índices de hospitalização associados ao infarto e à IC, afetam imensamente a sociedade e a economia. Dessa maneira, a necessidade de aprofundar a compreensão do processo biológico envolvido no desenvolvimento e na evolução dessa doença é urgente, de modo a auxiliar na busca de estratégias alternativas para seu tratamento.

A modulação do balanço pró/anti-inflamatório é um alvo terapêutico potencial, visto que a resposta disparada pelo estímulo isquêmico pode ser determinante no remodelamento patológico após IAM. Somada a essa questão, questiona-se o papel dos AGEs na modulação da polarização de macrófagos M1 e M2, justificado pelo fato dos inúmeros trabalhos clínicos que sustentam a associação entre AGEs e IC e a conhecida contribuição dessas moléculas para o processo de remodelamento cardíaco.

4. HIPÓTESES

- A elevação do MGO induz a polarização de macrófagos com o fenótipo M1 e está associado à piora do remodelamento cardíaco após o IAM.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Determinar a influência dos AGEs na modulação da polarização dos macrófagos (M1 ou M2), após o infarto agudo do miocárdio.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar se o aumento artificial de AGEs, com o uso de um agente glicante, é capaz de exercer efeito sobre a polarização dos macrófagos cardíacos.
- Determinar se a inibição dos AGEs endógenos é capaz de modificar a polarização dos macrófagos.
- Determinar o perfil de citocinas no tecido cardíaco de ratos submetidos ao IAM.

6. REFERÊNCIAS

- Alanova, P., A. Chytilova, et al. (2017). "Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia." J Appl Physiol (1985) **122**(6): 1452-1461.
- Anderson, J. L. and D. A. Morrow (2017). "Acute Myocardial Infarction." N Engl J Med **376**(21): 2053-2064.
- Azevedo, P. S., B. F. Polegato, et al. (2016). "Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment." Arg Bras Cardiol **106**(1): 62-69.
- Benjamin, E. J., M. J. Blaha, et al. (2017). "Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **135**(10): e146-e603.
- Blackburn, N. J. R., B. Vulesevic, et al. (2017). "Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction." Basic Res Cardiol **112**(5): 57.
- Cao, W., J. Chen, et al. (2014). "Advanced glycation end products promote heart failure through inducing the immune maturation of dendritic cells." Appl Biochem Biotechnol **172**(8): 4062-4077.
- Chen-Scarabelli, C., L. Saravolatz, et al. (2015). "Dilemmas in end-stage heart failure." J Geriatr Cardiol **12**(1): 57-65.
- Chytilova, A., G. H. Borchert, et al. (2015). "Tumour necrosis factor-alpha contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia." Acta Physiol (Oxf) **214**(1): 97-108.
- Cohen, M. P., F. N. Ziyadeh, et al. (2002). "Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta1." Kidney Int **61**(6): 2025-2032.
- Courties, G., T. Heidt, et al. (2014). "In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing." J Am Coll Cardiol **63**(15): 1556-1566.
- CVDs, O. W. C. d. (2017).
- D'Elia, N., J. D'Hooge, et al. (2015). "Association Between Myocardial Mechanics and Ischemic LV Remodeling." JACC Cardiovasc Imaging **8**(12): 1430-1443.
- DATASUS. (2014). "Estatísticas Vitais." from <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937>.
- Deuse, T., J. Guilhaire, et al. (2017). "Macrophages Infiltration Is Associated with Maladaptive Remodeling of the Right Ventricle in an Experimental Model of Pulmonary Hypertension." The Thoracic and Cardiovascular Surgeon **65**(S01): S1-S110.
- Dhar, A., K. M. Desai, et al. (2010). "Alagebrium attenuates acute methylglyoxal-induced glucose intolerance in Sprague-Dawley rats." Br J Pharmacol **159**(1): 166-175.
- Dhar, A., I. Dhar, et al. (2011). "Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats." Diabetes **60**(3): 899-908.
- Dhar, A., M. P. Udumula, et al. (2016). "Pharmacological evaluation of novel alagebrium analogs as methylglyoxal scavengers in vitro in cardiac myocytes and in vivo in SD rats." Int J Cardiol **223**: 581-589.
- Fan, X., R. Subramaniam, et al. (2003). "Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7 cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor kappaB and intracellular reactive oxygen species formation." Arch Biochem Biophys **409**(2): 274-286.
- Fernando, L., S. Pamela, et al. (2014). "Cardiovascular disease in Latin America: the growing epidemic." Prog Cardiovasc Dis **57**(3): 262-267.

- Fishbein, M. C., D. Maclean, et al. (1978). "Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution." Am J Pathol **90**(1): 57-70.
- Frangogiannis, N. G. (2014). "The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling." Nat Rev Cardiol **11**(5): 255-265.
- Funk, C. D. and G. A. FitzGerald (2007). "COX-2 inhibitors and cardiovascular risk." J Cardiovasc Pharmacol **50**(5): 470-479.
- Glass, C. K. and G. Natoli (2016). "Molecular control of activation and priming in macrophages." Nat Immunol **17**(1): 26-33.
- Glycadia, S. (2007). "Phase 1 Study of Anti-glycation Agent GLY-230 in Healthy Subjects." ClinicalTrials.gov.
- Gombozhapova, A., Y. Rogovskaya, et al. (2017). "Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling." J Biomed Sci **24**(1): 13.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Hartog, J. W., A. A. Voors, et al. (2007). "Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications." Eur J Heart Fail **9**(12): 1146-1155.
- Hearse, D. J. and F. J. Sutherland (2000). "Experimental models for the study of cardiovascular function and disease." Pharmacol Res **41**(6): 597-603.
- Hegab, Z., S. Gibbons, et al. (2012). "Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease." World J Cardiol **4**(4): 90-102.
- Hegarová, M. and I. Málek (2013). "Possibilities of influencing the myocardial remodeling." Cor et Vasa **55**(4): e355-e363.
- Heimburger, R. F. (1946). "Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat." Arch Surg **52**: 677-689.
- Heymans, S., E. Hirsch, et al. (2009). "Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology." Eur J Heart Fail **11**(2): 119-129.
- Hirst, J. A., J. Howick, et al. (2014). "The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews." PLoS One **9**(6): e98856.
- Hochman, J. S. and B. H. Bulkley (1982). "Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study." Circulation **65**(7): 1446-1450.
- Hulsmans, M., F. Sam, et al. (2016). "Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling." J Mol Cell Cardiol **93**: 149-155.
- Hume, D. A. (2015). "The Many Alternative Faces of Macrophage Activation." Front Immunol **6**: 370.
- Ikeda, J., T. Ichiki, et al. (2013). "Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling." J Am Heart Assoc **2**(3): e000178.
- Inamdar, A. A. and A. C. Inamdar (2016). "Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization." J Clin Med **5**(7).
- Italiani, P. and D. Boraschi (2015). "New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory." Immune Netw **15**(4): 167-176.
- Jin, X., T. Yao, et al. (2015). "Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF-kappaB Pathway." Biomed Res Int **2015**: 732450.
- Johns, T. N. and B. J. Olson (1954). "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals." Ann Surg **140**(5): 675-682.
- Jung, M., Y. Ma, et al. (2017). "IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation." Basic Res Cardiol **112**(3): 33.
- Kennedy, L., M. P. Solano, et al. (2010). "Anti-glycation and anti-albuminuric effects of GLY-230 in human diabetes." Am J Nephrol **31**(2): 110-116.

- Kolar, F. and B. Ostadal (1991). "Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension." Pflugers Arch **419**(2): 121-126.
- Kraakman, M. J., D. Dragoljevic, et al. (2016). "Is the risk of cardiovascular disease altered with anti-inflammatory therapies? Insights from rheumatoid arthritis." Clin Transl Immunology **5**(5): e84.
- Libby, P. (2012). "Inflammation in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(9): 2045-2051.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-1143.
- Lindsey, J. B., F. Cipollone, et al. (2009). "Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications." Diab Vasc Dis Res **6**(1): 7-14.
- Lindsey, M. L., J. J. Saucerman, et al. (2016). "Knowledge gaps to understanding cardiac macrophage polarization following myocardial infarction." Biochim Biophys Acta **1862**(12): 2288-2292.
- Listing, J., A. Strangfeld, et al. (2008). "Does tumor necrosis factor alpha inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis?" Arthritis Rheum **58**(3): 667-677.
- Liu, L. and H. J. Eisen (2014). "Epidemiology of heart failure and scope of the problem." Cardiol Clin **32**(1): 1-8, vii.
- Liu, W., X. Zhang, et al. (2015). "Activation in M1 but not M2 Macrophages Contributes to Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction in Rats: a Critical Role of the Calcium Sensing Receptor/NLRP3 Inflammasome." Cell Physiol Biochem **35**(6): 2483-2500.
- Mansur, A. P., D. Favarato, et al. (2001). "Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996." Arq Bras Cardiol **76**(6): 497-510.
- Martinez-Gonzalez, J. and L. Badimon (2007). "Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks." Curr Pharm Des **13**(22): 2215-2227.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.
- McAlindon, E., C. Bucciarelli-Ducci, et al. (2015). "Infarct size reduction in acute myocardial infarction." Heart **101**(2): 155-160.
- Metra, M. and J. R. Teerlink (2017). "Heart failure." Lancet **390**(10106): 1981-1995.
- Mills, C. D., K. Kincaid, et al. (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-6173.
- Miyata, T. and C. van Ypersele de Strihou (2003). "Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation." Arch Biochem Biophys **419**(1): 50-54.
- Murray, P. J., J. E. Allen, et al. (2014). "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines." Immunity **41**(1): 14-20.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nagai, R., C. M. Hayashi, et al. (2002). "Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins." J Biol Chem **277**(50): 48905-48912.
- Nahrendorf, M. and F. K. Swirski (2013). "Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart." Circ Res **112**(12): 1624-1633.
- Nahrendorf, M. and F. K. Swirski (2016). "Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function." Circ Res **119**(3): 414-417.
- Neckar, J., B. Ostadal, et al. (2004). "Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery." Physiol Res **53**(6): 621-628.

- Nedic, O., S. I. Rattan, et al. (2013). "Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology." Free Radic Res **47 Suppl 1**: 28-38.
- Neviere, R., Y. Yu, et al. (2016). "Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions." Glycoconj J **33**(4): 607-617.
- Opie, L. H., P. J. Commerford, et al. (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet **367**(9507): 356-367.
- Pazos-Lopez, P., J. Peteiro-Vazquez, et al. (2011). "The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure." Vasc Health Risk Manag **7**: 237-254.
- Perrin, S. (2014). "Preclinical research: Make mouse studies work." Nature **507**(7493): 423-425.
- Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, et al. (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." Circ Res **44**(4): 503-512.
- Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, et al. (1985). "Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril." Circulation **72**(2): 406-412.
- Ramasamy, R., S. J. Vannucci, et al. (2005). "Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation." Glycobiology **15**(7): 16R-28R.
- Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodino-Janeiro, et al. (2012). "Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report." Cardiovasc Diabetol **11**: 102.
- Ridker, P. M. and T. F. Luscher (2014). "Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease." Eur Heart J **35**(27): 1782-1791.
- Rosamond, W. D. and A. Johnson (2017). "Trends in Heart Failure Incidence in the Community: A Gathering Storm." Circulation **135**(13): 1224-1226.
- Sanchis-Gomar, F., C. Perez-Quilis, et al. (2016). "Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome." Ann Transl Med **4**(13): 256.
- Setoguchi, S., S. Schneeweiss, et al. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha antagonist use and heart failure in elderly patients with rheumatoid arthritis." Am Heart J **156**(2): 336-341.
- Shimizu, I. and T. Minamino (2016). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **97**: 245-262.
- Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.
- Singh, V. P., A. Bali, et al. (2014). "Advanced glycation end products and diabetic complications." Korean J Physiol Pharmacol **18**(1): 1-14.
- Singla, D. K., R. D. Singla, et al. (2015). "Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart." PLoS One **10**(3): e0120739.
- Siqueira, A. S. E., A. G. Siqueira-Filho, et al. (2017). "Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil." Arq Bras Cardiol **109**(1): 39-46.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Sutton, M. G. and N. Sharpe (2000). "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy." Circulation **101**(25): 2981-2988.
- Troidl, C., H. Mollmann, et al. (2009). "Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction." J Cell Mol Med **13**(9B): 3485-3496.
- Tugal, D., X. Liao, et al. (2013). "Transcriptional control of macrophage polarization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(6): 1135-1144.

