

**Efeitos do Pré-Tratamento com o Fator Estimulante
de Colônia de Granulócitos (G-CSF) Sobre o
Desenvolvimento do Infarto do Miocárdio em Ratos**

Marcelo Perim Baldo

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Maio de 2008

Efeitos do Pré-Tratamento com o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF) Sobre o Desenvolvimento do Infarto do Miocárdio em Ratos

Marcelo Perim Baldo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em: 16/05/2008

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Orientador, UFES

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho – UFRJ

Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles – UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Maio de 2008

Baldo, Marcelo Perim, 1981

Efeitos do Pré-Tratamento com o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF) sobre o Desenvolvimento do Infarto do Miocárdio em Ratos. [Vitória] 2008

XI, 119 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2008)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

1. G-CSF 2. Infarto do Miocárdio 3. Apoptose 4. Arritmias
Ventriculares 5. Remodelamento 6. Mortalidade

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente até onde os outros já foram.”

(Alexander Graham Bell)

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e por sempre acreditarem na concretização desta etapa. Aos meus familiares, pela ajuda e participação essencial. À Larissa, que enfrentou ao meu lado todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Mill, por toda a confiança depositada no meu trabalho e pelas oportunidades concedidas, além de todo conhecimento compartilhado e orientações durante todo o tempo.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Vascular da Universidade de São Paulo, que me acolheram e forneceram suporte para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço nominalmente à Prof. Dra. Luciana Venturini Rossoni, coordenadora do laboratório, e a aluna Ana Paula Couto Davel por todo o empenho e dedicação para a conclusão dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo, pelo apoio ao trabalho e ajuda nos momentos de dificuldades.

Aos colegas de laboratório, Eduardo, Wellington, Pedro, Daniel, Amílcar, Rúbia, Marcela, Enildo, Christine, Sérgio, por todo o apoio técnico e pela convivência durante todo este tempo.

Aos funcionários, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES, pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo deste período.

Resumo

Introdução. Estudos na literatura mostram que o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) é capaz mobilizar células-tronco provenientes da medula óssea que diante de um evento fisiopatológico no coração, como por exemplo o infarto agudo do miocárdio, fariam o reparo do miocárdio perdido. Efeitos como a melhora da função cardíaca, redução do infarto e da mortalidade foram relacionados ao tratamento com G-CSF. Com a evolução do conhecimento na área, foi evidenciado um efeito direto sobre o miocárdio, como sendo responsável por todos os efeitos benéficos, e que as células mobilizadas pelo G-CSF não contribuiriam de forma significativa pelos benefícios. **Objetivos.** Diante dessas informações, nós objetivamos avaliar os efeitos do pré-tratamento com G-CSF sobre a fase aguda do infarto do miocárdio, e suas repercussões no remodelamento e progressão para a insuficiência cardíaca. **Metodologia.** Ratos Wistar (180-240g) foram randomizados para receber G-CSF (50µg/kg, sc) (IM-GCSF) ou placebo (IM), aplicados 7, 3 e 1 dias antes da cirurgia. O infarto foi realizado através da oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda e a extensão do infarto foi determinada através da área corada com trifeniltetrazólio (24 horas) ou pela área da cicatriz (15 dias). Um grupo de animais foi submetido à cirurgia fictícia para ser utilizado como controle (Sham). A medida da expressão protéica de Bcl-2, Bcl-xL e Bax foram realizadas imediatamente antes da indução do infarto por Western blot, utilizando amostras de ventrículo esquerdo. Para avaliar as arritmias ventriculares após o infarto, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60mg/kg, ip) e o eletrocardiograma foi monitorado por 30 minutos após a oclusão. O número de extrassístoles ventriculares, incidência e duração de taquicardias ventriculares (TV) e a incidência de fibrilação ventricular (FV) foram computados. Medidas hemodinâmicas foram realizadas 15 dias após o infarto através do cateterismo ventricular sob anestesia de quetamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Após o cateterismo ventricular, a avaliação da rigidez da câmara ventricular esquerda foi feita através da análise da curva pressão-volume (P-V). **Resultados.** A extensão do infarto medida 24 horas após a oclusão foi reduzida pelo pré-tratamento com G-CSF (35,8±2,8 vs. 43,7±2,1 IM; $p<0,05$). Da mesma forma, 15 dias após a oclusão, a extensão do infarto se apresentou reduzida no grupo IM-GCSF comparada ao grupo IM (27,2±2,2% vs. 35,9±1,4%, $p<0,05$). O pré-tratamento com G-CSF aumentou a

expressão protéica de Bcl-2 ($8,8\pm 0,9$ vs. $5,2\pm 0,6$ no grupo IM, $p<0,05$), Bcl-xL ($5,6\pm 0,8$ vs. $3\pm 0,2$ no grupo IM, $p<0,05$), mas não alterou os níveis de expressão de Bax ($5,9\pm 1$ vs. $5,5\pm 1,2$ no grupo IM, $p>0,05$). A mortalidade nas primeiras 24 horas após o infarto foi reduzida significativamente diante do pré-tratamento com G-CSF (26% vs. 47%, $p<0,05$), sendo a redução mais pronunciada nos primeiros 30 minutos seguidos à oclusão (11% vs. 27,6%, $p<0,05$). Tanto o número de eventos (7 ± 2 vs. 29 ± 6 , $p<0,05$) quanto a duração (13 ± 4 seg vs. 43 ± 9 seg, $p<0,05$) das TV foram reduzidos nos animais do grupo IM-GCSF, assim como a incidência de FV (10% vs. 69%, $p<0,05$). O grupo IM apresentou menor rigidez ventricular quando comparado a outros grupos na fase inicial ($k=19,9\pm 2,5$ vs. $k=41\pm 5$ no grupo IM-GCSF e $k=42,8\pm 3,5$ no grupo Sham, $p<0,05$), mas sob altas pressões, a rigidez ventricular no grupo IM difere somente do grupo IM-GCSF ($k=2,52\pm 0,2$, IM; $k=3,35\pm 0,2$, IM-GCSF; $k=3,02\pm 0,7$, Sham; $p<0,05$). **Conclusão.** O pré-tratamento com G-CSF foi efetivo em reduzir a extensão do infarto avaliada 24 horas após a oclusão, e essa diferença se manteve ao longo dos 15 dias após a oclusão, mesmo diante da interrupção do tratamento. Esse resultado pode ser devido ao aumento na expressão de fatores anti-apoptóticos, reduzindo a injúria isquêmica na fase inicial do infarto. Além disto, o aumento na expressão de conexina43 no grupo pré-tratado pode estar envolvido na redução das arritmias ventriculares, levando a importante redução da mortalidade precocemente ao infarto. Todos estes resultados parecem contribuir para a preservação da função hemodinâmica encontrada 15 dias após o infarto nos animais que receberam G-CSF.

Palavras-chave: G-CSF; Infarto do miocárdio, Apoptose; Arritmias ventriculares, Remodelamento, Mortalidade

Abstract

Background. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow stem cells and in the case of a cardiac pathophysiological event, such as acute myocardial infarction, they would repair the injured myocardium. Improvement in cardiac function, decrease in infarction size and mortality were related to G-CSF treatment. With the knowledge's evolution in this area, a direct effect on myocardium was evidenced as responsible to some beneficial effects, and that cardiac regeneration had a small contribution to this effects. **Aims.** In agreement with this data, we propose to evaluate the effects of pretreatment with G-CSF on acute phase of myocardial infarction, and its impacts in the cardiac remodeling process and to heart failure evolution. **Methods.** Male Wistar rats (180-240g) were randomized to receive G-CSF (50µg/kg, sc) or vehicle, at 7, 3 and 1 days before surgery. Myocardial infarction was induced by permanent occlusion of left descending coronary artery and the infarction size was measured through tripheniltetrazolium chloride (24 hours) or by infarction scar area (15 days). A group of animals were submitted to false-surgery and used as control (Sham). Protein expression was made immediately before myocardial infarction induction by Western blot, in a sample of the left ventricle. To evaluate the postinfarction ventricular arrhythmias, the animals were anesthetized with pentobarbital (60mg/kg, ip) and the electrocardiogram was monitored by 30 minutes after occlusion. The number of premature ventricular complex, incidence and duration of ventricular tachycardia (VT) and the incidence of ventricular fibrillation (VF) were computed. Hemodynamic measurements were performed 15 days after myocardial infarction through ventricular catheterization under ketamine (70mg/kg) and xilazine (10mg/kg) anesthesia. After ventricular catheterization, analysis of left ventricular stiffness was made by pressure-volume curve (P-V). **Results.** Myocardial infarction size measured 24 hours after coronary occlusion was decreased by G-CSF pretreatment (35.8±2.8 vs. 43.7±2.1 IM; $p<0.05$). Moreover, 15 days after coronary occlusion, the myocardial infarction was reduced in the IM-GCSF group as compare to IM group (27,2±2,2% vs. 35,9±1,4%, $p<0,05$). The treatment with G-CSF increase the protein expression of Bcl-2 (8.8±0.9 vs. 5.2±0.6 in IM group, $p<0.05$), Bcl-xL (5.6±0.8 vs. 3±0.2 in IM group, $p<0.05$), but doesn't change Bax expression (5.9±1 vs. 5.5±1.2 in IM group, $p>0.05$). In the first 24 hours after infarction, mortality was significantly reduced by G-CSF pretreatment

(26% vs. 47%, $p < 0.05$), being the reduction more prominent at the first 30 minutes after occlusion (11% vs. 27.6%, $p < 0.05$). The number of events (7 ± 2 vs 29 ± 6 , $p < 0.05$) and the duration (13 ± 4 s vs. 43 ± 9 s, $p < 0.05$) of VT were reduced in the animals of IM-GCSF group, as well as the incidence of VF (10% vs 69%, $p < 0.05$). IM group presents less ventricular stiffness as compared to other groups in a initial phase ($k = 19.9 \pm 2.5$ vs. $k = 41 \pm 5$ in IM-GCSF group and $k = 42.8 \pm 3.5$ in Sham group, $p < 0.05$), but at high pressure, the ventricular stiffness in IM only differs from IM-GCSF group ($k = 2.52 \pm 0.2$, IM; $k = 3.35 \pm 0.2$, IM-GCSF; $k = 3.02 \pm 0.7$, Sham; $p < 0.05$).

Conclusions. The pretreatment with G-CSF was effective in reducing myocardial infarction size evaluated soon after coronary occlusion and this difference was maintained throughout 15 days after occlusion. This result is due to an increase in expression of antiapoptotic factors, reducing the ischemic injury in the initial phase of myocardial infarction. Moreover, the increase in connexin43 expression in pretreated group seems to be responsible for the decrease in ventricular arrhythmias, leading to an important reduction in mortality rate soon after myocardial infarction. All of these results seem to contribute to hemodynamic preservation found 15 days after coronary occlusion in animals that received G-CSF.

Key words: G-CSF; Myocardial infarction; Apoptosis; Ventricular Arrhythmias, Remodeling, Mortality

Lista de Abreviaturas

IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
IL	Interleucina
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
M-CSF	Fator estimulante de colônia de monócitos
TGF-β	Fator de crescimento transformante β
Cx43	Conexina 43
PMN	Polimorfonucleares
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
AIF	Fator indutor de apoptose
GCSFR	Receptor para o fator estimulante de colônia de granulócitos
SCF	Fator de células tronco
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Jak	Janus kinase
Stat	Transdutor de sinalização e ativador de transcrição
VE	Ventrículo esquerdo
VD	Ventrículo direito
PDI	Pressão diastólica inicial
PDF	Pressão diastólica final
dP/dt	Derivada máxima de pressão
TV	Taquicardia ventricular
FV	Fibrilação ventricular
P-V	Pressão – Volume
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
TTC	Trifeniltetrazólio
ECG	Eletrocardiografia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Epidemiologia do Infarto Agudo do Miocárdio	13
1.2 Remodelamento Após o Infarto do Miocárdio	15
1.3 Apoptose e o Remodelamento Cardíaco	19
1.4 O Uso do G-CSF no Infarto do Miocárdio em Animais	22
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais de Experimentação	33
3.2 Grupos e Protocolos Experimentais	33
3.3 Registro e Análise Eletrocardiográfica	34
3.4 Coleta de Sangue e Quantificação Leucocitária	35
3.5 Técnica para Produção do Infarto do Miocárdio	35
3.6 Identificação da Área Infartada	36
3.7 Registros Hemodinâmicos	38
3.8 Avaliação da Rigidez do Ventrículo Esquerdo: Curva Pressão Volume	40
3.9 Preparo do Tecido para Análise da Expressão Gênica e Protéica	42
3.10 Ensaio para Medida da Expressão Protéica	42
3.11 Ensaio para Medida da Expressão Gênica (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa – RT-PCR)	43
3.12 Avaliação Arritmogênica após o Infarto do Miocárdio	45
3.13 Análise Estatística	47

4	RESULTADOS	49
4.1	Efeito do G-CSF na Mobilização de Leucócitos	50
4.2	Análise Eletrocardiográfica	51
4.3	Parâmetros Ponderais	54
4.4	Extensão do Infarto	56
4.5	Expressão Gênica de Vias Pró e Anti-Apoptóticas	61
4.6	Expressão Protéica	63
4.7	Parâmetros Hemodinâmicos	66
4.8	Análise da Rigidez da Câmara Ventricular Esquerda: Curva Pressão-Volume	67
4.9	Análise da Mortalidade	71
4.10	Arritmias Ventriculares Após o Infarto do Miocárdio	72
5	DISCUSSÃO	77
5.1	Aspectos Básicos	78
5.2	Redução da Extensão do Infarto	81
5.3	Preservação da Função Ventricular	88
5.4	Redução da Mortalidade	91
6	CONCLUSÃO	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do Infarto Agudo do Miocárdio

O desenvolvimento do conhecimento fisiopatológico do infarto agudo do miocárdio (IAM) teve início no século 19 com relatos de autópsias feitas por dois patologistas, J. F. Payne e E. F. A. Vulpian, mostrando obstrução de artérias coronárias. Pouco tempo depois, Ludwig Hektoen relatou, que a causa mais freqüente de IAM seria a trombose secundária a processos escleróticos nas coronárias (Maroo et al., 2004). Já em 1901, Krehl relatou que a trombose nem sempre causaria morte súbita como se pensava, e que os sintomas da obstrução seriam mais fortes quanto mais súbita fosse a oclusão (Braunwald, 1998). A partir desses relatos, vários médicos, entre eles James Herrick, começaram a descrever características clínicas do IAM, e suas observações deram início à busca por métodos de diagnóstico e terapias (Herrick, 1912). A descrição das alterações celulares decorrentes do infarto do miocárdio em humanos foi feita por Barrie & Urback (1957), mostrando os eventos inflamatórios e fazendo distinções entre as áreas afetadas pelo infarto.

O estudo do infarto do miocárdio há muito tempo desperta o interesse científico. Utilizando cães, Porter (1893) se propôs estudar os efeitos da oclusão da artéria coronária nos parâmetros funcionais do coração. Em 1918, um trabalho realizado por Smith (1918) introduziu os conhecimentos de eletrocardiografia (ECG) ao IAM, documentando a evolução das mudanças no eletrocardiograma após a ligadura da artéria coronária em cães (Smith, 1918). A ligadura da coronária em pequenos animais passou a ser utilizada a partir de 1954 em um trabalho onde, comparando a técnica em vários roedores, demonstrou-se que os melhores resultados foram obtidos em ratos (Johns & Olson, 1954). A partir daí, esta técnica foi sendo difundida por todo o mundo e hoje é a técnica mais utilizada para estudo do infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca experimentais.

Em 1929, Albert S. Hyman chamou a atenção para medidas de prevenção de doenças cardiovasculares, colocando já naquela época as doenças cardiovasculares como um problema de saúde pública (Hyman, 1929). Pouco tempo depois, Mangun

(1956) levantou a importância dos aspectos relativos à prevenção primária e também sobre a necessidade de acompanhamento e reabilitação de pacientes cardiopatas, como medida eficaz para redução da mortalidade. Estas medidas propostas ao longo dos anos para reduzir a mortalidade por doenças cardiovasculares foram confirmadas quando foi observada redução importante da mortalidade por causas cardiovasculares com a introdução de clínicas nas áreas onde antes não existia acesso (Dignan et al., 1979).

As doenças cardiovasculares são atualmente, as principais causas de morte e incapacidade no Brasil e no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, dos 16,7 milhões de óbitos ocorridos no ano de 2002, 7,2 milhões tiveram como causa a doença arterial coronária. Nos Estados Unidos, estimou-se que aproximadamente 700 mil pessoas sofreriam um IAM no ano de 2007, com uma previsão de custos diretos e indiretos na ordem de 151,6 bilhões de dólares (American Heart Association, 2007). Segundo dados do DATASUS, no ano de 2005 no Brasil foram notificados aproximadamente 65 mil óbitos tendo como causa o IAM (DATASUS).

As arritmias são responsáveis pela maior parte das mortes súbitas (Henkel et al., 2006), sendo que a degeneração em fibrilação ventricular está associada com baixa sobrevida nos primeiros trinta dias após o infarto agudo do miocárdio (Al-Khatib et al., 2003). Desta mesma forma, foi demonstrado que as arritmias ventriculares estão associadas à morte súbita nos seis primeiros meses que se seguem ao infarto do miocárdio (Maggioni et al., 1993). Estudo realizado por Gaudron et al., (2001) em pacientes infartados mostrou que pacientes com remodelamento ventricular mais acentuado têm maior propensão à morte súbita.

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do IAM, sendo que recentemente, Lanas et al (2007) mostraram que na América Latina, os principais fatores de risco associados ao IAM são o hábito de fumar, a dislipidemia, a obesidade abdominal e a hipertensão arterial. Em adição, Anand et al. (2008) mostraram que além dos fatores descritos anteriormente, a inatividade física, diabetes e o uso de álcool estão relacionados ao risco de infarto do miocárdio.

As conseqüências de um IAM são desastrosas, sendo a insuficiência cardíaca um exemplo, trazendo comprometimentos graves da função sistólica e reduzindo a expectativa de vida dos pacientes. Em um estudo que avaliou pacientes admitidos em hospital com diagnóstico de IAM entre 1979 e 1998, mostrou que 24% dos

pacientes desenvolveram IC dentro de 30 dias após a admissão (Hellermann et al, 2005). Outro estudo que analisou registros entre 1994 e 2000 de pacientes com IAM e sem história de IC prévia, mostrou que 20,4% dos pacientes tiveram IC no momento da admissão, e apenas 8,6 desenvolveram posteriormente (Spencer et al, 2002). Apesar da grande dificuldade em quantificar as complicações de um IAM, acredita-se que entre 30 e 40% dos pacientes com IAM nos Estados Unidos desenvolverão IC em algum momento após a admissão (Weir et al, 2006).

Grandes avanços na terapêutica para o IAM aconteceram nas últimas décadas. Um grande arsenal terapêutico tem sido utilizado para o tratamento pós-infarto com bons resultados. Atualmente, a terapia padrão para IAM inclui recuperação rápida e precoce do fluxo na artéria acometida, com a utilização de trombolíticos e intervenção mecânica. Além disso, agentes farmacológicos para diminuir os efeitos do remodelamento sobre o miocárdio são amplamente utilizados com resultados já comprovados, como por exemplo, os fármacos com ação no sistema renina-angiotensina-aldosterona (Pfeffer et al., 2003; Solomon et al., 2005). Além disto, outra classe farmacológica que tem obtido bons resultados clínicos são os bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos (CAPRICORN Investigators, 2001; Fonarow et al., 2007), e as estatinas (Ray et al., 2005; Schwartz et al., 2001).

1.2. Remodelamento Após o Infarto Agudo do Miocárdio

O remodelamento cardíaco que se segue a um IAM constitui um conjunto de alterações que ocorrem tanto no miocárdio infartado quanto no não infartado, causando um rearranjo estrutural e molecular compensatório, incluindo a hipertrofia do miocárdio remanescente, o que não é capaz de restaurar a função ventricular (Anversa et al., 1986; Mill et al., 1990). O remodelamento precoce à oclusão da artéria coronária é induzido pela perda aguda de miocárdio, e se caracteriza por dilatação e afinamento da área isquêmica causado pela morte e perda do alinhamento dos grupos de miócitos, eventos conhecidos como expansão do infarto (Swynghedauw, 1999; Sutton et al., 2000). Essa diminuição da espessura da parede na região infartada ocorre por estiramento celular e diminuição do espaço intercelular entre os miócitos. Já na área não infartada, o principal evento que

contribui para a diminuição da espessura da parede, é o rearranjo de grupos de miócitos diminuindo a quantidade de células e capilares através da parede, sendo determinantes para a dilatação ventricular após o infarto (Weisman et al., 1988; Olivetti et al., 1990), mostrando correlação com a extensão e a transmuralidade do infarto (Eaton e Bulkley, 1981).

Nos primeiros minutos após a oclusão da artéria coronária, são observados distúrbios metabólicos na região isquêmica como redução de fosfocreatina e ATP. Além disso, ocorre redução da função mitocondrial, junto com redução do estoque de glicogênio nas áreas isquêmica e não-isquêmica, o que leva à redução na tensão desenvolvida pela parede não infartada (Wood et al., 1979). Junto às alterações metabólicas, ocorrem alterações elétricas, com redução do potencial de repouso da membrana pelo aumento da concentração de K⁺ extracelular (Janse et al., 1979).

O súbito aumento da resistência extracelular contribui de forma significativa para o retardo na condução elétrica, seguida por aumento da resistência intracelular, causando desacoplamento elétrico entre as células podendo levar ao aparecimento de atividade ectópica (Kleber et al., 1987). Os achados eletrocardiográficos precoces à oclusão incluem a elevação do segmento S-T, e redução do segmento Q-T. Janse et al. (1980) demonstraram que precocemente à oclusão da artéria coronária em cães e porcos, a manutenção das taquiarritmias ventriculares ocorre por circuitos de reentrada no miocárdio isquêmico e por efeito arritmogênico gerado pela corrente de lesão, culminando com o aparecimento de atividade ectópica. A dinâmica das arritmias após a oclusão da artéria coronária em ratos foi descrita por Optiz et al. (1995) dividindo em duas fases distintas: a primeira acontece durante os trinta minutos iniciais e a segunda inclui o período entre noventa minutos e nove horas após o início da isquemia. O aparecimento de atividade ectópica ventricular foi relacionado ao desacoplamento elétrico entre miócitos, visto que em camundongos com baixa expressão de conexina 43 (Cx43), a atividade ectópica foi extremamente aumentada em relação ao animal com níveis normais de expressão (Gutstein et al., 2005).

O desenvolvimento histopatológico do IAM foi descrito em ratos por Fishbein et al. (1978) mostrando que após 24 horas da ligadura da coronária, uma zona necrótica se torna evidente, além de edema intersticial, congestão vascular e áreas de hemorragia. As células polimorfonucleares (PMN) estão presentes a partir do segundo ao sexto dia após a ligadura, quando começam a diminuir. A infiltração de

células inflamatórias crônicas atinge o pico no sétimo dia, diminuindo gradualmente até o vigésimo primeiro dia após a oclusão. A partir do terceiro dia, ocorre proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno persiste até o vigésimo primeiro dia, quando o processo de reparo está completo (Fishbein et al., 1978). A Figura 1 apresenta resumidamente os eventos decorrentes do processo isquêmico que leva ao reparo cardíaco.

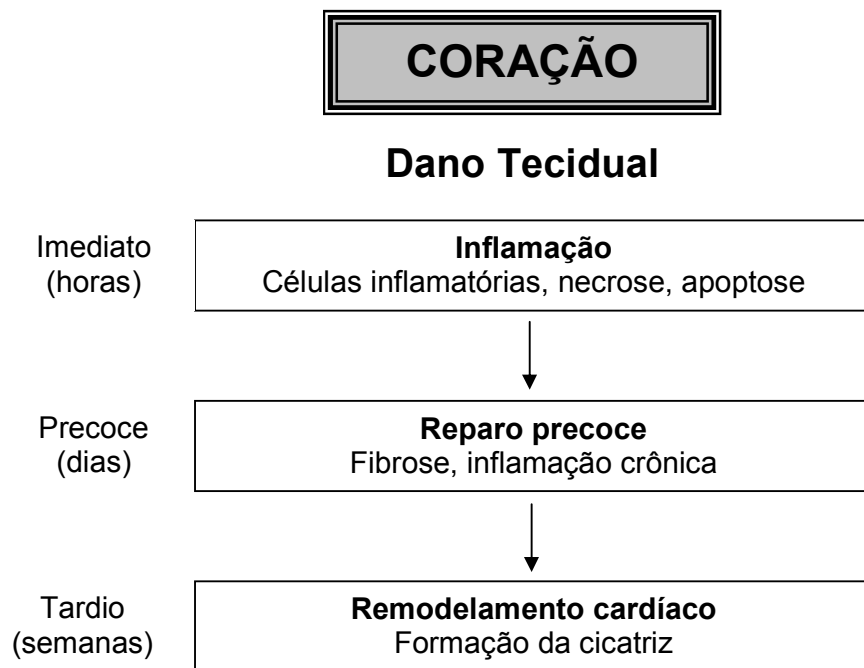


Figura 1. Evolução temporal dos eventos que conduzem ao reparo cardíaco após isquemia aguda (Adaptado de Ertl e Frantz, 2005).

As modificações iniciais que ocorrem na matriz extracelular no miocárdio isquêmico são a degradação do colágeno intersticial e a desorganização das fibras colágenas, favorecendo a dilatação da câmara (Swynghedauw, 1999). Os níveis de expressão de metaloproteinases, enzimas que degradam o colágeno, estão aumentados no terceiro dia após o IAM reduzindo gradativamente até o sétimo dia. A partir do segundo dia, a síntese de colágeno inicia o processo de reparo do tecido e se estende por algumas semanas, afetando também o miocárdio não infartado. O aumento da expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP) e de colágeno tipo I e III acontece a partir do terceiro dia, permanecendo alto por, pelo menos, vinte oito dias. O fator de crescimento transformante (TGF- β 1), um mediador fibrogênico, tem sua expressão aumentada tanto no miocárdio infartado quanto no não infartado a partir do segundo dia, sendo seguido pelo aparecimento de miofibroblastos e conseqüente aumento do colágeno. As fibras colágenas se tornam evidentes em ambas as regiões a partir do sétimo dia (Sun et al., 2000; Cleutjens et al., 1995).

