



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uso Prévio de Estatina no Infarto Agudo do Miocárdio Experimental
em Ratos: Análise de Estresse Oxidativo 48h Pós-Insulto Associado
a Parâmetros Ecocardiográficos

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Nadine Clausell
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Adriane Belló Klein**

Autor: Rafael Dall Alba

Porto Alegre, Outubro de 2011.

Uso Prévio de Estatina no Infarto Agudo do Miocárdio Experimental
em Ratos: Análise de Estresse Oxidativo 48h Pós-Insulto Associado
a Parâmetros Ecocardiográficos

Autor: Rafael Dall Alba

Dissertação para obtenção do
título de Mestre apresentada à
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de
Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da
Saúde: Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Nadine Clausell
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Adriane Belló Klein

Porto Alegre, 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Instituto de Ciências Básicas da Saúde no Laboratório de espécies ativas de oxigênio da mesma universidade, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

“Nos corações, no bate o pêndulo dos amantes.
Como se exaltam as duplas no leito do amor!
Eu, que sou a Praça da Paixão, surpreendo o
pulsar selvagem do coração das capitais.
Desabotoado, o coração quase de fora, abria-me
ao sol e aos jatos d'água.
Entraí com vossas paixões! Galgai-me com
vossos amores!
Doravante não sou mais dono de meu coração!
Nos demais - eu sei, qualquer um o sabe!
O coração tem domicílio no peito.
Comigo a anatomia ficou louca.
Sou todo coração - em todas as partes palpita.
Oh! Quantas são as primaveras em vinte anos
acesas nesta fornalha!
Uma tal carga acumulada torna-se simplesmente
insuportável.
Insuportável não para os versos de veras.”

Vladimir Maiakóvski

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha mãe por todo esforço, dedicação e amor. Ensinas-te me a lutar honestamente e nunca desistir. Sou muito grato a Alberto Guaraci Borges da Silveira pelo exemplo de caráter. És um Pai para mim, ensinou-me valores e princípios os quais moldaram meu caráter também. A minha avó Alzira e avô Paulo pela sabedoria e fé. A minha irmã sou agradecido pela amizade e companheirismo. A minha sobrinha Violeta pelo exemplo de que o novo é inevitável e imprescindível para a mudança do nosso velho olhar sobre o sentido da vida. Aos meus tios Juli e Fábio por todo amor e carinho. E a todos os familiares que me apoiaram nessa jornada e me ensinaram o verdadeiro sentido da família. A minha namorada Aline, por aturar minha loucura/ausência e ainda assim permanecer firme e companheira. Tu és muito especial para mim.

Agradeço a minha orientadora Nadine Clausell pela oportunidade desde a iniciação científica. Tu és exemplo de profissionalismo tanto na pesquisa, gestão e assistência. Também sou grato ao professor Luis Eduardo Rohde e a Dra Andréia Biolo pelas colaborações a esse trabalho.

Sou grato a todos do laboratório, Nidi, Carol, Dai, Stephanie, Amanda, Luzia, Luis Felipe, Vanessa, Gio e Kátia pela amizade e carinho. Ao colega Michael pelos ensinamentos e pela dedicação ao qual foram fundamentais para a conclusão desse feito.

O meu imenso carinho pela equipe de infra-estrutura do HCPA, Maria, Vera e Everaldo pelos seus serviços fundamentais e excelentes. A equipe da Unidade de Experimentação Animal Juliana, Eduardo e Fabíola. A enfermeira

Marta pela sua superação e exemplo de gestão com rigor, mas nunca perdendo a ternura.

Aos professores Adriane Belló-Klein e Alex Sander Da Rosa Araujo pelo acolhimento em seu laboratório. Ao colega Dhãniel pelo empenho nos experimentos.

Aos órgãos de fomento CNPq e FINEP/HCPA.

A UFRGS como exemplo de universidade gratuita de qualidade.

Enfim, a todos que fizeram deste período mais divertido e proveitoso.

Sumário

Lista de Abreviaturas	9
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	10
1 Marco teórico	12
1.1 Introdução	12
1.2 Epidemiologia das doenças cardiovasculares	13
1.3 Insuficiência cardíaca pós-infarto agudo do miocárdio: Patogênese e progressão da doença	15
1.4 Estresse Oxidativo	20
1.5 Insuficiência Cardíaca e Estresse Oxidativo	23
1.6 Modulação imunoinflamatória no IAM	26
1.7 Estatinas	28
1.8 Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas	29
1.9 Diversidades das estatinas e sua multiplicidade de respostas	31
2 Justificativa	34
3 Hipótese	34
4 Objetivo Geral	35
4.1 _Objetivos Específicos	35
5 Referências Bibliográficas	36
6 Artigo Original	50
6.1 Abstract	51
6.2 Introduction	53
6.3 Methods	55
6.4 Results	59

6.5 Discussion	62
6.6 Conclusion	66
6.7 References	67

Lista de Abreviaturas

AVC – Acidente vascular cerebral

CAT – Catalase

DCV – Doenças cardiovasculares

EAO – Espécies ativas de oxigênio

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH/GSSG – Glutaciona/glutaciona dissulfeto

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HMG-CoA redutase – enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-A redutase

IAM – Infarto Agudo do miocárdio

IC – Insuficiência Cardíaca

IκB – Inibidores do NF-κB

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LPO – Lipoperoxidação

MMP – Matriz metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB – Fator nuclear κ B

NOS – Óxido nítrico sintase

O₂^{•-} – Radical superóxido

OH[•] – Radical hidroxil

REDOX – Reações de redução-oxidação

RyR – Receptores de rianodina

SCA – Síndrome coronariana aguda

SOD – Superóxido dismutase

TGF β 1 – Fator de transformação do crescimento

TLR4 – Receptor toll like

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VE – Ventrículo esquerdo

Lista de Figuras

MARCO TEÓRICO

Figura 1 Frequência mundial das doenças.....	14
Figura 2 Remodelamento cardíaco.....	17
Figura 3 Progressão do IAM.....	18
Figura 4 Reatividade das espécies de ativas de oxigênio.....	21
Figura 5 Formação e depuração das espécies ativas de oxigênio.....	22
Figura 6 Via de síntese de colesterol e inibição via HMG-CoA redutase.....	29

Lista de Tabelas

ARTIGO ORIGINAL

Table 1 Cardiac function and morphometric characteristics assessed by echocardiogram of rats 48 h post-AMI.....	56
Table 2 Cardiac antioxidant and oxidative damage profile of rats 48 h post-AMI.....	58

1 Marco teórico

1.1 Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa e sistêmica que apesar dos avanços da medicina tanto no seu diagnóstico como também no seu tratamento, o prognóstico continua sendo comparado a de algumas neoplasias e de outras doenças degenerativas ^{1, 2}. Nesse intuito faz-se necessário a investigação de mecanismos que possam interferir nos fatores de morbimortalidade. O infarto agudo do miocárdio (IAM) como um dos principais eventos que desencadeiam a IC, dependendo da sua magnitude, pode gerar a extinção de milhões de cardiomiócitos ³, comprometendo a função cardíaca. Conjuntamente com a debilidade hemodinâmica, eventos de ordem celular contribuem para piores desfechos. A homeostase celular de organismos eucariontes é sustentada através de complexos mecanismos precisamente regulados. Sua capacidade responsiva é intensa e contínua para todo o sistema, porém, exacerbada quando este equilíbrio é perdido. Neste âmbito podemos entender alterações decorrentes da síndrome da IC como o desencadeamento de um processo progressivo de remodelamento tecidual cardíaco e de diversos desfechos fisiopatológicos adjacentes ^{4, 5}.

Participando desse quadro, o estresse oxidativo parece refletir a debilidade do sistema que se apresenta em desequilíbrio, exemplificado pela queda da atividade das enzimas antioxidantes ⁶⁻⁸. Essa queda se reflete num acúmulo de EAO que podem danificar ainda mais proteínas, lipídios e o próprio DNA ^{6, 7}.

A fim de restabelecer esse equilíbrio, diversas abordagens vêm sendo realizadas. Uma delas é a utilização de fármacos, como a estatina, que além de possuir efeitos comprovadamente benéficos no controle lipidêmico, possuem também efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios, anti-arritmogênicos, atuando na redução da mortalidade e re-infarto, e um efeito de redução no dano oxidativo que é pouco compreendido⁹⁻¹². Nesse contexto, o atual estudo propõe avaliar o efeito do pré-tratamento com estatina sobre parâmetros funcionais e bioquímicos cardíacos em ratos infartados analisados precocemente após 48 horas do evento.

1.2 Epidemiologia das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) ocupam o primeiro lugar como causa de morte no âmbito mundial superando até mesmo guerras, acidentes de carro e violência urbana. Em uma estimativa da Organização Mundial da Saúde, 17,1 milhões de pessoas morreram de DCV em 2004 representando 30% de todas as mortes globais. Dentro destas mortes 7,2 milhões foram devido à doença coronariana e 5,7 milhões foram devido a acidentes vasculares isquêmicos. Em uma estimativa futura é de que em 2030 aproximadamente 23,6 milhões de indivíduos vão morrer de causas relacionadas com doenças cardiovasculares¹³.

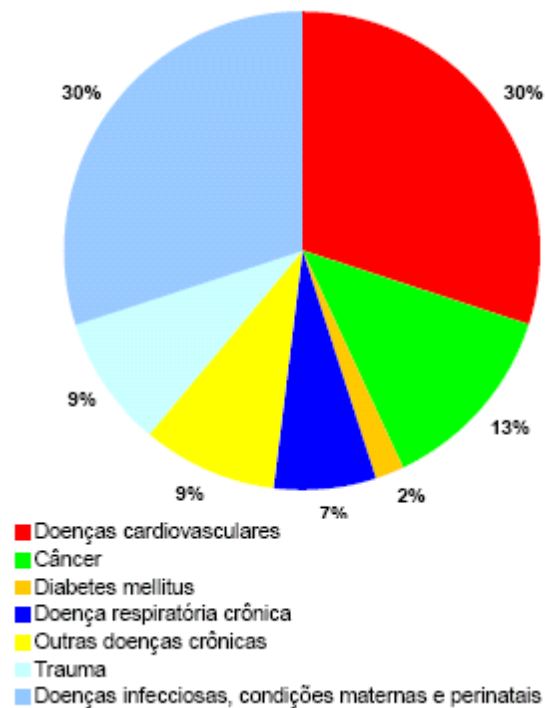


Figura 1: Frequência mundial das doenças. (Organização Mundial da Saúde 2005).

No Brasil as DCV também são as principais causas de óbito. No ano de 2007 houve 1.055.507 internações por doenças do aparelho circulatório onde 268.575 foram devidas a esse grupo de doenças, que inclui o infarto e o acidente vascular cerebral (AVC), quase 30% do total de óbitos registrados devido as DCV¹⁴. Estima-se que as mortes por doenças crônicas no Brasil, em 2005, tenham representado uma perda de US\$ 3 bilhões devido a mortes prematuras por doença isquêmica do coração, acidente vascular encefálico e diabetes mellitus e que, nos próximos 10 anos, essa cifra chegue a US\$ 49 bilhões¹⁴.