- Urata, Y., M. Yamaguchi, et al. (2002). "Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages." Free Radic Biol Med **32**(8): 688-701.
- Usher, M. G., S. Z. Duan, et al. (2010). "Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice." J Clin Invest **120**(9): 3350-3364.
- van Zoelen, M. A., A. Achouiti, et al. (2011). "The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection." Crit Care **15**(2): 208.
- Vlassara, H., W. Cai, et al. (2002). "Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15596-15601.
- Wang, Y., T. Yang, et al. (2012). "Mathematical modeling and stability analysis of macrophage activation in left ventricular remodeling post-myocardial infarction." BMC Genomics **13 Suppl 6**: S21.
- Willemsen, S., J. W. Hartog, et al. (2012). "The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction." Am Heart J **164**(5): 742-749 e743.
- Xu, W. Q., Z. Yu, et al. (2011). "Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats." Basic Res Cardiol **106**(3): 329-342.
- Xue, J., S. V. Schmidt, et al. (2014). "Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation." Immunity **40**(2): 274-288.
- Yamagishi, S., K. Nakamura, et al. (2008). "Inhibitors of advanced glycation end products (AGEs): potential utility for the treatment of cardiovascular disease." Cardiovasc Ther **26**(1): 50-58.
- Zhang, F., G. Banker, et al. (2011). "The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production." J Surg Res **171**(2): 871-876.
- Zhou, D., K. Yang, et al. (2017). "Promising landscape for regulating macrophage polarization: epigenetic viewpoint." Oncotarget **8**(34): 57693-57706.

7. ARTIGO 1

Methylglyoxal increases fibrosis and is related to M2 macrophage phenotype in an animal model of myocardial infarction

Juliana Oliveira Rangel^{1,2}, Bianca de Moraes Fracasso^{1,2}, Alessandra Gonçalves Machado^{1,2}, Niara da Silva Medeiros^{1,2}, Daniel Lucas Sturza Caetano^{1,3}, Fernanda Curuja^{1,4}, Fernanda Ben^{1,4}, Nadine Clausell^{1,2}, Michael Andrades^{1,2}

1 – Cardiovascular Research Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

2 – Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 – Student graduate in Biomedicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

4 – Student graduate in Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Michael Andrades

Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

E-mail: meandrades@hcpa.edu.br

Abstract

Methylglyoxal (MGO) circulating levels are increased during diabetes, myocardial infarction, and in inflammatory diseases. It is a highly reactive small carbonyl that generates Advanced Glycation End-products (AGEs), a class of molecules associated with inflammatory signaling and heart failure in clinical studies. Anti-AGEs drugs, such as aminoguanidine (AMG), have been employed in experimental setting with limited success. Despite this, data regarding the impact of *in vivo* increased MGO levels on inflammation during a myocardial infarction (MI) are insufficient. Here, we investigated if the MGO administration *in vivo* would change myocardial macrophage polarization and heart remodeling for up to 10 days. Sixty-eight male Wistar rats (90 days old) were randomly allocated in the following groups: sham, MI, MI + MGO, MI + AMG. Different sets of animals were followed by 2, 6, and 10 days. Cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α , and IL-10) were analyzed in cardiac homogenates and an increase of 65% could be seen in IL-6 levels in MGO-treated group at day 6. However, MRC1 expression, a marker of M2 macrophage increased 2-fold, indicating a slight M2 profile. Accordingly, increase of 51% in cardiac fibrosis was detected in MG-treated animals, despite no changes in cardiac chambers could be seen. The AMG did not protect against M2 profile or cardiac fibrosis. Our results suggest that MGO could predispose macrophages toward M2 phenotype and augment fibrosis after an MI event.

Introduction

The massive death of cardiomyocytes caused by acute myocardial infarction (MI) results in a sterile inflammatory process and a cascade of biochemical intracellular signaling processes that triggers reparative changes, which include dilatation, hypertrophy, and fibrosis. This cardiac remodeling will induce the heart to a progressive fail and may lead to the development of heart failure (HF), which is associated with significant morbidity and mortality (Cohn, Ferrari et al. 2000; Opie, Commerford et al. 2006; Frangogiannis 2014).

The inflammatory process that takes place soon after MI will be initially coordinated by neutrophils, with macrophages being the second line of action against ischemia (Sager, Hulsmans et al. 2016). These macrophages have two opposing phenotypes: the proinflammatory M1 (also known as classically activated) are known by secreting tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), expressing inducible nitric oxide synthase (iNOS), and producing reactive oxygen species (ROS); and the anti-inflammatory and angiogenic M2 (or alternatively activated), previously described as producers of TGF- β and VEGF and mannose receptor (MRC1) and arginase-1 expressing cells (Wang, Liang et al. 2014). This polarization plays a critical role in the clinical course of various conditions, and has been explored in studies involving cancer (Tariq, Zhang et al. 2017), kidney (Tian and Chen 2015), lung (Gharib, Johnston et al. 2014), and brain (Hu, Leak et al. 2015). After a MI, M1 phenotype starts occupying the tissue and is replaced by M2 phenotype about 5 days after (Troidl, Mollmann et al. 2009; Wang, Yang et al. 2012). Attempts in changing this balance were proven to be harmful to the organ (Jetten, Roumans et al. 2014; Schmidt, Strecker et al. 2017). However, there is a lack of understanding about the

importance of balancing the macrophages profiles in the heart and their possible contribution to post-MI cardiac remodeling.

Several factors can guide the polarization of macrophages and contributing to the cardiac remodeling (Krausgruber, Blazek et al. 2011; Singla, Singla et al. 2015; Tellechea, Buxade et al. 2018). Among them, a possible polarizing agent is the advanced glycation end-products (AGEs), molecules that may arise from diet or from the reaction of proteins with metabolic by products, such as glycolaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal (MGO) (Jin, Yao et al. 2015; Guo, Lin et al. 2016). These products exert their signaling functions mainly through the interaction with a class of receptors called RAGE, present in several cell types, including macrophages and cardiomyocytes (Lindsey, Cipollone et al. 2009; Donaldson, Taatjes et al. 2010). *In vitro* studies evaluating macrophages after incubation with AGEs have conflicting results regarding polarization to M1 or M2 phenotype (Jin, Yao et al. 2015; Son, Hwang et al. 2017). However, the effects of AGEs on macrophage polarization *in vivo* are still unknown in the setting of MI.

The relevance of AGEs in the cardiology field became clearer after anti-AGE molecules were first tested (Bakris, Bank et al. 2004). One prototype drug is aminoguanidine (AMG), widely used for proof-of-concept studies, which act as an aldehyde scavenger and prevents its binding to proteins through the Maillard reaction (Thornalley 2003).

Little is known about the interaction between AGEs, macrophages and cardiac remodeling. Thus, this study aimed to evaluate the role of AGEs in the polarization of cardiac macrophages against an ischemic insult, and its possible association with the processes of cardiac remodeling and if the use of an anti-

AGE agent is able to modulate this effect, attenuating the pathological remodeling that leads to the development of HF.

Methods

Animals

A total number of 172 male Wistar rats with 90 days-old (250–350 g) were randomized in two groups before surgery: SHAM or MI group. After two days, an echocardiography was realized and a new randomization was done with WinPepi software. It were ten randomized groups, sham, MI, MI + MGO, MI + AMG, each one with subgroups according to euthanasia time (2, 6, and 10 days) (Fig. 1). Myocardial infarctions were induced by permanent ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) under ketamine and xylazine anesthesia. Prior to thoracotomy, bupivacaine was also applied (1 mg/kg; i.m.) in the caudal ribs next to incision site. All animals received post-operative analgesia with tramadol (5 mg/kg, i.p.), 1 dose every 12 hours for one day and a half. Sham-operated animals underwent the same procedure except that no ligation was performed. Methylglyoxal administration (17 mg/kg, #M0252 Sigma-Aldrich) was carried out by intraperitoneal injection and aminoguanidine (0.5 g/L, #396494 Sigma-Aldrich) was given in drinking water. The hearts were divided into 2 areas: infarcted and remote, that were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C freezer, or put in 10% formaldehyde to histological analyses. All rats were housed under conditions with controlled temperature (22–25°C) and 12 h light/dark cycles; they were given standard chow and water ad libitum. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH

Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the Institutional Ethics Committee under the number 14-0272.

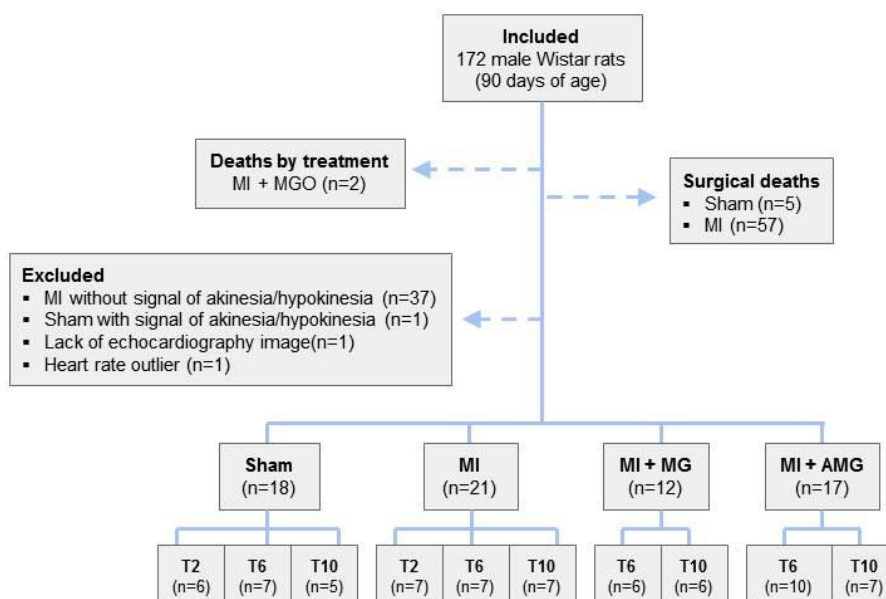


Figure 1. Animal inclusion and exclusion diagram. Previously to surgery, rats were randomized in sham or MI group. After an echocardiography 2 days post-surgery, a new randomization in 10 groups was performed, according to time of euthanasia. Deaths were recorded during treatment, surgery, and the procedure. The lack of akinesia or hypokinesia in the MI group or any evidence of these signs in sham group was used as exclusion criteria. Some losses occurred during the experimental procedures and the actual sample size for each analysis is presented in the figures legends.

Echocardiography

All rats were anaesthetized by isoflurane (3%, 0.5 L of O₂/min). Transthoracic echocardiography was performed using a HD7 Philips system with a 12-3 MHz linear transducer. We measured The infarct size (% MI), assessed by measuring the akinetic and/or hypokinetic portion (AHP) length of the ventricular walls and expressed as a percentage of the total perimeter of the endocardial contour (EP) in three transverse sections of LV (edges of the mitral valve, papillary muscles, and of apical region), using the formula: %MI = (AHP/EP) x 100. Ejection fraction (EF) was calculated by the formula: EF = (LV End Diastolic Diameter³ - LV End Systolic Diameter³/LV End Diastolic Diameter³) x 100, determined in the M-mode.

The investigator performing and reading the echocardiogram was blinded to the treatment allocation.

qPCR

Total cellular RNAs were extracted using Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. RNA integrity was analyzed on 1.5% agarose gel. RNA (1 µg) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA synthesis kit (Applied Biosystem, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Real time PCR array analysis was performed by using the probes TaqMan Rn00571654_m1 CD86 to M1, Rn01487342_m1 MRC1 to M2, Rn01495634_g1 CD68 to total macrophages, Rn00667869_m1 GAPDH as housekeeping gene. The standard PCR conditions consisted of: 94 °C for 5 min, 30 cycles of: 94 °C for 30 sec, annealing temperature for 30 sec, 72 °C for 1 min. A final 10-min extension at 72 °C was done at the end.

Western Blot

First, the total heart homogenate protein concentration was determined by Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006, Bio-Rad) using bovine serum albumin (#A9647, Sigma-Aldrich) as the standard. Protein was separated by 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. Then, protein was transferred to PVDF membranes (#IPVH000010, Merk-Millipore) and incubated with the antibodies anti-AGE 1:3000 (#AB9890, Millipore) and RAGE 1:1000 (#sc-5563, Santa Cruz Biotechnology). After washing with TTBS three times, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody. Color was developed on the bands using the Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP

Substrate (Millipore Corporation). Fluorescence was recorded in ImageQuant Imager LAS500 (Healthcare GE Life Sciences) and quantified by optical densitometry using ImageJ analysis software. The Coomassie staining was used as loading control (Welinder and Ekblad 2011).

Fibrosis staining

The medial heart slide (3 mm) was fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Then, a 3 μ m slice was incubated with a 0.1% Sirius Red solution dissolved in aqueous saturated picric acid for 1 hour, washed in acidified water (0.5% hydrogen chloride), dehydrated and mounted with DPX Mounting. Images were obtained from infarcted, remote and the interface areas (between scar and healthy tissue), in microscope (400x-fold). Quantitative evaluations red stained collagen fibers were performed using ImageJ software.

Luminex assay

Heart tissue from infarcted area was homogenized in buffer containing 50 mM Tris, pH 7.5, 1% Triton X-100 octoxynol, 1 mM PMSF, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate and 1 tablet of SigmaFast protease inhibitor cocktail. Protein was determined and 1 μ g was employed in the Luminex assay. Analytical kits were run accordingly to the manufacturer instructions (Life Technologies, # LRC0002M) and the kit was run in Luminex xMap system.