Após a oclusão permanente da artéria coronária em ratos, observa-se aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no músculo cardíaco. Nas primeiras horas após a oclusão, ocorre um aumento da expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL) 1 e 6, reduzindo ao longo dos 7 primeiros dias seguidos à oclusão (Herskowitz et al., 1995; Vandervelde et al., 2007). Além disto, ocorre um súbito aumento na expressão gênica do fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) e do fator estimulante de colônia de granulócitos monócitos (GM-CSF) após o infarto, persistindo até o sétimo dia após a oclusão (Vandervelde et al., 2007). Recentes estudos mostram a participação de algumas citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento de disfunções cardiovasculares. Em humanos, pacientes com IC apresentam elevados níveis plasmáticos de TNF- α (Amione, 2005). Em modelos animais, a infusão de TNF- α em ratos mostrou ser capaz de induzir dilatação ventricular, culminando com disfunção cardíaca progressiva (Bozkurt et al., 1998). As IL também têm sido relacionadas ao remodelamento ventricular esquerdo após o infarto em ratos. Ono et al. (1998) mostraram forte correlação positiva entre a expressão de IL-1beta e IL-6 e o diâmetro diastólico final. Além disto, IL-6 e TNF- α reduzem a contratilidade em músculos papilares isolados (Finkel et al., 1992).

Todas as alterações metabólicas, estruturais e moleculares que ocorrem no miocárdio submetido à oclusão permanente da artéria coronária levam à disfunção hemodinâmica, estando intimamente relacionada à mortalidade. A pressão diastólica final aumenta após o infarto, sendo relacionada à extensão do infarto. O débito cardíaco cai, junto à perda da função contrátil do ventrículo esquerdo. Estas modificações na função ventricular esquerda levam ao aumento da complacência pulmonar e comprometimento da função ventricular direita (Zimmer et al., 1990), que juntamente com o aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, conduz à hipertrofia do ventrículo direito (Pfeffer et al., 1985a).

O grau de comprometimento da função cardíaca pós IAM se relaciona com a extensão do tecido acometido pelo infarto. Infartos considerados pequenos (menores de 30%) não apresentam comprometimento significativo da função ventricular esquerda, mensurada 21 dias após a ligadura da coronária. Já infartos médios e grandes se associam com comprometimento contrátil, débito cardíaco reduzido e aumento da pressão de enchimento ventricular esquerda (Pfeffer et al., 1979).

A reperfusão do miocárdio isquêmico é de extrema importância para impedir a disfunção cardíaca. Estudos mostram que a precocidade da reperfusão da área afetada isquemia do miocárdio está relacionada a infartos menores e com menor expansão ventricular (Hochman et al, 1987; Boyle et al, 1993). Muitas substâncias foram utilizadas para tentar impedir, ou ao menos retardar, os feitos deletérios do remodelamento no coração, obtendo relativo sucesso e sendo responsáveis pela redução da mortalidade e melhora da qualidade de vida dos pacientes. Apesar disto, novas estratégias têm sido constantemente buscadas com a intenção de garantir melhoras ainda maiores.

1.3. Apoptose e o Remodelamento do Miocárdio

Apoptose é um processo de morte celular que desempenha importantes funções no desenvolvimento, homeostase, remodelamento e manutenção dos tecidos, sendo que as vias que participam dos eventos na apoptose existem há mais de um bilhão de anos (Metzsten et al., 1998; Crow et al., 2004). A falta de regulação

das vias apoptóticas pode trazer conseqüências adversas ao organismo. A classificação de morte celular depende das causas fisiopatológicas, aspectos morfológicos ou dos estímulos gerados na célula em questão.

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada por condensação citoplasmática e nuclear, com perda de contato com células vizinhas. Em seguida, é observada desintegração do citoesqueleto e fragmentação do DNA, junto ao rompimento da membrana nuclear. Os fragmentos de DNA são incluídos pela membrana plasmática, formando os corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas, sem evocar reação inflamatória. Não é observada ruptura da membrana citoplasmática ou alteração em outras organelas durante o processo de apoptose (Wyllie, 1974; Takemura & Fujiwara, 2004; Fischer & Osthoff, 2005).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo processo de apoptose são geneticamente regulados, compreendendo uma complexa maquinaria que visa ativar proteases específicas levando a distúrbios da função mitocondrial e dano irreversível ao DNA. Duas podem ser as vias que conduzem à apoptose. A via extrínseca, quando há ativação de receptores da superfície da membrana plasmática, denominados “death receptors”, levando à ativação de proteases, conhecidas como caspases, e, posteriormente, à fragmentação do DNA (Nagata, 1997; Kroemer et al., 2007). As caspases são proteases que tem participação fundamental no desenvolvimento da apoptose em todas as vias. A via intrínseca; tem como evento primordial a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF) e citocromo c que vão participar da ativação de caspases, levando à morte celular (Crow et al., 2004; Kroemer et al., 2007). Uma grande família de proteínas tem participação fundamental na via intrínseca. Esta família compreende fatores pró-apoptóticos (Bax e Bak) que, depois de ativados, translocam-se do citoplasma para a membrana mitocondrial formando poros, facilitando a liberação de citocromo c. Já a Bcl-2 e a Bcl-xL, que são representantes anti-apoptóticos desta família, impedem a ativação da Bax e Bak, impedindo sua translocação para a membrana mitocondrial e preservando a função mitocondrial (Cheng et al., 2001). A Figura 2 ilustra resumidamente as vias descritas acima.

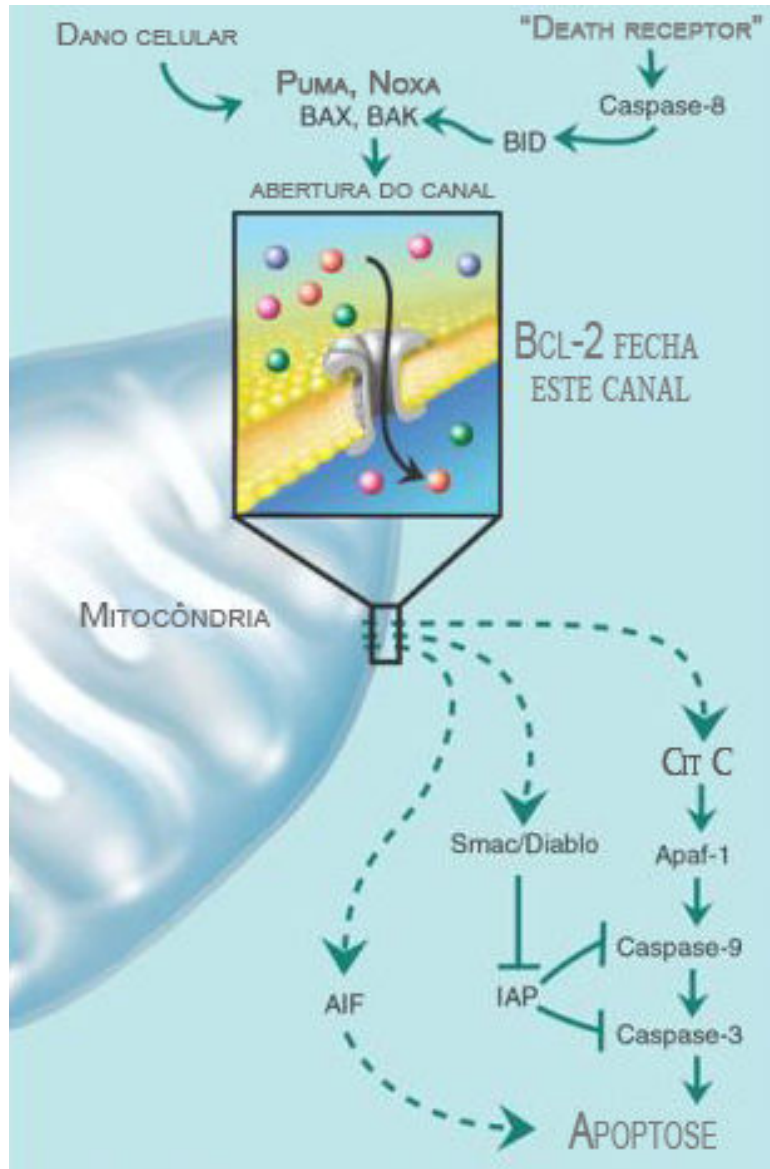


Figura 2. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Adaptado de Finkel et al. 2001).

Durante um infarto do miocárdio, a perda de miócito contribui de forma bastante significativa para a disfunção contrátil, sendo que a apoptose tem uma participação importante neste processo (Takemura & Fujiwara, 2004). De acordo com Kajstura et al. (1996), nas primeiras 24 horas após a oclusão permanente da artéria coronária em ratos, a apoptose contribui de forma importante para a perda de miócitos. Foi relatado aumento precoce da expressão de Bax, junto à diminuição na expressão de Bcl-2 após a ligadura (Cheng et al., 1996). Já em uma fase mais crônica do infarto, foi relatado aumento da expressão de Bcl-xS, um fator pró-apoptótico, causado pelo aumento da atividade β -adrenérgica (Prabhu et al., 2003).

A perda aguda de miócitos após o infarto do miocárdio ocorre em todas as áreas, incluindo aquelas não afetadas pelo processo isquêmico (Palojoki et al., 2001), o que pode ser causado por ativação de fatores relacionados à apoptose como a caspase 3 e uma redução na relação Bcl-2/Bax já no primeiro dia após a oclusão da artéria coronária (Schwarz et al., 2006). Após um evento isquêmico seguido por prolongada reperfusão, Gao et al. (2004) observaram que o tratamento anti-apoptótico foi eficaz em reduzir a extensão do infarto do miocárdio, mostrando a importante participação da apoptose no desenvolvimento da fase aguda do infarto. Corroborando com esses resultados, Kim et al. (2003) observaram que o aumento da fragmentação do DNA após a isquemia está relacionada à liberação do AIF.

Em humanos, a apoptose contribui de forma importante para a perda celular nas primeiras horas do IAM, sendo que a partir do primeiro dia a necrose adquire papel fundamental (Veinot et al., 1997) Sabe-se que a apoptose ocorre no coração de pacientes com insuficiência cardíaca, podendo contribuir para a perda progressiva da função cardíaca (Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1997)

1.4. O Uso do G-CSF no Infarto Agudo do Miocárdio em Animais

A linhagem hematopoiética de granulócitos exerce um papel fundamental para a defesa do organismo frente à agentes infecciosos. A produção de células hematopoiéticas foi descrita por Dancey et al. (1976), sendo estimada em um trilhão de células por dia, sendo que destas, aproximadamente 70 bilhões são neutrófilos.

O G-CSF é um polipeptídeo de 20 kDa produzido por vários tipos celulares, como células endoteliais vasculares (Lenhoff et al., 1999) e fibroblastos (Fibbe et al., 1988; Kaushansky et al., 1988). Recentemente verificou-se que também é produzido por miócitos cardíacos (Vandervelde et al., 2007). Já é conhecido que esta citocina tem a capacidade de estimular a proliferação e sobrevivência de neutrófilos (Basu et al., 2002). Recentemente, tem sido descrito na literatura diversos tipos celulares responsivos ao G-CSF. Sua ação nessas células é mediada por seu receptor (GCSFR) que é expresso em células da linhagem hematopoiética (Avalos, 1996). A Figura 3 apresenta a formação das células hematopoiéticas a partir de seu precursor na medula óssea.

Na clínica, o uso do G-CSF já está bem estabelecido no tratamento de granulocitopenias, principalmente aquelas causadas por quimioterapia anti-neoplásica (Pui et al., 1997; Lehrnbecher et al., 2007).

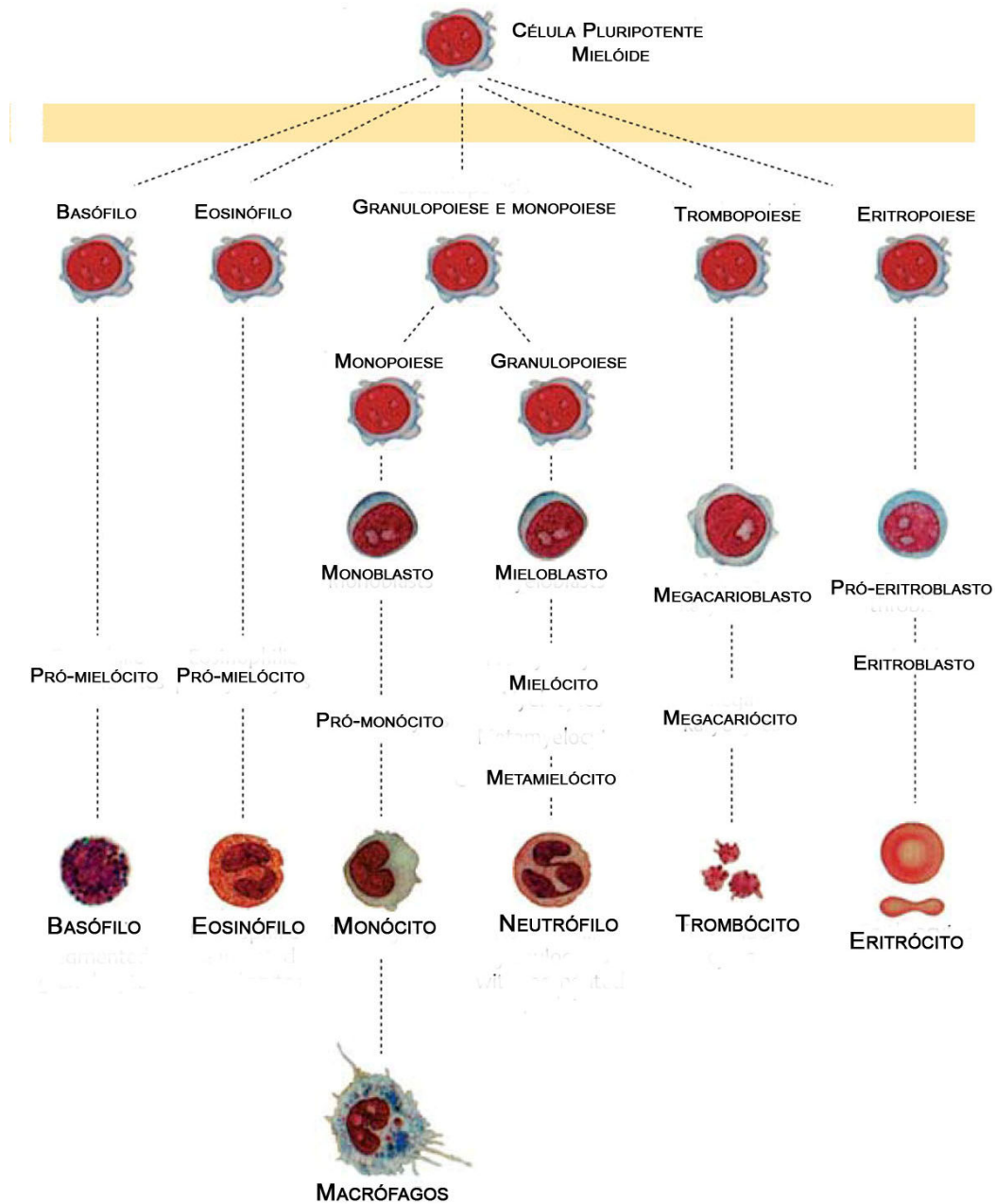


Figura 3. Dinâmica de formação de células hematopoiéticas a partir de seus precursores (Adaptado de Theml et al., 2004).

No ano de 2001, surgiu a idéia de que as células-tronco da medula óssea mobilizadas pelo G-CSF poderiam migrar para o miocárdio infartado, e se diferenciar em miócitos cardíacos. Em trabalho publicado por Orlic et al. (2001b), o pré-tratamento feito em camundongos infartados com a associação entre duas citocinas, o G-CSF e o fator de células-tronco (SCF), mostrou ser capaz de regenerar o tecido miocárdico perdido, além de formar novas estruturas vasculares. Junto aos efeitos regenerativos, foi observado melhora significativa nos parâmetros hemodinâmicos e estruturais do coração, além de uma redução da mortalidade, quantificados 28 dias após o infarto do miocárdio. Foi descrito por Fukuhara et al. (2004) que as células mononucleares da medula óssea mobilizadas pelo G-CSF migram para o miocárdio e se regeneram em cardiomiócitos após o infarto. A regeneração do miocárdio e de estruturas vasculares foi observada também por Dawn et al. (2006) em camundongos infartados e tratados com G-CSF levando à melhora hemodinâmica e estrutural do coração. Em um modelo de isquemia seguida de reperfusão em coelhos, o tratamento com G-CSF foi capaz de mobilizar as células-tronco da medula óssea, previamente marcadas, para a área isquêmica. A identificação e a caracterização fenotípica mostraram que as células se diferenciaram em miócitos, células endoteliais e miofibroblastos, demonstrando o potencial regenerativo das células mobilizadas pelo G-CSF (Minatoguchi et al., 2004). Ieishi et al. (2007) mostraram que 4 semanas após um evento isquêmico seguido por reperfusão em ratos, o tratamento com G-CSF foi capaz de reduzir a extensão do infarto, melhorando a função hemodinâmica.

Por outro lado, em um modelo de infarto do miocárdio em primatas, Norol et al. (2003) observaram aumento da angiogênese no miocárdio infartado após tratamento com a associação entre o G-CSF e o SCF, embora sem detecção de indícios de reparo cardíaco. Deten et al. (2005) utilizaram a associação das duas citocinas em camundongos infartados e não observaram nenhum efeito sobre a hemodinâmica, mortalidade, ou regeneração miocárdica. Estudo realizado por Werneck-de-Castro et al. (2006), utilizando altas doses de G-CSF em ratos infartados, não observaram melhora da função cardíaca, nem mesmo no consumo máximo de oxigênio em exercício aeróbico. Segundo Fukahara et al. (2005), a utilização do G-CSF causa efetivamente migração de células para o miocárdio após o infarto, mas a contribuição destas células seria muito pequena para explicar os efeitos benéficos observados com o tratamento com G-CSF.

Trabalhos posteriores ao de Orlic et al. (2001) confirmaram os efeitos benéficos do G-CSF, descrevendo principalmente os efeitos sobre o remodelamento ventricular após o infarto. Ohtsuka et al. (2004) mostraram em camundongos que os benefícios hemodinâmicos do tratamento independiam da associação do SCF ao G-CSF e também do tempo em que o tratamento era iniciado, mostrando redução de apoptose e aumento na formação de novos vasos. Em um estudo utilizando modelo de infarto agudo em animais maiores, foi observada melhora da função cardíaca registrada 4 semanas após o infarto, além de redução da extensão do infarto em porcos que receberam tratamento com G-CSF (Iwanaga et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados utilizando modelos de isquemia crônica também em porcos, onde o G-CSF melhorou a função contrátil na parede isquêmica (Hasegawa et al., 2006). Um resultado em comum observado nos dois trabalhos citados acima e no trabalho de Li et al (2006b) foi o aumento da fosforilação da Akt nos animais que receberam tratamento com G-CSF. Em contrapartida, o aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foi observado no modelo agudo, o que não foi evidenciado no modelo crônico (Iwanaga et al., 2004; Hasegawa et al., 2006). Alguns estudos utilizando G-CSF em animais infartados mostraram um efeito anti-apoptótico. Estudos recentes mostraram redução precoce da apoptose em animais infartados que receberam tratamento com G-CSF, evidenciando também significativa redução na apoptose de células do endotélio vascular (Iwanaga et al., 2004; Ohtsuka et al, 2004; Harada et al., 2006), efeito que também foi encontrado em modelo de infarto crônico (Hasegawa et al., 2006).

Outro efeito que tem sido relacionado ao G-CSF é a neoangiogênese. Em experimentos feitos *in vitro*, a exposição ao G-CSF mostrou migração de células endoteliais e formação de estruturas vasculares. Junto a isso, a injeção intramuscular desta citocina foi capaz de aumentar a angiogênese induzida por processo isquêmico em camundongos (Lee et al., 2005). Ohtsuka et al. (2004) observaram que tanto o pré-tratamento quanto o tratamento após o infarto do miocárdio em camundongos foi efetivo em aumentar a densidade capilar na área de borda ao infarto. Em um modelo de isquemia seguida por reperfusão em porcos, Sato et al. (2007) mostraram que o tratamento com G-CSF aumentou o número de vasos sanguíneos no ventrículo esquerdo desses animais, mas sem observar melhora funcional. Recentemente, Li et al. (2006b) mostraram que o tratamento de animais com insuficiência cardíaca após o infarto com G-CSF resultou em melhora

da função cardíaca. Foi observada redução da fibrose por aumento da expressão de metaloproteinases, além da redução de TGF- β 1. Outros achados importantes foram a redução da expressão do receptor AT-1 para angiotensina II e do TNF- α , o que pode ter contribuído para os efeitos benéficos do tratamento.

O tratamento combinado do G-CSF com o fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF) mostrou melhora da função contrátil do ventrículo esquerdo após o infarto por suprimir o remodelamento da zona de borda (Miki et al., 2004). Resultado semelhante foi obtido por Sugano et al. (2005) quando, utilizando o tratamento com G-CSF após o infarto, observaram aceleração do processo de reparo reduzindo a expansão ventricular. Outra evidência de melhora funcional foi obtida utilizando a associação entre o G-CSF e o SCF, aumento da reserva contrátil em ratos infartados submetidos a estresse farmacológico, mas sem encontrar indícios de regeneração miocárdica (Sesti et al., 2005).

Outro importante efeito recentemente reportado ao G-CSF é a atividade protetora contra arritmias ventriculares. A utilização da associação entre G-CSF e o SCF mostrou eficácia na redução de arritmias ventriculares induzidas em animais infartados (Kuhlmann et al., 2006). Resultado semelhante foi observado com o uso do G-CSF em miócitos em cultura, impedindo o comprometimento das junções do tipo *gap* após um evento de hipóxia (Kuwabara et al., 2007).

Uma nova visão em relação aos efeitos do G-CSF no infarto surgiu em 2004, quando foi demonstrada a expressão de receptores específicos para G-CSF em miócitos cardíacos obtidas em pacientes com cardiopatia dilatada idiopática (Hamamoto et al., 2004). Corroborando com esta idéia, Harada et al. (2005) evidenciaram recentemente a expressão de receptores para G-CSF (G-CSFR) em miócitos cardíacos, e a ligação com este receptor ativaria a Janus Kinase 2 (Jak2) e concomitante ativação de um transdutor de sinalização e ativador de transcrição 3 (Stat3), culminando com a redução da apoptose após o infarto pelo aumento da expressão de proteínas com ação anti-apoptóticas da família da Bcl-2. Além disto, foi observada melhora da função cardíaca 7 dias após o infarto do miocárdio. Em um modelo experimental de isquemia seguida de reperfusão em coração isolado, Ueda et al. (2006) mostraram que a adição de G-CSF à solução de reperfusão foi capaz de reduzir a injúria de reperfusão, com aumento da pressão de desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e redução da extensão da região infartada. Isso foi justificado por aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial no tecido

cardíaco. Os trabalhos realizados por Harada et al. (2005) e Ueda et al. (2006) mostram que o G-CSF possui efeito direto sobre o miocárdio. O efeito agudo, não genômico, poderia contribuir para a melhora da função cardíaca relatada ao G-CSF.

Na clínica, os efeitos do tratamento com G-CSF em pacientes infartados seguem a mesma controvérsia dos resultados experimentais. Utilizando pacientes recentemente infartados, Ince et al. (2005) mostraram que o tratamento com G-CSF foi efetivo em melhorar a fração de ejeção desses pacientes durante o período de um ano de acompanhamento. Além disso, os efeitos deletérios do remodelamento foram atenuados nos pacientes tratados com G-CSF, observando redução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo junto a melhora contrátil (Ince et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados por Leone et al., (2007) mostrando melhora da função cardíaca e redução dos efeitos do remodelamento em pacientes com infarto extenso na parede anterior e baixa fração de ejeção que receberam tratamento com G-CSF. A melhora da fração de ejeção após seis meses de acompanhamento foi observada em pacientes que receberam tratamento com G-CSF logo após o infarto do miocárdio (Takano et al., 2007). Por outro lado, em estudo conduzido por Kang et al. (2004), foi mostrado que a injeção intracoronária das células mobilizadas pelo G-CSF melhoraram a função cardíaca de pacientes após o infarto do miocárdio, o que não foi observado no grupo que só recebeu a terapia com G-CSF. Neste trabalho foi observado um aumento na incidência de reestenose no grupo que recebeu tratamento com G-CSF (Kang et al., 2004). Da mesma forma, em estudo utilizando pacientes que sofreram infarto do miocárdio, o tratamento com G-CSF não resultou em melhora da função cardíaca, nem mesmo retardo do processo de remodelamento (Zohlhofer et al., 2006).

Apesar de muitos autores demonstrarem resultados positivos, os benefícios do G-CSF ainda não estão bem esclarecidos, visto que alguns trabalhos não observaram benefícios deste tratamento. Todos os estudos fizeram suas análises em uma fase crônica ou no máximo subcrônica do infarto, sendo que os efeitos do G-CSF sobre a fase aguda ainda não foram demonstrados. Além disto, não estão esclarecidas se as alterações observadas na fase crônica do infarto são decorrentes de interferências no processo de remodelamento ou se estão associadas a alterações na fase aguda.

Outra questão que ainda permanece obscura é o efeito do G-CSF sobre a mortalidade imediata ao infarto, pois todos os relatos excluem a mortalidade precoce

à oclusão como sendo intrínseco ao método, e justificam a mortalidade a longo prazo pela melhora funcional causada pelo tratamento com G-CSF.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do G-CSF no infarto do miocárdio experimental em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com G-CSF sobre:

- a extensão do infarto 24 horas após a cirurgia;
- a função hemodinâmica em ratos, 15 dias após o infarto;
- a mortalidade precoce ao infarto do miocárdio,
- as arritmias ventriculares após o infarto do miocárdio,
- grau de ativação de vias pró e anti-apoptóticas.

Materials e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 180 a 240 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Durante todo o tempo do estudo, os animais foram alojados em uma sala com temperatura controlada, e tinham livre acesso a água e ração padrão para roedores. Todos os protocolos realizados seguiram o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

3.2. Grupos e Protocolos Experimentais

Para a realização do presente trabalho, os animais foram divididos em três grupos:

- **IM-GCSF:** os animais deste grupo receberam injeções por via subcutânea de G-CSF recombinante humano (FILGRASTIM[®], BIOSINTÉTICA, BUENOS AIRES, ARG), na dose de 50µg por quilo de peso corporal, diluída em glicose 5% (HALEX ISTAR, GOIÁS, BRASIL), em uma proporção de 1:6. O esquema de doses utilizada para este grupo foi o pré-tratamento com G-CSF em três doses, sendo estas aplicadas 7, 3 e 1 dias antes do procedimento de infarto.
- **IM:** os animais deste grupo receberam glicose a 5% por via subcutânea em volume correspondente ao peso corporal, seguindo o mesmo intervalo de aplicação do grupo IM-GCSF.
- **Sham:** Os animais foram submetidos a todo o procedimento cirúrgico que será descrito posteriormente, exceto a oclusão permanente da artéria coronária.