1.3 Insuficiência cardíaca pós-infarto agudo do miocárdio: Patogênese e progressão da doença

A IC é uma síndrome clínica complexa que ocorre secundariamente a anormalidades da estrutura/função cardíaca (herdadas ou adquiridas) que prejudicam a capacidade do ventrículo esquerdo para receber (deficiência diastólica) ou ejetar sangue (deficiência sistólica). A IC pode ser resultado de um evento isquêmico coronariano, especificamente o IAM. O episódio de isquemia é caracterizado pelo déficit energético miocárdico causado pela redução do fluxo sanguíneo, o qual pode ser gerado por um aumento do tônus vascular coronariano, agregação plaquetária intracoronária ou formação de trombo. Esse processo culmina em uma hipoperfusão tissular e conseguinte diminuição da biodisponibilidade de O₂ e nutrientes no miocárdio, levando à interrupção do metabolismo aeróbico, depleção da creatina fosfato e início da glicólise anaeróbica ¹⁵. Logo após o infarto, o tecido miocárdico já apresenta sinais de alterações de acinesia muscular. A evolução temporal e a irreversibilidade da área de lesão tecidual após o IAM é variável e dependente da transmuralidade do evento, fluxo coronariano residual e de determinantes hemodinâmicos do consumo de oxigênio. Em uma primeira resposta, o músculo cardíaco entra em hibernação, e se forem restaurados os constituintes energéticos, não ocorrerá dano ao tecido. Num período temporal intermediário, ocorre o fenômeno de *stunning*, ou seja o miocárdio pode se apresentar atordado. Esse quadro já configura uma deterioração na função biológica onde os cardiomiócitos podem ser induzidos tanto a vias de sobrevivência quanto às de apoptose. Já num período de tempo maior, a lesão miocárdica

torna-se irreversível caracterizando um quadro necrótico por destruição dos componentes celulares ¹⁵.

No aspecto clínico, o tamanho da área necrosada constituiu um fator determinante do prognóstico em longo prazo. A classificação clínica de Killip e Kimbal, elaborada no final dos anos 60, ajudou a esclarecer a importância da quantificação da área infartada na disfunção do ventrículo esquerdo (VE). A classificação é referente desde a classe I, com pequenos infartos, até a classe IV com necroses extensas, superiores a 30% da parede anterior do VE, condicionando quadros de choque cardiogênico, quase sempre letais ¹⁶.

Na década de 40, Heimburger padronizou uma técnica que mimetizava o evento do IAM em ratos ¹⁷. Os pesquisadores Johns e Olson consolidaram o modelo de infarto em um estudo descritivo abordando a anatomia coronariana de ratos, hamsters, camundongos e cobaias na cirurgia de IAM ¹⁸. Em 1979, Pfeffer e colaboradores, em um trabalho clássico classificaram as áreas de infarto do VE no modelo entre pequenas (4 – 30%), médias (31 – 46%) e grandes (47 - 59%) ¹⁹.

Estes estudos demonstraram que a oclusão aguda de uma artéria coronária, particularmente quando ocorrem lesões transmuralis de grandes proporções, resultam em alterações complexas da arquitetura ventricular. Essas alterações começam a se estabelecer imediatamente após a oclusão arterial, progredindo por várias semanas após o dano isquêmico inicial (Fig 2). Este processo de modificação estrutural do miocárdio foi então denominado de remodelamento ventricular, afetando significativamente a função do ventrículo esquerdo ²⁰. O remodelamento ventricular cardíaco pode ser definido como alterações da expressão gênica, alterações moleculares, celulares e

intersticiais que se manifestam clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração após a lesão cardíaca ⁴. Este evento nada mais é do que um processo adaptativo de regeneração tecidual que envolve eventos fisiológicos de inflamação, aumento da resposta simpática, formação de novos vasos, proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e remodelamento da cicatriz ²¹ (Fig 2 - 3).

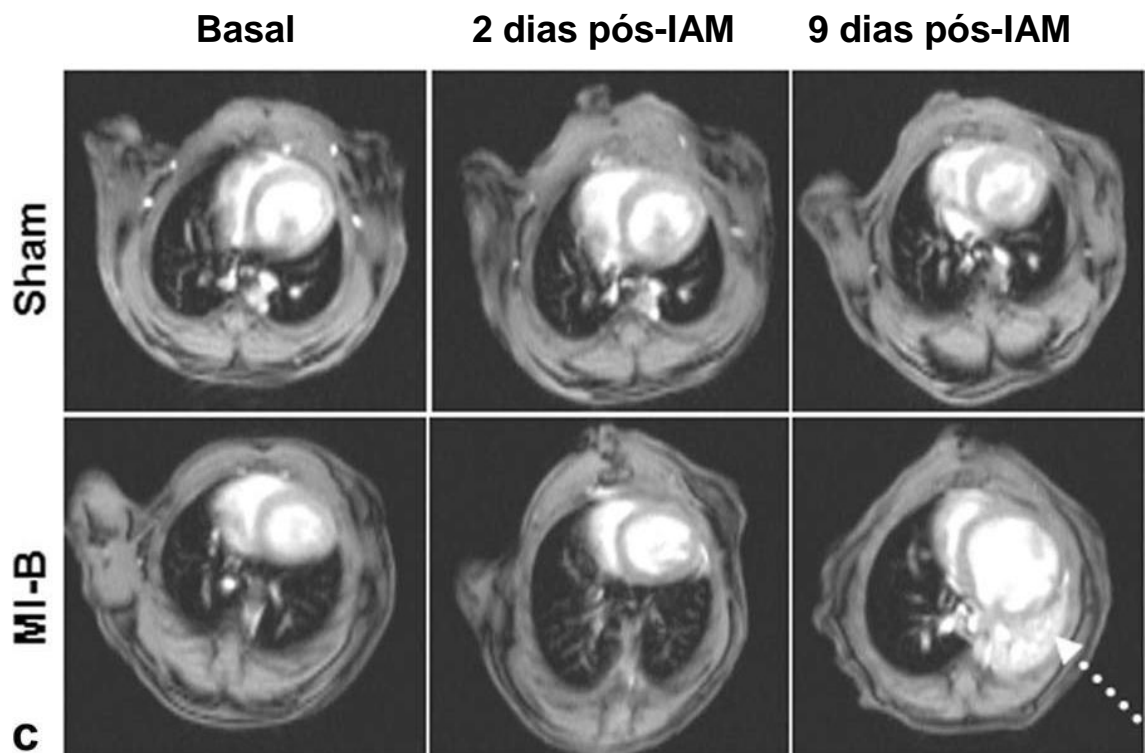


Figura 2- Remodelamento cardíaco: Imagem de ressonância magnética plano transversal representando quadros comparativos entre camundongos não-infartados (3 imagens superiores) e camundongos infartados (3 imagens inferiores) nos tempos 0, 2 e 9 dias após modelo de infarto agudo do miocárdio ²².

A exposição a prolongados períodos de isquemia gera a necrose dos cardiomiócitos promovendo a ativação das vias de morte celular, estimulação da via dos receptores toll-like (TLR4), e aumento de EAO ²³⁻²⁷. Estes componentes induzem a ativação do complexo NF-kB que regula positivamente

a sinalização para citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- α que por sua vez, recrutam plaquetas, neutrófilos e células mononucleares, levando assim, a um incremento na resposta inflamatória medida por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento ^{28, 29}. Os níveis dessas citocinas influenciam diretamente no processo de remodelamento cardíaco, coordenando a resposta inflamatória ³⁰ (Fig 3).

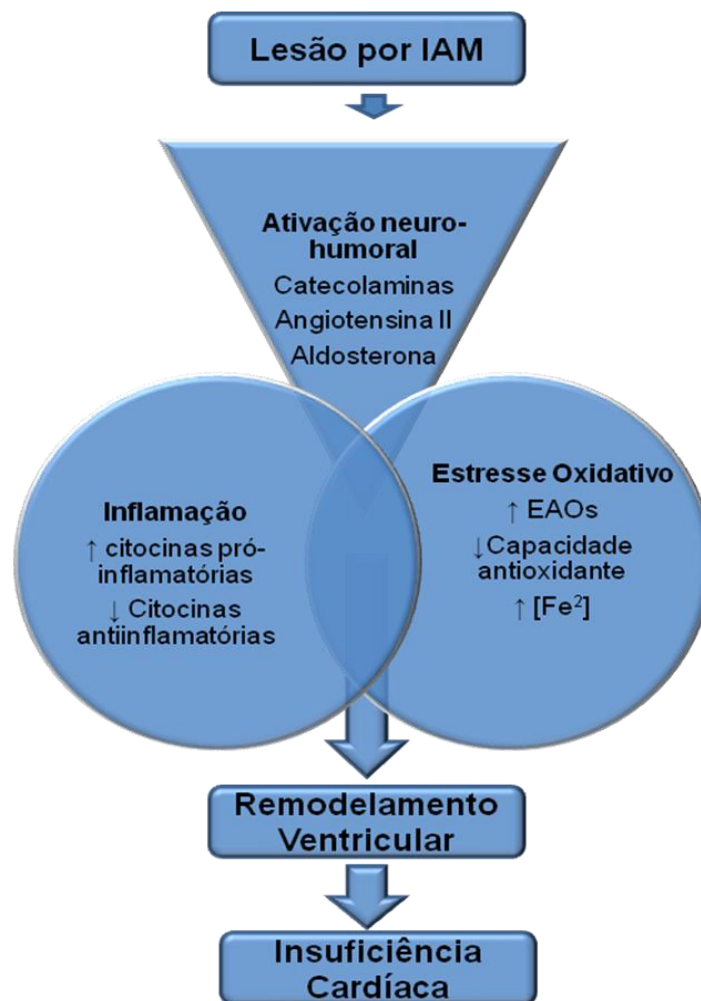


Figura 3 - Infarto agudo do miocárdio gerando uma resultante de aumento da resposta simpática, inflamação e estresse oxidativo promovendo o remodelamento ventricular sendo intimamente correlacionado com a insuficiência cardíaca. Adaptado de Khaper 2010 ⁸.

Após o IAM os cardiomiócitos perdem a assimetria das suas camadas fosfolipídicas da membrana plasmática causada pela diminuição da ATP celular. Esse déficit energético resulta em uma diminuição da atividade de translocação dos aminofosfolípidios, podendo também ocorrer um desacoplamento do citoesqueleto com a membrana plasmática celular. Essa desorganização da membrana do cardiomiócito possibilita a ligação de mediadores inflamatórios como as fosfolipases tipo IIA (sPLA2-IIA) as quais estão relacionadas com a indução da morte dessas células ^{31, 32}.