Results

Cytokine profile

M1 macrophages usually produce proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , and IL1- β , while M2 macrophages secrete predominantly anti-inflammatory cytokines such as IL-10. Levels of proinflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines were detected in heart homogenate from infarcted area at 3 different times (Fig. 1). When we analyzed just the MI group, we saw a slight proinflammatory profile at day 2 in this group compared to sham. Further, there was a reduction of proinflammatory cytokines at day 6 with an increase in IL-10 at day 10, in accordance with previous descriptions (Troidl, Mollmann et al. 2009). Analyzing the MGO group we found a slight increase on IL-6 and IL-10 levels in the 6th day compared to sham. Both MGO and AMG groups showed further increase in TNF- α at day 6.

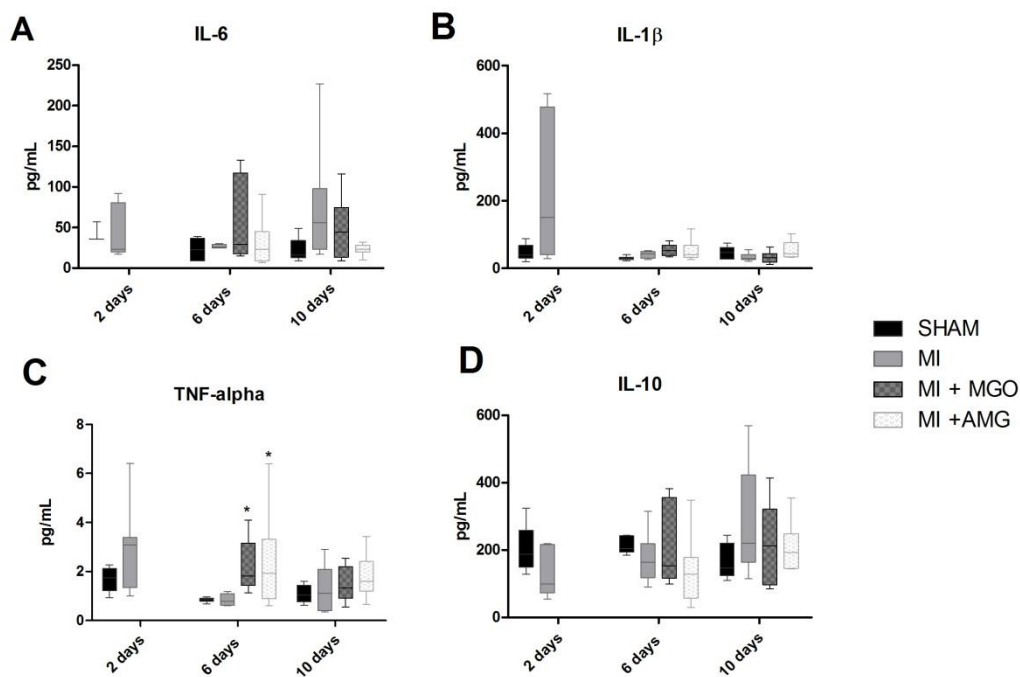


Figure 1. Cytokines levels in infarcted area of cardiac tissue. A-C) Pro-inflammatory cytokines related to M1 D) Anti-inflammatory cytokine related to M2. *p <0.05 compared to sham and MI, based on Kruskal Wallis with *post-hoc* Tukey test (n=3-8).

Macrophage polarization

As the cytokine profiling was not able to define the macrophage polarization in heart, we decided to measure molecular markers of M1-M2 phenotype by qPCR in heart tissue (remote and infarcted area). CD86 is a specific surface marker widely used to identify M1 macrophage while mannose receptor is a known marker for M2 phenotype. Figure 2C shows that MGO administration induced a M2 profile after 6 days, mainly because there was an increase in MRC1 expression rather than a decrease in CD86. However, in remote area the expression profile did not suggest a polarization. AMG-treated group showed no difference from MI group, which despite the increase in the total macrophage marker (CD68) no phenotype polarization occurred (Fig. 2).

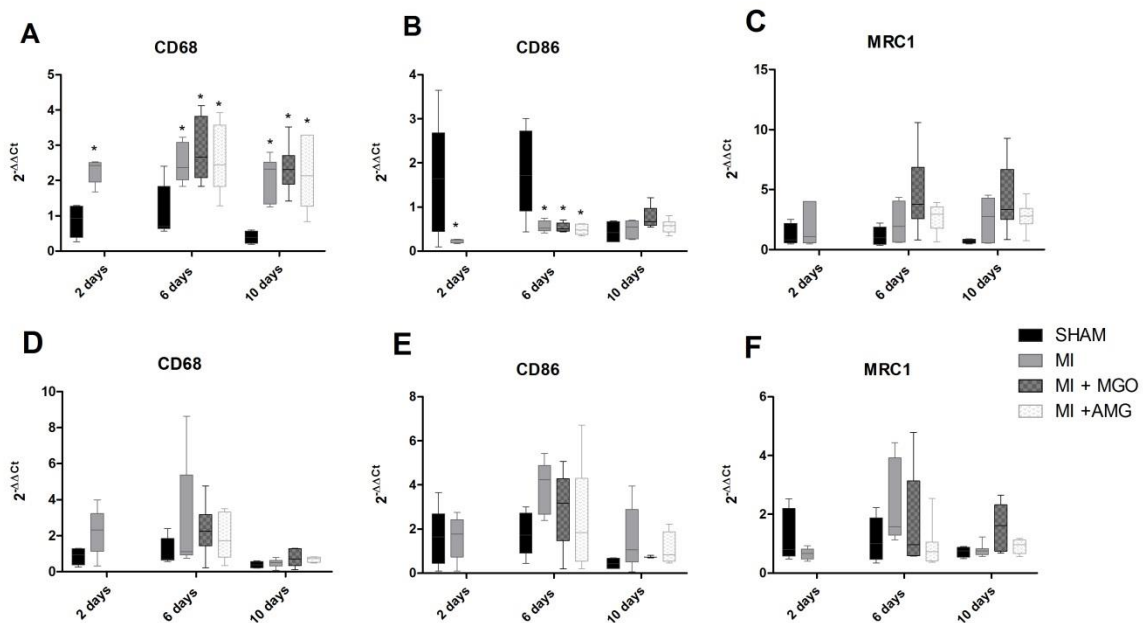


Figure 2. Gene expression of macrophages markers. Macrophages in infarcted area on the top: CD68 indicates total macrophages (A), whereas CD86 is an M1 phenotype marker (B) and MRC1 an M2 phenotype marker (C). Macrophages in remote area below (D-F). *p < 0.05 compared to sham, based on Kruskal Wallis with *post-hoc* Tukey test (n=4-8).

AGEs and RAGE expression

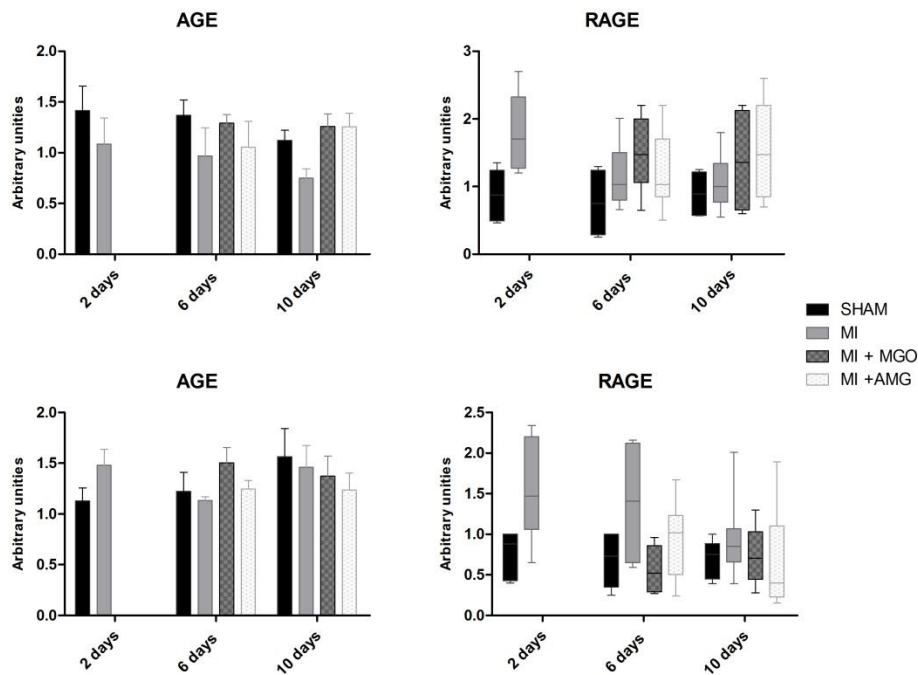


Figure 3. Cardiac levels of AGEs and RAGE. Infarcted area on the top (A and B). Remote area below (C and D). One-way ANOVA (n=4-8) (A and C). Kruskal Wallis (n=4-8) (B and D).

To examine the level of AGEs, we treated the animals with MG, the most important precursor of these molecules. The levels of AGEs and their receptor in heart tissue homogenate were also measured in infarcted and remote cardiac areas by western blotting. Although there was no difference in AGEs between the groups and at different times in both areas (Fig. 3A, 3C), in infarcted area it could be seen an upregulation of RAGE in the MI group until 6 days after infarction (Fig. 3B). In remote area, this difference also tends to stabilize in MI group on the tenth day after the ischemic event (Fig. 3D). Surprisingly, when we verified the groups treated with MGO and AMG in the infarcted area both appear with increased RAGE levels (Fig. 3B). In contrast, in the remote area both groups have similar levels of RAGE (Fig. 3D).

Fibrosis quantification

M2 macrophages have been implicated in fibrosis development. To assess whether MGO treatment was able to induce cardiac fibrosis, reflecting the polarization to M2 in this group, Picrosirius red staining was used. We could observe that fibrosis in the infarcted area begins to increase since 5 days after MI, being more pronounced in the 10th day. But between MI groups, no differences could be seen. In remote area, all groups presented similar fibrosis process, although sham group seems to show a slight increases compared to MI groups since the 6th day. In the transition cardiac region, from infarction to remote area, the difference between MI and sham became more evident only on the 10th day. Analyzing the MGO- and AMG-treated groups we could see a pronounced fibrosis increase in MGO group in the 6th day compared to MI group, and no difference in AMG group. However, when we analyzed the fibrosis process at day 10 all MI groups showed a similar increase compared to sham. Contrary to our expectations, it is remarkable that AMG had the same ability to induce fibrosis as MGO.

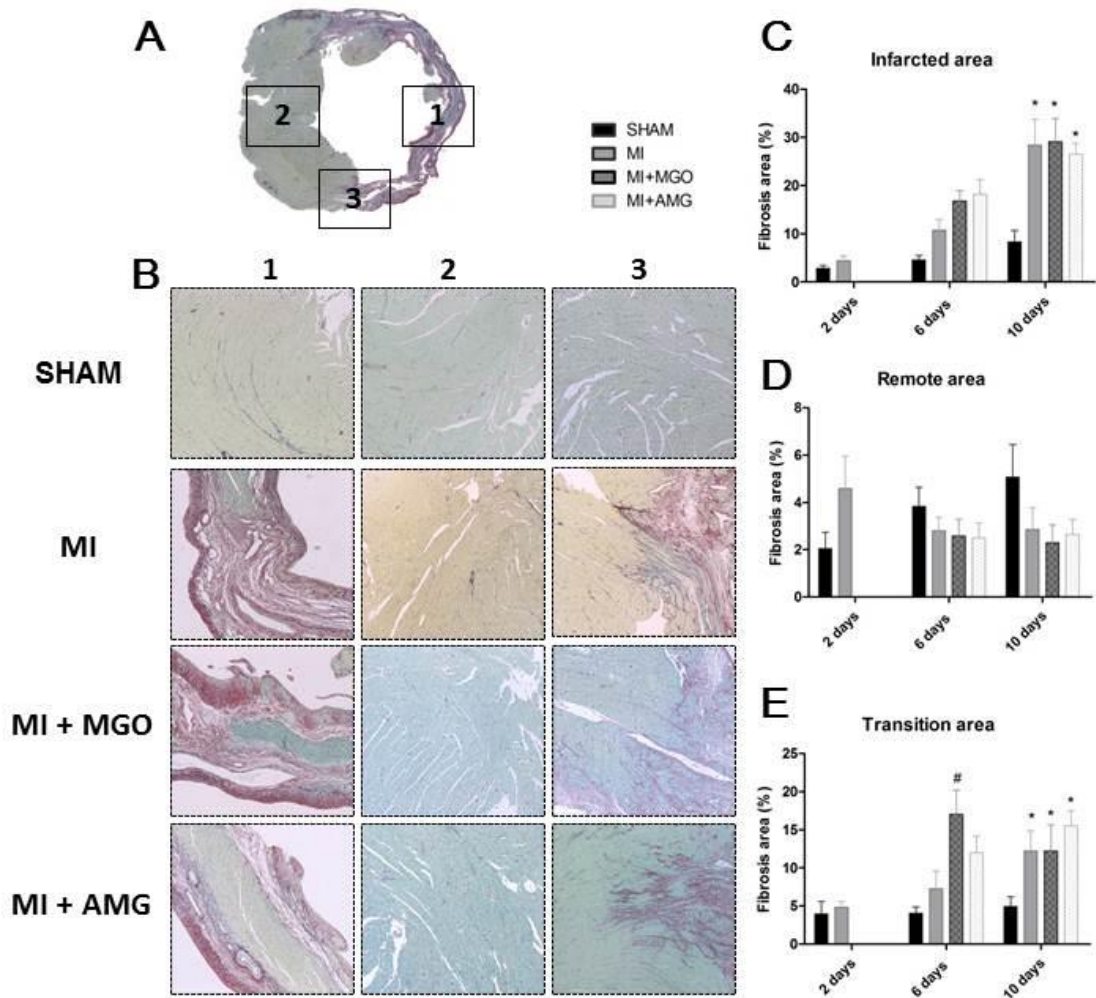


Figure 4. Fibrosis staining by Picrosirius Red. Medial heart slice showing areas for fibrosis measurement (A) Representative images of each area by group (B) Quantification by Image J software in infarct area (C), remote area (D) and transition area (E). * $p < 0.05$ compared to sham, # $p < 0.05$ compared to MI, one-way ANOVA with post-hoc LSD ($n=5-8$).