Todos os grupos de animais foram estudados 24 horas ou 15 dias após o procedimento cirúrgico para realizar os procedimentos descritos a seguir. A figura 4 demonstra o esquema de pré-tratamento utilizado para este trabalho.

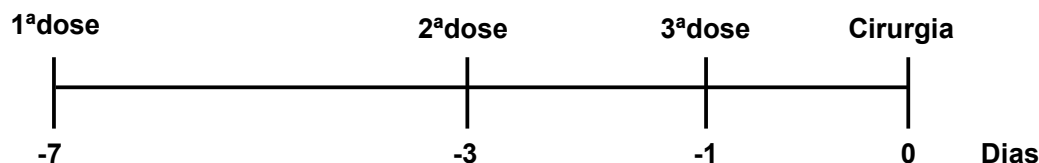


Figura 4. Esquema terapêutico de pré-tratamento utilizado nos protocolos descritos neste trabalho.

3.3. Registro e Análise Eletrocardiográfica

Para registro do eletrocardiograma, o animal foi colocado em uma câmara fechada, contendo Halotano (AYERST, SÃO PAULO, BRASIL) para anestesia geral. Em seguida o animal foi colocado em uma mesa cirúrgica, em posição supina e tinha os membros fixados sem que estes fossem tensionados. Uma máscara com éter etílico (VETEC, Rido de Janeiro, Brasil) foi utilizada para manutenção da anestesia. Os eletrodos estavam acoplados a agulhas (BD, BRASIL) 25x7 que eram implantadas no tecido subcutâneo do animal seguindo o posicionamento padronizado no triângulo de Einthoven, onde o eletrodo ligado à terra foi implantado na pata traseira direita do animal. Os eletrodos eram conectados a um pré-amplificador e o sinal era lançado no monitor de um osciloscópio (ECAFIX TC 50, FUNBEC, BRASIL). Do osciloscópio, o sinal era enviado para um registrador (FUNBEC RG 300, BRASIL) e o sinal registrado em papel milimetrado termossensível. A calibração do aparelho era feita diante de uma onda quadrada com amplitude de 1 milivolt (mV) emitida pelo pré-amplificador, em que o ganho do registrador era regulado para uma escala onde 1 mV corresponderia à 20 mm (milímetros) do papel termossensível, com uma velocidade de 100 mm/s. O amortecimento do registrador era regulado para que o registro feito no papel fosse o mais parecido com o registro na tela do monitor.

Foram realizadas todas as 6 derivações do plano frontal (três derivações bipolares, D1, D2, D3, e três unipolares, aVR, aVL e aVF), sendo obtidos os

seguintes parâmetros em D2: frequência cardíaca (pelo intervalo R-R), amplitude e duração da onda P, duração do complexo QRS, duração dos intervalos PR e QT, amplitude e duração da onda Q (analisados em D1) e o ângulo médio do eixo elétrico do complexo QRS no plano frontal (dado pela soma dos vetores médios do complexo QRS em D1 e aVF). Os registros feitos no papel termossensível eram digitalizados através do Scanner (ScanJet 2400c, Hewlett-Packard, BRASIL) em uma resolução fixa de 300 dpi e analisados utilizando o software ImageJ (versão 1.36b, National Institute of Health, EUA).

3.4. Coleta de Sangue e Quantificação Leucocitária

Para coleta de sangue, os animais foram colocados em um contensor apropriado para ratos. A pata traseira direita foi imobilizada e uma pequena área era depilada para expor a veia safena lateral. Sob iluminação com lâmpada amarela para causar vasodilatação, a veia safena lateral era puncionada com uma agulha (BD, BRASIL) 13X4,5 e uma amostra de sangue coletada com uma pipeta automática. O sangue era estancado por compressão do local e o animal era liberado. Uma alíquota de 20 μ l (microlítros) de sangue foi adicionada a um tubo de Eppendorf contendo 380 μ l de ácido acético a 2%. Feita a homogeneização da solução, uma alíquota dessa solução foi colocada em uma câmara de Neubauer (NORMAX, PORTUGAL) coberta por uma lamínula apropriada. Após 5 minutos de estabilização, a câmara de Neubauer era colocada em um microscópio ótico (ausJENA, ALEMANHA), onde se realizava a contagem dos leucócitos totais.

3.5. Técnica para Produção do Infarto do Miocárdio

O procedimento de infarto do miocárdio foi realizado de acordo com a técnica padrão em nosso laboratório (Mill et al., 1990), que está descrita resumidamente abaixo.

Em uma câmara fechada, o animal foi submetido à anestesia geral com halotano. Atingido o padrão anestésico ideal, o animal foi colocado em posição supina em uma mesa cirúrgica, com uma máscara contendo éter etílico para

manutenção da anestesia. O lado esquerdo do tórax era aberto no nível do 4º espaço intercostal, por onde o coração era rapidamente exteriorizado. Após visualização da artéria coronária descendente anterior esquerda, logo abaixo da borda do átrio esquerdo, um fio de mononylon 6.0 (MEDLINE, BRASIL) ligado a uma agulha não traumática enlaçava a artéria, fazendo uma oclusão permanente dessa artéria. O coração foi imediatamente reposicionado e o tórax fechado com uma sutura em forma de bolsa. Os animais que não retomavam espontaneamente os movimentos respiratórios receberam ventilação mecânica até a recuperação da respiração. Foram considerados infartados os animais que apresentassem onda Q patológica em D1 24 horas após o procedimento de ligadura, além de apresentarem indicação de isquemia transmural (pela técnica do trifeniltetrazólio) ou cicatriz do infarto.

3.6. Identificação da Área Infartada

Depois da realização do ECG 24 horas após o procedimento de ligadura da artéria coronária, o animal era sacrificado e rapidamente era retirado o coração e perfundido com solução de Tyrode borbulhada com uma mistura gasosa de carbogênio contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Completada a perfusão, separavam-se os átrios dos ventrículos e pesavam-se os ventrículos. O ventrículo direito era separado do ventrículo esquerdo e novamente pesados. O ventrículo esquerdo era colocado em um Banho Maria (FANEM LTDA®, SÃO PAULO, BRASIL) à 37°C por 10 minutos em uma solução a 1% de Cloridrato de Trifeniltetrazólio (TTC) (VETEC, RIO DE JANEIRO, BRASIL). Pela técnica do TTC, a parte viável adquire uma coloração vermelho escuro e a parte infartada demonstra uma coloração esbranquiçada (VIVALDI et al, 1985). A parte viável foi separada da parte infartada e colocadas em uma placa de vidro com fundo branco e digitalização foi feita com o auxílio de um Scanner (ScanJet 2400c, Hewlett-Packard, BRASIL) em uma resolução fixa de 300 dpi. Todos os infartos incluídos neste estudo foram transmuraux. As áreas das partes infartada e viável eram determinadas por planimetria através do software ImageJ (versão 1.36b, National Institute of Health, EUA). O resultado da medida do infarto é descrito aqui como a área percentual

infartada do ventrículo esquerdo em relação a área total do ventrículo esquerdo . Para comparar a técnica da medida da área de infarto pela área com a técnica de peso das partes infartada e não infartada, os resultados de cada análise foram correlacionados com os seus respectivos pares. A Figura 5 apresenta o ventrículo esquerdo remanescente e isquêmico, corado pela técnica do TTC.



Figura 5. Ventrículo esquerdo corado com TTC, mostrando a área remanescente (esquerda) e a área isquêmica (direita).

A extensão do infarto foi realizada após 15 dias da oclusão da coronária da seguinte forma. O coração foi retirado, os átrios eram separados dos ventrículos e esses foram pesados, assim como o ventrículo esquerdo e o direito. A cicatriz do infarto foi separada da área remanescente com o auxílio de uma lupa, sendo pesados separadamente. A área infartada e a remanescente foi colocada sobre uma placa de vidro e com o auxílio de um scanner, as imagens foram digitalizadas. Posteriormente, a área do infarto e a remanescente eram medidas utilizando o software ImageJ e os valores da área infartada foi apresentado como porcentagem da área infartada em relação à área total do ventrículo esquerdo.

As vísceras foram pesadas após o experimento, colocadas em estufa a 96°C por 24 horas e novamente pesadas para obtenção do peso desidratado, além do cálculo do percentual de água.

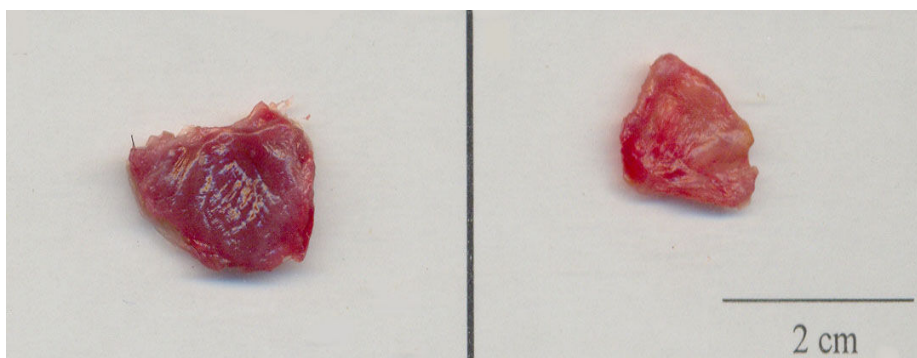


Figura 6. Ventrículo esquerdo separado em área remanescente (esquerda) e área de cicatriz (direita).

3.7. Registros Hemodinâmicos

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura contendo Quetamina (AGENER UNIÃO, SÃO PAULO, BRASIL) na dose de 70 miligramas (mg) por quilo de peso corporal e Xilazina (BAYER, SÃO PAULO, BRASIL) na dose de 10 mg por quilo de peso. Após constatação da perda dos reflexos, os animais foram colocados em posição supina em uma mesa cirúrgica tendo os membros levemente fixados. Foi realizada uma depilação no nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 centímetros (cm) foi realizada para localização e acesso aos vasos a serem cateterizados. Primeiramente, localizava-se a veia jugular externa e uma dissecção era feita para retirar todo o tecido conjuntivo ao redor do vaso. Um pequeno orifício era feito com uma tesoura oftálmica, por onde era introduzido um cateter de polietileno (PE 50) previamente preenchido solução salina com heparina (HEPARINA SÓDICA, ARISTON, BRASIL) e ligado a um transdutor de pressão (TRI 21, LETICA SCIENTIFIC INSTRUMENTS, ESPANHA), e este conectado a um sistema de aquisição de dados PowerLab (ADINSTRUMENTS INC, AUSTRÁLIA). O cateter então era avançado até o ventrículo direito para início do registro. Para a fixação do cateter, uma linha de algodão foi utilizada para amarrar o vaso e o cateter, impedindo que este se movimentasse. O registro da onda de pressão do ventrículo direito era feito por um período médio de 10 minutos, tempo suficiente

para completa estabilização do registro. Feito o registro do ventrículo direito, o procedimento de dissecação era realizado na artéria carótida comum direita, com extremo cuidado para não lesar os nervos que se projetam junto ao vaso. Após clampeamento da artéria carótida, um novo cateter PE 50, previamente heparinizado e conectada ao transdutor, era inserido no vaso por um orifício aberto com uma tesoura oftálmica. Após o registro da pressão arterial, o cateter foi avançado até o ventrículo esquerdo onde o registro era realizado por um período de aproximadamente 10 minutos.

Os parâmetros avaliados pelo cateterismo cardíaco eram: pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), pressão sistólica (PS), derivada máxima de pressão ($dP/dt+$), derivada mínima de pressão do ventrículo esquerdo ($dP/dt-$), como demonstrado na figura 7. Os registros eram digitalizados para posterior análise usando o software Chart v. 5.5 (ADINSTRUMENTS INC, AUSTRÁLIA).

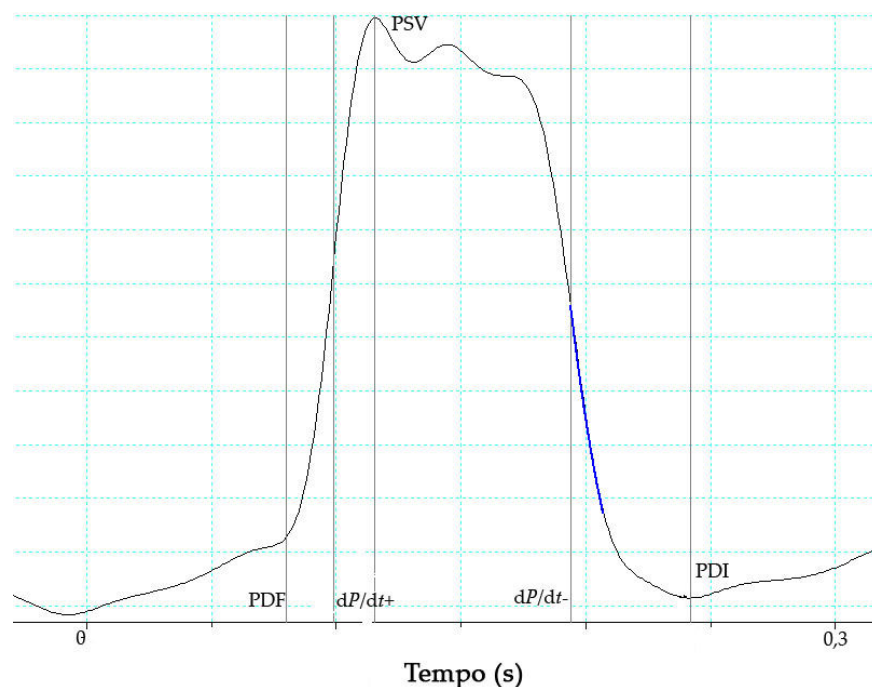


Figura 7. Registro típico de uma onda de pressão do ventrículo esquerdo, mostrando os pontos de análise.

3.8. Avaliação da Rigidez do Ventrículo Esquerdo: Curva Pressão-Volume

Depois de realizados os registros hemodinâmicos, o coração do animal foi parado em diástole por injeção de 0,2 ml de cloreto de potássio 3 M em *bolus* pela veia jugular. Rapidamente era realizada uma incisão na artéria aorta e uma cânula de dupla-luz (uma cânula PE 50 inserida em outra cânula PE200) inserida por 6 mm dentro do ventrículo esquerdo para infusão de volume simultaneamente com o registro da pressão. Com uma linha, o sulco átrio-ventricular foi ligado para evitar a comunicação entre as duas câmaras. Uma pequena incisão foi feita na parede externa do ventrículo direito para impedir algum efeito compressivo. O coração foi esvaziado manualmente gerando uma pressão intraventricular de cerca de -5 mmHg e solução salina foi infundida com o auxílio de uma bomba de infusão (BI 2000, INSIGHT EQUIPAMENTOS, BRASIL), em uma taxa de 0,68 ml por minuto. A figura 8 apresenta a preparação para a realização da curva pressão-volume.

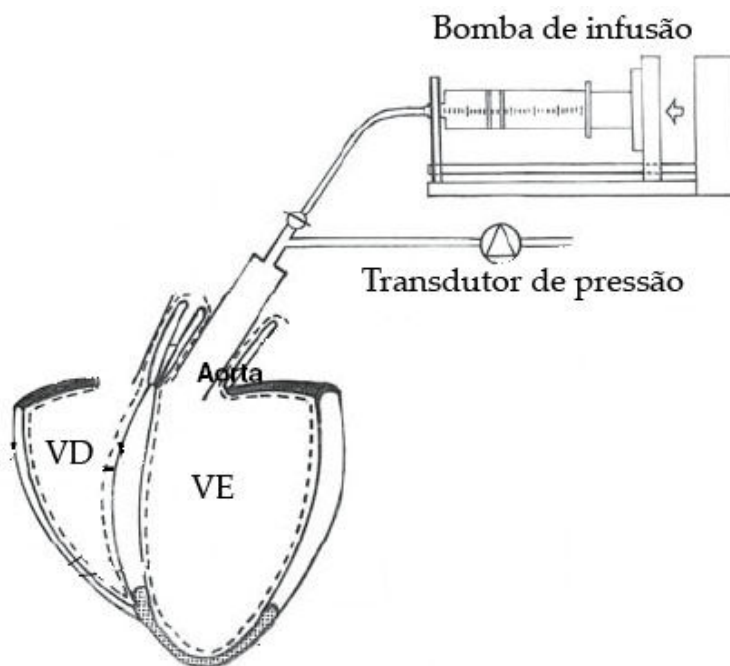


Figura 8. Preparação experimental para realização da curva pressão-volume. (Adaptado de Jugdutt et al., 2007).

Pelo menos três curvas foram registradas dentro de um período de 10 minutos, e as análises foram realizadas através das médias das mesmas, avaliando o volume infundido em valores fixos de pressão (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mmHg). Foi adotado o volume 0,05mL para o valor de 0 mmHg. A Figura 9 mostra um registro típico de uma curva pressão-volume.

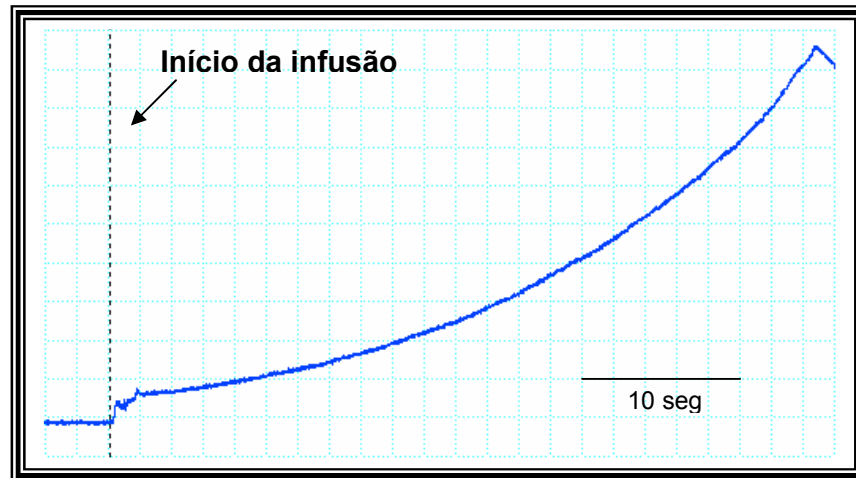


Figura 9. Registro típico da curva pressão-volume em ratos.

O cálculo da constante de rigidez do ventrículo esquerdo (em mmHg/mL) foi obtida através do ajuste dos dados da curva P-V para uma regressão linear entre 0 e 5 mmHg, obtendo a primeira constante de rigidez (k_{0-5}). Entre 5 e 30 mmHg, a curva foi ajustada utilizando um modelo monoexponencial, sendo a fórmula descrita como $P = b \cdot e^{k \cdot v}$, onde:

P= pressão

b= taxa de crescimento exponencial

e= base dos logaritmos neperianos

k= constante de rigidez

v= volume

Para a análise da segunda constante de rigidez do ventrículo esquerdo, foi utilizada a escala logarítmica de pressão, transformando a curva P-V entre 5-30 mmHg em uma função linear, de onde era obtida a segunda constante de rigidez da câmara ventricular (k_{5-30}), facilitando a comparação entre as retas. Isto permite

comparar as respostas de cada curva, sem sofrer influência de possíveis diferenças existentes entre 0-5 mmHg.

3.9. Preparação do Tecido para Análise da Expressão Gênica e Protéica

Sete dias após o início do tratamento, imediatamente antes do procedimento de ligadura da coronária, uma amostra de cada grupo foi sacrificada e o coração rapidamente retirado e colocado em solução nutritora em gelo. Os átrios foram separados dos ventrículos e o ventrículo direito separado do ventrículo esquerdo. O ventrículo esquerdo foi colocado em tubo com identificação apropriada e armazenado a -70°C para posterior utilização.

3.10. Ensaio para Medida da Expressão Protéica (*Western blot*)

Utilizando uma amostra do ventrículo esquerdo, foi realizada a extração protéica com tampão apropriado (vanadato de sódio 1mM, SDS 1%, Tris-HCl pH 7,4, 10mM) sob fervura com o auxílio de um homoneizador Polytron (BRINKMANN INSTRUMENTS, WESTBURY, NY). O homogenato foi centrifugado a 12000g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante retirado e estocado em gelo. A quantificação protéica foi realizada pelo método de Lowry em espectrofotômetro de placa (μ QUANT, BIOTEK INSTRUMENTS, INK). Foi realizada a eletroforese em tampão de corrida, utilizando 75mcg de proteína, em gel de acrilamida 12% por 2 horas a 90 volts. A eletroforese de transferência para uma membrana de nitrocelulose foi realizada a 4°C durante toda a noite (*overnight*) a 90 volts. Para verificar a eficácia da transferência, o gel foi incubado com Comassie Blue para detecção de proteínas remanescentes.

A membrana foi incubada com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, NaCl 0,5M, Tween-20 0,1%, Tris-HCl 20mM, pH 7,5) por 90 minutos, seguida da incubação com anticorpo monoclonal primário [anti-bcl-2 contra coelho, diluição de 1:750 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.), anti-bcl-xL contra coelho, diluição

de 1:750 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.); anti-bax contra coelho, diluição de 1:750 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.), anti-conexina43 (policlonal) contra coelho, diluição de 1:1500 (ZYMED LABORATORIES, CA, USA)] por 4 horas, sob agitação mecânica. Em seguida, a membrana foi submetida a uma tríplice incubação com solução de lavagem (NaCl 0,5M, Tween-20 0,1%, Tris-HCl 20mM, pH 7,5), cada uma com duração de 10 minutos.

A membrana foi incubada com anticorpo secundário por 90 minutos, sob agitação mecânica constante. A detecção das bandas foi realizada através da utilização de uma substância quimioluminescente (ECL PLUS WESTERN BLOTTING SYSTEM, AMERSHAM BIOSCIENCES, USA) em contato com um filme fotossensível. A quantificação das bandas foi realizada com o programa Scion Image para Windows (SCION CORPORATION, USA) após digitalização dos filmes com auxílio de um Scanner (SCANJET 2400C, HEWLETT-PACKARD, BRASIL).

3.11. Ensaio para Medida da Expressão Gênica (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa – RT-PCR)

Uma amostra do ventrículo esquerdo de cada animal foi descongelada e homogeneizada em solução TRIZOL (1ml/100mg, INVITROGEN). Em seguida, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio e centrifugado (CENTRIFUGA 5804R, EPPENDORF, ALE) para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada e a ela foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Após 10 minutos de estabilização à temperatura ambiente, a solução foi novamente centrifugada, a fase aquosa foi descartada e o precipitado foi retirado com etanol a 75%. Uma rápida centrifugação foi realizada, o excesso de etanol retirado e o RNA solubilizado em água.

O cDNA foi construído utilizando a enzima transcriptase reversa (SuperScript reverse transcriptase) (200U/μL) e uma seqüência iniciadora inespecífica em um termociclador (EPPENDORF, ALEMANHA) a partir de todo RNA extraído. Os genes de interesse foram amplificados com a enzima DNA polimerase e com seqüências iniciadoras específicas por uma quantidade de ciclos pré-estabelecida por uma curva

padrão construída para cada gene. A Tabela 1 mostra as seqüências iniciadoras, a temperatura de anelamento e o tamanho do produto final para cada gene utilizado. O produto final da amplificação foi preparado para eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,05% de brometo de etídeo. As bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultra-violeta (UVP BIOIMAGING SYSTEM, USA) e quantificadas com o auxílio do programa Scion Image.

Tabela 1. Genes e as respectivas seqüências iniciadoras, temperatura de anelamento e extensão do produto final

Gene	Seqüência	Temp. (°C)	Produto
Bcl-2	5'- TCCTTCCAGCCTGAGAGCAACC-3' 5'-GGTGACATCTCCCTGTTGACGC-3'	58	356
Bcl-xL	5'-GTGGCTGGTGTAGTTCTGCTGG-3' 5'-AACAAGGCAGGCTCTTCTCCC-3'	58	356
Bax	5'-GGAGATGAACTGGACAATAATATGG-3' 5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3'	53	152
β -actina	5'- TGGCATTGTGATGGACTCCG-3' 5'- TTAATGTCACGCACGATTTCCC-3'	58	192

Produto descrito como número de pares de bases no produto final. Temp, Temperatura.

3.12. Avaliação Arritmogênica Após o Infarto

Para avaliação das arritmias pós-infarto, uma amostra foi retirada de cada grupo para a realização deste protocolo. Os animais receberam seus respectivos tratamentos e o infarto foi realizado da seguinte forma. Após anestesia com pentobarbital sódico (60mg/kg) intraperitoneal, o animal foi posicionado em uma mesa cirúrgica e o registro eletrocardiográfico realizado com o auxílio de um pré-amplificador (BioAmp, AdInstruments, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AdInstruments, Austrália) por 5 minutos antes da cirurgia na derivação D1. Foi realizada uma toracotomia no nível do quarto espaço intercostal e o coração rapidamente eviscerado, para oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda. O coração foi reposicionado e o tórax fechado. O registro eletrocardiográfico foi obtido por 30 minutos após à cirurgia e gravados para análise off-line. A análise de arritmias ventriculares foi feita de acordo com a padronização de Walker et al. (1988). Os seguintes parâmetros foram medidos:

- A frequência cardíaca em intervalos de 5 minutos, sempre em períodos de ritmo sinusal;
- O número de extrassístoles ventriculares;
- O número e a duração das taquicardias ventriculares (TV), caracterizado pela ocorrência de quatro ou mais extrassístoles ventriculares consecutivas;
- A incidência de fibrilação ventricular (FV). A irreversibilidade da FV foi caracterizada após cinco minutos de cardioversão mecânica.

A figura 10 mostra um registro eletrocardiográfico típico, evidenciando as arritmias utilizadas na análise dos dados.