As células inflamatórias liberam enzimas como as (MMP-1, MMP-3 e MMP-9, que degradam e remodelam a matriz extracelular para ajudar a remover as células necróticas, mas também deixam o miocárdio estruturalmente frágil (Fig. 2). Macrófagos também ativam os fibroblastos, em parte pela liberação de fator de crescimento transformador TGFβ1 ³³. O processo de reestruturação da matriz extracelular pode provocar o acúmulo de fibrose resultando em consequências como a IC congestiva e arritmias. Por outro lado, o afinamento demasiado pode acarretar na dilatação do ventrículo esquerdo e até mesmo ruptura de aneurisma ³⁴.

Grandes avanços ocorreram no entendimento dos mecanismos hemodinâmicos, histológicos e moleculares envolvidos nas alterações que ocorrem no tecido cardíaco após um dano isquêmico. Porém muitos pacientes que sofrem eventos agudos, mesmo quando tratados de forma otimizada, desenvolvem dilatação ventricular progressiva e, frequentemente, evoluem para quadros de IC. Nesse sentido, estratégias com o objetivo de atenuar o

remodelamento ventricular vêm sendo propostas e testadas, como é o caso da terapia medicamentosa.

1.4 Estresse Oxidativo

As EAO, bem como as espécies ativas de nitrogênio, são produtos metabólicos celulares naturais participando do equilíbrio homeostático dos sistemas vivos ³⁵. Elas são assim definidas por serem moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos ou moleculares ³⁶.

As EAO estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres ³⁷. A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais podemos destacar a cadeia respiratória mitocondrial, atividade da xantina oxidase, NADPH oxidase e mecanismos fagocitários através da ação da mieloperoxidase.

Cerca de um a cinco por cento do oxigênio consumido pela mitocôndria é transformado no radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) podendo ser produzido em pelo menos dois locais dentro da cadeia respiratória; no complexo I e na região do complexo III ^{36, 38}. Outros compostos, também se destacam como EAO além do $O_2^{\cdot-}$ como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxil (OH^{\cdot}) sendo este último o mais danoso (Fig. 4).



Figura 4 - Reatividade das espécies de ativas de oxigênio³⁹.

A reatividade das EAO é demonstrada pela lipoperoxidação (LPO) das membranas, sendo um processo fisiológico que envolve não somente o *turnover* das membranas celulares através da oxidação de seus componentes (ácidos graxos poli-insaturados e proteínas transmembrana como também a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos⁴⁰.

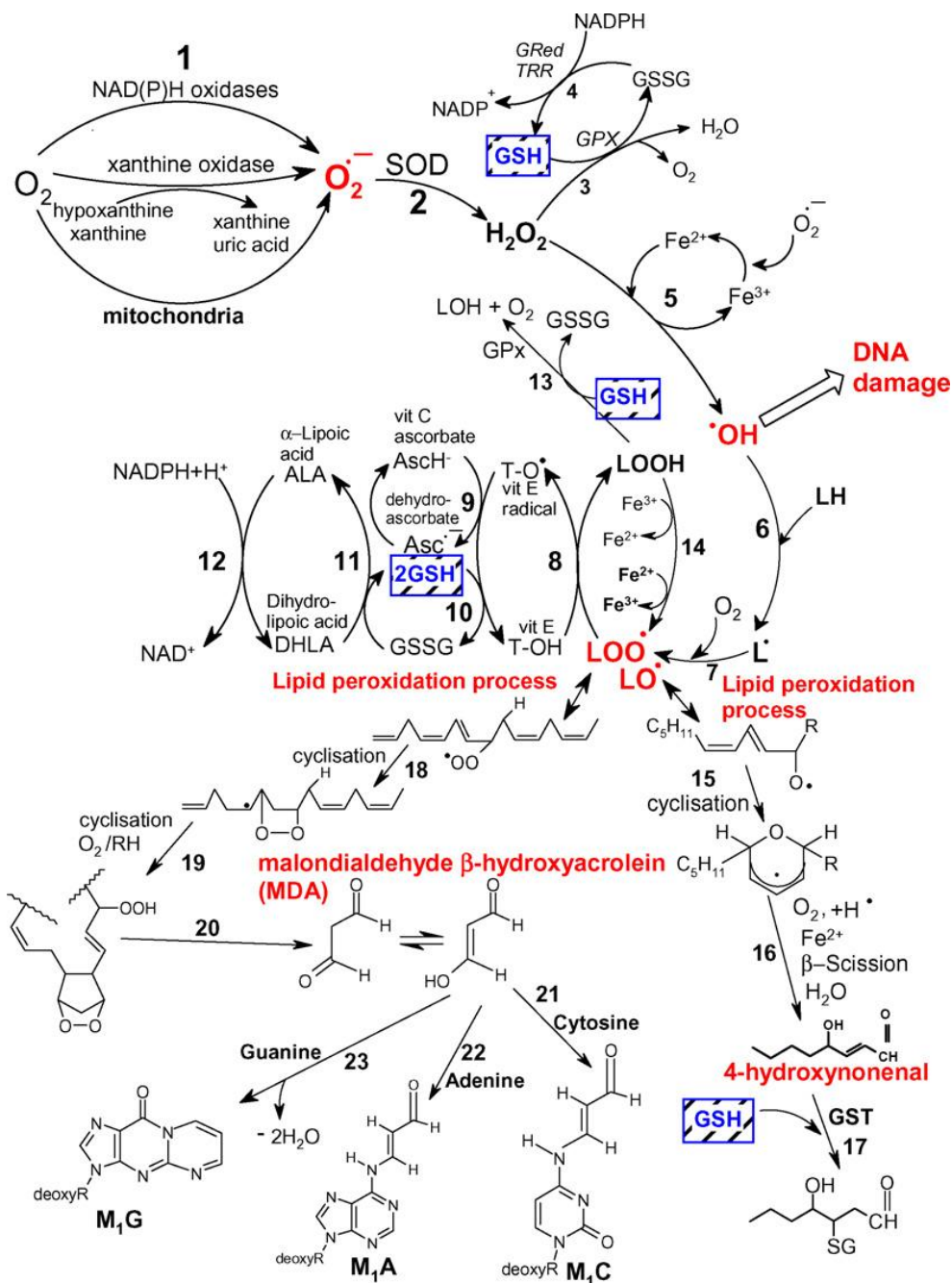


Figura 5 - Formação e depuração das espécies ativas de oxigênio ³⁷.

De forma a garantir a homeostase sistêmica, isto é, a manutenção do equilíbrio das reações de REDOX, os sistemas vivos selecionaram substâncias que possuem o potencial de neutralizar as ações das EAO, prevenindo, desta forma, os danos oxidativos ⁴¹. Tais substâncias são chamadas de antioxidantes, incluindo componentes enzimáticos (linha de defesa primária) e

não-enzimáticos (linha de defesa secundária), que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo de ânion radical superóxido e de peróxido de hidrogênio (Fig. 5). Existem também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados ⁴⁰. Dentre as enzimas podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Por outro lado, os organismos possuem defesas não-enzimáticas que podem ser divididas da seguinte forma: antioxidantes hidrofílicos (por exemplo: vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavinas, carotenoides e tocoferóis) ³⁷. A glutathione é um dos componentes antioxidantes não-enzimáticos mais abundantes no âmbito celular. O seu estado REDOX e o de resíduos de cisteína fornecem elementos para a caracterização do estresse oxidativo total ⁴².

O estresse oxidativo pode ser definido como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano potencial” ^{43, 44}.

1.5 Insuficiência Cardíaca e Estresse Oxidativo

O coração analisado como uma bomba contrátil consome uma das maiores quantidades de oxigênio em comparação com os outros órgãos. Seus mecanismos regulatórios evoluíram de maneira a otimizar a manutenção de um equilíbrio entre a oferta e consumo de O₂ miocárdico. O coração consegue aumentar o consumo de O₂ acima das máximas condições de carga durante diferentes situações fisiológicas e também nas patológicas como as de

estresse, sendo hipóxia, isquemia, pressurização e sobrecarga de volume ⁴⁵. Dentre eles, o mecanismo REDOX possui um papel principal nas vias de sinalização podendo ser decisivo sobre o caminho de sobrevivência ou de morte da célula ⁴⁵. É conhecido que os tecidos vasculares e cardíacos são ricas fontes de EAO, incluindo o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e óxido nítrico ^{46, 47}.

A depressão da função cardíaca na IC crônica tem origem multifatorial e, embora a sua causa exata não tenha sido completamente elucidada, vários estudos apontam para a participação de radicais livres e em especial as EAO na patogênese desta doença ^{7, 48, 49}. Estudos experimentais mostram diminuição da atividade antioxidante (enzimas antioxidantes) e aumento da produção de EAO, resultando no incremento do estresse oxidativo ⁶. Por consequência, a contratilidade miocárdica é deprimida conjuntamente com a sua função, resultante da redução de Ca^{++} proveniente do retículo sarcoplasmático e da atividade da Ca^{++} ATPase no tecido cardíaco ²⁶. Também o estado REDOX dos receptores de rianodina (RyR) são alterados na IC levando ao incremento da atividade da RyR, o que, presumivelmente, contribui para diminuir o teor de cálcio retículo sarcoplasmático e induzir a outras resultantes anormais de liberação do cálcio observadas na IC ⁵⁰. Outros estudos relacionam alterações morfológicas, como hipertrofia e apoptose dos cardiomiócitos, e disfunção da contratilidade miocárdica com o aumento da expressão das isoformas da NOS (óxido nítrico sintase): NOS endotelial (eNOS) ⁵¹.

Em uma revisão clássica, Antozzi e colaboradores descrevem a importância das bases moleculares e bioquímicas para o entendimento de

cardiomiopatias primárias e as subdividem em dois grupos: como resposta a desordens estruturais da contratilidade do miocárdio e como desordens no metabolismo energético cardíaco, sendo os defeitos nos processos de fosforilação oxidativa na mitocôndria e no processo de beta oxidação reconhecidamente as principais causas metabólicas da cardiomiopatia ⁵².

Devido a estas alterações metabólicas, é possível inferir que as conseqüentes alterações nos processos de oxi-redução que ocorrem na célula, e conseqüentemente no “status” de estresse oxidativo ao qual este órgão está submetido são também responsáveis diretas pelo processo de remodelamento ventricular ⁵².

Num estudo sobre os índices de LPO e atividade antioxidante (GPx e vitamina C) de pacientes com diferentes graus de IC congestiva, foi encontrado um progressivo aumento de danos induzidos por radicais livres e diminuição das reservas antioxidantes diretamente proporcionais ao grau da IC ⁵³. Autores sugerem que a partir destes dados, novas estratégias de tratamento com elementos antioxidantes devam ser propostas ^{6, 8}.

Estudos também apontam para uma interação entre o estresse oxidativo e fatores inflamatórios nos eventos de isquemia e reperfusão mediados principalmente pelo TLR4/NADPH oxidase ^{8, 54}.