Echocardiography

To evaluate if treatments were able to alter the cardiac function an echocardiographic analysis was performed. Besides the expected differences between MI and sham, no differences were found between the MGO and AMG group.

Table 1. Echocardiographic variables in 10th day after MI.

Time after infarct	2 days		6 days				10 days			
	SHAM (n=18)	MI (n=20)	SHAM (n=12)	MI (n=13)	MI + MGO (n=12)	MI + AMG (n=15)	SHAM (n=5)	MI (n=7)	MI + MGO (n=6)	MI + AMG (n=7)
MI (%)	0	36 (1.9)	0	38 (2.3)	38 (2.6)	35 (2.0)	0	37 (2.9)	32 (4.9)	42 (2.8)
EF (%)	89 (1.3)	49* (2.9)	89 (1.8)	47* (3.6)	47* (3.9)	47* (3.1)	85 (2.6)	44* (6.2)	49* (5.2)	45* (4.9)
FS (%)	54 (1.8)	21* (1.6)	53 (2.6)	20* (1.9)	20* (2.1)	19* (1.6)	48 (3.2)	18* (2.9)	21* (2.8)	18* (2.3)
LVEDD (mm)	3.2 (0.2)	5.8* (0.2)	3.3 (0.2)	6.7* (0.1)	6.7* (0.3)	6.5* (0.2)	3.8 (0.4)	7.1* (0.4)	6.9* (0.4)	7.1* (0.3)
LVEDD (mm)	6.8 (0.2)	7.3 (0.1)	7 (0.2)	8.4* (0.1)	8.3* (0.2)	8* (0.1)	7.4 (0.3)	8.7* (0.2)	8.6* (0.2)	8.7* (0.2)
HR (bpm)	397 (5.8)	415 (5.6)	397 (2.6)	396 (6.2)	381 (13.7)	399 (4.3)	387 (7.8)	406 (5.9)	408 (7.3)	407 (8.5)

Results are expressed as mean and standard error. EF (Ejection Fraction), FS (Fractional Shortening), LVEDD (Left Ventricle End-Systolic Diameter), LVEDD (Left Ventricle End-Diastolic Diameter). One-way ANOVA with *post-hoc* test Bonferroni. *p<0.05. compared to SHAM

Discussion

A lack of consensus still exists regarding the role of AGEs on the macrophage polarization in *in vitro* research. This study was the first one to test this hypothesis in a model of MI. Here we have shown that MGO promotes a slight increase in RAGE expression and in macrophage polarization toward M2 phenotype when administered prior to the MI.

Macrophages exhibit functional heterogeneity and are didactically differentiated into M1 and M2. The main characteristics of M1 macrophages are the upregulated expression of CD86 and CD11c, proinflammatory mediators, such as IL-6, IL-1 β , TNF- α , and iNOS. On the other hand, M2 macrophages are characterized by MRC1, CD163, Arginase 1 (Arg1) expression and secretion of anti-inflammatory cytokines including TGF- β and IL-10 (Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). In this study, the administration of 17 mg/kg/day of MGO for 8 days after MI surgery did not change expressively the tissue levels of IL-6, IL-1 β , and IL-10 but gene expression markers showed a trend to a M2 profile. In a similar way, RAGE seems to be necessary to induce M2 phenotype in an *in*

vivo model of lung fibrosis (Badke, Lee et al. 2017). However, *in vitro* studies have shown an opposite effect, with macrophages polarizing to an M1 phenotype in the presence of AGEs (Juraneck, Geddis et al. 2013; Jin, Yao et al. 2015; Guo, Lin et al. 2016). Thus, although the expression of AGE and RAGE have already been directly associated with macrophage polarization (Jin, Yao et al. 2015; Khan, Schultz et al. 2016), it is observed that this interaction is not yet well understood, varying according to factors such as microenvironmental stimulus, disease studied, macrophages source, and interaction with other type of cells.

Due to the lack of more conclusive findings on macrophage polarization in this study, we verified whether the administration of MGO effectively increased AGEs. AGEs derived from MGO have already been associated with adverse remodeling and functional loss of the heart after MI. Thus, MGO may represent a novel target for preventing damage and improving function of the infarcted heart (Blackburn, Vulesevic et al. 2017). Unfortunately, no change in AGE levels was observed in our study, all groups were similar to control. One explanation is that the anti-AGE antibody used in this work (#AB9890, Millipore) was generated from glycolaldehyde (GA)-modified protein. However, the expected protein modification to be found is hydroimidazolone (MG-H1) (Zhao, Le et al. 2017), accounting for approximately 90% of all adducts (Rabbani and Thornalley 2012). Blackburn (2017) described an increase in MG-H1 as soon as 6 hours after MI, whereas no increase could be seen in N-(ϵ)-carboxyethyllysine (CEL) or N-(ϵ)-carboxymethyllysine (CML) (Blackburn, Vulesevic et al. 2017). This way, in spite of not detecting increase in AGE, we cannot rule out that other glycated species are increased.

Analysis of cardiac function by echocardiography showed no differences between AMG and MGO groups compared to MI. The analyses of fibrosis process revealed a gradual increase among all MI groups, mainly in infarcted and transition areas. In the transition area we also could observe a important increase in MGO group at the 6th day compared to MI. Studies show that MGO has been associated with the fibrosis stimulus (Onishi, Akimoto et al. 2014; Nagai, Doi et al. 2016). In the 10th all MI groups showed the same increase in fibrosis compared to sham, even the AMG group. This AMG's action on collagen deposition was unexpected, because the scientific literature associates this drug with anti-fibrotic effects (Parthasarathy, Gopi et al. 2014). The short follow up may have been insufficient to see more evident results as heart remodeling peaks 10 days after the MI (Fishbein, Maclean et al. 1978).

This study had some limitations. The first one was the lack of a specific antibody for detection of MGO-modifiable AGEs, which limited a more conclusive answer to our research question. Furthermore, an additional methodology to assess macrophage polarization, such as confocal microscopy, would be desirable.

In conclusion, we demonstrated that MGO administration promotes macrophage polarization toward the M2 phenotype in the heart after an MI, with an increase in fibrosis deposition. Our study give new insight into the knowledge of macrophage polarization under the stimulus of glycant molecules, contributing with additional data *in vivo* studies which still are limited in this area.

References

- Badke, A., J. Lee, et al. (2017). "The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Influences Macrophage Polarization." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **195**: A3278.
- Bakris, G. L., A. J. Bank, et al. (2004). "Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process." *Am J Hypertens* **17**(12 Pt 2): 23S-30S.
- Blackburn, N. J. R., B. Vulesevic, et al. (2017). "Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction." *Basic Res Cardiol* **112**(5): 57.
- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." *J Am Coll Cardiol* **35**(3): 569-582.
- Dhar, A., I. Dhar, et al. (2011). "Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats." *Diabetes* **60**(3): 899-908.
- Donaldson, C., D. J. Taatjes, et al. (2010). "Combined immunoelectron microscopic and computer-assisted image analyses to detect advanced glycation end-products in human myocardium." *Histochem Cell Biol* **134**(1): 23-30.
- Fishbein, M. C., D. Maclean, et al. (1978). "Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution." *Am J Pathol* **90**(1): 57-70.
- Frangogiannis, N. G. (2014). "The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling." *Nat Rev Cardiol* **11**(5): 255-265.
- Gharib, S. A., L. K. Johnston, et al. (2014). "MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis." *J Leukoc Biol* **95**(1): 9-18.
- Gombozhapova, A., Y. Rogovskaya, et al. (2017). "Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling." *J Biomed Sci* **24**(1): 13.
- Guo, Y., C. Lin, et al. (2016). "AGEs Induced Autophagy Impairs Cutaneous Wound Healing via Stimulating Macrophage Polarization to M1 in Diabetes." *Sci Rep* **6**: 36416.
- Hu, X., R. K. Leak, et al. (2015). "Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair." *Nat Rev Neurol* **11**(1): 56-64.
- Jetten, N., N. Roumans, et al. (2014). "Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses." *PLoS One* **9**(7): e102994.
- Jin, X., T. Yao, et al. (2015). "Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF-kappaB Pathway." *Biomed Res Int* **2015**: 732450.
- Juranek, J. K., M. S. Geddis, et al. (2013). "RAGE deficiency improves postinjury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice." *Diabetes* **62**(3): 931-943.
- Khan, M. A., S. Schultz, et al. (2016). "Hyperglycemia in Stroke Impairs Polarization of Monocytes/Macrophages to a Protective Noninflammatory Cell Type." *J Neurosci* **36**(36): 9313-9325.
- Krausgruber, T., K. Blazek, et al. (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nat Immunol* **12**(3): 231-238.
- Lindsey, J. B., F. Cipollone, et al. (2009). "Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications." *Diab Vasc Dis Res* **6**(1): 7-14.
- Nagai, T., S. Doi, et al. (2016). "Linagliptin Ameliorates Methylglyoxal-Induced Peritoneal Fibrosis in Mice." *PLoS One* **11**(8): e0160993.
- Onishi, A., T. Akimoto, et al. (2014). "Peritoneal fibrosis induced by intraperitoneal methylglyoxal injection: the role of concurrent renal dysfunction." *Am J Nephrol* **40**(4): 381-390.

- Opie, L. H., P. J. Commerford, et al. (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet **367**(9507): 356-367.
- Parthasarathy, A., V. Gopi, et al. (2014). "Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs." Life Sci **118**(1): 15-26.
- Rabbani, N. and P. J. Thornalley (2012). "Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome." Amino Acids **42**(4): 1133-1142.
- Sager, H. B., M. Hulsmans, et al. (2016). "Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure." Circ Res **119**(7): 853-864.
- Schmidt, A., J. K. Strecker, et al. (2017). "Targeting Different Monocyte/Macrophage Subsets Has No Impact on Outcome in Experimental Stroke." Stroke **48**(4): 1061-1069.
- Singla, D. K., R. D. Singla, et al. (2015). "Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart." PLoS One **10**(3): e0120739.
- Son, S., I. Hwang, et al. (2017). "Advanced glycation end products impair NLRP3 inflammasome-mediated innate immune responses in macrophages." J Biol Chem **292**(50): 20437-20448.
- Tariq, M., J. Zhang, et al. (2017). "Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer." J Cell Biochem **118**(9): 2484-2501.
- Tellechea, M., M. Buxade, et al. (2018). "NFAT5-Regulated Macrophage Polarization Supports the Proinflammatory Function of Macrophages and T Lymphocytes." J Immunol **200**(1): 305-315.
- Thornalley, P. J. (2003). "Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts." Arch Biochem Biophys **419**(1): 31-40.
- Tian, S. and S. Y. Chen (2015). "Macrophage polarization in kidney diseases." Macrophage (Houst) **2**(1).
- Troidl, C., H. Mollmann, et al. (2009). "Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction." J Cell Mol Med **13**(9B): 3485-3496.
- Wang, N., H. Liang, et al. (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." Front Immunol **5**: 614.
- Wang, Y., T. Yang, et al. (2012). "Mathematical modeling and stability analysis of macrophage activation in left ventricular remodeling post-myocardial infarction." BMC Genomics **13 Suppl 6**: S21.
- Welinder, C. and L. Ekblad (2011). "Coomassie staining as loading control in Western blot analysis." J Proteome Res **10**(3): 1416-1419.
- Zhao, D., T. T. Le, et al. (2017). "Effect of glycation derived from alpha-dicarbonyl compounds on the in vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin: A model study with glyoxal, methylglyoxal and butanedione." Food Res Int **102**: 313-322.

CAPÍTULO 2

Avaliação da polarização de macrófagos em um modelo adaptativo de hipertrofia do ventrículo direito.