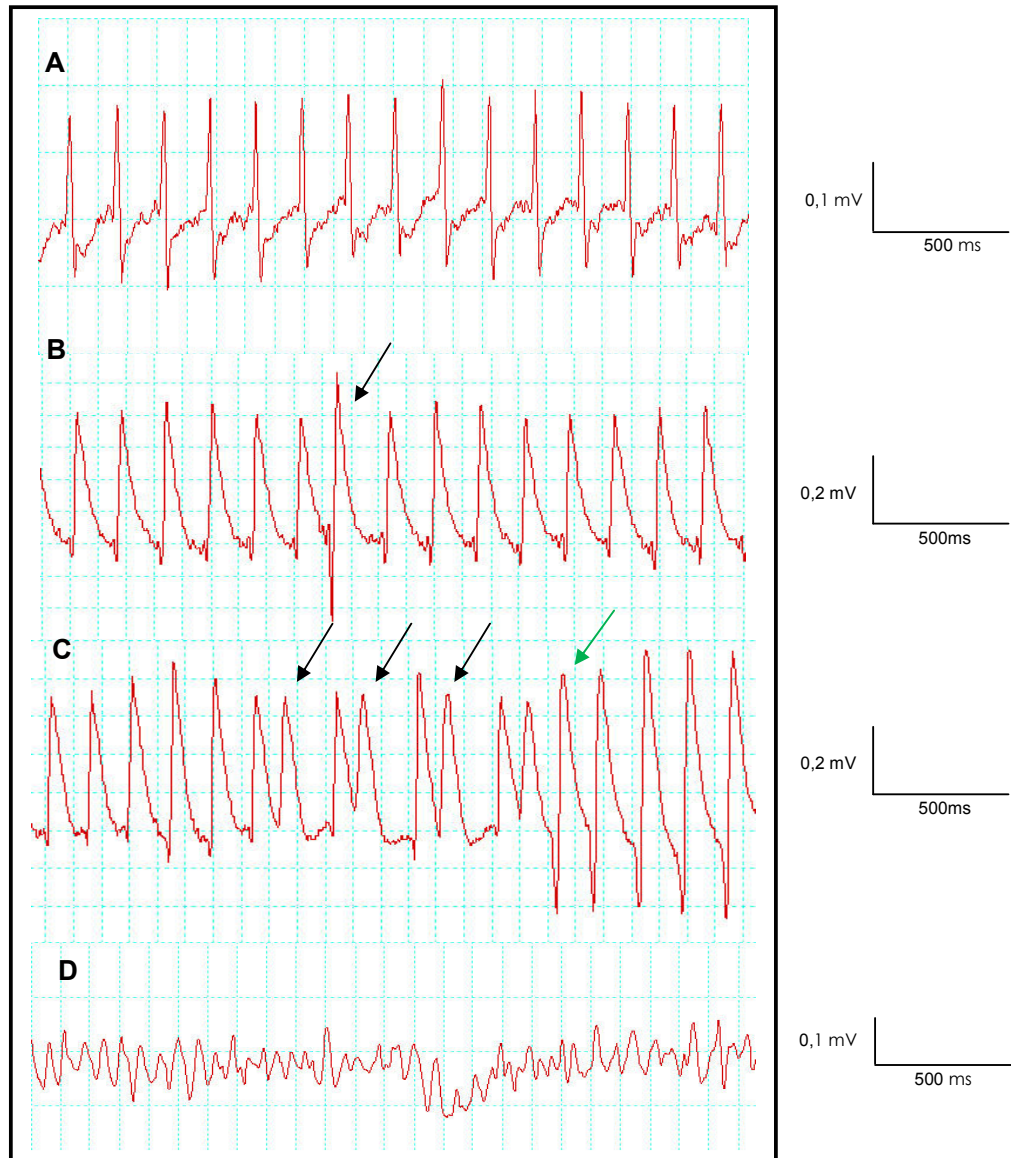


Figura 10. Registros eletrocardiográficos mostrando (A) antes e (B) após a oclusão da coronária, com supra-desnivelamento do segmento S-T, sendo evidenciada uma extrassístole isolada; (C) setas pretas evidenciam extrassístoles bigeminadas, sendo seguida por uma taquicardia ventricular apontada pela seta verde; (D) fibrilação ventricular.

Para a análise das arritmias pelo sistema de escores (Baczkó et al., 1997), utilizamos todos os animais incluídos neste protocolo, inclusive aqueles que morreram durante o registro. A Tabela 2 apresenta os valores específicos para cada condição.

Tabela 2. Sistemas de Escores para a Caracterização da Gravidade das Taquiarritmias Cardíacas Após o Infarto*

<i>Arritmias</i>	<i>Escores</i>
Nenhuma arritmia	0
TV < 10 segundos, sem FV	1
TV entre 11 - 30 segundos, sem FV	2
TV entre 30 - 90 segundos, sem FV	3
TV entre 91-180 segundos ou FV < 10 segundos	4
TV > 180 segundos ou FV > 10 segundos	5
FV irreversível	6

* Retirado de Baczkó et al. (1997)

3.13. Análise Estatística

O teste *t* de *Student* foi utilizado quando era necessária a comparação entre dois grupos independentes. Para comparação entre uma única medida em mais de dois grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para uma via e a comparação entre dois ou mais grupos em relação a um segundo fator foi utilizada a ANOVA para dois fatores. Quando o teste era positivo, foi utilizada a correção de Bonferroni para múltiplas comparações.

Para avaliar a influencia do tratamento sobre a mortalidade, foi realizada uma análise de sobrevivência baseada no método de Kaplan-Meier, e a comparação entre as curvas foi feita pelo teste de log rank. Para análise ponto a ponto da curva de mortalidade, foi realizado o teste de Chi-quadrado comparando a proporção de mortes entre os grupos.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre duas variáveis quantitativas, e para a avaliação da complementaridade entre os métodos de medida do infarto foi utilizado o modelo de Bland-Altman.

Na análise temporal das extrassístoles, utilizamos a área sob a curva (ASC) seguida por teste t de Student não pareado. A incidência de FV foi comparada utilizando o teste exato de Fischer.

Para a comparação entre as curvas pressão-volume, foi utilizado uma regressão linear para obter a constante de rigidez de cada grupo, sendo posteriormente comparadas por uma ANOVA de uma via.

Todos os valores estão expressos no texto e nos gráficos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS para Windows (SPSS SOFTWARE VERSÃO 13, USA). Para construção dos gráficos, foi utilizado o software OriginPro versão 7.0 (ORIGINLAB CORPORATION, MA, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do G-CSF na Mobilização de Leucócitos

A contagem de leucócitos totais realizada antes do início do tratamento não diferiu entre os grupos avaliados (Sham, 12820 ± 580 céls./mm³; IM, 12300 ± 365 céls./mm³; IM-GCSF, 12258 ± 398 céls./mm³; $p > 0,05$). Já a coleta realizada imediatamente antes do procedimento cirúrgico mostrou que o grupo que recebeu o pré-tratamento com G-CSF apresentou aumento significativo de leucócitos em comparação aos demais grupos (Sham, 13272 ± 413 céls./mm³; IM, 12535 ± 320 céls./mm³; IM-GCSF, 22673 ± 849 céls./mm³; $p < 0,05$). (Figura 11)

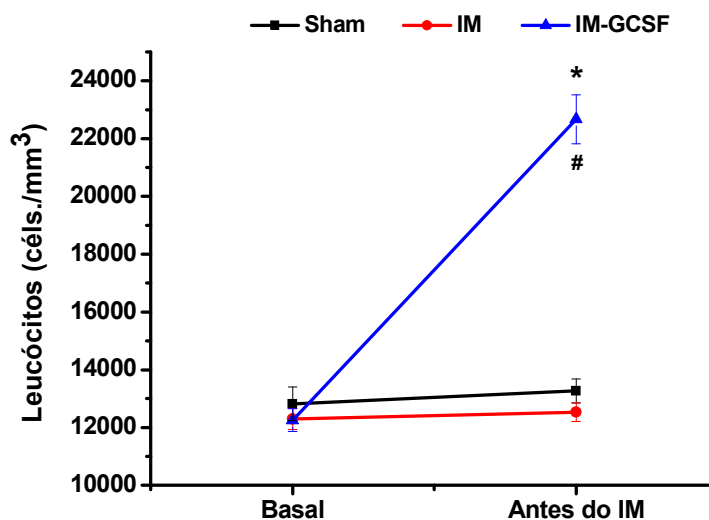


Figura 11. Contagem de leucócitos antes do início do tratamento (Basal) e imediatamente antes da indução do infarto ou da cirurgia fictícia. Sham (n=10); IM (n=31); IM-GCSF (n=32).

* $p < 0,05$ vs. IM

$p < 0,05$ vs. Sham

4.2. Análise Eletrocardiográfica

O acompanhamento eletrocardiográfico realizado antes e após a ligadura coronariana ou cirurgia fictícia está apresentado na Figura 12. Um aumento da frequência cardíaca foi observado em todos os grupos 24 horas após o procedimento cirúrgico, retornando aos valores basais ao longo do período de acompanhamento (Figura 12A). Os grupos submetidos ao infarto apresentaram onda Q em D1 a partir do primeiro dia, sendo que a duração e a amplitude foram diminuindo progressivamente ao longo dos 5 dias iniciais até a estabilização (Figura 12G e 12H, respectivamente).

A análise do eixo elétrico de QRS mostrou que 24 horas após a indução do infarto, os grupos IM e IM-GCSF apresentaram desvio significativo do eixo elétrico de QRS para a direita comparados ao grupo Sham, sendo mantida até o fim do acompanhamento (Figura 12I).

Os demais parâmetros como duração da onda P, QRS, QT, intervalo P-R, e a amplitude da onda P não sofreram alterações estatisticamente significantes entre os grupos estudados (Figura 12).

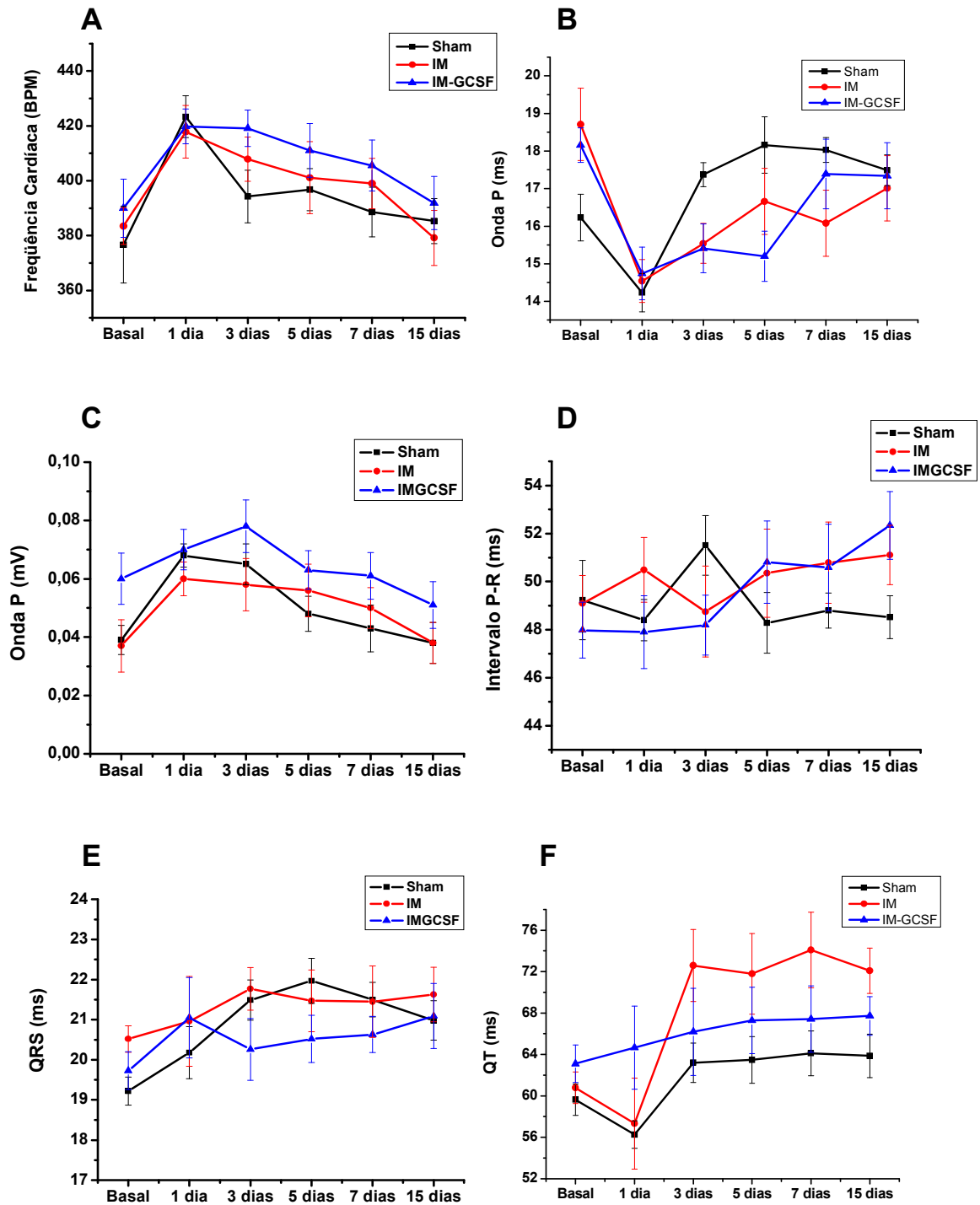


Figura 12. Curso temporal das medidas eletrocardiográficas nos grupos Sham (n=10), IM (n=14) e IM-GCSF (n=14). Os valores representam a média±E.P.M.

* $p < 0,05$ vs. IM

‡ $p < 0,05$ vs. IM-GCSF.

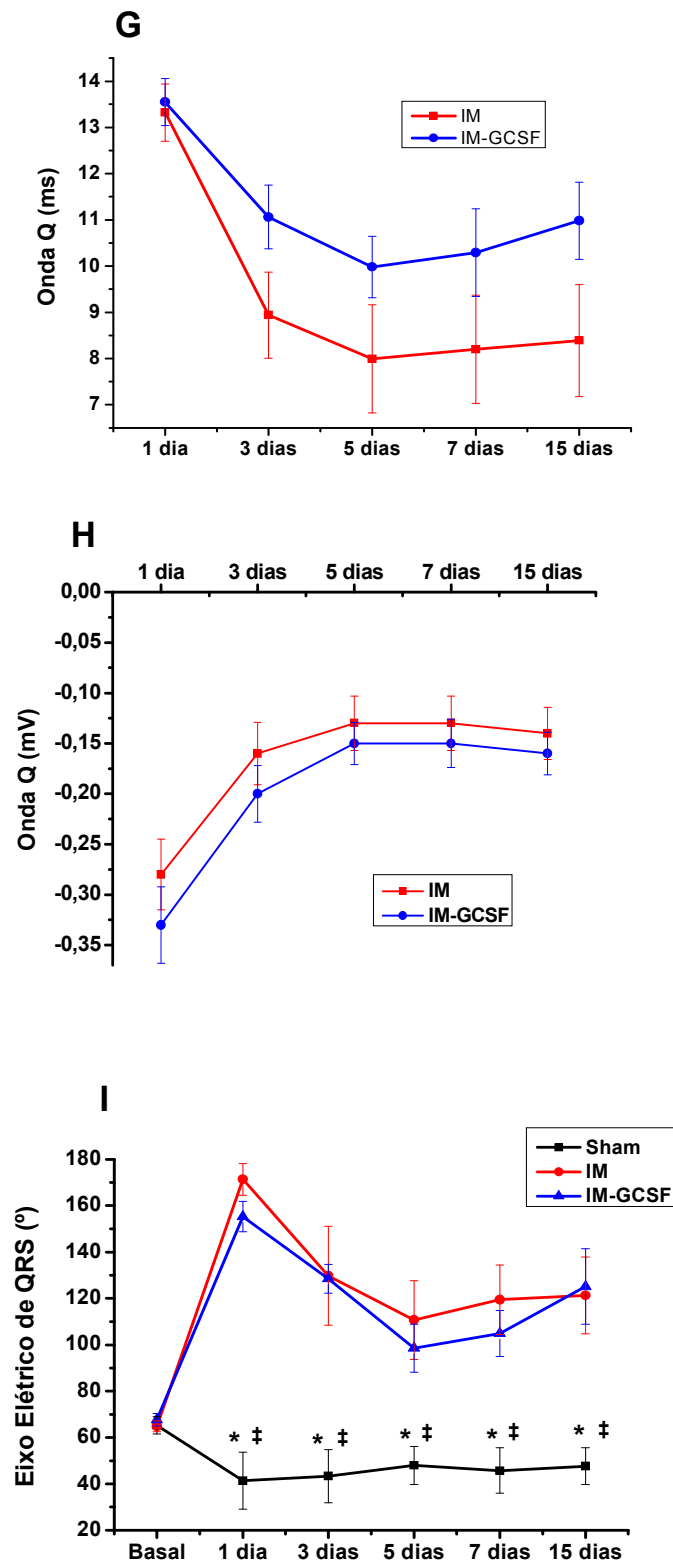


Figura 12. Curso temporal das medidas eletrocardiográficas nos grupos Sham (n=10), IM (n=14) e IM-GCSF (n=14). Os valores representam a média±E.P.M.
 * $p < 0,05$ vs. IM
 ‡ $p < 0,05$ vs. IM-GCSF.

4.3. Parâmetros Ponderais

A Tabela 3 dispõe os parâmetros ponderais dos grupos Sham, IM e IM-GCSF nos períodos específicos de análise.

O peso corporal dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos nos tempos indicados na tabela. Com o intuito de avaliar um possível efeito sobre a hipertrofia cardíaca, foi realizada a medida do peso das câmaras ventriculares. No primeiro dia após a oclusão da artéria coronária, não foi detectada nenhuma diferença significativa no peso relativo dos ventrículos esquerdo e direito (Tabela 3). As análises realizadas 15 dias após a indução do infarto do miocárdio mostram que o grupo IM apresentou tendência de aumento do peso relativo do ventrículo direito quando comparado aos demais grupos ($0,72 \pm 0,05$ IM vs. $0,63 \pm 0,05$ Sham e $0,65 \pm 0,03$ IM-GCSF, $p=0,07$), mas sem alcançar significância estatística.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos analisados no peso do fígado ($41,8 \pm 1,4$, Sham; $37,2 \pm 1,3$, IM; $37,2 \pm 1,4$, IM-GCSF; $p>0,05$) e dos pulmões ($6,7 \pm 0,3$, Sham; $7 \pm 0,3$, IM; $6,9 \pm 0,6$, IM-GCSF; $p>0,05$), avaliados quinze dias após o infarto.

O peso da cicatriz do infarto avaliado 15 dias após o infarto apresentou ligeira tendência à redução nos animais pré-tratados com G-CSF ($0,40 \pm 0,04$ IM-GCSF vs. $0,47 \pm 0,02$ IM; $p=0,08$), mas sem apresentar diferença significante.

Tabela 3. Parâmetros Ponderais

	<i>Sham</i>	<i>IM</i>	<i>IM-GCSF</i>
Peso Corporal (g)			
Basal	218±4	220±3	219±4
1º dia	249±3	247±4	248±4
15º dia	312±6	320±6	314±8
1º DIA	(n=6)	(n=17)	(n=18)
Ventrículo direito (mg/g)	0,62±0,04	0,62±0,04	0,69±0,03
Ventrículo esquerdo (mg/g)	2,31±0,1	2,38±0,1	2,43±0,1
15º DIA	(n=8-10)	(n=12-14)	(n=12-14)
Pulmões (mg/g)	6,7±0,3	7±0,3	6,9±0,6
Água (%)	82±0,4	81±0,3	81±0,3
Fígado (mg/g)	41,8±1,4	37,2±1,3	37,2±1,4
Água (%)	74±0,4	73±0,4	73±0,3
Ventrículo direito (mg/g)	0,63±0,05	0,72±0,05	0,65±0,03
Ventrículo esquerdo (mg/g)	1,95±0,05	2±0,04	2±0,07
Peso da Cicatriz (mg/g)	-	0,47±0,02	0,40±0,04

Os pesos das vísceras foram corrigidos para o peso corporal. O percentual de água foi calculado pela diferença entre o peso úmido e o peso seco do tecido.

4.4. Extensão do Infarto

Vinte e quatro horas após a ligadura da artéria coronária, a extensão do infarto foi quantificada pela técnica do TTC. Pode-se observar que o grupo IM-GCSF apresentou menor extensão da área infartada quando comparada ao grupo IM ($35,8 \pm 2,8\%$ vs. $43,7 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$) (Figura 13). A extensão do infarto medida pelo peso da área corada por TTC também foi diferente, proporcionalmente àquela avaliada pela área ($40 \pm 2\%$ no grupo IM vs. $31,5 \pm 2,8\%$ no grupo IM-GCSF, $p < 0,05$).

Para avaliar a validade do método de medida da extensão do infarto pela técnica do TTC, fizemos a comparação do método de medida da área com o método de quantificação pelo peso da área infartada. Este método é realizado pesando a área infartada em relação ao peso da área total do ventrículo esquerdo. A análise de correlação mostrou uma forte associação positiva entre os dois métodos ($r = 0,98$, $p < 0,05$) (Figura 14). O gráfico de Bland-Altman mostrou forte interação entre os dois métodos (Figura 15).

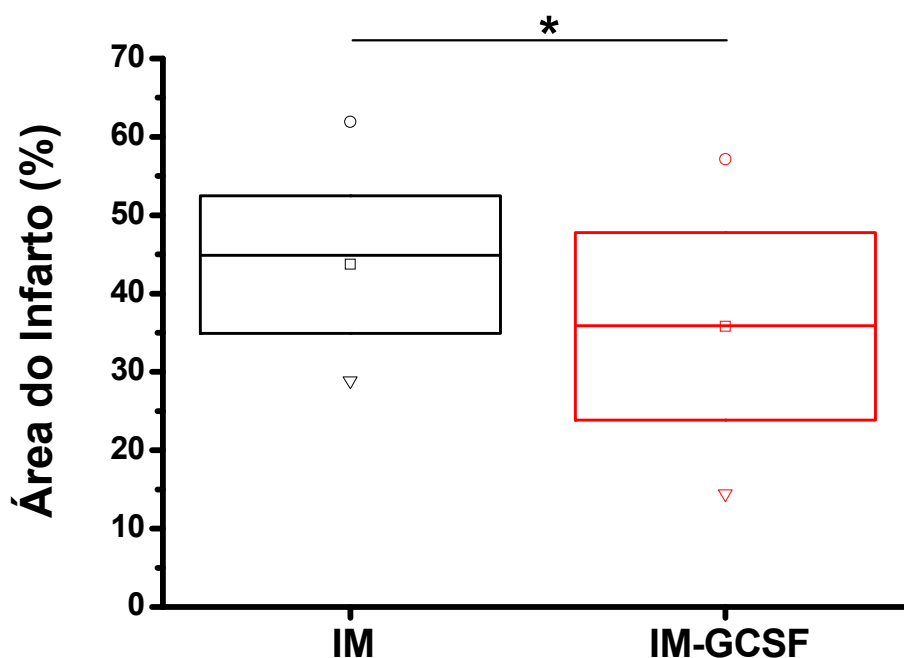


Figura 13. Box-plot representando a extensão do infarto medida 24 horas após o infarto, apresentada como a porcentagem da área infartada do ventrículo esquerdo em relação a área total do ventrículo esquerdo. Linha horizontal apresenta a mediana, quadrado representa a média, o box representa desvio padrão, círculo representa o valor máximo, triângulo representa o valor mínimo. IM (n=17), IM-GCSF (18).

* $p < 0,05$ vs. IM

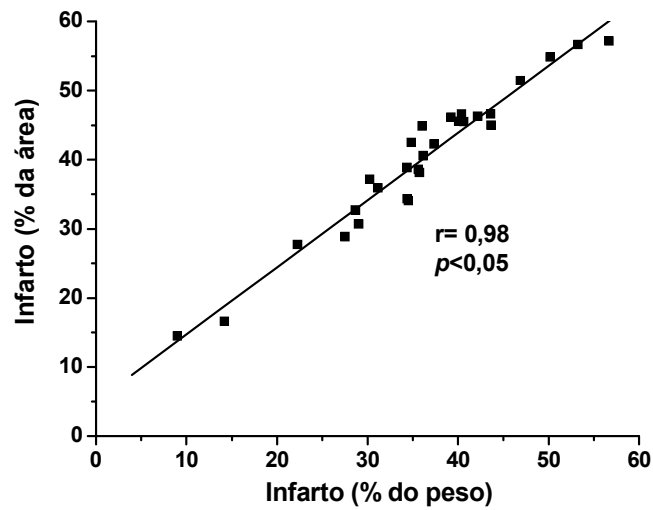


Figura 14. Correlação entre as duas formas de quantificação da extensão do infarto 24 horas após a ligadura da coronária: pela área e pelo peso. O r representa o coeficiente de correlação.

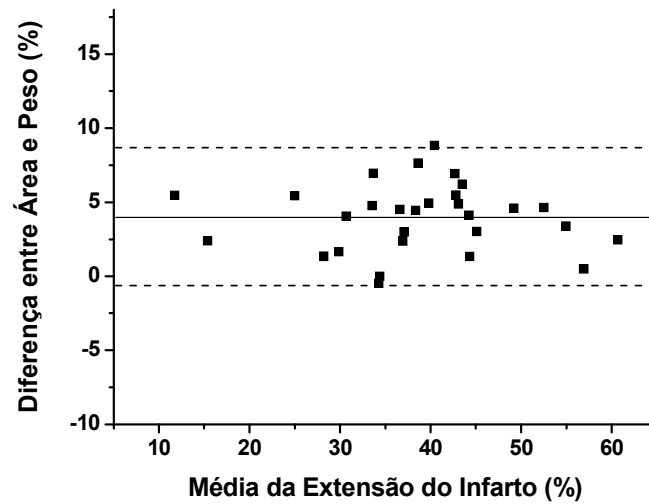


Figura 15. Análise de Bland-Altman para comparação entre dois métodos de medida da extensão do infarto com 24 horas.

A análise de correlação entre a extensão do infarto medida 24 horas após a oclusão e a quantidade de leucócitos mobilizados imediatamente antes do procedimento mostrou que não houve associação significativa no grupo IM ($r = 0,38$, $p > 0,05$) (Figura 16A) nem no grupo IM-GCSF ($r = 0,25$, $p > 0,05$) (Figura 16B).

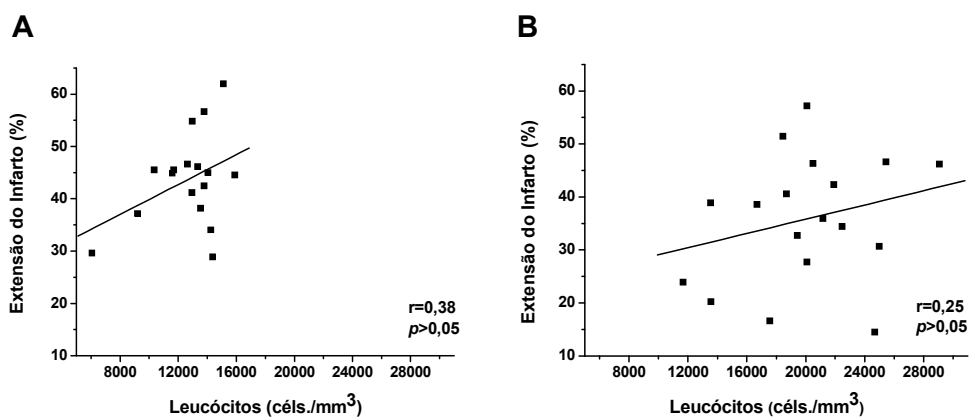


Figura 16. Análise de correlação entre a extensão do infarto medida 24 horas após a ligadura da coronária e a quantidade de leucócitos mobilizados. A, correlação no grupo IM (n=17); B, correlação no grupo IM-GCSF (n=18).