Ratos infartados e submetido a tratamento com drogas vasodilatadoras (captopril e prazosin), por 16 semanas, tiveram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT e atenuação da LPO, quando comparados aos seus controles, sugerindo uma ação antioxidante destes fármacos (o grupamento sulfidril do captopril atuando como um “varredor” de radicais livres) ⁵⁵.

Baseada no conceito do desequilíbrio REDOX, a terapia antioxidante surgiu como uma terapia inovadora, preventiva e até remediadora de todas as doenças onde o estresse oxidativo apresentava-se evidente. Contudo, contrariando as expectativas, os resultados de longos testes clínicos têm mostrado que a terapia antioxidante não melhora o quadro clínico na maioria das condições patológicas testadas ⁵⁶⁻⁵⁸, sugerindo que as suplementações empregadas não têm sido adequadas às necessidades dos pacientes e/ou que uma melhor definição de estresse oxidativo seja necessária. Assim, o pesquisador Dean Jones tem sugerido que estresse oxidativo seja definido como uma desregulação da sinalização e do controle REDOX ⁴², criando a possibilidade de haver estresse oxidativo envolvendo apenas a alteração do circuito REDOX, de forma restrita, sem a ocorrência de um desequilíbrio REDOX global. Segundo esta nova definição, o estresse oxidativo poderia ser quantificado através da determinação dos potenciais de redução plasmáticos dos pares GSH/GSSG (glutathiona/glutathiona dissulfeto) e, principalmente, Cys/CySS (cisteína/cistina) ⁵⁹.

1.6 Modulação imunoinflamatória no IAM

A modulação imunoinflamatória tem papel fundamental relacionada a fisiopatogenia da IC e sua correlação direta com o estresse oxidativo ⁶⁰. Diversos estudos demonstraram atividade celular ou humoral em diversas formas de IC, bem como aumento na concentração sérica de diversos marcadores inflamatórios (como o TNF- α , IL-6, IL-1) ^{60, 61}. As citocinas são mediadores biológicos de origem inflamatória que têm sido encontradas em

concentrações séricas elevadas em pacientes com IC. De forma geral estas são moléculas protéicas de baixo peso molecular (15 a 30 kD) sintetizadas por diferentes tipos celulares, em resposta a inúmeros estímulos fisiológicos e fisiopatológicos. São agentes vasodepressores e inotrópicos negativos como o TNF- α e a IL-6 e encontram-se em concentrações elevadas em pacientes com IC ⁶². Entre outros efeitos, estes mediadores aumentam indiretamente a expressão da enzima iNOS, aumentando a concentração de óxido nítrico, reduzindo a contratilidade cardíaca e promovendo efeitos tóxicos através da indução de apoptose ⁶³.

O TNF- α é uma das citocinas mais estudadas na busca de uma correlação entre a modulação imunoinflamatória e a fisiopatogenia da IC. Esta citocina tem um papel central na inicialização e sustentação da resposta inflamatória ⁶⁴. O TNF- α , assim como outras citocinas tem sua transcrição gênica ativada pelo dímero p50/p65 do NF- κ B que se transloca para o núcleo, onde ativa também transcrição dos genes IL-1, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectina, e o fator tecidual que atuam em promotores de elementos resposta κ B, portanto regulados pelo NF- κ B. Este fator se encontra na forma heterodímera, inativo no citoplasma, ligado a proteínas inibidoras denominadas genericamente de I κ B. Quando a célula é estimulada, o I κ B é fosforilado, assim sinalizando para sua degradação proteolítica ⁶⁵. Outra citocina, a IL-10 demonstra potentes propriedades anti-inflamatórias inibindo a produção de várias outras citocinas, como o próprio TNF- α ⁶⁶. A IL-10 também atua como um antagonista natural do TNF- α por inibição do NF- κ B sinalizando através da preservação do I κ B ⁶⁷. Estudos recentes mostraram que a queda na razão IL-10/TNF- α é correlacionada positivamente com a progressão da IC pós-IAM ⁶¹.

Além disso, num estudo realizado com cardiomiócitos isolados de ratos após sete dias de IAM, foi possível observar que houve correlação entre a queda da razão IL-10/TNF- α e a geração de EAO associando-se ao modelo *in vivo* com a progressão da IC^{60, 61}.

1.7 Estatinas

Medicamentos hipocolesterolêmicos reduzem eventos cardíacos em pacientes dislipidêmicos ou mesmo naqueles com níveis moderadamente elevados de colesterol, podendo melhorar ou mesmo reverter lesões vasculares. Neste contexto, as estatinas vêm se mostrando úteis em restaurar a função endotelial e proteger contra complicações da doença aterosclerótica, tanto na prevenção primária, quanto na secundária. Estes mecanismos incluem a redução do crescimento das células do músculo liso, formação de trombo, bem como na redução da proteína C reativa⁶⁸.

As estatinas são agentes hipolipemiantes, responsáveis pela diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol através da captação de LDL. Elas agem em uma etapa limitante na síntese de colesterol intracelular. A estatina inibe de forma seletiva e competitiva a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-A redutase (HMG-CoA redutase), responsável pela conversão da HMG-COA à mevalonato (Fig. 5)⁶⁹. Os efeitos pleiotrópicos das estatinas caracterizam-se pelas propriedades anti-inflamatórias, ações imunomoduladoras, antitrombogênica e de melhora da disfunção endotelial⁷⁰.

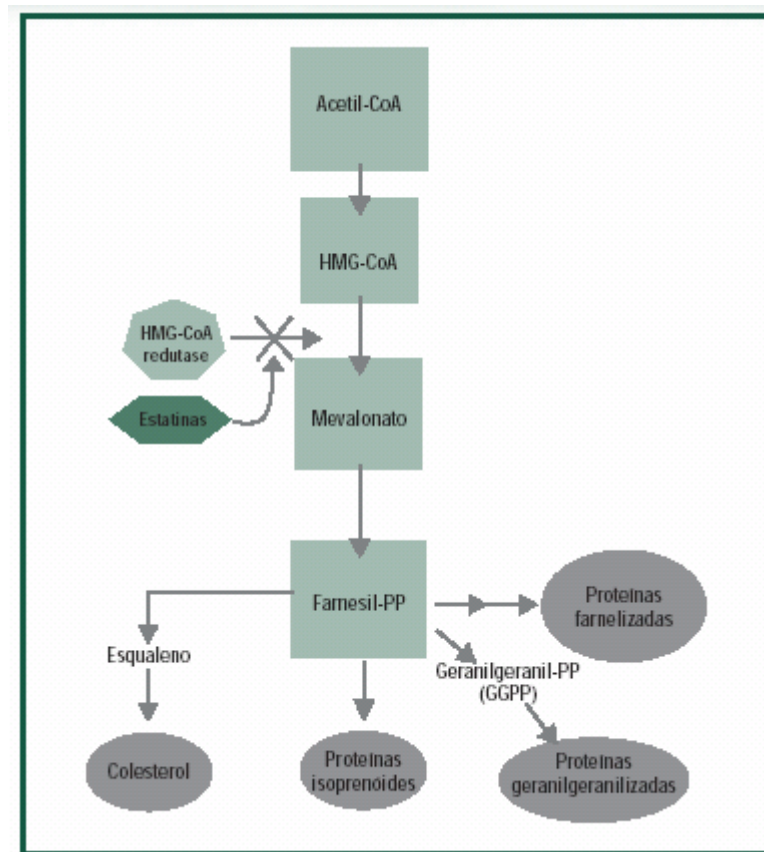


Figura 6 – Via de síntese de colesterol e inibição via HMG-CoA redutase.

1.8 Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas

Tem sido demonstrado através de vários ensaios clínicos, que a administração de estatina tem reduzido morbidade e mortalidade entre pacientes com diferentes perfis de risco, através dos seus efeitos benéficos como prevenção primária e secundária. O provável mecanismo hipolipemiante desta terapia na prevenção da aterosclerose é baseado numa redução na deposição de colesterol e estabilização da placa aterosclerótica ⁷¹. Estudos experimentais subseqüentes sobre o uso de estatinas demonstraram a potencialidade dos efeitos benéficos da estatina poderiam ser estendidos para o contexto clínico no tratamento de doenças cardiovasculares, bem como outras doenças crônicas associadas ao aumento do estresse oxidativo ⁷². Estes

estudos demonstram que as estatinas diminuem a biodisponibilidade de um dos subprodutos da reação da HMG-CoA redutase, o geranil, que é um elemento ligante essencial da proteína Rac1 em seu ancoramento com a membrana celular. Assim, sem essa conformação espacial na membrana, a função da Rac1 é prejudicada não levando ao acionamento da rota de ativação da NADPH oxidase e conseguinte geração de EAO, principalmente O_2^- ^{73, 74}.

Tais efeitos das estatinas têm sido observados quando avaliados parâmetros como modificações do processo inflamatório, função endotelial, vasoreatividade, função plaquetária e parâmetros de coagulação e fibrinólise ⁷⁵. ⁷⁶. Em um estudo em animais normocolesterolêmicos o uso de sinvastatina promoveu a angiogênese e ativação de vias de sobrevivência celular através da Akt ⁷⁷. A eficácia das estatinas foi também estudada de forma combinada com a terapia padrão, administrando antagonistas dos receptores da angiotensina (losartan), no modelo de IAM. Este estudo demonstrou que o uso combinado desses fármacos resulta em melhores resultados na função cardíaca esquerda quando comparados os tratamentos isoladamente ⁷⁸.

Estes efeitos pleiotrópicos, não relacionados com o controle colesterolêmico, possibilitaram testar o uso das estatinas como terapia coadjuvante na síndrome coronariana aguda (SCA). O Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) e o Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI-22) são importantes ensaios clínicos prospectivos controlados que apresentaram evidências consistentes sobre a administração de estatinas como terapia adjuvante em síndromes isquêmicas agudas ^{75, 79-81}. Outros dois ensaios clínicos, PROVEM IT e A to Z, além do MIRACL e TIMI 22, mostraram que a administração precoce de estatinas (nos primeiros dias e em

altas doses) em pacientes com SCA levou à redução significativa do desfecho composto de óbito, IAM e reinternação por novo episódio de SCA^{82, 83}. Estes benefícios foram bem mais evidenciados em longo prazo, apesar de alguns destes estudos apontarem algum benefício já nas primeiras semanas. O pré-tratamento com estatinas em pacientes acometidos por acidente vascular cerebral resultou em uma menor degeneração neuronal precoce e uma melhora no prognóstico⁸⁴.

Existe consenso indicando o uso de estatinas nas primeiras semanas após o evento coronariano agudo, e nas atuais diretrizes indicam o uso de estatinas logo após os primeiros dias pós-SCA⁸⁵. Primariamente os estudos utilizavam doses iniciais divergentes (atorvastatina (80 mg/dia), sinvastatina (40 mg/dia) e pravastatina (40 mg/dia))⁸⁶. Porém em uma meta-análise englobando cerca de 40.000 pacientes demonstrou que o tratamento com altas doses de estatina resultaram numa maior proteção de 25% de novos eventos coronarianos e 18% de proteção para IAM não fatais comparado com doses moderadas para pacientes que já sofreram o evento¹². No modelo de IAM, um estudo avaliando várias concentrações de atorvastatina demonstrou que doses de 20mg/Kg/dia possui melhores resultados no remodelamento cardíaco e menores áreas de infarto⁸⁷.