RESUMO

Os macrófagos são ativos participantes do remodelamento cardíaco, seja depois de um estímulo adaptativo ou mal-adaptativo. Eles participam principalmente através de secreção de citocinas, fatores de crescimento, e fagocitose de restos celulares. A maior parte do conhecimento sobre o papel dos macrófagos no remodelamento do miocárdio vem de estudos com ventrículo esquerdo (VE) e pouco se sabe sobre o remodelamento do ventrículo direito (VD). A exposição crônica ao ambiente de hipóxia crônica desencadeia uma hipertrofia adaptativa similar a que ocorre com a prática de atividade física, moradia em grandes altitudes e gravidez. No entanto, o papel dos macrófagos nesse cenário ainda é desconhecido. O objetivo desse estudo foi investigar a polarização de macrófagos no VD e seus efeitos subjacentes depois de um estímulo hipertrófico adaptativo. Para isso, ratos *Wistar* machos adultos (n=8) foram expostos à hipóxia crônica contínua (10% oxigênio) por 4 semanas. Ratos controle (n=8) foram mantidos em condições ambientais padrão. A hipóxia estimulou a hipertrofia do VD em 274% e a infiltração de macrófagos em 42%. Entretanto, nenhuma polarização para M1 ou M2 foi observada. Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 não foram modificados no VD hipertrofiado, mas houve uma redução de TGF- β (62%) e fibrose (20%), quando comparado aos ratos normóxicos. Assim, mesmo com o aumento de macrófagos no VD de ratos expostos à hipóxia, não houve polarização de macrófagos. Apesar disso, se verificou uma redução da fibrose cardíaca. Essas mudanças podem contribuir para o remodelamento adaptativo e provavelmente são diferentes quando respondem a estímulos mal-adaptativos.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Importância clínica do ventrículo direito

Por muito tempo a fisiopatologia do VD é restrita a padrões extrapolados a partir de estudos referentes ao VE, sugerindo que a bomba VD possa estar sendo negligenciada, apesar de os dois ventrículos diferirem intensamente em sua embriologia, geometria e fisiologia (Guihaire, Noly et al. 2015). A adaptação do VD à doença é complexa e depende de muitos fatores. Os mais importantes parecem ser o tipo e a severidade da injúria ou estresse miocárdico, o tempo de curso do evento (agudo ou crônico), e o momento do início do processo patológico (nascimento, infância ou idade adulta). Outros fatores importantes podem incluir a ativação neuro-hormonal, expressão gênica alterada, e o padrão do remodelamento ventricular. Entretanto, cada vez mais o VD tem recebido a merecida atenção por parte da comunidade médica, uma vez que está associado como fator prognóstico na insuficiência cardíaca esquerda (Haddad, Doyle et al. 2008, Guihaire, Noly et al. 2015).

A insuficiência cardíaca direita (ICD) está comumente associada à disfunção ventricular esquerda. Entre outros fatores menos frequentes que podem afetar o VD encontram-se: displasias arritmogênicas do VD, doença cardíaca congênita e doença respiratória crônica (Voelkel, Quaife et al. 2006). Na hipertensão pulmonar (HP), a causa mais comum de ICD, o dano vascular pulmonar irá inevitavelmente afetar toda unidade cardiopulmonar. Ao longo das últimas duas décadas, a disfunção do VD tem sido considerada como fator determinante para os desfechos de longo-prazo em pacientes com HP, sendo diretamente associada à taxa de sobrevida e mais importante do que a

hemodinâmica pulmonar em si (Haddad, Doyle et al. 2008). Em estudos envolvendo variáveis hemodinâmicas e sobrevida na HP, uma média alta das pressões do átrio direito e reduzido débito cardíaco são consistentemente associados com menor sobrevida. Adicionalmente, a HP é um fator de risco para mortalidade em transplantados cardíacos, devido à elevada taxa de falência do VD no pós-operativo (Klotz, Wenzelburger et al. 2006; McLaughlin, Archer et al. 2009). Apesar de haver melhorias na administração farmacológica ao longo dos últimos anos, pacientes com HP ainda morrem de ICD (Guihaire, Bogaard et al. 2013; Guihaire, Noly et al. 2015).

1.2 Hipertrofia do VD: modelo adaptativo *versus* mal-adaptativo

Muitos modelos experimentais de ICD têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos, fornecendo um maior conhecimento da fisiopatologia do VD. Mecanismos envolvidos na transição da hipertrofia adaptativa para o remodelamento mal adaptativo em condições de pressão crônica do VD ou sobrecarga de volume são de grande interesse, porém ainda pouco compreendidos (Guihaire, Bogaard et al. 2013; Guihaire, Noly et al. 2015). A hipóxia crônica tem sido usada comumente para induzir hipertensão pulmonar em uma ampla variedade de espécies animais, especialmente em roedores. Este modelo adaptativo, altamente reproduzível, leva a um significativo enrijecimento das grandes artérias pulmonares com consequente hipertrofia do VD, de maneira a compensar a sobrecarga (Kolar and Ostadal 1991). Neste modelo, a hipertrofia adaptativa é observada em cerca de 2-3 semanas. Esse remodelamento é comparável ao visto com a prática de exercício físico, na gravidez e moradia em grandes altitudes, e é reversível após cessar o estímulo

(Shimizu and Minamino 2016). Entre essas situações, a hipóxia crônica e a atividade física têm recebido atenção crescente pelos seus efeitos cardioprotetores após IAM ou injúria de isquemia-reperusão. Essa proteção é associada com uma melhora da função cardíaca, redução da fibrose miocárdica (Xu, Yu et al. 2011), e menor tamanho de infarto, mesmo após 5 semanas sem o estímulo (Neckar, Ostadal et al. 2004).

Outro modelo bastante conhecido, porém considerado mal-adaptativo, é o da monocrotalina (MCT), um alcaloide presente em sementes de plantas leguminosas da espécie *Crotalaria spectabilis*. Os ratos parecem ser os melhores candidatos para esse modelo, apresentando uma hipertrofia progressiva do VD dentro de aproximadamente 12 dias após uma única injeção subcutânea de MCT (Schultze and Roth 1998). A disfunção do VD leva cerca de mais 3-4 semanas, e a severidade depende principalmente da dose administrada, variando de 30 mg/Kg a 80 mg/Kg. Um resumo das características desses dois modelos pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1. Comparação de modelos de hipertrofia adaptativa e mal-adaptativa do ventrículo direito (adaptado de Guihaire 2013).

Modelo	Sobrecarga do VD	Remodelamento do VD	Toxicidade miocárdica	Reversibilidade da sobrecarga do VD
Hipóxia	Crônica	Adaptativa (4 semanas)	Isquemia	Espontaneamente
Monocrotalina (MCT)	Crônica	Mal adaptativa (3 semanas)	Miocardite + dano coronário	Após terapia específica para HP

1.3 Inflamação no VD

Atualmente, a inflamação é reconhecida como importante colaboradora no remodelamento cardíaco (Frangogiannis 2014) e na patogênese da ICD (Mathew 2010; Schermuly, Ghofrani et al. 2011; Groth, Vrugt et al. 2014; Bello-Klein, Mancardi et al. 2017), sendo estudada nos pulmões (Hashimoto-Kataoka, Hosen et al. 2015) e no tecido vascular (El Kasmi, Pugliese et al. 2014). Um tipo celular crucial na coordenação dos processos inflamatórios é o macrófago (Frangogiannis 2014). Em contraste com VE, o remodelamento do VD é menos explorado, embora a infiltração de macrófagos já tenha sido provada em um modelo mal-adaptativo de hipertrofia de VD (Deuse, Guilhaire et al. 2017). No entanto, o papel dessas células nesse cenário ainda é desconhecido. Vias inflamatórias se mostram ativadas mesmo em modelos fisiológicos de hipertrofia do VD (Chytilova, Borchert et al. 2015; Alanova, Chytilova et al. 2017) e algumas moléculas, como TNF- α , são importantes para cardioproteção conferida pela exposição crônica à hipóxia em resposta à isquemia (Chytilova, Borchert et al. 2015).

Como discutido no capítulo anterior, uma dicotomia tem sido proposta para ativação de macrófagos: clássica *versus* alternativa, também conhecida como M1 e M2, respectivamente (Mantovani 2013, Nahrendorf 2013). Um equilíbrio entre os dois perfis deve ser mantido sob pena de agravamento do processo de remodelamento cardíaco, pois tanto a ativação persistente do fenótipo pró-inflamatório quanto a superativação do fenótipo pró-fibrótico pode ser prejudicial (Troidl, Mollmann et al. 2009; Hulsmans, Sam et al. 2016; Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). Estudos envolvendo remodelamento de VE após insulto isquêmico revelam que há uma proeminente expansão da

população de macrófagos através de proliferação local ou recrutamento de monócitos circulatórios, com uma transição do fenótipo pró-inflamatório para o reparativo (Hulsmans, Sam et al. 2016). Entretanto, nenhuma informação sobre a polarização está disponível para o VD hipertrofiado.

Assim, a nossa proposta foi investigar o perfil fenotípico dessas células miocárdio do VD, em um modelo de hipertrofia adaptativa. Então, a partir desse propósito pretendemos ampliar a questão de pesquisa explorando a polarização dos macrófagos em um modelo patológico de hipertrofia do VD.

2. JUSTIFICATIVA

No passado, muitos experimentos relegaram o VD a um papel primariamente passivo. Atualmente, o VD tem atraído maior interesse por parte da comunidade médica principalmente por ser fator prognóstico na insuficiência cardíaca esquerda.

Em modelos animais que levam à hipertrofia do VD, o papel dos macrófagos já tem sido explorado no tecido vascular e pulmonar. Recentemente, se observou uma infiltração de macrófagos no miocárdio do VD, mas ainda faltam informações sobre a repercussão dessas células nesse cenário.

Assumindo a relevância do VD e dos macrófagos nas doenças cardiovasculares, propusemos, a partir de um modelo de hipertrofia adaptativa por hipóxia crônica, avaliar o perfil destas células imunes no miocárdio para, subsequentemente, ampliarmos as questões de pesquisa.

3. HIPÓTESE

A hipóxia crônica leva à polarização de macrófagos em direção ao perfil M2.

4. OBJETIVO

Avaliar a polarização de macrófagos no remodelamento do ventrículo direito causado por hipóxia contínua crônica.

5. REFERÊNCIAS

- Alanova, P., A. Chytilova, et al. (2017). "Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia." J Appl Physiol (1985) **122**(6): 1452-1461.
- Chytilova, A., G. H. Borchert, et al. (2015). "Tumour necrosis factor-alpha contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia." Acta Physiol (Oxf) **214**(1): 97-108.
- Deuse, T., J. Guihaire, et al. (2017). "Macrophages Infiltration Is Associated with Maladaptive Remodeling of the Right Ventricle in an Experimental Model of Pulmonary Hypertension." The Thoracic and Cardiovascular Surgeon **65**(S01): S1-S110.
- El Kasmi, K. C., S. C. Pugliese, et al. (2014). "Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension." J Immunol **193**(2): 597-609.
- Frangogiannis, N. G. (2014). "The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling." Nat Rev Cardiol **11**(5): 255-265.
- Gombozhapova, A., Y. Rogovskaya, et al. (2017). "Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling." J Biomed Sci **24**(1): 13.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Groth, A., B. Vrugt, et al. (2014). "Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension." Respir Res **15**: 47.
- Guihaire, J., H. J. Bogaard, et al. (2013). "Experimental models of right heart failure: a window for translational research in pulmonary hypertension." Semin Respir Crit Care Med **34**(5): 689-699.
- Guihaire, J., P. E. Noly, et al. (2015). "Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: Insights from experimental studies." Arch Cardiovasc Dis **108**(10): 519-529.
- Haddad, F., R. Doyle, et al. (2008). "Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure." Circulation **117**(13): 1717-1731.
- Hashimoto-Kataoka, T., N. Hosen, et al. (2015). "Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(20): E2677-2686.
- Hulsmans, M., F. Sam, et al. (2016). "Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling." J Mol Cell Cardiol **93**: 149-155.
- Klotz, S., F. Wenzelburger, et al. (2006). "Reversible pulmonary hypertension in heart transplant candidates: to transplant or not to transplant." Ann Thorac Surg **82**(5): 1770-1773.
- Kolar, F. and B. Ostadal (1991). "Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension." Pflugers Arch **419**(2): 121-126.
- Mantovani, A., S. K. Biswas, et al. (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." J Pathol **229**(2): 176-185.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.

- Mathew, R. (2010). "Inflammation and pulmonary hypertension." Cardiol Rev **18**(2): 67-72.
- McLaughlin, V. V., S. L. Archer, et al. (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association." J Am Coll Cardiol **53**(17): 1573-1619.
- Nahrendorf, M. and F. K. Swirski (2013). "Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart." Circ Res **112**(12): 1624-1633.
- Neckar, J., G. H. Borchert, et al. (2013). "Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels." Curr Pharm Des **19**(39): 6880-6889.
- Schermuly, R. T., H. A. Ghofrani, et al. (2011). "Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension." Nat Rev Cardiol **8**(8): 443-455.
- Schultze, A. E. and R. A. Roth (1998). "Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **1**(4): 271-346.
- Troidl, C., H. Mollmann, et al. (2009). "Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction." J Cell Mol Med **13**(9B): 3485-3496.
- Voelkel, N. F., R. A. Quaife, et al. (2006). "Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure." Circulation **114**(17): 1883-1891.