Quinze dias após a produção do infarto do miocárdio, a extensão da cicatriz foi medida por planimetria. Observamos que o grupo que recebeu o pré-tratamento com G-CSF apresentou menor área de infarto ($27,2 \pm 2,2\%$ vs. $35,9 \pm 1,4\%$ no grupo IM, $p < 0,05$) (Figura 17). Já a avaliação da extensão do infarto através do peso da cicatriz não foi diferente entre os grupos estudados ($23,6 \pm 1,1\%$ no grupo IM vs. $19,6 \pm 2\%$ no grupo IM-GCSF, $p > 0,05$). Pode ser observado que existe correlação significativa entre a extensão do infarto medida pela área e pelo peso da cicatriz (Figura 18).

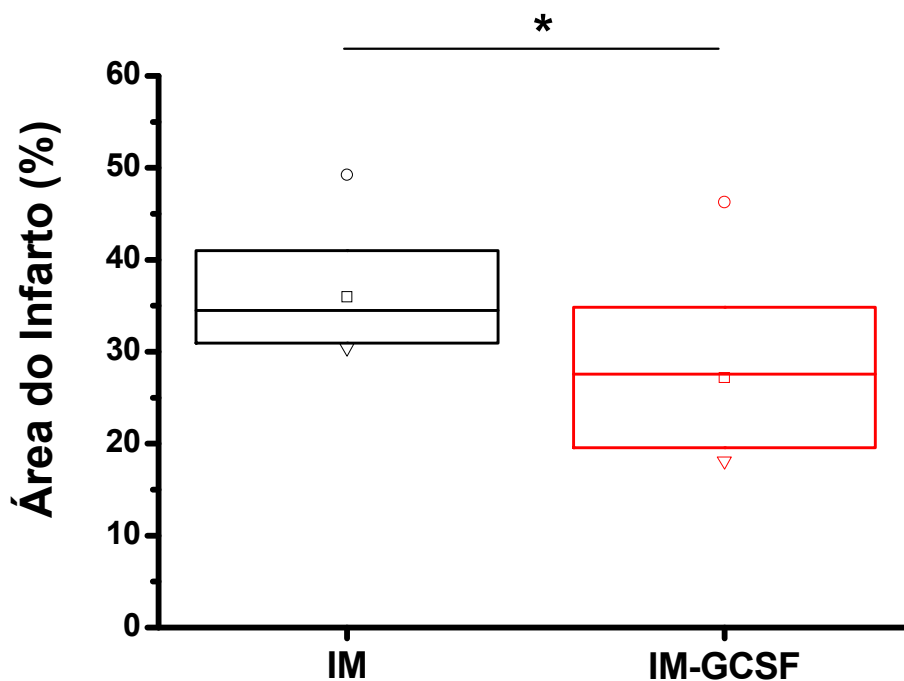


Figura 17. Box-plot representando a extensão do infarto medida 15 dias após o infarto, apresentada como a porcentagem da área infartada em relação a área total do ventrículo esquerdo. Linha horizontal apresenta a mediana, quadrado representa a média, o box representa desvio padrão, círculo representa o valor máximo, triângulo representa o valor mínimo. IM (n=13), IM-GCSF (13).
* $p < 0,05$ vs. IM

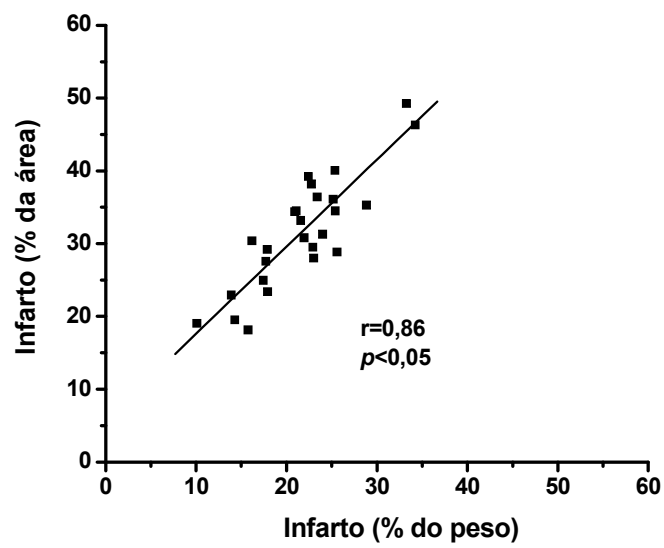


Figura 18. Correlação entre os dois métodos utilizados para avaliar a extensão do infarto 15 dias após a oclusão da artéria coronária. O r representa o coeficiente de correlação entre as duas variáveis.

4.5. Expressão Gênica de Vias Pró e Anti-Apoptóticas

A análise de expressão gênica feita por RT-PCR imediatamente antes do IAM mostrou que os animais tratados com G-CSF apresentam níveis aumentados do mRNA para Bcl-2 em relação ao grupo IM ($1,2 \pm 0,08$ vs. $0,94 \pm 0,03$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 19). A expressão de Bcl-xL apresentou tendência de aumento no grupo tratado com GCSF mas sem diferença significativa ($1,05 \pm 0,07$, IM-GCSF; $0,88 \pm 0,05$, IM) (Figura 20). Os níveis de expressão do mRNA para Bax não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados ($1,34 \pm 0,06$, G-CSF; $1,35 \pm 0,08$, Controle; $p > 0,05$) (Figura 21). Todos os níveis de expressão gênica foram normalizados pelos níveis de expressão do gene constitutivo β -actina.

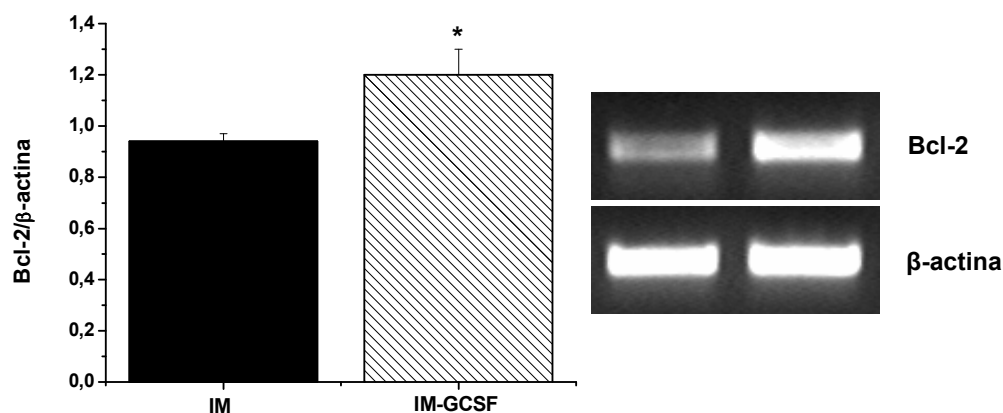


Figura 19. Expressão gênica de Bcl-2 por RT-PCR. Dados apresentados como média \pm E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6).

* $p < 0,05$ vs. Controle

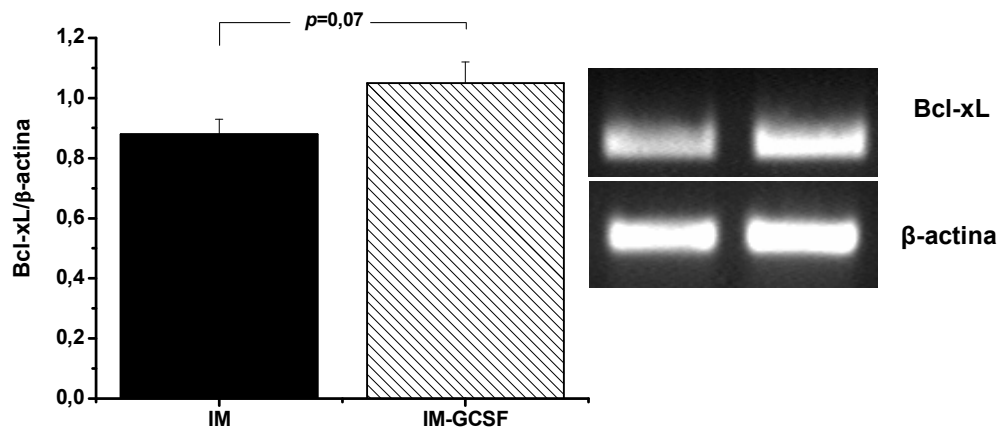


Figura 20. Expressão gênica de Bcl-xL por RT-PCR. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6).

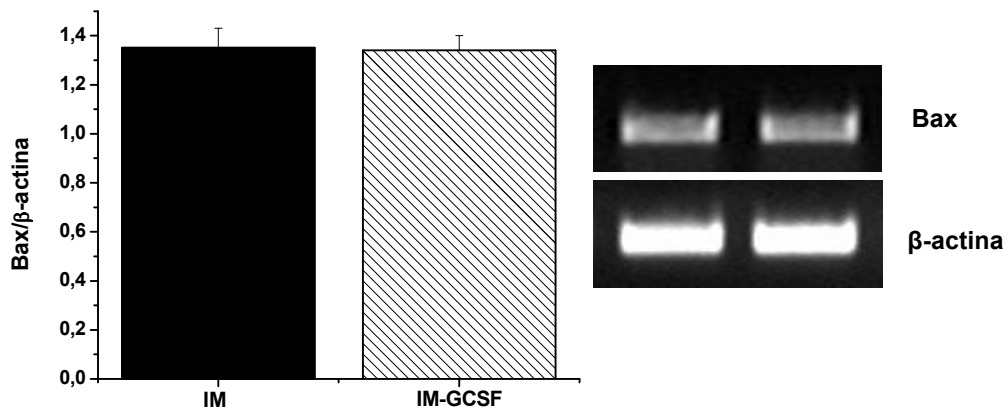


Figura 21. Expressão gênica de Bax por RT-PCR. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6).

4.6. Análise da Expressão Protéica

As análises de expressão protéica foram realizadas pela técnica de Western blot.

Os animais do grupo IM-GCSF apresentaram níveis significativamente maiores da expressão protéica de Bcl-2 ($8,8 \pm 0,9$, IM-GCSF; $5,2 \pm 0,6$, IM; $p < 0,05$) (Figura 22) e Bcl-xL ($5,6 \pm 0,8$, IM-GCSF; $3 \pm 0,2$, IM; $p < 0,05$) (Figura 23) quando comparados ao grupo IM. Do mesmo modo que na expressão gênica, os níveis de expressão protéica de Bax não foram diferentes entre os grupos de estudo ($5,9 \pm 1$, IM-GCSF; $5,5 \pm 1,2$, IM; $p > 0,05$) (Figura 24).

A relação entre os níveis de expressão protéica de Bcl-2 e Bax, reconhecidamente um índice de proteção celular contra apoptose, foi significativamente aumentado no grupo IM-GCSF, comparado ao grupo IM ($1,4 \pm 0,3$, IM-GCSF; $0,9 \pm 0,2$, IM; $p < 0,05$) (Figura 25).

A expressão de conexina43 se mostrou aumentada nos animais pré-tratados com G-CSF, quando comparada ao grupo que não recebeu tratamento ($1,06 \pm 0,08$ vs. $0,82 \pm 0,03$, $p < 0,05$) (Figura 26).

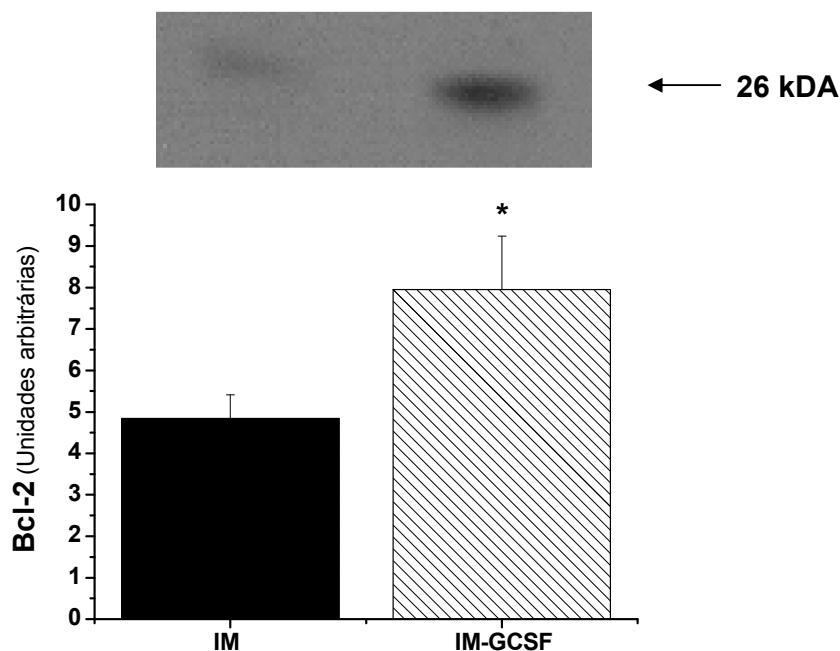


Figura 22. Expressão protéica de bcl-2 no ventrículo esquerdo de ratos por Western blot. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6)

* $p < 0,05$

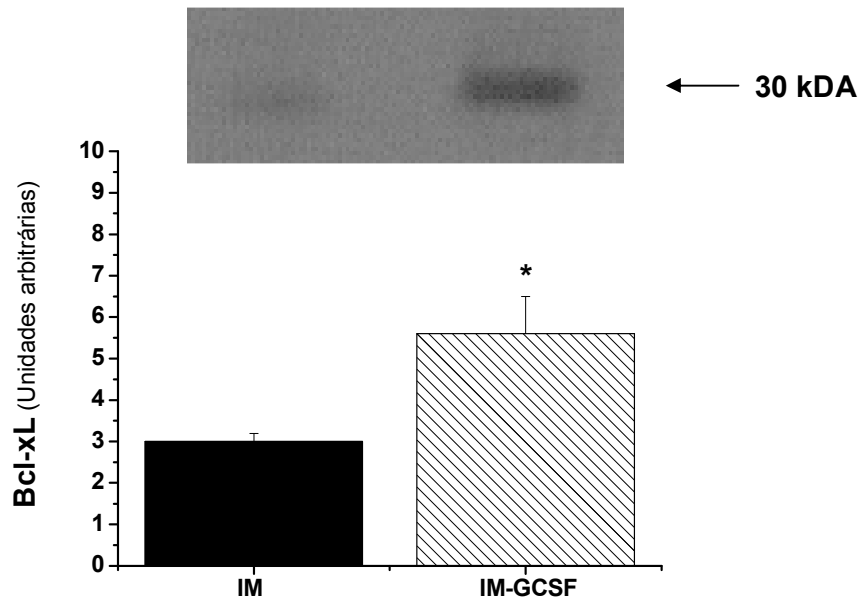


Figura 23. Expressão protéica de bcl-xL no ventrículo esquerdo de ratos por Western blot. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6)
* $p < 0,05$

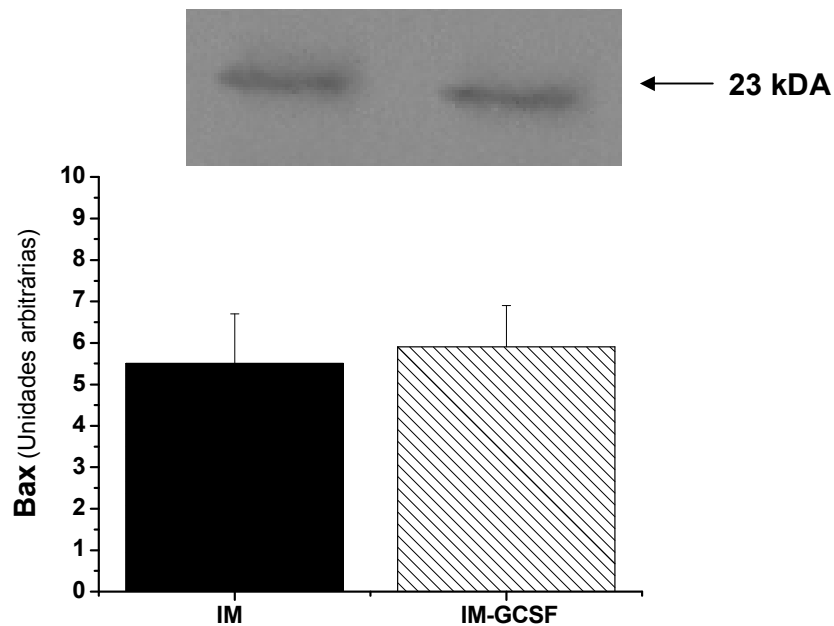


Figura 24. Expressão protéica de bax no ventrículo esquerdo de ratos por Western blot. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6)

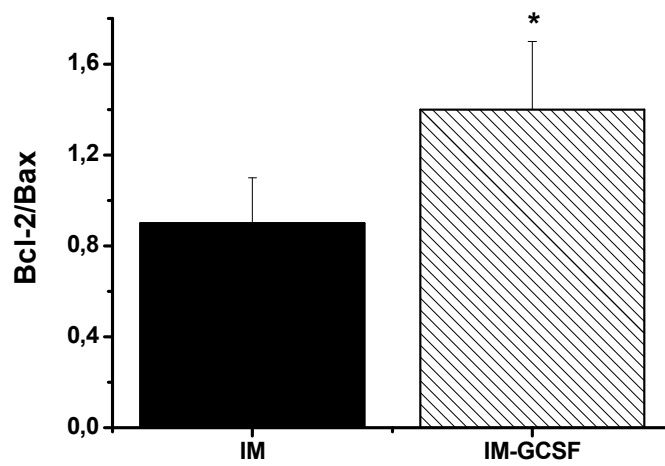


Figura 25. Relação entre a expressão protéica de Bcl2/Bax. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=6) e IM-GCSF (n=6)
* $p < 0,05$

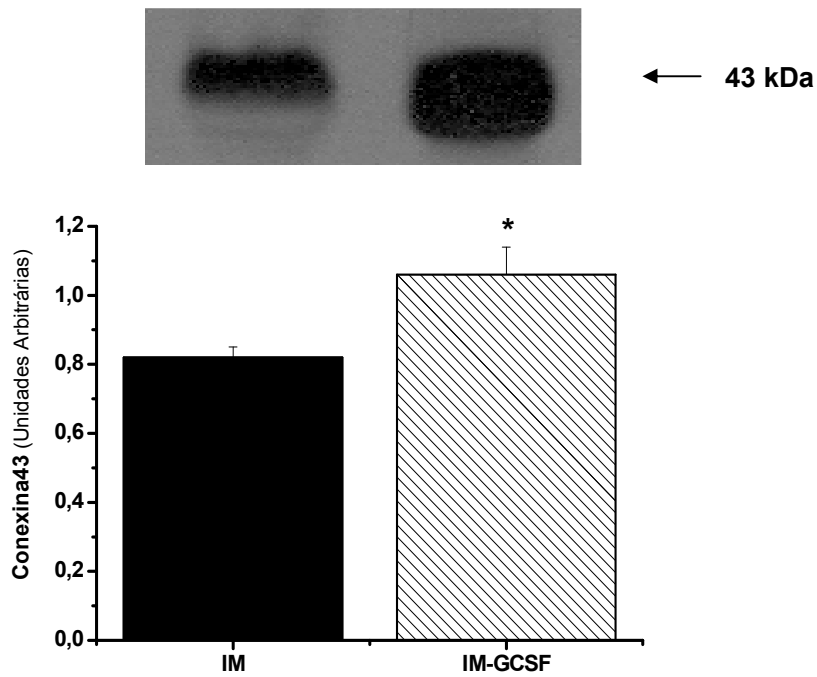


Figura 26. Expressão protéica de Connexina43 no ventrículo esquerdo de ratos por Western blot. Dados apresentados como média±E.P.M. IM (n=5) e IM-GCSF (n=5)
* $p < 0,05$

4.7. Parâmetros Hemodinâmicos

Quinze dias após a indução do IM, os animais foram submetidos às medidas hemodinâmicas para análise da função cardíaca. A Tabela 4 apresenta os parâmetros hemodinâmicos medidos.

O Grupo IM apresentou aumento significativo da PDFVE comparado aos demais grupos, sendo que o pré-tratamento com G-CSF restaura parcialmente a PDFVE (8,1±0,9 Sham; 17,8±3,6 IM; 12,4±2,7 IM-GCSF; $p<0,05$). Pode-se observar uma redução significativa da PSVE no grupo IM em relação ao grupo Sham e IM-G-CSF. Resultados semelhantes foram observados na dP/dt VE + e - e na dP/dt VD + no grupo IM, que encontra-se significativamente reduzidos em relação aos demais grupos, mas sem diferenças na dP/dt VD -.

Não foram detectadas diferenças entre os grupos estudados na FC, PSVD, PDVE, PDVD e PDFVD.

Tabela 4. Parâmetros hemodinâmicos 15 dias após o infarto do miocárdio

	Sham (n=8)	IM (n=13)	IM-GCSF (n=13)
FC (BPM)	244±10	234±11	263±10
PSVE (mmHg)	115,5±3,1	102,4±3,3 [#]	111,5±2*
PDVE(mmHg)	5,3±0,9	7,2±2	6,3±2
PDFVE(mmHg)	8,1±0,9	17,8±3,6 [#]	12,4±2,7* [#]
+dP/dt (VE) (mmHg/s)	4424±141	2886±294 [#]	3759±393*
-dP/dt (VE) (mmHg/s)	-3227±136	-2130±190 [#]	-2714±205*
PSVD(mmHg)	32,2±0,84	30,8±1	35,4±2,4
PDVD(mmHg)	3,3±0,4	3,5±0,9	2,8±0,9
PDFVD(mmHg)	5,1±0,4	5,6±0,8	5,2±0,9
+dP/dt (VD) (mmHg/s)	1070±24	824±48 [#]	1071±68*
-dP/dt (VD) (mmHg/s)	-789±28	-681±48	-826±57

FC, frequência cardíaca; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; PS, pressão sistólica; PD, pressão diastólica; PDF, pressão diastólica final; dP/dt , derivada máxima de pressão.

[#] $p<0,05$ vs. Sham

* $p<0,05$ vs. IM

4.8. Análise da Rigidez da Câmara Ventricular Esquerda: Curva Pressão-Volume

A curva pressão-volume se comportou de forma linear entre 0 e 5 mmHg (Figura 27), e exponencial de 5 a 30 mmHg (Figura 29). A Figura 21 apresenta as retas relativas a cada grupo. A análise da inclinação das retas mostrou que o grupo IM apresenta menor grau de inclinação quando comparado aos demais grupos ($19,9 \pm 2,5$ vs. 41 ± 5 no grupo IM-GCSF e $42,8 \pm 3,5$ mmHg/mL no grupo Sham), indicando uma dilatação ventricular esquerda mais pronunciada quando comparada aos demais grupos. Pode ser observado na Figura 28 que existe uma forte correlação negativa entre a extensão do infarto e o grau de inclinação da reta ($r = -0,83$, $p < 0,05$).

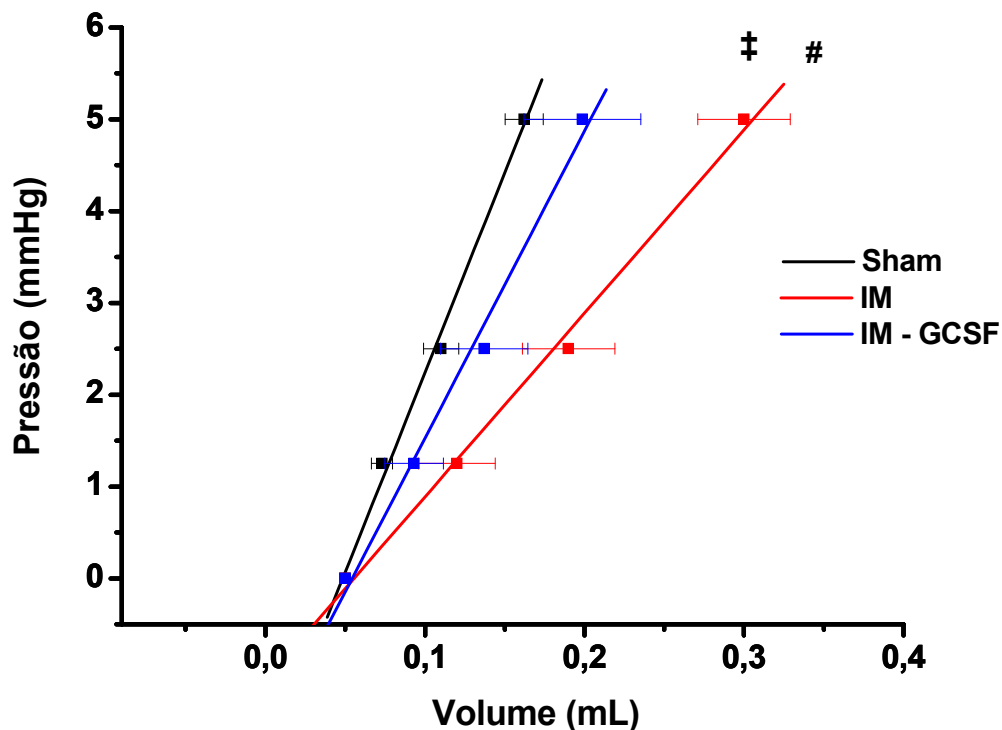


Figura 27. Ajuste linear da curva pressão-volume realizada 15 dias após o infarto nos grupos Sham (n=8), IM (n=10) e IM-GCSF (n=10). Os valores estão apresentados como média \pm E.P.M.