1.9 Diversidades das estatinas e sua multiplicidade de respostas

As estatinas podem aumentar a atividade de eNOS com inibição de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina 1⁸⁸. A pitavastatina preserva

a função endotelial em artérias coronárias e arteríolas na presença de hipercolesterolemia, aumentando o nível NOS e reduzindo o estresse oxidativo, além de minimizar a susceptibilidade à oxidação de LDL ⁸⁹. Num estudo experimental crônico utilizando ratos Wistar foram observados efeitos terapêuticos da rosuvastatina administrada 2 dias antes do insulto e avaliados 10 semanas pós-IAM; houve uma melhora da disfunção endotelial e uma redução significativa da agregação plaquetária ⁹⁰. Em ratos normocolesterolêmicos, a administração de rosuvastatina antes da indução de isquemia miocárdica, aumentou a eNOS, diminui iNOS e o dano vascular endotelial ⁹¹.

Independentemente da capacidade de redução do colesterol, vários estudos tem focado os efeitos pleiotrópicos das estatinas, que incluem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios vasculares ⁹². Em outro estudo, foi utilizada fluvastatina precocemente (14 dias antes do insulto) com o objetivo de avaliar uma possível ação cardioprotetora, de varredura (*scavenger*) de radicais livres atenuando a injúria pós-isquemia e reperfusão. Os resultados indicaram que o tratamento prévio com fluvastatina reduziu a área de infarto, independente da ação hipolipemiante, podendo ter atenuado a lesão miocárdica principalmente via óxido nítrico. Porém, suas propriedades antioxidantes, não foram elucidadas de maneira completa sendo testado apenas um único marcador de EAO ⁹³. Em um estudo de Hayashidani e colaboradores utilizando camundongos infartados pelo modelo de oclusão coronariana e tratados por quatro semanas com fluvastatina, foi demonstrado que o uso da estatina resultou em uma menor dilatação ventricular esquerda no grupo tratado comparado com o grupo placebo, resultando em uma melhor fração de

encurtamento no período de 28 dias após IAM. Também foi demonstrado que o tratamento com esse fármaco diminuiu a atividade das enzimas metaloproteinases MMP-2 e MMP-13 que degradam a matriz extracelular ⁹⁴.

Durante a fase de inflamação aguda, neutrófilos e monócitos adicionam ao tecido cardíaco lesado mieloperoxidases (MPO) que apesar de constituírem uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunitário inato induzem a formação de EAO e subseqüentemente contribuem para o processo de remodelamento do miocárdio ⁹⁵. Clinicamente, altos níveis de MPO plasmáticos predizem um aumento no risco de complicações cardiovasculares em pacientes com um aumento na mortalidade de pacientes que sofreram infarto do miocárdio ^{96, 97}. Em um estudo avaliando a atividade da MPO, avaliada por imagem de ressonância magnética, o uso de atorvastatina em camundongos infartados demonstrou uma significativa diminuição da atividade dessa enzima nas imagens analisadas já em 48h pós-infarto. O grupo controle também demonstrou que o maior pico de MPO se dá nas mesmas 48 horas ⁹⁸. Estes dados demonstram que as alterações bioquímicas decorrentes do IAM que se correlacionam com o remodelamento ventricular são observadas de forma imediata no pós-evento.

O tratamento com atorvastatina pós-IAM, em camundongos demonstrou queda de 40% na mortalidade durante as quatro semanas e revelou um aumento da concentração do óxido nítrico endotelial que foi relacionado com uma maior neovascularização na zona de borda infartada ⁹⁹.

Estatinas reduzem níveis plasmáticos de colesterol, diminuindo assim a entrada das lipoproteínas modificadas pela parede vascular. Há cada vez mais evidências de que as estatinas também podem exercer efeitos além da

diminuição dos níveis séricos de colesterol. Entretanto, muitos destes efeitos pleiotrópicos parecem estar envolvidos de forma restrita apenas a restauração ou a melhora da função endotelial através do aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, promovendo uma melhora na função endotelial, reduzindo estresse oxidativo, e atenuando respostas inflamatórias. Assim, os efeitos das estatinas são vistos como endotélio-dependente podendo contribuir como terapia coadjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares⁹². Por outro lado, o seu papel na rota inflamatória a partir do estresse oxidativo, de forma preventiva ou mesmo pós-insulto, especificamente no tecido miocárdico, ainda não foi totalmente esclarecido.

2 Justificativa

Há uma importante lacuna no conhecimento a respeito do que ocorre entre o insulto cardíaco e o início do remodelamento ventricular no que tange a correlação entre o pré-tratamento com estatinas e o estresse oxidativo.

Embora estudos mostrem diversos efeitos que não apenas hipolipemiantes das estatinas, seus efeitos específicos sobre o estresse oxidativo num pré-tratamento analisado em tempo precoce pós-IAM ainda não foram totalmente explorados.

3 Hipótese

O uso prévio de estatina pode modular de forma benéfica parâmetros de estresse oxidativo e se associar a melhora de parâmetros cardiovasculares 48h pós-IAM experimental em ratos.

4 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de estresse oxidativo em animais submetidos ao tratamento prévio com atorvastatina (20mg/Kg por dia) com início duas semanas antes do infarto, até o final do experimento sendo analisados 48h após o insulto, correlacionando os achados com dados de função cardíaca.

4.1 Objetivos Específicos

Avaliar parâmetros morfofuncionais ecocardiográficos como função cardíaca e área de infarto no tempo precoce de 48 horas pós-IAM;

Avaliar o perfil de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, bem como dano a lipídios de membrana e a proteínas, 48h pós-infarto.

5 Referências Bibliográficas

1. Okonko DO, Anker SD. Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms. *J Card Fail.* 2004;10(1 Suppl):S5-9.
2. Cleland JG, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Eastaugh J, Follath F, Freemantle N, Gavazzi A, van Gilst WH, Hobbs FD, Korewicki J, Madeira HC, Preda I, Swedberg K, Widimsky J, management IoHFPCallpiea, Cardiology SGoDotWGoHFoTESo. Management of heart failure in primary care (the IMPROVEMENT of Heart Failure Programme): an international survey. *Lancet.* 2002;360(9346):1631-1639.
3. Willems E, Lanier M, Forte E, Lo F, Cashman J, Mercola M. A chemical biology approach to myocardial regeneration. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(3):340-350.
4. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. 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.* 2000;35(3):569-582.
5. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet.* 28 2006;367(9507):356-367.
6. Singal P, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 2000;2(3):206-211.
7. Singal P, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res.* 1998;40(3):426-432.
8. Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM, Singal PK. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the

- management of heart failure. *Antioxid Redox Signal.* 1 2010;13(7):1033-1049.
9. Malik S, Sharma AK, Bharti S, Nepal S, Bhatia J, Nag TC, Narang R, Arya DS. In Vivo Cardioprotection by Pitavastatin From Ischemic-Reperfusion Injury Through Suppression of IKK/NF- κ B and Upregulation of pAkt -eNOS. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011.
 10. Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol.* 2002;86(1):5-18.
 11. Kayikcioglu M, Can L, Evrengul H, Payzin S, Kultursay H. The effect of statin therapy on ventricular late potentials in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2003;90(1):63-72.
 12. Mills EJ, O'Regan C, Eyawo O, Wu P, Mills F, Berwanger O, Briel M. Intensive statin therapy compared with moderate dosing for prevention of cardiovascular events: a meta-analysis of >40 000 patients. *Eur Heart J.* 2011;32(11):1409-1415.
 13. World health organization. Cardiovascular diseases (CVDs). 2011.
 14. Brasil. Ministério da Saúde-DATASUS Banco de Dados 2005.
 15. Libby P, Bonow OR, Mann DL, Zipes DP *Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine, 8th Edition*, 8 ed; 2008.
 16. Killip T, 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol.* 1967;20(4):457-464.
 17. Heimbürger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg.* 1946;52:677-689.

18. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954;140(5):675-682.
19. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44(4):503-512.
20. Pfeffer M, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81(4):1161-1172.
21. Krafts KP. Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis.* 2010 Oct-2010;6(4):225-233.
22. Alsaïd H, Bao W, Rambo MV, Logan GA, Figueroa DJ, Lenhard SC, Kotzer CJ, Burgert ME, Willette RN, Ferrari VA, Jucker BM. Serial MRI characterization of the functional and morphological changes in mouse lung in response to cardiac remodeling following myocardial infarction. *Magn Reson Med.* 2011.
23. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31-47.
24. Oyama J, Blais C, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(6):784-789.
25. Riad A, Jäger S, Sobirey M, Escher F, Yaulema-Riss A, Westermann D, Karatas A, Heimesaat MM, Bereswill S, Dragun D, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol.* 2008;180(10):6954-6961.

26. Chandra M, Surendra K, Kapoor R, Ghatak A, Kaur G, Pandey N, Misra M. Oxidant stress mechanisms in heart failure. *Boll Chim Farm.* 2000;139(3):149-152.
27. Stutz A, Golenbock DT, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3502-3511.
28. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res.* 2002;55(2):329-340.
29. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999;99(11):1492-1498.
30. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation.* 1998;98(2):149-156.
31. van Dijk A, Krijnen PA, Vermond RA, Pronk A, Spreeuwenberg M, Visser FC, Berney R, Paulus WJ, Hack CE, van Milligen FJ, Niessen HW. Inhibition of type 2A secretory phospholipase A2 reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. *Apoptosis.* 2009;14(6):753-763.
32. Post JA, Verkleij AJ, Langer GA. Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/reperfused cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(2):749-760.
33. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med.* 2000;135(4):316-323.

34. Zamilpa R, Lindsey ML. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(3):558-563.
35. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266(1-2):37-56.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defenses. In: Free radicals in biology and medicine. 4rd ed. Oxford: Clarenton Press; 2007. p.105-245.
37. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
38. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1985;237(2):408-414.
39. Ohara A. *Radicais Livres - Bons, Maus e Naturais*; Entendendo o mecanismo oxidativo, 4 ed 2006.
40. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 1 2000;486(1):10-13.
41. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
42. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1865-1879.
43. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-295.

44. Packer L, Cadenas E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic Res.* 2007;41(9):951-952.
45. Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.* 1 2011;50(7):777-793.
46. Griending KK, Ushio-Fukai M. NADH/NADPH Oxidase and Vascular Function. *Trends Cardiovasc Med.* 1997;7(8):301-307.
47. Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(2):345-353.
48. Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res.* 1996;13(5):649-662.
49. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-1478.
50. Donoso P, Sanchez G, Bull R, Hidalgo C. Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front Biosci.* 2011;16:553-567.
51. Stein B, Eschenhagen T, Rüdiger J, Scholz H, Förstermann U, Gath I. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(5):1179-1186.
52. Antozzi C, Zeviani M. Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism. *Cardiovasc Res.* 1997;35(2):184-199.