6. ARTIGO 2

Rats Exposed to Chronic Continuous Hypoxia Present Reduced Right Ventricular Fibrosis without Macrophage Polarization

Juliana Oliveira Rangel¹, Frantisek Kolar², Michael Andrades^{1,3}

1 – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 – Institute of Physiology of Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

3 – Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Michael Andrades

Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

E-mail: meandrades@hcpa.edu.br

Abstract

Macrophages participate in the cardiac remodeling, either after an adaptive or maladaptive stimulus, mainly by secreting cytokines, growth factors, phagocytizing cell debris. The majority of the knowledge comes from studies based on the left ventricle and less is known about the right ventricle (RV) remodeling. Continuous exposure hypoxic environment triggers an adaptive hypertrophy similar to that seen with the practice of physical activity, dwelling in high altitudes, and pregnancy. However, the role of macrophages in this scenario is still unknown. The aim of this study was to investigate the macrophage polarization in the RV and its downstream effects after an adaptive hypertrophic stimulus. To this end, adult male Wistar rats (n=8) were exposed to moderate chronic continuous hypoxia (10% oxygen) in a normobaric chamber for 4 weeks. Control rats (n=8) were kept at room air. Hypoxia stimulated a 274% hypertrophy of RV and macrophage infiltration. However, no polarization in M1 or M2 phenotype could be seen. The levels of proinflammatory cytokine IL-6 were unchanged in hypertrophied RV but a decrease was seen for TGF- β (-62%) and fibrosis (-20%) levels, when compared to normoxic rats. These changes may contribute to the adaptive remodeling and are likely to be different when RV responds to a maladaptive stimulus.

Introduction

Chronic hypoxia has been used to induce pulmonary hypertension in a wide variety of animal species (Guihaire, Noly et al. 2015). The exposure to low levels of oxygen leads to the stiffening of the large pulmonary arteries and consequent right ventricle (RV) hypertrophy to compensate the elevated afterload (Kolar and Ostadal 1991). The model is comparable to the hypertrophy seen in the practice of physical activity, dwelling in high altitudes, and pregnancy, which is reversible after stopping the stimulus (Shimizu and Minamino 2016). Among these situations, chronic hypoxia and exercise training have received an increasing attention as clinically relevant cardioprotective effects on myocardial infarction and ischemia-reperfusion injury. This protection is associated with an cardiac function improvement, attenuated myocardial fibrosis (Xu, Yu et al. 2011), and reduced infarct size, even after 5 weeks after cessation of stimulus (Neckar, Ostadal et al. 2004).

Inflammatory signaling is important to the myocardium remodeling and macrophages act as important coordinator of this process (Frangogiannis 2014). Despite well explored in the left ventricle (LV) remodeling, it is already known that macrophages infiltrate in the myocardium during the maladaptive RV hypertrophy (Deuse, Guihaire et al. 2017). However, the role of these cells in this scenario is still unknown. Inflammatory pathways are activated even in a physiological model of RV hypertrophy (Chytilova, Borchert et al. 2015; Alanova, Chytilova et al. 2017) and some molecules, such as the tumor necrosis factor- α (TNF- α), are important to the protection conferred by hypoxic exposure against ischemic challenge (Chytilova, Borchert et al. 2015).

A dichotomy has been proposed for macrophages according to their signaling and function: M1 (or classical activation) represents the inflammatory and cytotoxic phenotype whereas M2 (or alternative activation) represents the anti-inflammatory or reparative phenotype (Nahrendorf and Swirski 2013). A M1-M2 balance should be kept to avoid damages to the host, as cytotoxic or fibrotic consequences (Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017). Data from studies with LV remodeling after an ischemic insult shows that there is a marked expansion of the cardiac macrophage population through both local proliferation and monocyte recruitment, with a transition from inflammatory to reparative macrophages (Hulsmans, Sam et al. 2016). However, no information on the polarization of macrophages is available for the RV hypertrophy.

Thus, the aim of this study was to investigate whether the exposure of rats to an adaptive stimulus for RV hypertrophy could interfere on macrophage polarization in the myocardium.

Methods

Model of pulmonary hypertension induced by hypoxia

Eight adults male Wistar rats were exposed to moderate chronic continuous hypoxia (10% oxygen) in a normobaric chamber equipped with hypoxic generators (Everest Summit, Hypoxico Inc., NY, USA) for 4 weeks. No reoxygenation occurred during this period. Eight control rats were kept for the same period of time at room air. All animals were housed in a controlled environment (23°C; 12:12-h light-dark cycle; light from 5:00 AM) with free access to water and a standard chow diet.

ELISA

After 4 weeks the rats were sacrificed by cervical dislocation, the hearts were removed and the right ventricles were separated. Tissue from right ventricle was homogenized in ice-cold PBS buffer containing protease inhibitor cocktail, and total protein concentration was determined using the Bradford method (B6916, Sigma Aldrich). The ELISA kits were used for determination of pro-inflammatory cytokine IL-6 (KRC0061, Thermo Fisher), pro-fibrotic TGF- β (ab119558, Abcam), and pSmad3 (85-86192-11, Thermo Fisher) to verify the TGF- β via activation, according to manufacturer instruction.

qPCR

Total cellular RNAs were extracted using RNeasy reagent (RN190, Molecular Research Center) according to the manufacturer's protocol. RNA (1 μ g) was reverse transcribed using the cDNA synthesis kit (K1632, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Prior to Real Time, the DNase protocol was also performed (AMPD1, Sigma Aldrich). Real time PCR analyses were performed by using the TaqMan assays to CD86 (M1 marker), MRC1 (M2 marker), and CD68 (total macrophages) (Rn00571654_m1, Rn01487342_m1, and Rn01495634_g1, respectively). GAPDH, HPRT, ACTB and B2M housekeeping genes were tested to stability using the NormFinder software. As all genes showed similar values, a geometric average of all was used for normalization (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

Immunochemistry

Heart medial sections were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut in serial sections of 4 μ m. Immunohistochemical staining was performed using primary antibody raised against rat-CD68 1:50 (6A324, Santa Cruz Biotechnology), which was detected with a peroxidase-labeled streptavidin biotin technique. Ten non-overlapping images were obtained from RV tissue in microscope (400x) and quantitative evaluations were performed using ImageJ software.

Fibrosis staining

The medial heart slide (3 mm) was fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Then, a 3 μ m slice was incubated with a 0.1% Picrosirius red solution dissolved in aqueous saturated picric acid for 1 hour, washed in acidified water (0.5% hydrogen chloride), dehydrated and mounted with DPX Mounting. Images were obtained from RV tissue in microscope (400x) and quantitative evaluations red stained collagen fibers were performed using ImageJ software.

Results

Morphometric and haematocrit analyses

Table 1. Body and right ventricle weight parameters and haematocrit

Group	<i>n</i>	BW1 (g)	BW2 (g)	RV (mg)	RV/BW (mg.g ⁻¹)	Haematocrit (%)
<i>Normoxia</i>	8	195 ± 3	418 ± 7	219 ± 5.6	0.52 ± 0.007	38 ± 0.9
<i>Hypoxia</i>	8	192 ± 4	345 ± 2.8*	601 ± 24*	1.74 ± 0.07*	63 ± 2.3*

BW1=basal body weight, BW2=body weight at the end of protocol, RV=right ventricle, RV/BW=relative weight of right ventricle. Values are means ± SEM, *p<0.05, Student's T-test.

Both normoxia and hypoxia-exposed rats entered the protocol with the same weight (Table 1). The Hypoxia group showed a decreased weight gain (153 g vs. 223 g in Normoxia) and an increased haematocrit (63% vs. 38% in Normoxia), which was already expected. The RV hypertrophy was pronounced in Hypoxia group with a 3-fold weight increase when compared to the Normoxia group (Table 1).

Macrophage polarization

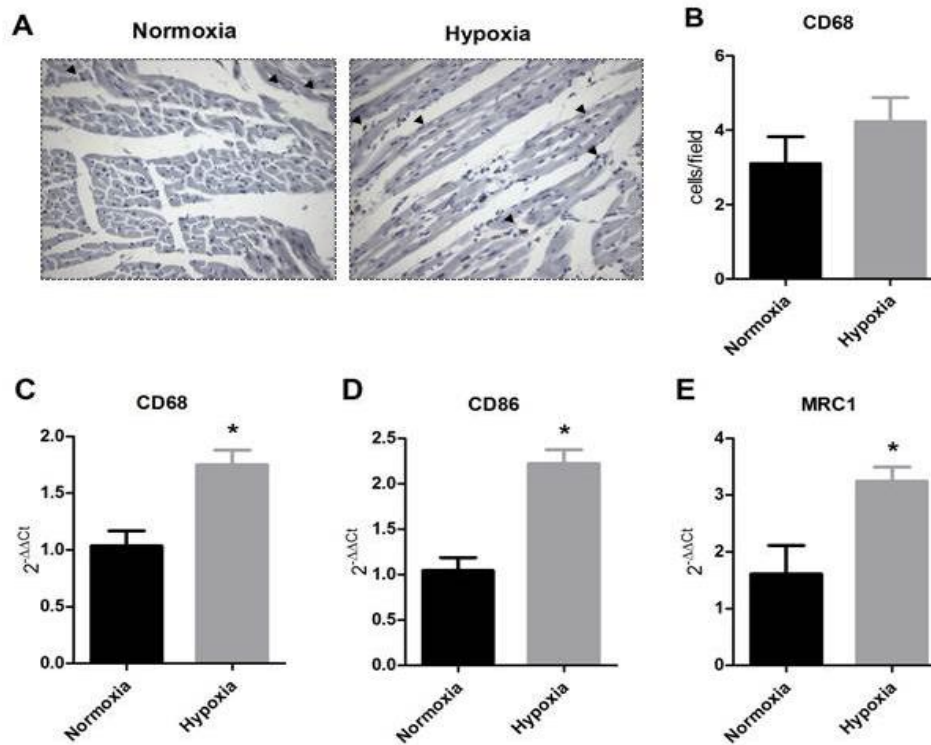


Figure 1. Macrophages markers in RV tissue assessed by immunochemistry and qPCR. A) Representatives images from CD68 staining showing macrophages (arrows) B) Macrophages CD68⁺ quantification in Normoxia (n=4) and in Hypoxia (n=6) (C) Total macrophages gene expression D) M1 phenotype and E) M2 phenotype. *p<0.05, Student's T-test (n=8/group).

Macrophage infiltration in RV from hypoxia stimulated rats was not different from normoxic rats, when detected by immunochemistry (Fig 1B). However, we detected an increase in CD68 expression by qPCR in RV cardiac tissue (Fig 1C), as well as in CD86 (a surface marker of M1 phenotype) (Fig 1D) and mannose receptor (a marker for M2 phenotype) (Fig 1E). These markers were all increased at the same ratio after hypoxic stimulus, reflecting the absence of macrophage polarization.

Inflammation assessment

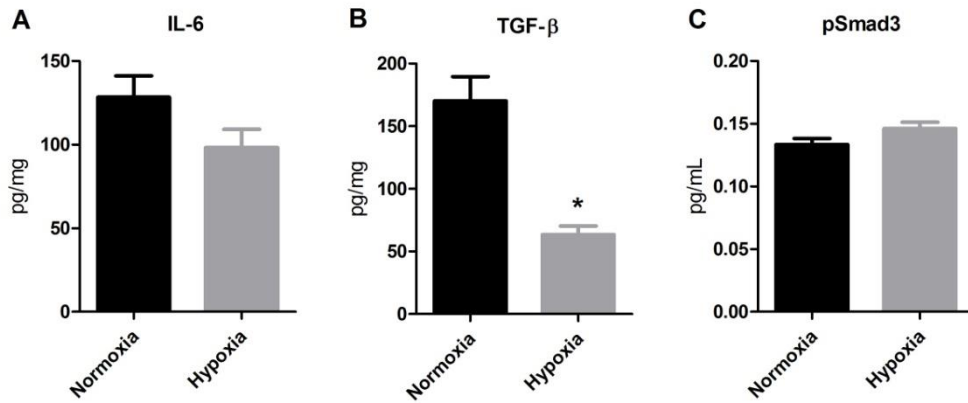


Figure 2. Right-ventricle tissue levels of macrophages markers. A) Pro-inflammatory cytokine and M1 marker B) Pro-fibrotic factor and M2 marker C) Factor stimulated after TGF-β pathway activation. * $p < 0.05$, Student's T-test ($n=8$ /group).