‡ $p < 0,05$ vs. IM-GCSF

$p < 0,05$ vs. Sham

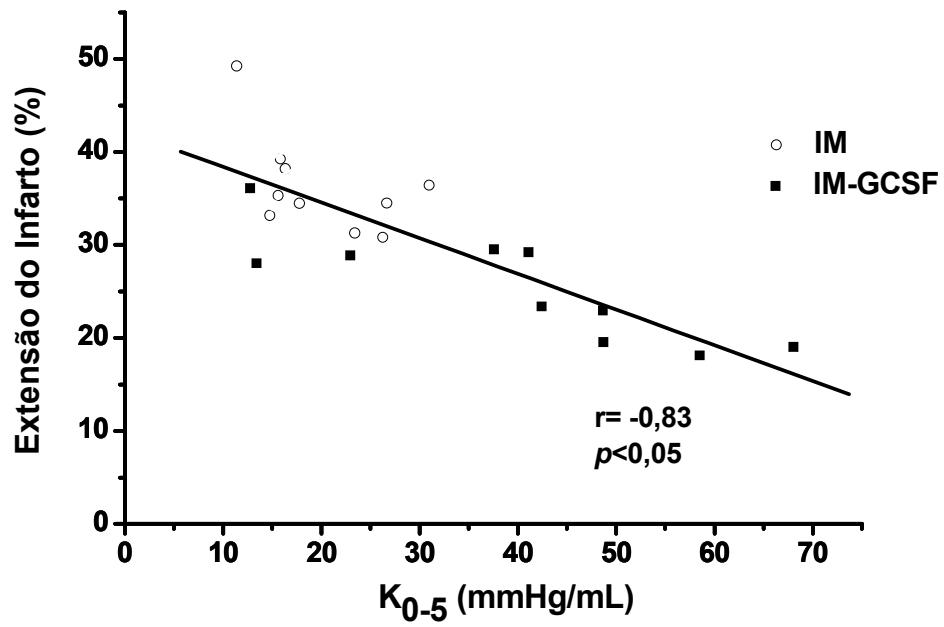


Figura 28. Análise de correlação entre a extensão do infarto medida aos 15 dias após a oclusão e a constante de rigidez da câmara medida pela inclinação da curva pressão-volume de 0-5 mmHg (k_{0-5}). Os valores estão apresentados como média \pm E.P.M.

A Figura 29 apresenta as curvas P-V ajustadas por uma regressão monoexponencial. As medidas foram realizadas 15 dias após o procedimento cirúrgico, e a transformação logarítmica da escala de pressão está ilustrada na Figura 30. Pode ser observado que o grupo IM apresenta a curva desviada para a direita. A inclinação da curva mostrou que as curvas dos grupos Sham e IM estão em paralelo, não havendo diferença significativa entre estes grupos, sendo que o grupo IM-GCSF apresenta inclinação significativamente maior comparado ao grupo IM, mas sem diferença com o grupo Sham ($k=2,52\pm 0,2$, IM; $k=3,35\pm 0,2$, IM-GCSF; $k=3,02\pm 0,7$, Sham; $p<0,05$). A análise de correlação entre a constante de rigidez da câmara ventricular e a extensão do infarto mostra grande tendência à associação entre as duas variáveis, mas sem apresentar diferença significativa (Figura 31).

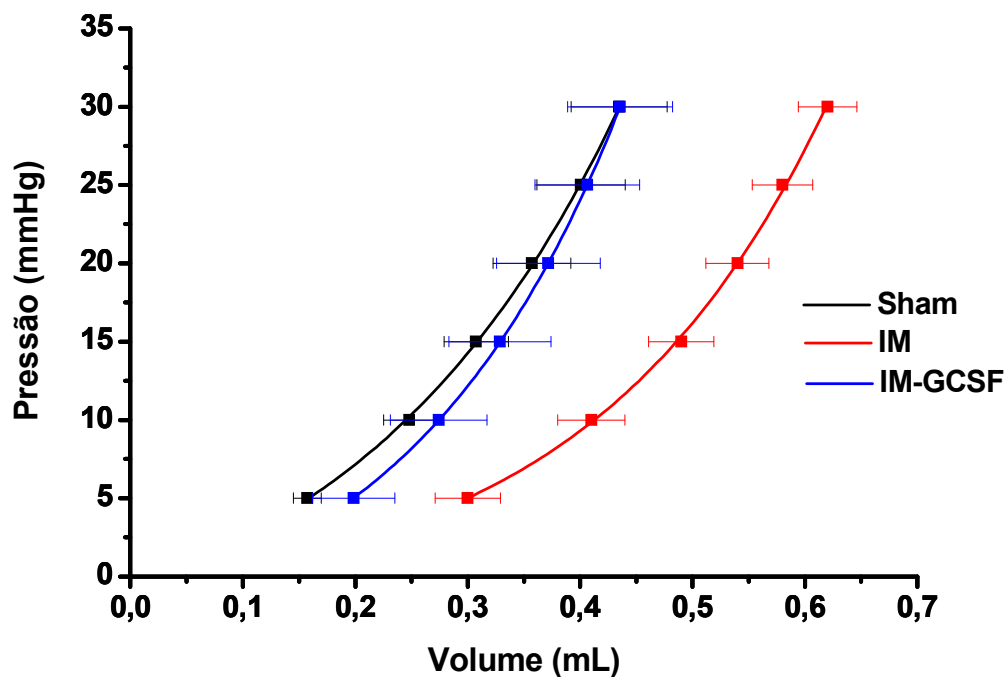


Figura 29. Ajuste monoexponencial da curva pressão-volume realizada 15 dias após o infarto nos grupos Sham (n=8), IM (n=10) e IM-GCSF (n=10). Os valores estão apresentados como média \pm E.P.M.

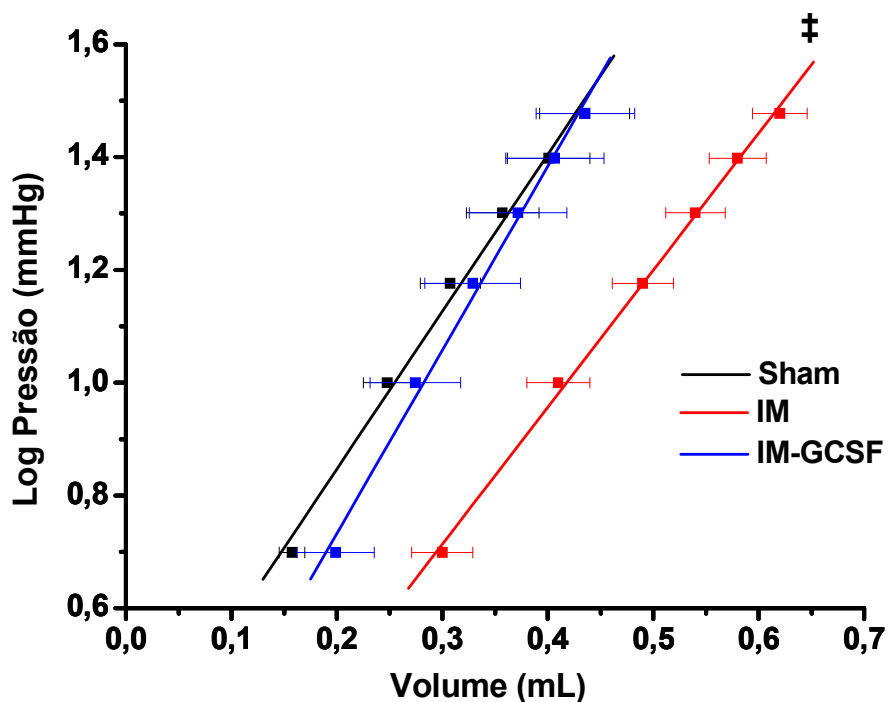


Figura 30. Relação pressão-volume utilizando escala logarítmica para a pressão entre 5 e 30 mmHg. Os valores estão apresentados como média \pm E.P.M. ‡ $p < 0,05$ vs IM-GCSF

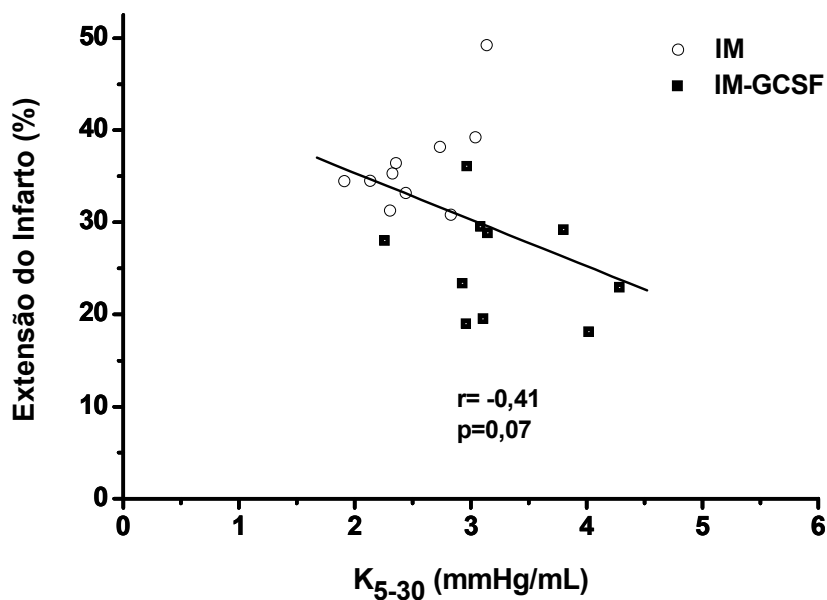


Figura 31. Análise de correlação entre a extensão do infarto medida aos 15 dias após a oclusão e a constante de rigidez da câmara ventricular (k). Os valores estão apresentados como média \pm E.P.M.

4.9. Análise da Mortalidade

Foram utilizados nos diversos protocolos um total de 176 animais, sendo 16 do grupo Sham, 87 no grupo IM e 73 no grupo IM-GCSF. A mortalidade total no grupo IM foi significativamente maior comparada ao grupo IM-GCSF (47% vs. 26%, $p < 0,05$). Nenhum animal morreu no grupo Sham.

A comparação das curvas de sobrevida mostrou que os animais do grupo IM-GCSF tem maior probabilidade de sobrevida após o infarto que o grupo IM (log rank, $p < 0,05$). Quando analisada ponto a ponto, a curva de Kaplan-Meier mostrou que a mortalidade foi reduzida significativamente nos trinta minutos iniciais à oclusão da artéria coronária no grupo IM-GCSF quando comparada ao grupo IM (11% vs. 27,6%; $p < 0,05$) (Figura 29). Levando em consideração somente os animais que morreram durante o período compreendido entre 90 minutos e nove horas após a cirurgia, não foi observada diferença significativa entre os grupos (16,9% no grupo IM-GCSF vs. 27% no grupo IM, $p > 0,05$). Pode-se observar que a maior diferença de mortalidade ocorre durante os trinta minutos iniciais após a oclusão da coronária, e que o grupo pré-tratado com G-CSF mostrou aumento da sobrevida quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento (Figura 32).

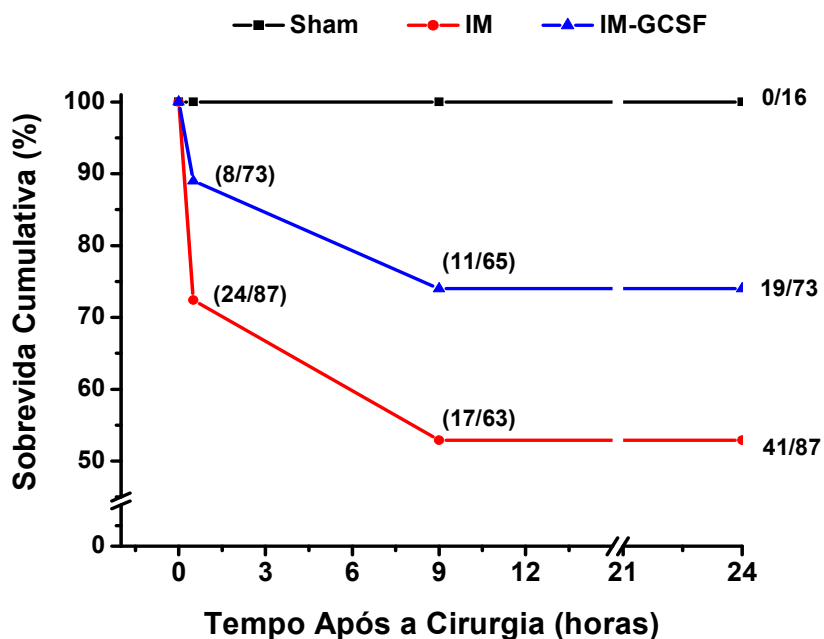


Figura 32. Análise da sobrevida após o infarto do miocárdio pelo método de Kaplan-Meier. Os valores apresentados na curva representam o número de animais mortos/número total de animais naquele ponto de análise.

4.10. Arritmias Ventriculares Após o Infarto do Miocárdio

A análise da atividade elétrica após a oclusão da artéria coronária mostrou que a frequência cardíaca não variou significativamente entre os grupos durante os 30 minutos que seguem a oclusão da artéria coronária (Figura 33).

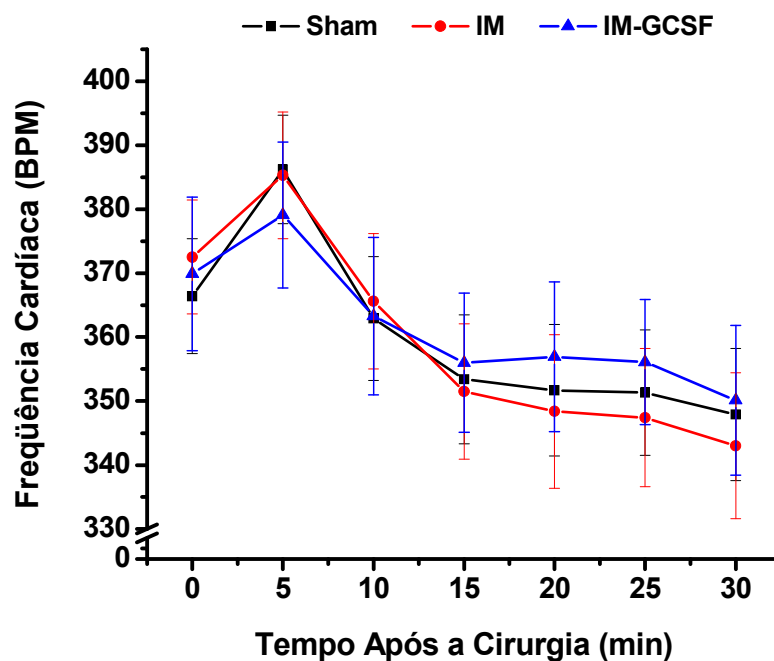


Figura 33. Variação da frequência cardíaca durante o tempo de análise das arritmias após o infarto do miocárdio nos grupos Sham (n=6), IM (n=12) e IM-GCSF (n=9). Valores representam a média±E.P.M.

A Tabela 5 apresenta os resultados relativos ao acompanhamento eletrocardiográfico após o infarto do miocárdio. Pode-se observar que o número de extrassístoles durante os trinta minutos de análise foi significativamente reduzido no grupo IM-GCSF (201 ± 47 vs. 678 ± 117 no grupo controle, $p < 0,05$). Além disso, tanto o número de TV (7 ± 2 no grupo IM-GCSF vs. 29 ± 6 no grupo IM, $p < 0,05$) quanto o tempo total dos eventos (13 ± 4 no grupo IM-GCSF vs. 43 ± 9 no grupo IM, $p < 0,05$) foram menores no grupo que recebeu o pré-tratamento com G-CSF. Nenhum tipo de arritmia foi detectado no grupo Sham.

Tabela 5. Atividade Elétrica Anormal nos Primeiros 30 Minutos Após o Infarto do Miocárdio

	Extrassístoles (eventos)	TV		FV
		Eventos	Duração (seg)	(% Incidência)
Sham	--	--	--	--
IM	678 ± 117	29 ± 6	43 ± 9	69
IM-GCSF	$201 \pm 47^*$	$7 \pm 2^*$	$13 \pm 4^*$	10*

Para as análises acima, foram utilizados somente os animais que sobreviveram aos 30 minutos após o infarto do miocárdio, exceto para a incidência de FV, que foram utilizados todos os animais, incluindo aqueles que morreram durante o experimento. IM (n=12) e IM-GCSF (n=9). TV, taquicardia ventricular; FV, fibrilação ventricular.

* $p < 0,05$ vs. IM

A Figura 34 apresenta a distribuição temporal das extrassístoles ventriculares após o infarto do miocárdio. Podemos observar que o maior número de extrassístoles no grupo IM acontece no período compreendido entre o terceiro e o décimo primeiro minutos após a oclusão. Já no grupo IM-GCSF, as arritmias se concentraram no intervalo entre o sexto e o nono minutos após o infarto.

A comparação entre a área sob a curva mostrou que o pré-tratamento com G-CSF é capaz de reduzir a incidência de extrassístoles durante os trinta minutos iniciais que seguem à oclusão da artéria coronária ($165,1 \pm 22,7$ u.a. vs. $543,4 \pm 47,6$ u.a. no grupo IM, $p < 0,05$) (Figura 35).

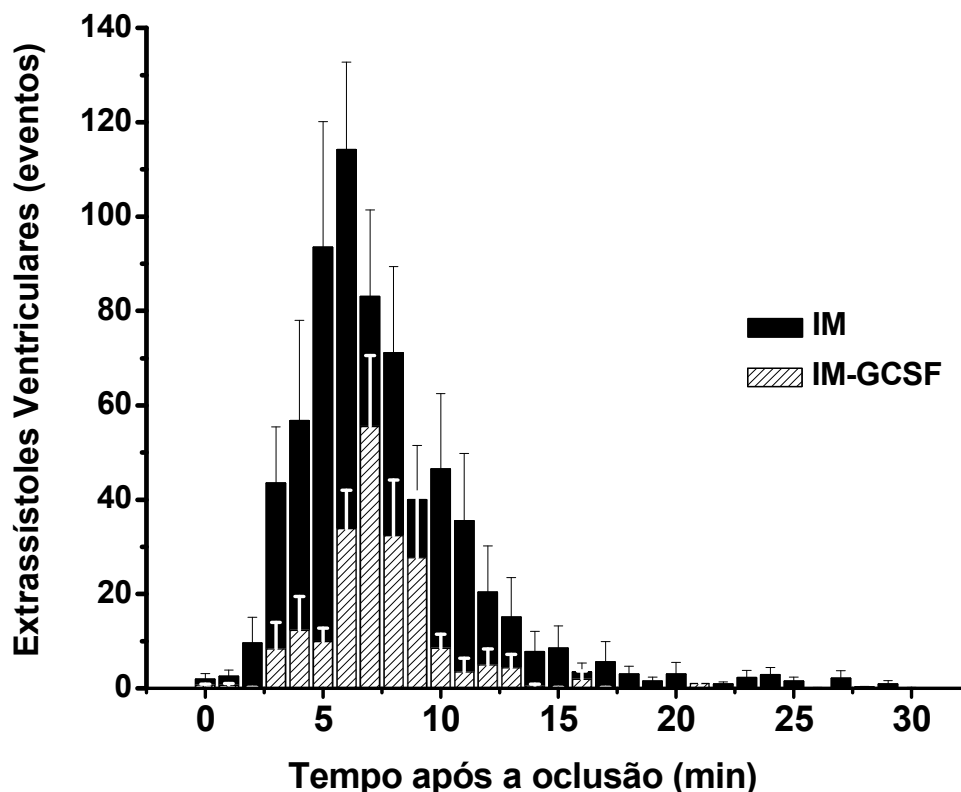


Figura 34. Análise temporal dos batimentos prematuros ventriculares após o infarto do miocárdio nos grupos IM (n=12) e IM-GCSF (n=9). Dados apresentados como média±E.P.M.

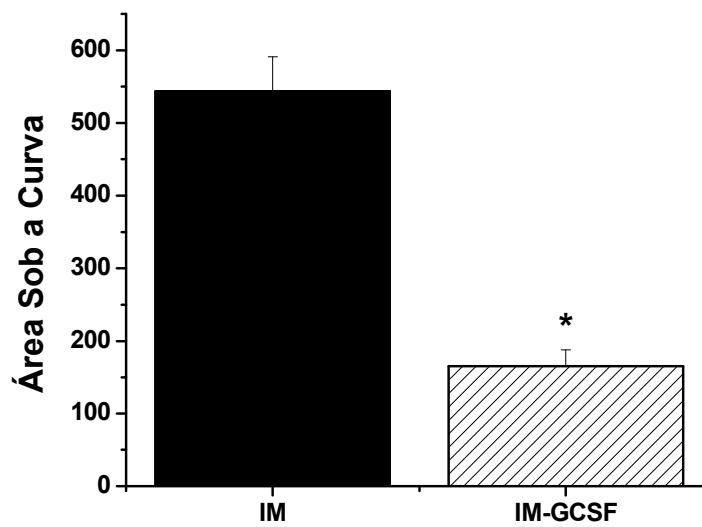


Figura 35. Área sob a curva da distribuição temporal das extrasístoles ventriculares após o infarto do miocárdio no grupo IM (n=12) e IM-GCSF (n=9). Valores representam a média±E.P.M.

* $p < 0,05$ vs. IM

Através da análise do escore de arritmia, que leva em consideração todos os animais utilizados, inclusive os que morreram durante os registros, observamos que o pré-tratamento com G-CSF foi efetivo em reduzir a intensidade da atividade arritmogênica após o infarto do miocárdio, conferindo escores significativamente menores quando comparados ao grupo IM ($2,1 \pm 0,5$ vs. $4,1 \pm 0,4$; $p < 0,05$) (Figura 36).

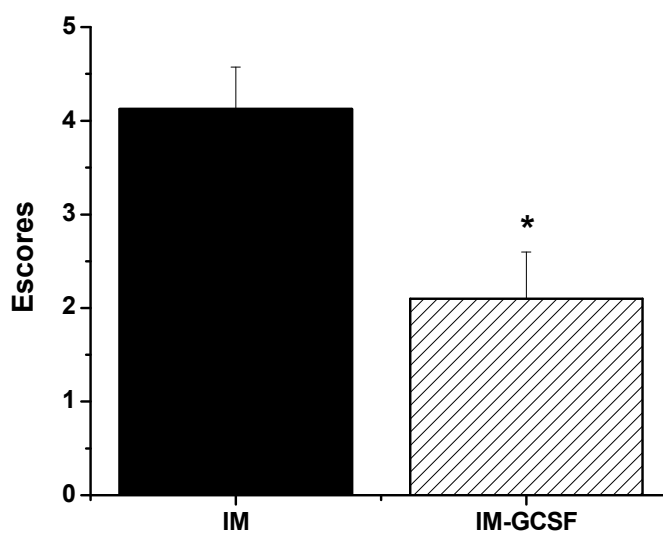


Figura 36. Análise das arritmias após o infarto do miocárdio pelo sistema de escores. IM (n=16) e IM-GCSF (n=10). Dados apresentados como média±E.P.M.
* $p < 0,05$ vs. IM

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos Básicos

As doenças cardiovasculares são um problema global de saúde, sendo responsáveis por aproximadamente um terço das mortes em todo o mundo. O IAM, o principal exemplo de doença cardiovascular, é reconhecidamente uma importante causa de morbi-mortalidade.

Um grande número de trabalhos tem sido realizado nas últimas décadas, com o intuito de melhorar o prognóstico de pacientes que sofreram um IAM. Vários modelos experimentais têm sido usados para ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do IAM e do remodelamento ventricular pós-infarto. Modelos de isquemia seguida por reperfusão tanto in vivo quanto in vitro e a oclusão mecânica de artérias coronárias em grandes animais têm ampliado o conhecimento sobre o desenvolvimento fisiopatológico dos eventos isquêmicos no coração. Além destes modelos experimentais citados acima, a oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda é o mais utilizado em estudos em animais, por ser de fácil reprodutibilidade e por reproduzir não só as alterações moleculares e celulares da fase aguda do infarto, mas também todas as disfunções estruturais e funcionais causadas pelo remodelamento cardíaco. Inicialmente, os experimentos de oclusão coronariana eram realizados em cães, por serem anatomicamente semelhantes aos seres humanos, mas os resultados eram inesperadamente diferentes em cada animal além da alta taxa de mortalidade, mesmo que a técnica utilizada fosse rigorosamente igual em todas as unidades experimentais.

Diante deste paradoxo, John's & Olson (1954) conduziram um estudo onde compararam os resultados da ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda em animais de pequeno porte. Eles observaram que a produção do infarto nestes roedores era seguida por uma reduzida taxa de mortalidade e menor variabilidade no infarto, comparado com outros modelos existentes. Outra importante característica deste modelo experimental em ratos foi mostrada por Clark et al. (1980), descrevendo um modelo válido para estudo das arritmias após o infarto do miocárdio.

Nas últimas duas décadas, inúmeros estudos utilizam este modelo de infarto para avaliar os efeitos de diversas drogas na terapêutica do infarto e da insuficiência cardíaca. Fármacos como os beta-bloqueadores foram utilizados tanto em pesquisa clínica e experimental, reduzindo os efeitos deletérios do remodelamento ventricular e mostrando benefícios hemodinâmicos após infarto (Sun et al., 2005; Yaoita et al., 2002; Mill et al., 1992; Doughty et al., 1997). Os inibidores da enzima conversora de angiotensina foram extensamente estudados neste modelo experimental de infarto em roedores, obtendo-se resultados positivos em relação à melhora da função cardíaca (Pfeffer et al., 1985a) e redução do infarto e da mortalidade (Pfeffer et al., 1985b), o que garante esta classe farmacológica como padrão na terapia do infarto. A escolha deste modelo de infarto em ratos para o nosso estudo está vinculada ao fato de que o mesmo é capaz de mimetizar eventos semelhantes aos encontrados em humanos, como as arritmias ventriculares letais e a perda celular predominantemente por apoptose na fase aguda.

Todos os estudos conduzidos neste modelo experimental foram de grande utilidade e efetividade na prevenção do remodelamento cardíaco pós-infarto, garantindo um melhor prognóstico aos pacientes infartados, o que pode ser evidenciado nos últimos anos com uma significativa redução do tempo de internação e de mortalidade por consequência das doenças cardiovasculares em geral (Rosamond et al., 1998; Fox et al., 2004), como também das síndromes coronarianas agudas (Spencer et al., 1999; Spencer et al., 2004; Fox et al., 2007). Embora as terapias intervencionistas e farmacológicas sejam bastante eficazes em reduzir os efeitos deletérios da isquemia no músculo cardíaco, o status de irreversibilidade da lesão não foi alterado, ou seja, o músculo perdido pela isquemia não será recuperado. Recentemente, muito tem sido pesquisado e novas formas de tratamento têm sido intensamente buscadas. A principal delas, a terapia celular, que se baseia nas propriedades das células-tronco objetivando a regeneração dos tecidos lesados. Na cardiologia em especial, esta nova alternativa de tratamento se mostra bastante promissora devido à pequena taxa de regeneração do tecido cardíaco.

A escolha pelo estudo dos efeitos do G-CSF no infarto do miocárdio se deve à grande controvérsia de resultados existentes na literatura, além de alguns aspectos relativos aos benefícios do G-CSF ainda estarem pouco esclarecidos principalmente na fase aguda do infarto. O esquema terapêutico utilizado (7, 3 e 1 dias antes do

IAM) está vinculado à informação provida por Li et al. (2006b), em que animais que receberam G-CSF apresentaram aumento na expressão do GCSFR. Assim, utilizamos uma aplicação inicial para uma possível sensibilização do miocárdio, de modo que o efeito das outras duas doses em intervalos menores e próximas ao infarto pudesse ser potencializado. A escolha da dose se baseou nos estudos disponíveis na literatura em que a dose varia enormemente, sendo que para o nosso estudo foi escolhida uma dose intermediária (Ohtsuka et al., 2004; Iwanaga et al., 2004; Sugano et al., 2005; Werneck-de-Castro et al., 2006; Kuwabara et al.; 2007).