53. Keith M, Geranmayegan A, Sole M, Kurian R, Robinson A, Omran A, Jeejeebhoy K. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(6):1352-1356.
54. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med.* 1 2010;48(9):1121-1132.
55. Khaper N, Singal P. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(4):856-861.
56. Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL, Omenn GS, Valanis B, Williams JH. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(23):1743-1750.
57. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR, Investigators HaH-TT. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;293(11):1338-1347.
58. Williams KJ, Fisher EA. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8(2):139-146.
59. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Bio Med.* 2001;30(11):1191-1212.

60. Kaur K, Sharma A, Dhingra S, Singal P. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(6):1023-1030.
61. Kaur K, Sharma A, Singal P. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(1):H106-113.
62. White M, Ducharme A, Ibrahim R, Whittom L, Lavoie J, Guertin MC, Racine N, He Y, Yao G, Rouleau JL, Schiffrin EL, Touyz RM. Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(4):483-489.
63. Hermansen SE, Kalstad T, How OJ, Myrnes T. Inflammation and reduced endothelial function in the course of severe acute heart failure. *Transl Res.* 2011;157(3):117-127.
64. Ksontini R, MacKay S, Moldawer L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg.* 1998;133(5):558-567.
65. Ritchie M. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation.* 1998;98(17):1707-1713.
66. Bolger A, Sharma R, von Haehling S, Doehner W, Oliver B, Rauchhaus M, Coats A, Adcock I, Anker S. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2002;90(4):384-389.

67. Schottelius A, Mayo M, Sartor R, Baldwin AJ. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31868-31874.
68. Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit.* 2001;7(5):1075-1085.
69. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 11 2001;292(5519):1160-1164.
70. Jones P, Farmer J. Adjunctive interventions in myocardial infarction: the role of statin therapy. *Curr Atheroscler Rep.* 2008;10(2):142-148.
71. Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness. *Circulation.* 2002;106(16):2055-2060.
72. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives -. *Circ J.* 2010;74(5):818-826.
73. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2001;154(1):87-96.
74. Wagner AH, Köhler T, Rückschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(1):61-69.

75. Olsson A, Schwartz G, Szarek M, Luo D, Jamieson M. Effects of high-dose atorvastatin in patients \geq 65 years of age with acute coronary syndrome (from the myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering [MIRACL] study). *Am J Cardiol.* 2007;99(5):632-635.
76. Kinlay S, Schwartz G, Olsson A, Rifai N, Leslie S, Sasiela W, Szarek M, Libby P, Ganz P, Investigators MIRwACLS. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation.* 2003;108(13):1560-1566.
77. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6(9):1004-1010.
78. Sohma R, Inoue T, Abe S, Taguchi I, Kikuchi M, Toyoda S, Arikawa T, Hikichi Y, Sanada S, Asanuma H, Kitakaze M, Node K. Cardioprotective effects of low-dose combination therapy with a statin and an angiotensin receptor blocker in a rat myocardial infarction model. *J Cardiol.* 16 2011.
79. Schwartz GG, Oliver MF, Ezekowitz MD, Ganz P, Waters D, Kane JP, Texter M, Pressler ML, Black D, Chaitman BR, Olsson AG. Rationale and design of the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) study that evaluates atorvastatin in unstable angina pectoris and in non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1998;81(5):578-581.

80. Cannon CP, McCabe CH, Belder R, Breen J, Braunwald E. Design of the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE IT)-TIMI 22 trial. *Am J Cardiol.* 2002;89(7):860-861.
81. Cannon CP. PROVE-IT TIMI 22 Study: potential effects on critical pathways for acute coronary syndrome. *Crit Pathw Cardiol.* 2003;2(3):188-196.
82. Schwartz G, Olsson A, Ezekowitz M, Ganz P, Oliver M, Waters D, Zeiher A, Chaitman B, Leslie S, Stern T, Investigators MIRwACLMS. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;285(13):1711-1718.
83. Ray K, Cannon C, McCabe C, Cairns R, Tonkin A, Sacks F, Jackson G, Braunwald E, Investigators PI-T. Early and late benefits of high-dose atorvastatin in patients with acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(8):1405-1410.
84. Tsai NW, Lin TK, Chang WN, Jan CR, Huang CR, Chen SD, Cheng KY, Chiang YF, Wang HC, Yang TM, Lin YJ, Lin WC, Chang HW, Lee LH, Lu CH. Statin pre-treatment is associated with lower platelet activity and favorable outcome in patients with acute non-cardio-embolic ischemic stroke. *Crit Care.* 2011;15(4):R163.
85. [II Brazilian Guidelines on Acute Cardiac Insufficiency]. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(3 Suppl 3):2-65.
86. Grundy S, Cleeman J, Merz C, Brewer HJ, Clark L, Hunninghake D, Pasternak R, Smith SJ, Stone N, Program CCotNCE. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult

- Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* Aug 2004;44(3):720-732.
87. Birnbaum Y, Ashitkov T, Uretsky BF, Ballinger S, Motamedi M. Reduction of infarct size by short-term pretreatment with atorvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003;17(1):25-30.
 88. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97(12):1129-1135.
 89. Kumai T, Oonuma S, Matsumoto N, Takeba Y, Taniguchi R, Kamio K, Miyazu O, Koitabashi Y, Sekine S, Tadokoro M, Kobayashi S. Anti-lipid deposition effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, in a rat model of hypertension and hypercholesterolemia. *Life Sci.* 2004;74(17):2129-2142.
 90. Schäfer A, Fraccarollo D, Eigenthaler M, Tas P, Firnschild A, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Rosuvastatin reduces platelet activation in heart failure: role of NO bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):1071-1077.
 91. Di Napoli P, Taccardi A, Grilli A, De Lutiis M, Barsotti A, Felaco M, De Caterina R. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2005;66(3):462-471.
 92. Wolfrum S, Jensen K, Liao J. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):729-736.
 93. Matsuki A, Igawa A, Nozawa T, Nakadate T, Igarashi N, Nonomura M, Inoue H. Early administration of fluvastatin, but not at the onset of

ischemia or reperfusion, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through the nitric oxide pathway rather than its antioxidant property. *Circ J.* 2006;70(12):1643-1649.

94. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Suematsu N, Kinugawa S, Ide T, Wen J, Takeshita A. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation.* 19 2002;105(7):868-873.
95. Nahrendorf M, Swirski F, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J, Libby P, Weissleder R, Pittet M. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-3047.
96. Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart.* 2007;93(7):826-831.
97. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 22 2007;49(20):1993-2000.
98. Nahrendorf M, Sosnovik D, Chen J, Panizzi P, Figueiredo J, Aikawa E, Libby P, Swirski F, Weissleder R. Activatable magnetic resonance imaging agent reports myeloperoxidase activity in healing infarcts and noninvasively detects the antiinflammatory effects of atorvastatin on ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2008;117(9):1153-1160.

- 99.** Landmesser U, Engberding N, Bahlmann F, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004;110(14):1933-1939.

6 Artigo Original

**Prior use of statins in experimental acute myocardial infarction:
Early analysis of oxidative stress and of echocardiographic parameters**

Rafael Dall' Alba^a, Michael Everton Andrades^a, Alex Sander da Rosa Araujo^b,
Adriane Belló-Klein^b, Nadine Oliveira Clausell^a.

^aCardiovascular Research Laboratory, Hospital de Clinicas de Porto Alegre,
Porto Alegre – RS, Brazil

^bCardiovascular Physiology Laboratory – Basic Sciences Institute – Federal
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

Keywords: Oxidative stress, statin therapy and myocardial infarction.

Corresponding author
Prof.^a Nadine Clausell
2350 Ramiro Barcelos St.
Porto Alegre, RS, Brazil
Zip Code: 90053-903
Phone 55 51 33598844
E-mail: nclausel07@gmail.com

6.1 Abstract

Aims: Acute myocardial infarction (AMI) leads to loss of cardiac tissue homeostasis with overexpression of reactive oxygen species (ROS) associated with cardiac function impairment. The use of statins could be an alternative to preserve cardiac function after AMI due to its pleiotropic effects that include a poorly understood antioxidant potential. In this study we intend to evaluate the effects of pretreatment of statins as an oxidizing agent and its influence on echocardiographic parameters 48 hours after AMI.

Main methods: Male Wistar rats were divided into two groups: placebo group (P): NaCl 0.9% (n=14) and statin group (S): atorvastatin 20 mg/kg (n=14). Both groups were treated for 14 days prior to AMI. Animals were subjected to experimental AMI by left anterior descending coronary occlusion. Forty eight hours after AMI, echocardiographic measurements (fractional shortening, ejection fraction and infarct size) were evaluated. Animals were then killed, left ventricles collected and infarcted (IZ) and non-infarcted zones (NIZ) separated out. Analysis of oxidative stress was performed by measuring the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase (GPx)), damage to proteins and lipids in IZ and NIZ of the hearts, separately.

Key findings: Echocardiographic and enzymatic analyses did not show statistically significant differences when compared P and S groups. However, in both groups P and S, there were statistically significant differences in GPx activity comparing NIZ and IZ (P group 22.9 ± 42.01 vs. 51.67 ± 12.09 , nmol/mg protein, $p < 0.05$ and S group 95.38 ± 20.54 vs. 61.58 ± 8.14 , $p < 0.05$),

respectively. Finally, in the NIZ of the S group there was less protein damage than in the NIZ-P group as assessed by carbonyl levels (6.51 ± 1.29 vs. 8.27 ± 1.03 , $p = 0.02$ nmol/mg protein) respectively.

Significance: Statin therapy protects against oxidative damage to proteins in non-infarcted myocardium. We also observed a decrease in GPx activity in IZ compared with NIZ, regardless the treatment. These findings indicate that there is a heterogenic response between the myocardial zones to ischemic injury and that statins may have some regionally differentiated antioxidant effects post-AMI. Whether these observations are related to less cardiac remodeling post-AMI observed with statins, warrants further long term studies.

6.2 Introduction

Ischemic injury provoked by acute myocardial infarction (AMI), a major precursor of heart failure, is usually followed by wound repair process of the left ventricle referred to as post-infarction left ventricle remodeling ¹. This process involves a series of responses that start immediately after the ischemic event, such as increased pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6, cardiomyocytes loss and fibroblast proliferation ². Collectively, these changes contribute to left ventricle remodeling with disorganization of extracellular matrix generating a poor ventricular function and worsening of heart failure ³.