As no macrophage polarization marker was seen by qPCR, we assessed signaling profile in the RV tissue. IL-6 is associated with M1 macrophages whereas TGF-β is a factor secreted by M2 macrophages. While the hypoxia did not change IL-6 levels (Fig 2A), it caused a 62% decrease in TGF-β (Fig 2B). Then, we decided to measure pSmad3 to confirm the activation of TGF-β pathway and no difference was detected (Fig 2C).

Fibrosis evaluation

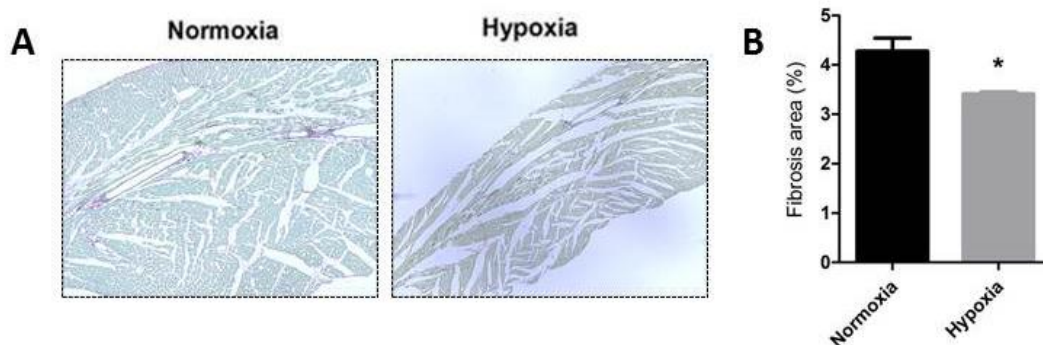


Figure 3. Fibrosis staining by Picosirius Red. A) Representative images from RV fibrosis B) Quantification by ImageJ software in RV tissue. * $p < 0.05$, Student's T-test (Normoxia, $n=4$; Hypoxia, $n=6$).

Due to the surprising result related to TGF- β (Fig 2B), we decided to confirm the fibrosis process directly in the RV tissue. Accordingly, the fibrosis was lower in the hypoxic group (Fig 3).

Discussion

The heart contains a population of resident and monocyte-derived macrophages recruited in response to stimulus such as ischemia and hemodynamic stress (Hulsmans, Sam et al. 2016). These cells participate in the adaptive and maladaptive LV remodeling (Oliveira, Araujo et al. 2013; Gombozhapova, Rogovskaya et al. 2017; Abbadi, Laroumanie et al. 2018) but less is known about their participation in the RV remodeling (Deuse, Guihaire et al. 2017). Thus, the aim of this study was to evaluate the macrophage polarization in the RV adaptive hypertrophy triggered by hypoxic stimulus.

The animal model employed in this work develops a reversible RV hypertrophy after 4 weeks of continuous exposition to a hypoxic/normobaric environment. This hypertrophy is an adaptive response to the increased lung vasoconstriction, caused by low levels of oxygen, and takes place to compensate the pressure overload (Kolar and Ostadal 1991). Here, after 4 weeks of exposition the animals presented a RV 3-fold heavier compared to normoxia. The rats submitted to hypoxia also showed an increased haematocrit and weight loss, according to expected (Chytilova, Borchert et al. 2015; Alanova, Chytilova et al. 2017). The changes seen in this model are considered physiological adaptations as they are all reversible after the cessation of the stimulus (Kolar and Ostadal 1991).

In vitro studies have disagreed whether hypoxia will trigger M1 or M2 phenotype, suggesting that degree of oxygenation in the diseased tissues interfere in the resulting phenotype and remodeling (Leblond, Gerault et al. 2016; Raggi, Pelassa et al. 2017). Here, we showed that macrophage infiltrate in the RV myocardium without polarization, at least when considering the classic dichotomy M1-M2. The existence of intermediate phenotypes between this M1-M2 spectrum (Martinez and Gordon 2014) and common markers between these macrophages have been hampering a clear identification of macrophage phenotype (Jablonski, Amici et al. 2015). One example is the Arginase-1, a classic M2 marker, which can be also up-regulated in M1 macrophages (El Kasmi, Qualls et al. 2008). In addition, the lack of consistent agreement between researches about which are the best genes to distinguish M1-M2 result in more difficulties in this context (Jablonski, Amici et al. 2015; Gensel, Kopper et al. 2017).

Another way to check macrophage polarization is profiling tissue inflammatory mediators. We showed the hypoxia did not promoted changes of IL-6 levels in hypertrophied RV, indicating an absence of M1 phenotype. On the other hand, IL-6 and other proinflammatory cytokines increase in RV maladaptive remodeling after chemically-induced pulmonary hypertension (Wang, Zuo et al. 2016). Despite the suggestion that IL-6 is associated with maladaptive remodeling, TNF- α proinflammatory signaling during adaptive hypoxia is necessary to induce tolerance against LV ischemia (Chytilova, Borchert et al. 2015; Alanova, Chytilova et al. 2017). Here, we also showed that hypoxia exposure promoted a decrease in RV TGF- β and fibrosis levels, a signaling pathway associated with M2 phenotype. Interestingly, the opposite was seen in

the RV hypertrophy secondary to pulmonary hypertension (Rich, Pogoriler et al. 2010). Thus, it suggests that the decrease in the profibrotic pathways leads to an adaptive remodeling.

This study had some limitations. First, the analyses were limited to one time-point after 4 weeks of exposure to hypoxic environment. Analyses in other time-points may provide information on the balance of M1-M2 profile during the RV adaptive process (Sharma, Taegtmeyer et al. 2004). Second, there are some intermediate phenotypes between the M1 and M2 that could not be detected in our work (Martinez and Gordon 2014). For example, stimulation of macrophages with factors released by pulmonary artery from animals subjected to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension showed a pro-inflammatory and profibrotic phenotype (El Kasmi, Pugliese et al. 2014). Despite agreeing with our results, it does not fit in the M1-M2 model. Thus, future works widen the range of macrophage phenotype.

In conclusion, macrophages participate in the remodeling process that takes place when a tissue is subjected to a challenge. However, their role differs according to the microenvironmental stimuli and tissue involved. In this study we showed that rats exposed to chronic continuous hypoxia develop an adaptive RV hypertrophy with macrophage infiltration without M1-M2 polarization. We also showed a decrease in myocardial fibrosis, which is compatible with the adaptive remodeling. Our results provide evidence on the behavior of macrophages during the adaptive remodeling of RV.

References

- Abbadi, D., F. Laroumanie, et al. (2018). "Local production of tenascin-C acts as a trigger for monocyte/macrophage recruitment that provokes cardiac dysfunction." Cardiovasc Res **114**(1): 123-137.
- Alanova, P., A. Chytilova, et al. (2017). "Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia." J Appl Physiol (1985) **122**(6): 1452-1461.
- Anderson, J. L. and D. A. Morrow (2017). "Acute Myocardial Infarction." N Engl J Med **376**(21): 2053-2064.
- Azevedo, P. S., B. F. Polegato, et al. (2016). "Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment." Arq Bras Cardiol **106**(1): 62-69.
- Badke, A., J. Lee, et al. (2017). "The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Influences Macrophage Polarization." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **195**: A3278.
- Bakris, G. L., A. J. Bank, et al. (2004). "Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process." Am J Hypertens **17**(12 Pt 2): 23S-30S.
- Benjamin, E. J., M. J. Blaha, et al. (2017). "Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **135**(10): e146-e603.
- Blackburn, N. J. R., B. Vulesevic, et al. (2017). "Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction." Basic Res Cardiol **112**(5): 57.
- Bodiga, V. L., S. R. Eda, et al. (2014). "Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy." Heart Fail Rev **19**(1): 49-63.
- Cao, W., J. Chen, et al. (2014). "Advanced glycation end products promote heart failure through inducing the immune maturation of dendritic cells." Appl Biochem Biotechnol **172**(8): 4062-4077.
- Chen-Scarabelli, C., L. Saravolatz, et al. (2015). "Dilemmas in end-stage heart failure." J Geriatr Cardiol **12**(1): 57-65.
- Chytilova, A., G. H. Borchert, et al. (2015). "Tumour necrosis factor-alpha contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia." Acta Physiol (Oxf) **214**(1): 97-108.
- Cohen, M. P., F. N. Ziyadeh, et al. (2002). "Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta1." Kidney Int **61**(6): 2025-2032.
- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." J Am Coll Cardiol **35**(3): 569-582.
- Courties, G., T. Heidt, et al. (2014). "In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing." J Am Coll Cardiol **63**(15): 1556-1566.
- CVDs, O. W. C. d. (2017).
- D'Elia, N., J. D'Hooge, et al. (2015). "Association Between Myocardial Mechanics and Ischemic LV Remodeling." JACC Cardiovasc Imaging **8**(12): 1430-1443.
- DATASUS. (2014). "Estatísticas Vitais." from <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937>.
- Deuse, T., J. Guilhaire, et al. (2017). "Macrophages Infiltration Is Associated with Maladaptive Remodeling of the Right Ventricle in an Experimental Model of Pulmonary Hypertension." The Thoracic and Cardiovascular Surgeon **65**(S01): S1-S110.

- Dhar, A., K. M. Desai, et al. (2010). "Alagebrium attenuates acute methylglyoxal-induced glucose intolerance in Sprague-Dawley rats." Br J Pharmacol **159**(1): 166-175.
- Dhar, A., I. Dhar, et al. (2011). "Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats." Diabetes **60**(3): 899-908.
- Dhar, A., M. P. Udumula, et al. (2016). "Pharmacological evaluation of novel alagebrium analogs as methylglyoxal scavengers in vitro in cardiac myocytes and in vivo in SD rats." Int J Cardiol **223**: 581-589.
- Donaldson, C., D. J. Taatjes, et al. (2010). "Combined immunoelectron microscopic and computer-assisted image analyses to detect advanced glycation end-products in human myocardium." Histochem Cell Biol **134**(1): 23-30.
- El Kasmi, K. C., S. C. Pugliese, et al. (2014). "Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension." J Immunol **193**(2): 597-609.
- El Kasmi, K. C., J. E. Qualls, et al. (2008). "Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens." Nat Immunol **9**(12): 1399-1406.
- Fan, X., R. Subramaniam, et al. (2003). "Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7 cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor kappaB and intracellular reactive oxygen species formation." Arch Biochem Biophys **409**(2): 274-286.
- Fernando, L., S. Pamela, et al. (2014). "Cardiovascular disease in Latin America: the growing epidemic." Prog Cardiovasc Dis **57**(3): 262-267.
- Fishbein, M. C., D. Maclean, et al. (1978). "Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution." Am J Pathol **90**(1): 57-70.
- Frangogiannis, N. G. (2014). "The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling." Nat Rev Cardiol **11**(5): 255-265.
- Funk, C. D. and G. A. FitzGerald (2007). "COX-2 inhibitors and cardiovascular risk." J Cardiovasc Pharmacol **50**(5): 470-479.
- Gensel, J. C., T. J. Kopper, et al. (2017). "Predictive screening of M1 and M2 macrophages reveals the immunomodulatory effectiveness of post spinal cord injury azithromycin treatment." Sci Rep **7**: 40144.
- Gharib, S. A., L. K. Johnston, et al. (2014). "MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis." J Leukoc Biol **95**(1): 9-18.
- Glass, C. K. and G. Natoli (2016). "Molecular control of activation and priming in macrophages." Nat Immunol **17**(1): 26-33.
- Glycadia, S. (2007). "Phase 1 Study of Anti-glycation Agent GLY-230 in Healthy Subjects." ClinicalTrials.gov.
- Gombozhapova, A., Y. Rogovskaya, et al. (2017). "Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling." J Biomed Sci **24**(1): 13.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Guihaire, J., P. E. Noly, et al. (2015). "Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: Insights from experimental studies." Arch Cardiovasc Dis **108**(10): 519-529.
- Guo, Y., C. Lin, et al. (2016). "AGEs Induced Autophagy Impairs Cutaneous Wound Healing via Stimulating Macrophage Polarization to M1 in Diabetes." Sci Rep **6**: 36416.
- Hartog, J. W., A. A. Voors, et al. (2007). "Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications." Eur J Heart Fail **9**(12): 1146-1155.
- Hearse, D. J. and F. J. Sutherland (2000). "Experimental models for the study of cardiovascular function and disease." Pharmacol Res **41**(6): 597-603.