5.2. Redução da Extensão do Infarto

Em 2001, Orlic et al. (2001a) mostraram que a injeção de células-tronco provenientes da medula óssea diretamente no músculo cardíaco de camundongos infartados foi capaz de regenerar o miocárdio perdido, resultando em melhora da função cardíaca. Em outro estudo publicado no mesmo ano, Jackson et al. (2001) mostraram que células-tronco hematopoiéticas eram capazes de regenerar estruturas cardíacas e vasculares após isquemia seguida por reperfusão em camundongos. Trabalhos posteriores, utilizando células-tronco hematopoiéticas em camundongos infartados, não confirmaram os achados iniciais em relação à regeneração cardíaca (Murry et al., 2004; Deten et al., 2005), nem a melhora hemodinâmica (Deten et al., 2005).

Com a intenção de encontrar alternativas terapêuticas regenerativas não-invasivas, o G-CSF começou a ser testado em animais de experimentação por suas propriedades sobre a granulopoiese e a mobilização de células precursoras. O G-CSF é uma citocina hematopoiética capaz de estimular a proliferação e a mobilização de granulócitos. Podemos confirmar estes dados com nossos resultados da contagem leucocitária, nos quais os animais pré-tratados com G-CSF apresentaram níveis significativamente elevados em comparação aos grupos que não receberam tratamento. Estes dados estão de acordo com a literatura existente sobre o assunto (Sugano et al., 2005; Werneck-de-Castro et al., 2006; Li et al., 2006a).

Além do efeito sobre a granulopoiese, o G-CSF é capaz de mobilizar outros tipos celulares provenientes da medula óssea, como as células progenitoras endoteliais e células-tronco hematopoiéticas. Com o intuito de aproveitar estas características do G-CSF, Orlic et al. (2001b) utilizaram uma associação de citocinas, o G-CSF e o SCF, em camundongos infartados e observaram regeneração cardíaca, com melhora da função cardíaca e redução da mortalidade pós-infarto. Vários outros estudos realizados posteriormente, mostraram benefícios do uso do G-CSF na prevenção do remodelamento. Um aspecto em comum em todos estes trabalhos é que a avaliação dos efeitos do G-CSF foi feita nas fases sub-crônica e crônica do infarto, sendo que os efeitos do G-CSF sobre a fase aguda ainda não haviam sido explorados. E uma pergunta deixada em aberto era se a redução da mortalidade e a melhora da função mecânica deviam-se a um efeito

precoce do G-CSF no infarto ou se seria decorrente da atenuação do remodelamento ventricular pós-infarto. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento do infarto em ratos com G-CSF foi capaz de reduzir significativamente o tamanho do infarto medido 24 horas após a oclusão da artéria coronária. Esse efeito do G-CSF foi observado utilizando dois métodos diferentes para avaliar a extensão da lesão isquêmica, baseada no método colorimétrico do TTC. Em estudo feito por Harada et al. (2005), o tratamento com G-CSF não foi efetivo em reduzir a extensão do infarto medida 3 dias após a ligadura, também pela técnica do TTC.

Estudos da literatura demonstram que após a oclusão da artéria coronária ocorre perda celular aguda, inicialmente causada por apoptose, posteriormente superada pela necrose 24 horas após a oclusão (Kajstura et al., 1996). Vários autores mostram que a apoptose tem participação fundamental na fase aguda do infarto do miocárdio (Kajstura et al., 1996; Kim et al., 2003; Gao et al., 2004), e contribuindo para a extensão da lesão e para a progressão da insuficiência cardíaca (Bialik et al., 1997; Prabhu et al., 2003). Em humanos, Abbate et al. (2002) demonstraram alta taxa de apoptose em corações de pacientes com oclusão persistente da artéria coronária. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com G-CSF aumentou a expressão protéica de Bcl-2 e Bcl-xL, sem alterar os níveis de expressão da Bax. Esses dados estão de acordo com os dados de Harada et al. (2005), que mostraram que o tratamento com G-CSF em camundongos infartados aumentou a expressão de Bcl-2 e Bcl-xL, por ativação da via da Jak2/Stat3. Apesar do aumento das proteínas anti-apoptóticas evidenciada por Harada et al. (2005), a redução na extensão do infarto na fase aguda não foi encontrada por este autor. Uma possível justificativa para a diferença em relação aos nossos achados pode ser que o tratamento feito por Harada et al. (2005) foi iniciado imediatamente após o infarto, e o aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas foi medido apenas 24 horas após o infarto. Em nosso experimento, os animais foram pré-tratados com G-CSF, e, portanto, já apresentavam aumento na expressão dessas proteínas no momento da oclusão coronariana, o que pôde ter sido mais eficaz na proteção contra os estímulos pró-apoptóticos precoces à oclusão. Além disso, uma outra possível explicação pode residir no número de animais utilizados para esta análise, tendo sido utilizado um número maior de animais no nosso trabalho, favorecendo o aparecimento de populações distintas, visto que as médias são bastante semelhantes entre os dois estudos.

A via Jak/Stat tem sido relatada na literatura por ser ativada por inúmeras citocinas, entre elas o G-CSF (Watanabe & Arai, 1996; Kisseleva et al., 2002; Harada et al., 2005). Esta via tem sido relacionada à citoproteção após eventos isquêmicos no coração. Segundo Negoro et al. (2000), a inibição farmacológica da Jak2 após o infarto do miocárdio leva à redução da ativação da Stat3, com conseqüente aumento da expressão da Bax e ativação da caspase 3. De acordo com Cheng et al. (1996), após o infarto do miocárdio em ratos, ocorre aumento na expressão de Bax, e redução da expressão de Bcl-2, o que poderia ser responsável por alterações estruturais no miocárdio. Após o infarto do miocárdio em coelhos, foi observado um aumento da apoptose em função do tempo, evidenciada por aumento da Bax na fração mitocondrial e citosólica, como aumento de citocromo C citosólico (Qin et al., 2005). Tem sido demonstrado na literatura que a relação entre Bcl-2/Bax determina a sobrevivência celular em relação a um estímulo apoptótico (Korsmeyer et al. 1993). Apenas três horas após a oclusão da artéria coronária, a relação Bcl-2/Bax é reduzida, conjuntamente ao aumento da atividade da caspase 3 (Simonis et al., 2007). Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com G-CSF aumenta a relação Bcl-2/Bax, favorecendo a viabilidade celular diante de estímulos apoptóticos.

Uma outra via intracelular que tem sido relacionada aos efeitos do G-CSF é a via fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K)/Akt. Esta é uma via que reconhecidamente promove a sobrevivência (Matsui & Rosenzweig, 2005; Wu et al., 2000) em miócitos submetidos à isquemia, sendo que o bloqueio farmacológico da PI3K inibe este efeito citoprotetor (Fujio Y et al., 2000). Ueda et al. (2006) mostraram que o tratamento com G-CSF ativa a via da PI3K/Akt em um modelo de isquemia seguida por reperfusão in vitro, melhorando a função cardíaca e reduzindo a extensão da lesão. Resultados semelhantes foram observados em cães submetidos à isquemia, em que a infusão endovenosa do G-CSF durante a reperfusão reduziu a extensão do infarto, sendo que a administração conjunta com um inibidor da PI3K aboliu o efeito protetor do G-CSF por redução da ativação da Akt (Takahama et al., 2006). A ativação da Akt foi evidenciada por Iwanaga et al. (2004) em ratos tratados com G-CSF, mostrando redução de células apoptóticas e menor extensão do infarto, avaliado sete dias após o infarto. O mesmo resultado sob a ativação da Akt foi observado por Hasegawa et al. (2006) em animais com infartos na fase crônica tratados com G-CSF. Em um modelo de isquemia seguida por reperfusão em ratos, Ravingerová et al. (2007) mostraram que a inibição da via intracelular da PI3K/Akt

bloqueia os efeitos benéficos do pré-condicionamento isquêmico. Os efeitos anti-apoptóticos do pré-condicionamento à hipóxia seguida pela reperfusão estão relacionados à ativação da Akt levando a fosforilação da Bad, com conseqüente redução da liberação mitocondrial de citocromo C e menor ativação da cascata das caspases (Uchiyama et al., 2004).

Cabe ressaltar que citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 induzem apoptose. O tratamento de animais infartados com G-CSF mostrou redução na expressão de TNF- α no coração (Li et al., 2006b). Além disso, foi relatado por Yoshioka et al. (2006) que camundongos submetidos a lesão vascular tratados com G-CSF apresentavam menores níveis plasmáticos de IL-6. Em um modelo de cardiopatia dilatada, o tratamento com G-CSF reduziu a expressão de Fas, que ativa a apoptose por ligação ao “death receptor” (Hou et al., 2006).

Um aspecto importante é que o procedimento cirúrgico para produção do infarto foi realizado por um pesquisador que não tinha conhecimento sobre os grupos experimentais, para evitar qualquer tipo de variação do procedimento. Além disso, cada gaiola continha animais de todos os grupos para que fossem mantidas as mesmas condições entre as unidades experimentais, e a seleção para a cirurgia era feita de forma aleatória entre os animais.

Diante dessas informações, podemos observar, com os dados disponíveis na literatura e com os dados gerados por este trabalho que o G-CSF possui efeito protetor contra estímulos apoptóticos por diferentes vias. Baseado nos dados da literatura sobre a participação da apoptose sobre a lesão aguda do infarto (Kajstura et al., 1996; Cheng et al., 1996) e em nossos dados sobre a ativação de vias anti-apoptóticas, podemos dizer que a redução da extensão da lesão observado por nós provavelmente seria decorrente de efeito anti-apoptótico tanto por ativação da via da Jak2/Stat3 quanto da PI3K/Akt, levando a expressão de fatores antiapoptóticos e reduzindo a lesão celular. A regeneração de cardiomiócitos, entretanto, não pode ser completamente descartada por nosso estudo, visto não avaliarmos a migração para o miocárdio das células mobilizadas, nem a possível diferenciação dessas células em cardiomiócitos. Entretanto, não encontramos correlação significativa entre o número de leucócitos mobilizados e o tamanho da lesão avaliada 24 horas após o infarto. Além disto, o aumento na expressão de fatores anti-apoptóticos nos animais pré-tratados com G-CSF antes da indução do infarto, sugere que a redução da

extensão do infarto precoce à oclusão decorreria de efeito pré-condicionante contra a apoptose, e não por efeito regenerativo.

Estudos anteriores já demonstraram que o G-CSF é capaz de reduzir o tamanho do infarto medido na fase crônica, isto é, após estar completados os processos de expansão do infarto e do remodelamento ventricular. Orlic et al. (2001b) mostraram que o pré-tratamento com G-CSF associado ao SCF em camundongos reduz a extensão do infarto avaliada quatro semanas após o infarto. Nesse trabalho foi evidenciado um aumento na proliferação de miócitos, células endoteliais e do músculo liso. O efeito do G-CSF na redução da extensão do infarto foi questionado por Deten et al. (2005) quando, utilizando protocolos semelhantes aos usados no trabalho de Orlic et al. (2001b), não observaram efeitos sobre diferenciação e proliferação celular, nem mesmo melhora hemodinâmica nos camundongos que receberam o tratamento com as citocinas. Nossos resultados mostram que animais pré-tratados com G-CSF apresentam menor área de infarto comparado ao grupo não tratado, 15 dias após o infarto. Esses resultados podem ser explicados pelos efeitos agudos do G-CSF, pois observamos redução do tamanho do infarto com apenas 24 horas da ligadura.

Outro aspecto a ser considerado nesta análise é a quantidade de leucócitos mobilizados no momento do infarto. Foi demonstrado por Minatoguchi et al. (2004) que o tratamento com G-CSF em coelhos submetidos a um modelo de isquemia seguida por reperfusão acelerou a absorção do tecido necrosado por aumentar o número de macrófagos e neutrófilos infiltrados na área isquêmica, acelerando o processo de reparo tecidual. A infusão de macrófagos ativados imediatamente à oclusão da artéria coronária em ratos melhora da função cardíaca e reduz os efeitos do remodelamento (Leor et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que a redução da infiltração de macrófagos no tecido cardíaco lesado dificulta o processo de reparo tecidual, reduz a espessura da parede lesada e aumenta a mortalidade (van Amerongen et al., 2007). Similarmente, a inativação farmacológica de macrófagos reduz os níveis teciduais de TNF- α sem alterar a função cardíaca, mas aumenta a mortalidade após o infarto em ratos (Kherani et al., 2004). Fraccarollo et al. (2008) observaram que parte dos benefícios atribuídos ao uso de eplerenona na fase aguda do infarto em ratos está relacionada à maior infiltração de macrófagos na área isquêmica, favorecendo o reparo cardíaco, levando à menor dilatação ventricular e maior espessura da parede infartada. No momento do infarto do

miocárdio, os animais pré-tratados com G-CSF apresentavam maior número de leucócitos circulantes. Já está bem descrito na literatura que o G-CSF aumenta as células da linhagem mielóide de forma geral, sendo mais pronunciado o aumento de neutrófilos e monócitos (Minatoguchi et al., 2004; Lim et al., 2007; Takano et al., 2007). Diante dessas informações, parte dos efeitos do G-CSF encontrados 15 dias após o infarto pode estar vinculado à modulação da atividade inflamatória. A confirmação desta hipótese, entretanto, é difícil em nosso trabalho pois não fizemos a marcação diferencial das células no tecido isquêmico.

O tratamento com G-CSF em ratos infartados aumentou a expressão de colágeno tipo I e III na área de cicatriz, acelerando o reparo cardíaco e levando a redução da expansão do ventrículo (Sugano et al., 2005). O uso associado de G-CSF e M-CSF mostrou resultados semelhantes em relação ao colágeno tipo I na área de borda do infarto (Miki et al., 2004). Um aspecto em comum aos dois trabalhos anteriormente citados (Sugano et al., 2005; Miki et al., 2004) foi o aumento da expressão de TGF- β , uma citocina pró-fibrótica, sendo relacionada a ela o aumento da deposição de colágeno. Em contrapartida, Minatoguchi et al. (2004) observaram aumento da expressão de metaloproteinases, junto à redução no conteúdo de colágeno em coelhos infartados e tratados com G-CSF. Resultados semelhantes foram observados em porcos submetidos à isquemia seguida por reperfusão, observando menor expressão de colágeno tipo III na região peri-infarto (Sato et al., 2007). Este efeito sobre matriz extracelular ainda não está bem esclarecido diante do tratamento com G-CSF, sendo bastante controverso e variando muito em relação ao modelo utilizado.

Tem sido demonstrado que o G-CSF é capaz de aumentar a neoangiogênese em animais infartados. Foi relatado que o tratamento com G-CSF aumenta a expressão de VEGF (Iwanaga et al., 2004), levando à formação de novos vasos na área de borda ao infarto em porcos (Iwanaga et al., 2004; Sato et al., 2007). De forma similar, Deindl et al. (2006) mostraram aumento da arteriogênese na região peri-infartada, 28 dias após o infarto em camundongos. Ohtsuka et al. (2004) que observaram aumento no número de capilares, além da redução de células em apoptose na área de borda do infarto, evidenciando que o efeito do G-CSF sobre a formação de novos vasos e proteção contra a injúria nos vasos existentes responderiam pela redução da área infartada e conseqüente melhora da função cardíaca em camundongos infartados.

É importante ressaltar que a extensão do infarto medida pela área mostrou diferença entre os grupos com 24 horas e 15 dias, o que não ocorreu quando a avaliação foi feita pelo peso da cicatriz sendo observada diferença somente na medida feita após 24 horas após o infarto. Foi observado por Li et al. (2006b) que os animais tratados com G-CSF apresentavam maior espessura da parede infartada, mas sem indícios de regeneração de miócitos. Outra evidência foi relatada por Minatoguchi et al. (2004) mostrando que 14 dias após o infarto, que a espessura da parede anterior em relação a parede posterior era significativamente maior nos animais que receberam tratamento com G-CSF. Em porcos submetidos à isquemia seguida por reperfusão, o tratamento com G-CSF mostrou grande tendência ao aumento da espessura da parede infartada (Sato et al., 2007). Em nosso trabalho, observamos que, apesar de menor área da cicatriz, os animais pré-tratados com GCSF apresentavam peso da cicatriz semelhante ao grupo infartado que não recebeu tratamento, sugerindo a presença de cicatriz mais espessa. Uma possível explicação para este fato pode estar em uma possível aceleração maior deposição de colágeno na região infartada como parte do processo de reparo, incrementando o peso da área cicatricial.

Baseados nos dados apresentados acima, concluímos que a redução do tamanho do infarto após a oclusão coronariana observada nos animais pré-tratados com G-CSF se deve a um possível efeito anti-apoptótico que ocorreria na fase aguda, e que, a modulação da atividade inflamatória no tecido isquêmico pode ser responsável por acelerar o reparo cardíaco, impedindo a expansão do infarto.

5.3. Preservação da Função Ventricular

A perda de tecido cardíaco causada pelo infarto do miocárdio leva a um comprometimento da função sistólica e diastólica, sendo que neste modelo, a sobrevida é inversamente proporcional à extensão da lesão (Pfeffer et al., 1979; Pfeffer et al., 1985a). Os resultados do cateterismo ventricular em nosso trabalho mostraram que os ratos pré-tratados com G-CSF apresentam função cardíaca mais preservada 15 dias após o infarto, em relação aos animais não tratados. Além disso, nos animais pré-tratados a contratilidade miocárdica avaliada pela $dP/dt+$ se mostrou mais preservada, da mesma forma que o relaxamento, avaliado pela $dP/dt-$. Uma justificativa para a preservação da função hemodinâmica nos animais pré-tratados é que estes apresentam redução do tamanho da lesão.

Já foi descrito anteriormente neste trabalho os efeitos do G-CSF sobre a formação de novos vasos. Tanto a redução da apoptose em células vasculares (Ohtsuka et al., 2004) quanto o aumento na expressão de VEGF e conseqüente formação de novos vasos (Iwanaga et al., 2004; Ohki et al., 2005) estão relacionadas à melhora hemodinâmica em animais infartados. Este aumento relatado de formação de novos vasos, principalmente na região de borda ao infarto pode contribuir para a melhora da função cardíaca por aumentar o suprimento de oxigênio e nutrientes nessa área, impedindo a expansão da lesão.

Outro mecanismo bastante descrito na literatura, e já relatado anteriormente neste trabalho é o aumento na ativação da Akt pelo G-CSF. Sabe-se que o incremento na atividade cardíaca da Akt através da transfecção viral em ratos levou a melhora contrátil após a crioinjúria (Matsui et al., 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Condorelli et al. (2002) mostrando melhora na $dP/dt+$ em animais com superexpressão cardíaca da Akt. Morisco et al. (2000) mostraram que a hipertrofia cardíaca causada por ativação beta-adrenérgica é mediada pela Akt. Utilizando camundongos com infarto cicatrizado, Li et al. (2006b) mostraram aumento da ativação da Akt, junto à ligeira hipertrofia cardíaca em animais tratados com G-CSF e os autores justificam a melhora hemodinâmica como sendo mediada por essa hipertrofia. Outros estudos mostrando preservação da função cardíaca em animais tratados com G-CSF mostraram aumento da ativação da Akt (Iwanaga et al., 2004; Hasegawa et al., 2006)

Sesti et al. (2005) mostraram que o tratamento com G-CSF/SCF não foi capaz de regenerar o miocárdio, mas mostrou melhora da função cardíaca sobre estresse hemodinâmico. Em contrapartida, Deten et al. (2005) não observaram nenhum efeito hemodinâmico após o infarto em camundongos pré-tratados com G-CSF. Corroborando com esses resultados, ratos tratados com altas doses de G-CSF após o infarto não apresentaram melhora funcional avaliada pelo consumo máximo de O₂ em exercício físico realizado em esteira (Werneck-de-Castro et al., 2006).

A função diastólica depende de basicamente do relaxamento e das propriedades passivas da parede ventricular. As propriedades passivas dependem da rigidez miocárdica, da espessura da parede e da geometria da câmara (Leite-Moreira, 2006). No caso do infarto do miocárdio, a menor distendibilidade ventricular sob altas pressões está associada a efeitos adversos, e esse evento está intimamente relacionado a alterações na matriz extracelular na área da cicatriz (Jugdutt et al., 2007). A complacência ventricular esquerda foi estudada em ratos infartados por Fletcher et al. (1981), mostrando que a infusão de volume simultaneamente ao registro da pressão intraventricular é um bom indício da rigidez da câmara ventricular, e uma ferramenta útil para estudo da função diastólica. Neste estudo foi demonstrado que a menor inclinação da reta em sua fase inicial era inversamente proporcional ao tamanho do infarto (Fletcher et al., 1981). Essa dilatação ventricular pode ser conseqüência da expansão ventricular após o infarto. A perda aguda de miócitos juntamente ao rearranjo estrutural dos grupos de miócitos leva ao afinamento da parede do coração e o aumento do volume ventricular. A degradação dos componentes da matriz extracelular também contribui para este evento precoce à oclusão. Sabe-se que a transfecção do gene da elastina após o infarto reduz a expansão do infarto preservando a função cardíaca (Mizuno et al., 2005). Da mesma forma, níveis elevados de colágeno estão associados ao reparo cardíaco e à menor expansão do infarto (Whittaker et al., 1991; Fang et al., 2008). Foi demonstrado recentemente que a redução do conteúdo de colágeno na área do infarto está relacionada a maiores efeitos do remodelamento, com maior distendibilidade do ventrículo esquerdo, aumentando a probabilidade de ruptura (Jugdutt et al., 2007). Em nosso experimento, a curva P-V mostrou na fase inicial que o grupo infartado indica grande dilatação ventricular mostrada por aumento do volume sob 5 mmHg de pressão, como descrito por outros autores (Fletcher et al., 1981; Pfeffer et al., 1985a). No grupo pré-tratado com G-CSF ocorreu maior redução

da dilatação ventricular, pois os valores foram similares ao grupo sem infarto. Isto pode estar relacionado ao fato de que este grupo apresenta menor área de infarto, já a partir do primeiro dia. Corroborando com isso, observamos forte correlação negativa entre a extensão do infarto e a constante de rigidez, mostrando que na parte inicial da curva, a redução do tamanho do infarto seria o principal determinante do aumento da constante de rigidez, ou seja, menor dilatação ventricular esquerda. Foi descrito por Hochman et al. (1987) que a extensão do infarto é um importante determinante da expansão ventricular. Além disso, como descrito por Sugano et al. (2005), a expressão aumentada de colágeno e a aceleração do reparo nos animais tratados com G-CSF reduziram a expansão do infarto, contribuindo para a melhora hemodinâmica sem alterar a extensão do infarto. Foi demonstrado por Miki et al. (2004) que o tratamento com G-CSF/M-CSF melhora a função cardíaca por acelerar o reparo na área de borda ao infarto, reduzindo a expansão do infarto. Essa possível deposição de colágeno pode explicar a resposta encontrada nos animais pré-tratados com G-CSF em relação à infusão de volume, em que apresentaram maior rigidez na porção inicial da curva P-V do VE. Sabendo que o infarto foi menor quando avaliado pela área, mas não pelo peso da cicatriz, pode ser um bom indício de que o aumento da deposição de colágeno na cicatriz seja responsável por esse aumento da rigidez ventricular e menor dilatação. Outro aspecto relevante que deve ser ressaltado é que esse possível aumento na deposição de colágeno na área de cicatriz não atinge o miocárdio viável, como descrito por alguns autores (Miki et al., 2004; Sugano et al., 2005), ou pelo menos não interfere nos parâmetros funcionais de contratilidade ($dP/dt+$) e relaxamento ($dP/dt-$).

Diante dessas informações, podemos dizer que a preservação da função hemodinâmica se deve a uma série de fatores, mas principalmente pela redução da extensão do infarto na fase aguda. Essa redução garantiu menor dilatação da câmara ventricular com menor pressão de enchimento, além de preservação da função contrátil.

5.4. Redução da Mortalidade

Ao longo dos anos, os grandes estudos científicos apresentam novas estratégias para o tratamento das complicações hemodinâmicas após o infarto do miocárdio visando redução da mortalidade. Aproximadamente 80% das mortes súbitas após evento isquêmico no coração são causadas por arritmias, sendo que as taquiarritmias contribuem com 82% desse total (Siddiqui & Kowey, 2006).

Foi demonstrado por Orlic et al. (2001b) que o pré-tratamento com a associação de G-CSF/SCF reduz a mortalidade após o infarto. Resultados semelhantes foram observados posteriormente com o uso do G-CSF antes ou após o infarto (Ohtsuka et al., 2004; Deindl et al., 2006). É importante ressaltar que estes estudos citados acima excluem a mortalidade precoce ao infarto, e justificam o aumento na sobrevivência pelos efeitos hemodinâmicos benéficos causados pelo tratamento com G-CSF. Em nosso trabalho, observamos que a mortalidade aconteceu exclusivamente dentro das primeiras nove horas após o infarto. Estes resultados estão de acordo com Hu et al. (2004), demonstrando alta taxa de mortalidade na fase inicial à oclusão da artéria coronária. Opitz et al. (1995) identificaram dois períodos de atividade arritmogênica aumentada precoce ao infarto em ratos, sendo o primeiro contemplando os trinta minutos iniciais à oclusão, e o segundo incluindo o período entre noventa minutos e nove horas após à oclusão, e estes períodos coincidiram com o aumento na mortalidade. Diante desta informação, a análise temporal da mortalidade dentro das 24 horas iniciais ao infarto mostrou que os trinta minutos iniciais respondem pela maior parte da diferença na mortalidade entre os grupos. Clark et al. (1980) mostraram que após a oclusão da artéria coronária em ratos ocorreu distúrbios elétricos, culminando com o aparecimento de taquiarritmias dentro das primeiras quatro horas posterior à oclusão. Outros estudos demonstram que as taquiarritmias ventriculares são a principal causa de morte precocemente ao infarto do miocárdio tanto em humanos (Siddiqui & Kowey, 2006) quanto em animais (Leenen & Yuan, 2001). Foi descrito que a mortalidade nas primeiras 24 horas após o infarto em ratos ocorre por arritmias, sendo que nos 30 minutos iniciais, as mortes aconteceram exclusivamente por taquiarritmias (Kolletis et al., 2007). Baseado nestes dados, nós fizemos uma análise da atividade arritmica durante os primeiros 30 minutos que seguem a oclusão da artéria coronária.