At the biochemical level, reactive oxygen species (ROS) formation increase in the post-ischemic myocardium ⁴. Increased ROS represent a mechanism of post-ischemic injury, trigger lipid peroxidation, oxidize proteins and cause DNA strand breaks, all interfering with and potentially damaging normal cellular function ⁵. Oxidative stress is associated with poor recovery of left ventricular function after a sustained period of ischemia and it contributes significantly to the acceleration of necrosis and thus extension of infarction, apoptosis and endothelial dysfunction ⁶. Most experimental studies examine the whole cardiac tissue, including infarcted and non-infarcted areas; however, subtle biochemical changes may occur comparing different degrees of ischemic injury, as observed with cardiac expression of IL-1, IL-6, IL-10 and TNF- α in post-AMI experimental models, potentially influencing subsequent functional and structural changes ⁷.

Pharmacological approaches have been used to preserve/restore ventricle structure and function post-AMI ⁸. Statins, which in addition to the beneficial effects on blood lipid control, also have pleiotropic anti-inflammatory, anti-arrhythmic effects, reduce mortality and reinfarction has been extensively studied ⁹. When statins are used prior to an ischemic event, decrease in necrosis myocardial area, better epicardial perfusion and improved left ventricular ejection fraction in patients post-percutaneous coronary intervention has been noted ¹⁰. Some of these effects are credited to statins antioxidant effects and to reduction in oxidative damage that is poorly understood ¹¹.

In the present study we tested the hypothesis that previous treatment with statins might be acting as an antioxidant protective factor, decreasing oxidative stress, potentially causing differential effects considering infarcted and non-infarcted related areas and preserving myocardial function post-AMI. We thus evaluated myocardial oxidative profile in both infarcted and non-infarcted related areas and echocardiographic parameters after AMI in rats pretreated during 14 days with atorvastatin.

6.3 Methods

Animals and groups

Eight week old male Wistar rats were studied and kept at the Experimental Animal Unit from the Research Center of the institution. All animals were treated in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals¹². The study was approved by the Institutional Ethics on Research Committee. Animals were randomized into two groups: Placebo + AMI (P) (n=14) and Statin + AMI (S) (n=14). All animals were kept in cages in a room at temperatures ranging from 20 °C to 25 °C and were exposed to light/dark cycles of 12 h, and fed *ad libitum* with rat chow. Atorvastatin (20 mg/kg/day), was administered by gastric gavage 14 days before experimental AMI induction, and then continued for 2 days after AMI¹³. A similar amount of NaCl 0.9% was given to the placebo group in the same period.

Myocardial infarction was induced according to a procedure previously described in the literature and adapted in our laboratory. Briefly, animals were placed in dorsal decubitus position and anesthetized with xylazine (0.90 mg/Kg) and ketamine (0.10 mg/Kg) administered intraperitoneally. Following the orotracheal intubation, animals were submitted to mechanical ventilation with a Harvard ventilator, Model 683 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) (frequency: 60 m/min, tidal volume: 1.5 mL) with O₂ supplementation and maintained in a 37 °C hot plate. Subsequently, a surgical incision was performed in the skin along the left sternal margin, divulsion of the pectoralis and transverse muscles was performed. Thoracotomy was performed at the 2nd intercostal space and the thorax was opened without exteriorization of the heart¹⁴. The left anterior descending coronary artery was identified and occluded with

a 6-0 mononylon suture underneath the left atrial appendage. Next, the thoracic cavity was closed with a 5-0 mononylon thread, muscles were repositioned and the skin sutured. All animals received analgesia after surgical procedure (bupivacaine 1mg/Kg). Total mortality of the experiment was 20%. On the second day after AMI animals were analyzed by echocardiography (14 animals *per* group) and then killed by exsanguination. The hearts were immediately removed, the left ventricle was divided in infarcted zone (IZ) and in non-infarcted zone (NIZ) and pieces were frozen in nitrogen for subsequent biochemical tests (eight animals *per* group).

Echocardiography

After 48 hours of the procedure the animals were anesthetized and submitted to echocardiographic analysis. Animals were placed in left lateral decubitus position (45° angle) to obtain cardiac images. An EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, MA, USA), using a 12–13 MHz transducer at 2 cm depth with fundamental and harmonic imaging. Baseline data were recorded prior to AMI induction to serve as control parameters.

Myocardial infarction size

On each echocardiographic transverse plane (basal, middle and apical) the arch corresponding to the segments with infarction (regions or segments of the myocardium showing one the following changes in myocardial kinetics: systolic movement akinesis region — AR) and the total endocardial perimeter (EP) were measured at end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as $\%IS = (AR/EP) \times 100$.

Left ventricular dimensions

Left ventricular diastolic and systolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level) and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity). Diastolic and systolic diameters (cm) were measured using the M-Mode, in the previously described three planes. Final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes.

LV systolic function

Left ventricular ejection fraction was calculated as: (end diastolic volume–end-systolic volume/ end-diastolic volume) x 100; end-diastolic and end-systolic cavity volumes were calculated using Simpson's rule. Left ventricular fractional shortening (LVFS) values were obtained by using the following equation: LVFS = $\frac{DD-SD}{DD} \times 100$ (diastolic diameter — DD; systolic diameter — SD) ¹⁵.

Oxidative profile

Antioxidant enzymes

For the evaluation of antioxidant enzymes, myocardial tissue was unfrozen, homogenized in a volume proportion of 1 mg tissue: 5 µL solution KCl (1.15% v/v), PMSF (10 mM) and centrifuged at 1000g x rpm for 5 min and the supernatant was used.

Analysis of superoxide dismutase (SOD) in myocardial tissue was based on the inhibition of the reaction of the superoxide radical with adrenaline and was carried out according to Misra and Fridovich ¹⁶. Analysis of the activity of enzyme catalase (CAT) was based on measuring the decrease in hydrogen

peroxide, according to Li ¹⁷. Activity of enzyme glutathione peroxidase (GPx) was based on the consumption of NADPH in the reaction of reduction of oxidized glutathione, according to Flohé and Guntzler ¹⁸. All reactions were performed in microtiter plates and normalized by protein content ¹⁹.

Oxidative damage

The quantity of aldehyde products generated by lipid peroxidation was quantified by the thiobarbituric acid reaction. Briefly, sample (0.25mg of protein) was reacted with 0.67% thiobarbituric acid at 99°C for 15 min. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were extracted with n-butanol and absorbance was read at 532 nm. A standard curve made of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO USA) was run in parallel and values expressed as nmol TBARS/mg protein ²⁰. Oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Proteins were precipitated by the addition of 10% trichloroacetic acid and resuspended in 10 mM DNPH, and the absorbance read at 370 nm ²¹. Results were expressed as nmol/mg protein.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD for all experiments. The comparison between groups and their respective myocardial zones (NIZ or IZ) was performed primarily by the interaction test and secondarily by Student's *t* test. Data with *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 and SPSS 14.0 programs.

6.4 Results

Echocardiographic parameters

Compared to baseline measurements (left ventricular ejection fraction = $73 \pm 4\%$ and $70 \pm 5\%$, $p = 0.3$), in both, P and S groups respectively, a moderate to severely reduced left ventricular ejection fraction post-AMI was evident; however no statistical difference between P and S groups was observed (Table 1). Infarct size in P and S groups was similar, overall around 40% of the left ventricular area.

Table 1.

Cardiac function and morphometric characteristics assessed by echocardiogram of rats 48 h post-AMI.

Parameters	Placebo Group	Statin Group	p
N	14	14	
Heart rate, bpm	277 ± 22	262 ± 21	0.16
Infarcted area, %	40 ± 5.4	40 ± 6.5	0.94
Systolic diameter, cm	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.45
Diastolic diameter, cm	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.25
Ejection fraction, %	38 ± 1.2	34 ± 6.5	0.30
LV fraction shortening, %	19 ± 4.2	18.5 ± 7	0.85

LV – left ventricular

Oxidative profile

Antioxidant enzymes analyses

Myocardial SOD, CAT and GPx activities were not different in S compared with P group ($p > 0.05$) or in the subgroups NIZ and IZ of the infarcted hearts. However the enzymatic activity of GPx in NIZ was significantly higher compared to IZ in both groups (P and S). Table 2.

Oxidative damage

Lipid peroxidation did not show statistically significant difference ($p > 0.05$) between P and S or in subgroups NIZ and IZ of infarcted hearts. However, levels of protein oxidative damage (carbonyl) were lower in the NIZ-S compared to NIZ-P group ($p = 0.02$). Table 2.

Table 2.

Cardiac antioxidant and oxidative damage profile of rats 48 h post-AMI.

Parameters	Placebo Group		p	Statin Group		p
	N			N		
Myocardial Zones	8	8		8	8	
	NIZ	IZ		NIZ	IZ	
<i>Antioxidant Enzymes</i>						
SOD, U/mg protein	13.60 ± 8.14	18.73 ± 9.06	0.44	8.95 ± 2.45	11.46 ± 7.40	0.32
CAT, U/mg protein	33.39 ± 14.53	40.48 ± 19.00	0.32	30.5 ± 11.08	38.91 ± 22.36	0.41
GPx, nmol/mg protein	95.38 ± 20.54	61.58 ± 8.14	<0.05	122.9 ± 42.01	51.67 ± 12.09	<0.05
<i>Oxidative Damage</i>						
Carbonyl, nmol/mg protein	8.27 ± 1.03	6.97 ± 1.94	0.83	6.51 ± 1.29*	8.47 ± 2.36	0.64
TBARS, nmol TBARS/mg protein	7.80 ± 3.58	11.03 ± 2.79	0.39	8.40 ± 2.39	9.76 ± 4.00	0.07

SOD - superoxide dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathione peroxidase; TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances.

Data shown as mean ± SD for each group. NIZ - Non-infarcted zone; IZ - Infarcted zone. * p = 0.02 P-NIZ vs. S-NIZ; other comparisons P-NIZ vs. S-NIZ and P-IZ vs. S-IZ p > 0.05.

6.5 Discussion

The use of statins has documented clinical benefits reducing cardiovascular events, including those following AMI and subsequent left ventricular dysfunction. This has raised the interest to better understand early molecular and cellular mechanisms interacting with statins, in particular those related to oxidative stress post-AMI. We showed that prior use of statin did not influence left ventricular function post-AMI, overall it was not able to modify anti oxidative parameters collectively, while it induced subtle differential effects on carbonyl expression comparing non infarcted areas from placebo and statin treated AMI-animals. Our findings also show that GPx activity decreases in the IZ compared with NIZ in both groups independently of treatment, suggesting that distinct myocardial areas respond differently to ischemic injury with regards to oxidative profile.

The use of statins is associated with well known several beneficial effects in acute coronary syndromes scenario ²²⁻²⁵. However, there is limited understanding of the early molecular events involving statin therapy post ischemic injury that could account for such potential beneficial effects, as well as the effect of its previous use, on several cardiac parameters. In fact, soon after ischemia, biochemical and physiological events occur that influence cardiac function. Cardiomyocyte death, contractile dysfunction and myofibroblast proliferation are among the main events that lead to ventricular remodeling in both infarcted and non-infarcted regions. Studies performed in the late post-AMI period treatment with statins demonstrated preservation of

ventricular geometry, decrease of inflammatory mediators and of oxidative stress^{7, 11}.