- Hegab, Z., S. Gibbons, et al. (2012). "Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease." World J Cardiol **4**(4): 90-102.
- Hegarová, M. and I. Málek (2013). "Possibilities of influencing the myocardial remodeling." Cor et Vasa **55**(4): e355-e363.
- Heimbürger, R. F. (1946). "Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat." Arch Surg **52**: 677-689.
- Heymans, S., E. Hirsch, et al. (2009). "Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology." Eur J Heart Fail **11**(2): 119-129.
- Hochman, J. S. and B. H. Bulkley (1982). "Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study." Circulation **65**(7): 1446-1450.
- Hu, X., R. K. Leak, et al. (2015). "Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair." Nat Rev Neurol **11**(1): 56-64.
- Hulsmans, M., F. Sam, et al. (2016). "Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling." J Mol Cell Cardiol **93**: 149-155.
- Hume, D. A. (2015). "The Many Alternative Faces of Macrophage Activation." Front Immunol **6**: 370.
- Ikeda, J., T. Ichiki, et al. (2013). "Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling." J Am Heart Assoc **2**(3): e000178.
- Inamdar, A. A. and A. C. Inamdar (2016). "Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization." J Clin Med **5**(7).
- Italiani, P. and D. Boraschi (2015). "New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory." Immune Netw **15**(4): 167-176.
- Jablonski, K. A., S. A. Amici, et al. (2015). "Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages." PLoS One **10**(12): e0145342.
- Jetten, N., N. Roumans, et al. (2014). "Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses." PLoS One **9**(7): e102994.
- Jin, X., T. Yao, et al. (2015). "Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF-kappaB Pathway." Biomed Res Int **2015**: 732450.
- Johns, T. N. and B. J. Olson (1954). "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals." Ann Surg **140**(5): 675-682.
- Jung, M., Y. Ma, et al. (2017). "IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation." Basic Res Cardiol **112**(3): 33.
- Juranek, J. K., M. S. Geddis, et al. (2013). "RAGE deficiency improves postinjury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice." Diabetes **62**(3): 931-943.
- Kennedy, L., M. P. Solano, et al. (2010). "Anti-glycation and anti-albuminuric effects of GLY-230 in human diabetes." Am J Nephrol **31**(2): 110-116.
- Khan, M. A., S. Schultz, et al. (2016). "Hyperglycemia in Stroke Impairs Polarization of Monocytes/Macrophages to a Protective Noninflammatory Cell Type." J Neurosci **36**(36): 9313-9325.
- Kolar, F. and B. Ostadal (1991). "Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension." Pflugers Arch **419**(2): 121-126.
- Kraakman, M. J., D. Dragoljevic, et al. (2016). "Is the risk of cardiovascular disease altered with anti-inflammatory therapies? Insights from rheumatoid arthritis." Clin Transl Immunology **5**(5): e84.
- Krausgruber, T., K. Blazek, et al. (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." Nat Immunol **12**(3): 231-238.
- Leblond, M. M., A. N. Gerault, et al. (2016). "Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models." Oncoimmunology **5**(1): e1056442.

- Libby, P. (2012). "Inflammation in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(9): 2045-2051.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-1143.
- Lindsey, J. B., F. Cipollone, et al. (2009). "Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications." Diab Vasc Dis Res **6**(1): 7-14.
- Lindsey, M. L., J. J. Saucerman, et al. (2016). "Knowledge gaps to understanding cardiac macrophage polarization following myocardial infarction." Biochim Biophys Acta **1862**(12): 2288-2292.
- Listing, J., A. Strangfeld, et al. (2008). "Does tumor necrosis factor alpha inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis?" Arthritis Rheum **58**(3): 667-677.
- Liu, L. and H. J. Eisen (2014). "Epidemiology of heart failure and scope of the problem." Cardiol Clin **32**(1): 1-8, vii.
- Liu, W., X. Zhang, et al. (2015). "Activation in M1 but not M2 Macrophages Contributes to Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction in Rats: a Critical Role of the Calcium Sensing Receptor/NLRP3 Inflammasome." Cell Physiol Biochem **35**(6): 2483-2500.
- Mansur, A. P., D. Favarato, et al. (2001). "Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996." Arg Bras Cardiol **76**(6): 497-510.
- Martinez-Gonzalez, J. and L. Badimon (2007). "Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks." Curr Pharm Des **13**(22): 2215-2227.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.
- McAlindon, E., C. Bucciarelli-Ducci, et al. (2015). "Infarct size reduction in acute myocardial infarction." Heart **101**(2): 155-160.
- Metra, M. and J. R. Teerlink (2017). "Heart failure." Lancet **390**(10106): 1981-1995.
- Mills, C. D., K. Kincaid, et al. (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-6173.
- Miyata, T. and C. van Ypersele de Strihou (2003). "Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation." Arch Biochem Biophys **419**(1): 50-54.
- Murray, P. J., J. E. Allen, et al. (2014). "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines." Immunity **41**(1): 14-20.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nagai, R., C. M. Hayashi, et al. (2002). "Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins." J Biol Chem **277**(50): 48905-48912.
- Nagai, T., S. Doi, et al. (2016). "Linagliptin Ameliorates Methylglyoxal-Induced Peritoneal Fibrosis in Mice." PLoS One **11**(8): e0160993.
- Nahrendorf, M. and F. K. Swirski (2013). "Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart." Circ Res **112**(12): 1624-1633.
- Nahrendorf, M. and F. K. Swirski (2016). "Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function." Circ Res **119**(3): 414-417.
- Neckar, J., B. Ostadal, et al. (2004). "Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery." Physiol Res **53**(6): 621-628.
- Nedic, O., S. I. Rattan, et al. (2013). "Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology." Free Radic Res **47 Suppl 1**: 28-38.

- Neviere, R., Y. Yu, et al. (2016). "Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions." Glycoconj J **33**(4): 607-617.
- Oliveira, A. G., T. G. Araujo, et al. (2013). "Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats." Obesity (Silver Spring) **21**(12): 2545-2556.
- Onishi, A., T. Akimoto, et al. (2014). "Peritoneal fibrosis induced by intraperitoneal methylglyoxal injection: the role of concurrent renal dysfunction." Am J Nephrol **40**(4): 381-390.
- Opie, L. H., P. J. Commerford, et al. (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet **367**(9507): 356-367.
- Parthasarathy, A., V. Gopi, et al. (2014). "Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs." Life Sci **118**(1): 15-26.
- Pazos-Lopez, P., J. Peteiro-Vazquez, et al. (2011). "The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure." Vasc Health Risk Manag **7**: 237-254.
- Perrin, S. (2014). "Preclinical research: Make mouse studies work." Nature **507**(7493): 423-425.
- Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, et al. (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." Circ Res **44**(4): 503-512.
- Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, et al. (1985). "Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril." Circulation **72**(2): 406-412.
- Rabbani, N. and P. J. Thornalley (2012). "Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome." Amino Acids **42**(4): 1133-1142.
- Raggi, F., S. Pelassa, et al. (2017). "Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1." Front Immunol **8**: 1097.
- Ramasamy, R., S. J. Vannucci, et al. (2005). "Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation." Glycobiology **15**(7): 16R-28R.
- Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodino-Janeiro, et al. (2012). "Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report." Cardiovasc Diabetol **11**: 102.
- Rich, S., J. Pogoriler, et al. (2010). "Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Chest **138**(5): 1234-1239.
- Ridker, P. M. and T. F. Luscher (2014). "Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease." Eur Heart J **35**(27): 1782-1791.
- Rosamond, W. D. and A. Johnson (2017). "Trends in Heart Failure Incidence in the Community: A Gathering Storm." Circulation **135**(13): 1224-1226.
- Sager, H. B., M. Hulsmans, et al. (2016). "Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure." Circ Res **119**(7): 853-864.
- Sanchis-Gomar, F., C. Perez-Quilis, et al. (2016). "Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome." Ann Transl Med **4**(13): 256.
- Schmidt, A., J. K. Strecker, et al. (2017). "Targeting Different Monocyte/Macrophage Subsets Has No Impact on Outcome in Experimental Stroke." Stroke **48**(4): 1061-1069.
- Setoguchi, S., S. Schneeweiss, et al. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha antagonist use and heart failure in elderly patients with rheumatoid arthritis." Am Heart J **156**(2): 336-341.
- Sharma, S., H. Taegtmeyer, et al. (2004). "Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1185-1192.

- Shimizu, I. and T. Minamino (2016). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **97**: 245-262.
- Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.
- Singh, V. P., A. Bali, et al. (2014). "Advanced glycation end products and diabetic complications." Korean J Physiol Pharmacol **18**(1): 1-14.
- Singla, D. K., R. D. Singla, et al. (2015). "Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart." PLoS One **10**(3): e0120739.
- Siqueira, A. S. E., A. G. Siqueira-Filho, et al. (2017). "Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil." Arg Bras Cardiol **109**(1): 39-46.
- Son, S., I. Hwang, et al. (2017). "Advanced glycation end products impair NLRP3 inflammasome-mediated innate immune responses in macrophages." J Biol Chem **292**(50): 20437-20448.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Sutton, M. G. and N. Sharpe (2000). "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy." Circulation **101**(25): 2981-2988.
- Tariq, M., J. Zhang, et al. (2017). "Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer." J Cell Biochem **118**(9): 2484-2501.
- Tellechea, M., M. Buxade, et al. (2018). "NFAT5-Regulated Macrophage Polarization Supports the Proinflammatory Function of Macrophages and T Lymphocytes." J Immunol **200**(1): 305-315.
- Thornalley, P. J. (2003). "Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts." Arch Biochem Biophys **419**(1): 31-40.
- Tian, S. and S. Y. Chen (2015). "Macrophage polarization in kidney diseases." Macrophage (Houst) **2**(1).
- Troidl, C., H. Mollmann, et al. (2009). "Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction." J Cell Mol Med **13**(9B): 3485-3496.
- Tugal, D., X. Liao, et al. (2013). "Transcriptional control of macrophage polarization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(6): 1135-1144.
- Urata, Y., M. Yamaguchi, et al. (2002). "Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages." Free Radic Biol Med **32**(8): 688-701.
- Usher, M. G., S. Z. Duan, et al. (2010). "Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice." J Clin Invest **120**(9): 3350-3364.
- van Zoelen, M. A., A. Achouiti, et al. (2011). "The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection." Crit Care **15**(2): 208.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Vlassara, H., W. Cai, et al. (2002). "Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15596-15601.
- Wang, J. J., X. R. Zuo, et al. (2016). "Evaluation and Treatment of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Right Ventricular Dysfunction during Monocrotaline-Induced Rat Pulmonary Arterial Hypertension." Cardiovasc Drugs Ther **30**(6): 587-598.
- Wang, N., H. Liang, et al. (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." Front Immunol **5**: 614.

- Wang, Y., T. Yang, et al. (2012). "Mathematical modeling and stability analysis of macrophage activation in left ventricular remodeling post-myocardial infarction." BMC Genomics **13 Suppl 6**: S21.
- Welinder, C. and L. Ekblad (2011). "Coomassie staining as loading control in Western blot analysis." J Proteome Res **10**(3): 1416-1419.
- Willemsen, S., J. W. Hartog, et al. (2012). "The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction." Am Heart J **164**(5): 742-749 e743.
- Xu, W. Q., Z. Yu, et al. (2011). "Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats." Basic Res Cardiol **106**(3): 329-342.
- Xue, J., S. V. Schmidt, et al. (2014). "Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation." Immunity **40**(2): 274-288.
- Yamagishi, S., K. Nakamura, et al. (2008). "Inhibitors of advanced glycation end products (AGEs): potential utility for the treatment of cardiovascular disease." Cardiovasc Ther **26**(1): 50-58.
- Zhang, F., G. Banker, et al. (2011). "The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production." J Surg Res **171**(2): 871-876.
- Zhao, D., T. T. Le, et al. (2017). "Effect of glycation derived from alpha-dicarbonyl compounds on the in vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin: A model study with glyoxal, methylglyoxal and butanedione." Food Res Int **102**: 313-322.
- Zhou, D., K. Yang, et al. (2017). "Promising landscape for regulating macrophage polarization: epigenetic viewpoint." Oncotarget **8**(34): 57693-57706.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os macrófagos participam ativamente do processo de remodelamento cardíaco após o coração ser submetido a algum estresse. No entanto, o papel dessas células difere de acordo com os estímulos microambientais, os quais irão

determinar o fenótipo do macrófago em predomínio no tecido. Algumas estratégias para manipular a polarização dessas células têm sido testadas, experimentalmente, com diferentes desfechos sobre o remodelamento cardíaco. Nesse trabalho, a administração de MGO, para promover o aumento de AGEs, estimulou a polarização de macrófagos cardíacos em direção ao fenótipo M2 no VE após o IAM. Essa polarização foi associada a maior deposição de fibrose, de acordo com o perfil pró-fibrótico característico de M2. Já a AMG não foi capaz de exercer efeito sobre a polarização, mas surpreendentemente também estimulou o processo fibrótico. Após exposição de ratos ao estímulo da hipóxia crônica demonstramos que o estímulo dos baixos níveis de oxigênio não afetou a polarização entre M1 e M2 no VD hipertrofiado, embora um significativo aumento na infiltração de macrófagos tenha sido detectado. Apesar de não haver indução em direção a nenhum dos fenótipos, observou-se uma redução da fibrose miocárdica, o que é compatível com o remodelamento adaptativo ao qual os animais foram submetidos.

Conjuntamente, nosso estudo proporciona novos conhecimentos acerca da polarização de macrófagos, contribuindo com os estudos *in vivo* que ainda são limitados nessa área. Ademais, nossos resultados fornecem evidências do comportamento dos macrófagos durante o remodelamento mal-adaptativo do VE pós-infarto e do remodelamento adaptativo do VD após estímulo hipertrófico.