A análise de arritmias após o infarto do miocárdio feita em nosso estudo mostrou que o pré-tratamento com G-CSF foi capaz de reduzir tanto o número de eventos quanto a duração das taquicardias ventriculares, além de praticamente abolir os eventos de fibrilação ventricular, mostrando que a atividade antiarrítmica exercida pelo G-CSF foi responsável pela redução da mortalidade precocemente ao infarto do miocárdio. Em estudo realizado em camundongos infartados, foi observado que o tratamento com G-CSF/SCF reduziu as taquicardias induzidas cinco semanas após a oclusão da artéria coronária (Kuhlmann et al., 2006). Em outro estudo recentemente publicado, foi demonstrado que o pré-tratamento com G-CSF feito em ratos foi capaz de reduzir a duração das taquicardias ventriculares após o infarto, além de extinguir o aparecimento de fibrilação ventricular (Kuwabara et al., 2007). Nossos dados estão de acordo com os dois trabalhos citados anteriormente, onde o número de eventos e o tempo de duração das taquicardias ventriculares foram significativamente reduzidos no grupo que recebeu o pré-tratamento com G-CSF juntamente com a redução na incidência de FV.

A expressão protéica de conexina 43 em nosso trabalho foi significativamente maior nos animais pré-tratados com G-CSF comparados aos animais que não receberam tratamento. Os distúrbios elétricos precoces à injúria isquêmica levam a retardo na condução e desenvolvem substrato para o desenvolvimento de atividade ectópica na zona de borda do infarto, predispondo ao aparecimento das taquiarritmias ventriculares letais (Kleber et al., 1987; Williams et al., 1974). De acordo com estudos disponíveis na literatura, o desacoplamento elétrico entre miócitos predispõe ao aparecimento de taquiarritmias. Utilizando camundongos com redução progressiva da expressão de Cx43, Danik et al. (2004) observaram que o aumento da suscetibilidade à arritmias ventriculares está vinculada a redução da expressão de Cx43. Em outro estudo, foi observado que em camundongos com baixa expressão de Cx43 (aproximadamente 50% em relação ao normal), a redução do acoplamento elétrico nestes animais está associada com aumento da incidência e duração das taquiarritmias ventriculares após a oclusão da artéria coronária (Lerner et al., 2000). Um estudo utilizando camundongos com restrição cardíaca à expressão de Cx43 apresentavam função e estrutura cardíacas preservadas, mas apresentavam morte súbita aos dois meses de idade por taquiarritmias cardíacas letais, mostrando a participação essencial das Cx43 na suscetibilidade à arritmias (Gutstein et al., 2001). Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios

onde o pré-tratamento com G-CSF aumentou a expressão de Cx43 em ratos, levando à redução na incidência de taquiarritmias ventriculares na fase aguda (Kuwabara et al., 2007). A expressão de Cx43 também foi aumentada em camundongos que receberam a associação de G-CSF e SCF após o infarto, culminando com redução de arritmias ventriculares induzidas (Kuhlmann et al., 2006).

Foi observado que em camundongos com deleção cardíaca do gene para caderina apresentam retardo da condução elétrica ventricular, apresentando morte súbita dentro de 6 a 8 semanas após a deleção, coincidindo com o período de início da atividade arritmogênica nestes animais. O mecanismo proposto para estes eventos é a diminuição da expressão das Cx43 e Cx40, contribuindo para diminuição da funcionalidade das junções do tipo Gap (Li et al., 2005). Kuwabara et al. (2007) observaram que o pré-tratamento com G-CSF em ratos, reduz as arritmias por estabilizar as junções do tipo Gap, preservando a condução elétrica. Esse efeito é alcançado pelo aumento na expressão de proteínas essenciais para o funcionamento destas junções, como Cx43, caderina e catenina.

Sabendo que a última aplicação do G-CSF foi realizada 24 horas antes da oclusão, e que, baseado em Tanaka & Tokiwa (1990) que demonstraram que os níveis plasmáticos de G-CSF voltam a valores residuais antes de 24 horas após a aplicação subcutânea da droga, é muito pouco provável que este efeito do pré-tratamento com G-CSF se deve a um efeito antiarrítmico direto, por ação em canais iônicos, mas provavelmente, o aumento da expressão de Cx43 em ratos pré-tratados contribui para impedir distúrbios de condução gerados pela isquemia, levando a uma importante redução da atividade elétrica anormal. Essa redução das arritmias letais no grupo pré-tratado com G-CSF foi a responsável por reduzir a mortalidade na fase inicial do infarto.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Diante de todas as informações geradas neste estudo e confrontando com os estudos disponíveis na literatura, podemos concluir que o pré-tratamento com G-CSF:

- Reduziu a mortalidade precoce à oclusão coronariana, provavelmente por reduzir as arritmias ventriculares nesta fase aguda;
- Reduziu o tamanho da lesão isquêmica, provavelmente por um efeito protetor contra apoptose na fase inicial ao infarto, visto o aumento da expressão de fatores anti-apoptóticos;
- Preservou a função ventricular esquerda, por redução do tamanho do infarto e um possível efeito sobre o processo de reparo cardíaco, levando a menor dilatação do ventrículo esquerdo.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Abbate A, Bussani R, Zoccai GGLB, Rossiello R, Silvestri F, Baldi F, Biasucci LM, Baldi A. Persistent infarct-related artery occlusion is associated with an increase in myocardial apoptosis at postmortem examination in humans late after an acute myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: 1051-1054.

Al-Khatib SM, Stebbins AL, Califf RM, Lee KL, Granger CB, White HD, *et al.* Sustained ventricular arrhythmias and mortality among patients with acute myocardial infarction: results from the GUSTO-III trial. *Am Heart J* 2003; 145: 515-521.

American Heart Association. *Heart Disease and Stroke Statistics – 2007 Update*. Dallas, TX: American Heart Association; 2007.

Amione GT. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005; 95: 3C-8C.

Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Afzal HY, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 2008; 29: 932-940.

Avalos BR. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 1996; 88: 761-777.

Baczkó I, Leprán I, Papp JG. Influence of anesthetics on the incidence of reperfusion-induced arrhythmias and sudden death in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29: 196-201.

Barrie HJ, Urback PG. The cellular changes in myocardial infarction. *Can Med Assoc J* 1957; 77: 100-106.

Basu S, Jodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002; 100: 854-861.

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997; 100: 1363-1372.

Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation* 1993; 88: 2872-2883.

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998; 97: 1382-1391.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus: informações de saúde. Disponível em: www.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm. Acesso em: 14 Jun. 2007.

Braunwald E. Evolution of the management of acute myocardial infarction: a 20th century saga. *Lancet* 1998; 352: 1771-1774.

CAPRICORN INVESTIGATORS. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomized trial. *Lancet* 2001; 357: 1385-1390.

Cheng EHYA, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. Bcl-2, Bcl-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8: 705-711.

Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 1996; 226: 316-327.

Clark C, Foreman MI, Kane KA, McDonald FM, Parratt JR. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *J Pharmacol Meth* 1980; 3: 357-368.

Cleutjens JPM, Verluyten MJA, Smits JFM, Daemen MJAP. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147 (2): 325-338.

Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico MVG, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM, Ross J. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99: 12333-12338.

Crow MT, Mani K, Nam YI, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; 95: 957-970.

Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 1976; 58: 705-715.

Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk J, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res* 2004; 95: 1035-1041.

Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Huang Y, Stein AB, Hunt G, Tiwari S, Varma J, Gu Y, Prabhu SD, Kajstura J, Anversa P, Ildstad ST, Bolli R. Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function. *Circ Res* 2006; 98: 1098-1105.

Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hofer IE, Mueller-Hoecker J, Franz WM. G-CSF administration after myocardial infarction in mice

attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J* 2006; 20: 27-36.

Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G, Zimmer HG. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 52-63.

Dignan MB, Hall MB, Hastings DW. Effect of increased access to health care on mortality from cardiovascular disease in rural Tennessee. *Public Health Rep* 1979; 94: 186-192.

Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, Macmahon S, Sharpe N. Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *J Am Col Cardiol* 1997; 29(5): 1060-1066.

Eaton LW, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: it's relationship to infarct morphology in a canine model. *Circ Res* 1981; 49: 80-88.

Engelmann MG, Theiss HD, Theiss CH, Huber A, Wintersperger BJ, Ruedinger AEW, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization. Final results from the G-CSF-STEMI (granulocyte colony-stimulating factor ST-segment elevation myocardial infarction) trial. *J Am Col Cardiol* 2006, 48: 1712-1721.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 22-32.

Fang L, Gao XM, Samuel CS, Su Y, Lim YL, Dart AM, Du XJ. Higher levels of collagen and facilitated healing protect against ventricular rupture following myocardial infarction. *Clin Sci* 2008 (in press).

Fibbe WE, Van Damme J, Billiau A, Duinkeerken N, Lurvink E, Ralph P, Altröck BW, Kaushansky K, Willemze R, Falkenburg JH. Human fibroblasts produce granulocyte-

CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulating by interleukin-1 and poly(rl).poly(rC). *Blood* 1988; 72: 860-866.

Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001; 292: 624-626.

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389.

Fischer U, Osthoff KS. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 187-215.

Fishbein MC, Maclean MB, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978; 90: 57-70.

Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res* 1981; 49: 618-626.

Fonarow GC, Lukas MA, Robertson M, Colucci WS, Dargie HJ. Effects of carvedilol early after myocardial infarction: Analysis of the first 30 days of carvedilol post-infarct survival control in left ventricular dysfunction (CAPRICORN). *Am Heart J* 2007; 154: 637-644.

Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 110: 522-527.

Fox KAA, Steg PG, Eagle KA, Goodman SG, Anderson FA, Granger CB, Flather MD, Budaj A, Quill A, Gore JM. Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999 – 2006. *JAMA* 2007; 297: 1892-1900.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, Kneitz S, van Rooijen N, Ertl G, Bauersachs J. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarction healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 2008; 51: 905-914.

Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000; 101: 660-667.

Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant* 2004; 13: 741-748.

Fukahara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in acute infarction model. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 67-72.

Gao F, Tao L, Yan W, Liu HR, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Early anti-apoptosis treatment reduces myocardial infarct size after a prolonged reperfusion. *Apoptosis* 2004; 9: 553-559.

Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C, Ertl G. Functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 33-40.

Gutstein DE, Danik SB, Lewitton S, France D, Liu F, Chen FL, Zhang J, Ghodsi N, Morley GE, Fishman GI. Focal gap junction uncoupling and spontaneous ventricular ectopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 1091-1098.

Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 2001; 88: 333-339.

Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Yamashiro S, Sueda T, Yagihara T, Kitamura S. Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances proliferation of human troponin I-positive cells derived from dilated cardiomyopathy through specific receptors. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1430-1437.

Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Takihara KY, Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; 11: 305-311.

Hasegawa H, Takano H, Iwanaga K, Ohtsuka M, Qin Y, Niitsuma Y, Ueda K, Toyoda T, Tadokoro H, Komuro I. Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 842-849.

Hellermann JP, Jacobsen SJ, Redfield MM, Reeder GS, Weston SA, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: clinical presentation and survival. *Eur J Heart Fail* 2005; 7 (1): 119-125.

Henkel DM, Witt BJ, Gersh BJ, Jacobsen SJ, Weston SA, Meverden RA, *et al.* Ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction: a 20-year community study. *Am Heart J* 2006; 151: 806-812.

Herrick JB. Clinical features of sudden obstruction of coronary arteries. *JAMA*. 1912; 59: 2015-2020.

Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995; 146: 419-428.

Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Eng J Med* 2003; 384: 593-600.

Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation* 1987; 75 (1): 299-306.

Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki KI, Martin H, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2238-2243.

Hou XW, Son J, Wang Y, Ru YX, Lian Q, Majiti W, Amazouzi A, Zhou YL, Wang PX, Han ZC. Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 85-91.

Hu K, Naumann A, Fraccarollo D, Gaudron P, Kaden JJ, Neubauer S, Ertl G. Heart rate reduction by zatebradine reduces infarct size and mortality but promotes remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 1281-1288.

Hyman AS. Sudden heart failure as a public health menace. *Am J Public Health* 1929; 19: 1103-1110.

Ieishi K, Nomura M, Kawano T, Fujimoto S, Ikefuji H, Noda Y, Nishikado A, Ito S. The effect of G-CSF in an ischemia reperfusion model rat. *J Med Invest* 2007; 54: 177-183.

Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction. Final 1-year results of the front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) trial. *Circulation* 2005; 112(Suppl I): 73-80.

Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, Odaka K, Hiroshima K, Tadokoro H, Komuro I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute

myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1353-1359.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.

Janse MJ, van Capelle FJ, Morsink H, Kleber AG, Wilms-Schopman F, Cardinal R, d'Almoncourt CN, Durrer D. Flow of "injury" current and patterns of excitation during early ventricular arrhythmias in acute regional myocardial ischemia in isolated porcine and canine hearts. Evidence for two different arrhythmogenic mechanisms. *Circ Res* 1980; 47: 151-165.

Janse MJ, Cinca J, Morena H, Fiolet JW, Kleber AG, de Vries GP, Becker AE, Durrer D. The "border zone" in myocardial ischemia. An electrophysiological, metabolic, and histochemical correlation in the pig heart. *Circ Res* 1979; 44: 576-588.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954; 140 (5): 675-682.

Jugdutt BI, Idikio H. Therapeutic drugs during healing after myocardial infarction modify infarct collagens and ventricular distendibility at elevated pressures. *Mol Cell Biochem* 2007; 304: 79-91.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.

Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Lee DS, Sohn Dw, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-756.

Kaushansky K, Lin N, Adamson JW. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte –macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest* 1988; 81: 92-97.

Kherani AR, Moss GW, Gu A, Zhang G, Schulman AR, Fal JM, Sorabella R, Plasse T, Rui L, Homma S, Burkhoff D, Oz MC, Wang J. Macrophage inhibitor, semapimod, reduces tumor necrosis factor-alpha in myocardium in a rat model of ischemic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 665-671.

Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 619-624.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the Jak/Stat pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24.

Kleber AG, Riegger CB, Janse MJ. Electrical uncoupling and increase of extracellular resistance after induction of ischemia in isolated, arterially perfused rabbit papillary muscle. *Circ Res* 1987; 61: 271-279.

Kolettis TM, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Vlahos AP, Mourouzis I, Fotopoulos A, Pantos C. Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. *Europace* 2007; 9: 1099-1104.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 327-332.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99-163.

Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, Hasib L, Stypmann J, Fabritz L, Stelljes M, Tian W, Zwiener M, Mueller M, Kienast J, Breithardt G, Nikol S. G-CSF/SCF reduces

inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med* 2006; 203: 87-97.

Kuwabara M, Kakinuma Y, Katare RG, Ando M, Yamasaki F, Doi Y, Sato T. Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction through recruitment of β -catenin and cadherin. *FEBS Letters* 2007; 581: 4821-4830.

Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S, for the INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America. The INTERHEART Latin American Study. *Circulation* 2007; 115: 1067-1074.

Lee M, Aoki M, Kondo T, Kobayashi K, Okumura K, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2535-2541.

Leenen HH, Yuan B. Mortality after coronary artery occlusion in different models of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 2001; 37: 209-215.

Lehrnbecher T, Zimmermann M, Reinhardt D, Dworzak M, Stary J, Creutzig U. Prophylactic human granulocyte colony-stimulating factor after induction therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 109: 936-943.

Leite-Moneira AF. Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart* 2006; 92: 712-718.

Lenhoff S, Rosberg B, Olofsson T. Granulocyte interactions with GM-CSF and G-CSF secretion by endothelial cells and monocytes. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 525-532.

Leone AM, Galiuto L, Garramone B, Rutella S, Giannico MB, Brugaletta S, Perfetti M, Liuzzo G, Porto I, Burzotta F, Niccoli G, Biasucci LM, Leone G, Rebuffi AG, Crea F. Usefulness of granulocyte colony-stimulating factor in patients with large anterior

acute myocardial infarction to prevent left ventricular remodeling (The Rigenera Study). *Am J Cardiol* 2007; 100: 397-403.

Leor J, Rozen L, Shani AZ, Feinberg MS, Amsalem Y, Barbash IM, Kachel E, Holbova R, Mardor Y, Daniels D, Ocherasshvilli A, Orenstein A, Danon D. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation* 2006; 114: I94 – I100.

Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation* 2000; 101: 547-552.

Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkenstein JD, Radice GL. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res* 2005; 97: 474-481.

Li Y, Fukuda N, Yokoyama SI, Kusumi Y, Hagikura K, Kawano T, Takayama T, Matsumoto T, Satomi A, Honye J, Mugishima H, Mitsumata M, Saito S. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 98-106.

Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, Kanamori H, Li L, Ogino A, Misao Y, Khai NC, Mikami A, Minatogushi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates heart failure. *Lab Invest* 2006; 86: 32-44.

Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Rok LS, Kim JH, Kim KH, Park HW, Kim W, Cho LS, Park JC, Kang PM, Schwartz RS, Kang JC. The effects of granulocyte-colony stimulating factor in bare stent and sirulimus-eluting stent in pigs following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; 118: 304-311.

Maggioni AP, Zuanetti G, Franzosi MG, Rovelli F, Santoro E, Staszewsky L, Tavazzi L, Tognoni G. Prevalence and prognostic significance of ventricular arrhythmias after

acute myocardial infarction in the fibrinolytic era. GISSI-2 results. *Circulation* 1993; 87: 312-322.

Mangun CW. The public aspects of rehabilitation in cardiovascular disease. *Chest* 1956; 30: 598-605.

Maroo A, Topol EJ. The early history and development of thrombolysis in acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1867-1870.

Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI3-kinase and Akt. *J Moll Cell Cardiol* 2005; 38: 63-71.

Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Gen* 1998; 14: 410-416.

Miki T, Miura Y, Nishino Y, Yano T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ichikawa Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Ura N, Shimamoto K. Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodeling in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 873-882.

Mill JG, Leite DV, Novaes MA, Lima-Pereira FE, Vassalo DV. Propranolol reduces myocardial hypertrophy in the right cardiac chambers after infarction in rats. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25: 865-869.

Mill JG, Milanez MC, Resende MM, Gomes MGS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 739-744.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 748-753.

Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004; 109: 2572-2580.

Mizuno T, Yau TM, Weisel RD, Kiani CG, Li RK. Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation* 2005; 112: I 81-I 88.

Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, Tschlis P, Vatner SF, Sadoshima J. The Akt-glycogen synthase kinase 3b pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by β -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 14466-14475.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KBS, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.

Narula J, Haider N, Virmani R, Sisalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw B. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.

Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T, Takihara KY. Activation of Jak/Stat pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 797-805.

Norol F, Merlet P, Isnard R, Sebillon P, Bonnet N, Cailliot C, Carrion C, Ribeiro M, Charlotte F, Pradeau P, Mayol JF, Peinnequin A, Drouet M, Safsafi K, Vernant JP, Herodin F. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003; 102: 4361-4368.

Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, Toko H, Akazawa H, Qin Y, Suzuki M, Hasegawa H, Nakaya H, Komuro I. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 2004; 18: 851-853.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.

Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1990; 67: 23-34.

Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, Shimada K, Ogawa H, Daida H, Hattori K, Ohsaka A. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J* 2005; 19: 20005-2007,

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: 149-156.

Optiz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat. Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation* 1995; 92: 253-261.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mckay R, Ginard BN, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Ginard BN, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Nat Acad Sci* 2001; 98 (18): 10344-10349.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol* 2001; 280: H2726-H2731.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985a; 57: 84-95.

Pfeffer MA, McMurray JJV, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Eng J Med* 2003; 349: 1893-1907.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503-512.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985b; 72 (2): 406-412.

Pirro M, Schillaci G, Menecali C, Bagaglia F, Paltriccia R, Vaudo G, Mannarino MR, Mannarini E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and H0XA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens* 2007; 25: 2093-2099.

Porter WT. On the results of ligation of the coronary arteries. *J Physiol* 1893; 15: 121-249.

Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy P, Read EJ, Khoo HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 296-301.

Prabhu SD, Wang G, Luo J, Gu Y, Ping P, Chandrasekar B. β -Adrenergic receptor blockade modulates Bcl-xS expression and reduces apoptosis in failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 483-493.

Pui CH, Boyett JM, Hughes WT, Hancock ML, Sandlund JT, Synold T, Relling MV, Ribeiro RC, Crist WM, Evans WE. Human granulocyte colony-stimulating factor after induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1997; 336: 1781-1787.

Qin F, Liang MC, Liang CS. Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 499-513.

Ravingerová T, Matejíková J, Neckár J, Andelová E, Kolár F. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007; 297: 111-120.

Ray KK, Cannon CP, McCabe CH, Cairns R, Tonkin AM, Sacks FM, Jackson G, Braunwald E. 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: 1405-1410.

Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, Wang CH, Heiss G. Trends in the incidence of myocardial infarction and mortality due coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Eng J Med* 1998; 339: 861-867.

Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, Shoji M, Iso Y, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Kawachi K, Wakabayashi K, Takeyama Y. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol* 2007 (in press).

Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and

angiotensina II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994; 89: 2273-2282.

Schwartz GG; Olsson AG; Ezekowitz MD; Ganz P; Oliver MF; Waters D; Zeiher A; Chaitman BR; Leslie S; Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285: 1711-1718.

Schwarz K, Simoni G, Yu X, Wiedemann S, Strasser RH. Apoptosis at a distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2006; 281:45-54.

Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1662-1669.

Siddiqui A, Kowey PR. Sudden death secondary to cardiac arrhythmias: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 517-525.

Silvestre JS, Heymes C, Oubénaissa A, Robert V, Faisant BA, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of Cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction. Effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999; 99: 2694-2701.

Smith FM. The ligation of coronary arteries with electrocardiographic study. *Arch Intern Med* 1918; 22: 8-27.

Simonis G, Wiedemann S, Schwarz K, Christ T, Sedding DG, Yu X, Marquetant R, Dullaes RCB, Ravens U, Strasser RH. Chelerythrine treatment influences the balance of pro- and anti-apoptotic signaling pathways in the remote myocardium after infarction. *Mol Cell Biochem* 2008; 310: 119-128.

Singh AK, Gudehithlu KP, Patri S, Litbarg NO, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G. Impaired integration of endothelial progenitor cells in capillaries of diabetic wounds is

reversible with vascular endothelial growth factor infusion. *Transl Res* 2007; 149: 282-291.

Smith FM. The ligation of coronary arteries with electrocardiographic study. *Ann Noninvas Electrocardiol* 1918; 9: 80-93.

Solomon SD, Skali H, Anavekar NS, Bourgoun M, Barvik S, Ghali JK, Warnica JW, Khrakovskaya M, Arnold MO, Schwartz Y, Velazquez EJ, Califf RM, McMurray JV, Pfeffer MA. Changes in ventricular size and function in patients treated with valsartan, captopril, or both after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 111: 3411-3419.

Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 179-183.

Spencer FA, Lessard D, Gore JM, Yarzebski J, Goldberg RJ. Declining length of hospital stay for acute myocardial infarction and post discharge outcomes. A community-wide perspective. *Arch Intern Med* 2004; 164: 733-740.

Spencer FA, Meyer TE, Goldberg RJ, Yarzebski J, Hatton M, Lessard D, Gore JM. Twenty year trends (1975-1995) in the incidence, in-hospital and long-term death rates associated with heart failure complicating acute myocardial infarction. A community-wide perspective. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1378-1387.

Spencer FA, Meyer TE, Gore JM, Goldberg RJ. Heterogeneity in the management and outcomes of patients with acute myocardial infarction complicated by heart failure: National Registry of Myocardial Infarction. *Circulation* 2002; 105: 2605-2610.

Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, Naito K, Ogawa S. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 446-456.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 316-323.

Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. Effect of β -blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest* 2005; 128: 1812-1821.

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

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215-262.

Takahama H, Minamino T, Hirata A, Ogai A, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Tsukamoto O, Okada KI, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Mochizuki N, Kitakaze M. Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 159-165.

Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y, Nakayama T, Matsuno K, Miyazaki Y, Yamamoto M, Fujimoto Y, Okada H, Okubo S, Fujita M, Shindo S, Kobayashi Y, Komiyama N, Takekoshi N, Imai K, Himi T, Ishibashi I, Komuro I. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; 122: 41-47.

Takemura G; Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 1-16.

Tanaka H, Tokiwa T. Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor studied in the rat by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 724-729.

Theml H, Diem H, Haferlach, T. *Color atlas of hematology. Practical microscopic and clinical diagnosis*. New York: Thieme; 2004.

Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation* 2004; 109: 3042-3049.

Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through akt-endothelial NO syntase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 108-113.

van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJA. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 2007; 170: 818-829.

Vandervelde S, Van Luyn MJA, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 783-793.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: e1-e7.

Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 1997; 28: 485-492.

Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985; 121: 522-530.

Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DWG, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of

arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-455.

Watanabe S, Arai KI. Roles of the Jak-Stat system in signal transduction via cytokine receptors. *Curr Opin Gen Develop* 1996; 6: 587-596.

Weir RAP, McMurray JJV, Velazquez EJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol* 2006; 97 (suppl): 13F-25F.

Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78: 186-201.

Werneck-de-Castro JPS, Sousa RHC, Oliveira PF, Ribeiro, VP, Mello DB, Peçanha R, Mattos E, Olivares EL, Maia ACV, Mill JG, Goldenberg RCS, Carvalho ACC. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 494-501.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 1991; 84: 2123-2134.

Williams DO, Scherlag BJ, Hope RR, El-Sherif N, Lazzara R. The pathophysiology of malignant ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia. *Circulation* 1974; 50: 1163-1172.

Wollert KC, Studer R, Von Bulow B, Drexler H. Survival after myocardial infarction in the rat. Role of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 1994; 90: 2457-2467.

Wood JM, Hanley HG, Entman ML, Hartley CJ, Swain JA, Busch U, Chang CH, Lewis RM, Morgan WJ, Schwartz A. Biochemical and morphological correlates of acute experimental myocardial ischemia in the dog. Energy mechanisms during very early ischemia. *Circ Res* 1979; 44: 52-61.

Wu W, Lee WL, Wu YY, Chen D, Liu TJ, Jang A, Sharma PM, Wang PH. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspases 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 40113-40119.

Wyllie HA. Death in normal and neoplastic cells. *J Clin Path* 1974; 27: 35-42.

Yaoita H, Sakabe A, Maehara K, Maruyama Y. Different effects of carvedilol, metoprolol, and propranolol on left ventricular remodeling after coronary stenosis or after permanent coronary occlusion in rats. *Circulation* 2002; 105: 975-980.

Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 61-69.

Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 2001; 104: 2158-2163.

Zimmer HG, Gerdes AM, Lortet S, Mall G. Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 1231-1243.

Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Schimitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A, for the REVIVAL-2 Investigators. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. A randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-1010.