In this study we showed that prior use of statins did not influence echocardiographic parameters at 48h post-AMI. In fact, major influence on cardiac structure and function was not necessarily expected to be evident in this very early period post-AMI since degradation of extracellular matrix, which constitutes a target for statin effects²⁶, and that affect ventricular geometry, only becomes evident at three days post-AMI²⁷. In addition, the AMI model employed in this study yields infarcts areas ranging from 20 to 40% but only rats with approximately 40% of akinetic areas entered the analyses. Use of statins did not influence either AMI areas or left ventricular function parameters. The large infarct areas may have lead to the absence significant treatment effects, since it may be unlikely that a pharmacological intervention produced an evident beneficial effect upon such an overwhelming event within 48 hours of injury.

Central to the events that drive the remodeling process post-AMI are the appearance of ROS²⁸. Reactive oxygen species may be involved in the activity of key processes linked to cardiac remodeling, such as matrix metalloproteinase activation and apoptosis^{29, 30}. Previous studies have demonstrated a heightened enzymatic activity (SOD, CAT and GPx) in the period after infarction, comprising up to 48 hours in order to counteract the harmful effects of ROS⁵. However, we have previously demonstrated no difference in SOD and CAT evaluated at 48 hours post-AMI when comparing infarcted and non-infarcted animals¹⁴. Our present study adds novel information examining oxidative stress in both infarcted and non-infarcted areas very early post-AMI. Indeed, only few studies attempted to analyze and differentiate infarcted from

non-infarcted areas, examining cytokines, apoptosis and iron overload^{3, 7, 31}, as traditionally the whole heart is homogenized for subsequent biochemical analysis¹⁴. Differential myocardial tissue behavior of oxidative stress post-AMI was never addressed. In the present study, we demonstrated that the intragroup comparison of GPx activity, irrespective of statin therapy, showed a decrease in this enzymatic activity in the myocardial IZ compared to NIZ, suggesting that myocardial zones respond differently to ischemic injury and should be analyzed independently. This decrease in GPx enzyme activity might be due to the depletion of its cofactor, glutathione, which is part of the most abundant non-enzymatic antioxidant cell class³².

Regardless of these apparent controversial findings involving antioxidant mechanisms related to the post-AMI period, studies have demonstrated that administration of statin had a significant effect protecting the heart against isoproterenol induced myocardial infarction by maintaining endogenous antioxidant enzyme activities³³. In this study, we showed that prior statin therapy caused no effects on SOD, GPx and CAT activity in this initial period post-AMI. This may indicate that statin pretreatment does not promote antioxidant adaptation at this enzymatic level at early times after AMI.

When ROS overcomes the buffering capacity of the antioxidant enzymes, oxidative stress takes place³⁴. Protein carbonylation and thiobarbituric reactive substances are well known footprints of oxidative damage on proteins and lipids, respectively³⁴. In the present study, we showed that there was a differentially expressed response in oxidative protein damage in NIZ comparing placebo and statin-treated animals; in particular, we showed no difference in lipid peroxidation between placebo and statin group whereas statin avoided

protein oxidation in NIZ, as lower levels of carbonyl were observed in NIZ of statin-treated animals. Considering the precocity of the analysis as well as the rapid lipid turnover caused by ischemic injury, the initial lipid damage was likely not apparent precluding the appearance of differences with treatment ⁵. These results suggest that statins may not affect this early stage of oxidation, but may be activating signaling pathways for cell survival. Protein oxidation, on the other hand, arises from other sources the main one being catalyzed by metal, as described previously ²¹. In fact, AMI is known to cause release of iron from heme proteins causing an increase in catalytic iron ³⁵. In turn, iron ion overload is related to impaired cardiomyocyte contractility. In addition, large areas of infarction that releases this metal, may result from the ability of the Fe²⁺ions have to generate reactive oxygen species ^{36, 37}. Statin therapy has been reported to reduce iron levels in hypercholesterolemic patients ³⁸. DePalma and colleagues described interactions of serum ferritin with statin use in a substudy of the iron (Fe) and atherosclerosis study (FeAST) and showed that statin use was associated with significantly lower ferritin levels ³⁹. Thus, we suggest that statin may interfere in iron imbalance and decrease metal catalyzed protein oxidation. Accordingly, analyses concerning iron metabolism, such as level of catalytic iron and proteins involved in iron balance are warranted in order to examine the relationship between statins and alternate protective mechanisms of protein oxidation.

Our data should be interpreted considering some technical limitations. We only assessed study parameters at the very early 48h post-AMI period which can limit definitions of changes at micro-morphological and functional levels. Perhaps the influence of treatment at this time-point is perceived only at

the cell signaling level. In this study infarcted areas were large (around 40% of the left ventricle area); in particular, prior reports suggest that therapies involving well established drugs such as captopril in similar large areas of infarction have shown limited benefits⁸.

6.6 Conclusion

Taken collectively, our data point to an expected absence of statin effect in the cardiac remodeling process and to a slightly antioxidant potential on proteins early post-AMI. Indeed, statin therapy seems to protect against oxidative damage to proteins in non-infarcted myocardium in this early time analysis. Studies evaluating the late consequences of this antioxidant potential should be further addressed.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the collaboration of the Laboratory of Reactive Oxygen Species - Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS especially to students and technical staff. We also thank the magnificent support from the Animal Research Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre - UFRGS. We are also thankful to Dr. Angela Vicente Tavares who initiated this research area in our laboratory. This work was supported by a Research Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and Brazilian National Research Council (CNPq) grants.

6.7 References

1. Pfeffer M, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-1172.
2. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*. 2004;164(2):665-677.
3. Vilahur G, Juan-Babot O, Pena E, Onate B, Casani L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(3):522-533.
4. Singal P, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2(3):206-211.
5. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1996;148(1):291-300.
6. Antozzi C, Zeviani M. Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism. *Cardiovasc Res*. 1997;35(2):184-199.
7. Zhang J, Cheng X, Liao YH, Lu B, Yang Y, Li B, Ge H, Wang M, Liu Y, Guo Z, Zhang L. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005;19(1):13-21.
8. Pfeffer M, Pfeffer J, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 1985;72(2):406-412.

9. Porter KE, Turner NA. Statins and myocardial remodelling: cell and molecular pathways. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e22.
10. Erkol A, Oduncu V, Tanalp AC, Sirma D, Dundar C, Akgun T, Turkyilmaz E, Kilicgedik A, Gozubuyuk G, Tigen K, Izgi A, Kirma C. Impact of Chronic Pre-Treatment of Statins on the Level of Systemic Inflammation and Myocardial Perfusion in Patients Undergoing Primary Angioplasty. *American Journal of Cardiology.* 15 2011;107(2):179-185.
11. Malik S, Sharma AK, Bharti S, Nepal S, Bhatia J, Nag TC, Narang R, Arya DS. In Vivo Cardioprotection by Pitavastatin From Ischemic-Reperfusion Injury Through Suppression of IKK/NF- κ B and Upregulation of pAkt -eNOS. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011.
12. Zurlo J. The Institute for Laboratory Animal Research - an international resource for promoting the Three Rs. *Altern Lab Anim.* 2009;37 Suppl 2:69-73.
13. Birnbaum Y, Ashitkov T, Uretsky BF, Ballinger S, Motamedi M. Reduction of infarct size by short-term pretreatment with atorvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003;17(1):25-30.
14. Tavares AM, da Rosa Araujo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Bello-Klein A, Rohde LE, Clausell N. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci.* 18 2010;87(23-26):699-706.
15. Moises VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos O, Andrade JL, Carvalho AC, Tucci PJ. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 2000;75(2):125-136.

16. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 25 1972;247(10):3170-3175.
17. Li Y, Schellhorn HE. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J Biomol Tech.* 2007;18(4):185-187.
18. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-121.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7 1976;72:248-254.
20. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-421.
21. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-357.
22. Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol.* 2002;86(1):5-18.
23. Kayikcioglu M, Can L, Evrengul H, Payzin S, Kultursay H. The effect of statin therapy on ventricular late potentials in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2003;90(1):63-72.
24. Mills EJ, O'Regan C, Eyawo O, Wu P, Mills F, Berwanger O, Briel M. Intensive statin therapy compared with moderate dosing for prevention of cardiovascular events: a meta-analysis of >40 000 patients. *Eur Heart J.* 2011;32(11):1409-1415.

25. Ray K, Cannon C, McCabe C, Cairns R, Tonkin A, Sacks F, Jackson G, Braunwald E, Investigators PI-T. Early and late benefits of high-dose atorvastatin in patients with acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(8):1405-1410.
26. Zhang J, Xu Y, Pan L, Chen T, Chen Z, Zhao R. Effect of simvastatin on collagen I deposition in non-infarcted myocardium: role of NF-kappaB and osteopontin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(11):1026-1034.
27. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(6):1281-1292.
28. Singal P, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res.* 1998;40(3):426-432.
29. Gopcevic K, Rovcanin B, Kekic D, Radenkovic S. Matrix metalloproteinases and membrane damage markers in sera of patients with acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2011;350(1-2):163-168.
30. Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T, Sadoshima J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(3):408-416.
31. Simonis G, Mueller K, Schwarz P, Wiedemann S, Adler G, Strasser RH, Kulaksiz H. The iron-regulatory peptide hepcidin is upregulated in the ischemic and in the remote myocardium after myocardial infarction. *European Heart Journal.* 2010;31:44-45.
32. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1865-1879.

33. Zhou R, Xu Q, Zheng P, Yan L, Zheng J, Dai G. Cardioprotective effect of fluvastatin on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Eur J Pharmacol.* May 31 2008;586(1-3):244-250.
34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defenses. In: Free radicals in biology and medicine. 4rd ed. Oxford: Clarenton Press; 2007. p.105-245.
35. Lele S, Shah S, McCullough PA, Rajapurkar M. Serum catalytic iron as a novel biomarker of vascular injury in acute coronary syndromes. *EuroIntervention.* 2009;5(3):336-342.
36. Turoczi T, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG, Das DK. HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res.* 13 2003;92(11):1240-1246.
37. Tang WH, Wu S, Wong TM, Chung SK, Chung SS. Polyol pathway mediates iron-induced oxidative injury in ischemic-reperfused rat heart. *Free Radic Biol Med.* 1 2008;45(5):602-610.
38. Yilmaz MI, Baykal Y, Kilic M, Sonmez A, Bulucu F, Aydin A, Sayal A, Kocar IH. Effects of statins on oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2004;98(2):119-127.
39. Depalma RG, Hayes VW, Chow BK, Shamayeva G, May PE, Zacharski LR. Ferritin levels, inflammatory biomarkers, and mortality in peripheral arterial disease: a substudy of the Iron (Fe) and Atherosclerosis Study (FeAST) Trial. *J Vasc Surg.* 2010;51(6):1498-1503.