

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Bruno de Lima Sanches

**A INFLUÊNCIA TEMPORAL NA INFLAMAÇÃO CARDÍACA EM UM MODELO
DA CARDIOMIOPATIA DE TAKOTSUBO**

Belo Horizonte

2022

Bruno de Lima Sanches

**A influência temporal na inflamação cardíaca em um modelo da
cardiomiopatia de Takotsubo**

Dissertação de mestrado apresentada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dr^a Silvia Guatimosim

Co-orientadora: Dr^a Cibele Rocha
Resende

Belo Horizonte

2022

043

Sanches, Bruno de Lima.

A influência temporal na inflamação cardíaca em um modelo da cardiomiopatia de Takotsubo [manuscrito] / Bruno de Lima Sanches. – 2022.
87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dr^a Sílvia Guatimosim. Co-orientadora: Dr^a Cibele Rocha Resende.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Coração. 3. Cardiomiopatia de Takotsubo. 4. Inflamação. 5. Ritmo Circadiano. 6. Isoproterenol. I. Fonseca, Sílvia Carolina Guatimosim. II. Resende, Cibele Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 562 DE **BRUNO DE LIMA SANCHES**

"A Influência Temporal Na Inflamação Cardíaca Em
Um Modelo da Cardiomiopatia De Takotsubo"

BRUNO DE LIMA SANCHES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **10 de agosto de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG

Profa. Dra. Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges, UNIFESP

Profa. Dra Cibele Rocha Resende, ICB/UFMG - Coorientadora

Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 10 de agosto de 2022

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges, Usuária Externa**, em 13/08/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2022, às 20:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1645685** e o código CRC **AE971F19**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 562 DE BRUNO DE LIMA SANCHES

Às 10:00 horas do dia **10 do mês de agosto de 2022**, transmitida através da plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Bruno de Lima Sanches**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges**, Universidade Federal de São Paulo, **Profa. Dra. Cibele Rocha Resende**, coorientadora, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**A Influência Temporal Na Inflamação Cardíaca Em Um Modelo da Cardiomiopatia De Takotsubo**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de agosto de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges, Usuária Externa**, em 13/08/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2022, às 20:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1645796** e o código CRC **1B787EBF**.

Depositei neste trabalho toda a minha vontade, perseverança e o infinito suco etéreo que encaro como sonho. Me abasteci com o amor, carinho e afeto da minha mãe, Iolanda, família e de todos os meus amigos queridos. À minha avó, Lucília Dias Ribeiro, cujas últimas palavras ditas a mim projetaram-me ao meu futuro mais feliz: dentre todas as forças que me impulsionaram, suas memórias não abandonaram os meus ombros nem por um só segundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha orientadora Profa. Dr^a Silvia Guatimosim, líder do Laboratório de Sinalização Cardíaca do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, que me ensinou, aconselhou, acolheu, guiou, instruiu, dialogou e me proveu liberdade para construir e maturar o meu espírito científico. Também agradeço a minha co orientadora, Profa. Dr^a Cibele Rocha Resende, pelas ideias e colaborações experimentais.

Aos amigos do Laboratório de Sinalização Cardíaca, Fernando, Marcos, Anderson e demais colegas agradeço a convivência, ajuda providencial em inúmeros experimentos, debates científicos enriquecedores e por suprimir o peso inequívoco de se fazer ciência em tempos de inseguranças financeiras e políticas.

Aos técnicos do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), pelo auxílio permanente durante os experimentos de microscopia, corroborando positivamente para a progressão do projeto.

Aos demais professores(as), colegas, técnicos(as) e auxiliares do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG e do programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia (PPGFISFAR), pela estrutura primordial para a manutenção deste projeto.

Aos meus amigos e companheiros de vida, Elvis, Fábio, Daniel, Gustavos, Lívia, Heloísa, Ana, André, Diego, Lucas, dentre tantos outros, por acreditar e insuflar a chama dos meus sonhos dos primórdios escolares e acadêmicos até a presente pós-graduação.

À minha mãe, irmãos, tias(os) e primos(as), pela vida.

*“Viva com muito amor, muito carinho, seja
muito feliz, e cuidado com a vida.
Cuidado com a vida...”*

(Lucília Dias Ribeiro)

RESUMO

A cardiomiopatia de Takotsubo (CT) representa uma importante causa de hospitalizações por eventos cardíacos agudos. Ela ocorre principalmente em mulheres após a menopausa em resposta a fatores estressores de origem emocional ou física, onde a liberação de catecolaminas hiperestimula o tecido cardíaco levando a modificações deletérias. É sabido que eventos cardíacos graves, como o infarto agudo do miocárdio, ocorrem com mais frequência em certos horários do dia. De forma semelhante, eventos fisiológicos que participam da patogênese destas doenças, como a inflamação, também apresentam uma ritimicidade circadiana. Sendo assim, o intuito deste trabalho é avaliar o impacto temporal no remodelamento cardíaco que ocorre na CT induzida por uma alta dose de isoproterenol (ISO), tendo como foco principal o componente inflamatório. Para isso camundongos fêmeas, C57BL/6 (8 a 12 semanas de idade) foram distribuídos em 4 grupos: (1) tratado com salina no ZT0 (7h da manhã, CTRL ZT0); (2) tratado com ISO +/- (300mg/kg no ZT0, ISO ZT0), e os grupos 3 e 4, tratados da mesma forma no ZT12 (que corresponde as 7h da noite, CTRL ZT12 e ISO ZT12). Três dias após o tratamento os animais foram sacrificados e o tecido cardíaco foi coletado.

Houve um aumento da massa cardíaca normalizada pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia (HW/BW e HW/TL) maior nos animais tratados com ISO no ZT12 vs ZT0. Além disso, houve uma perda de peso maior nos animais tratados no ZT12 vs ZT0. Confirmando os resultados da razão de HW/TL, observamos por meio da sonda fluorescente WGA que o ISO induz um aumento da área transversal dos cardiomiócitos (CSA) maior nos animais tratados no ZT12 vs ZT0. Também foi observado pela marcação de hematoxilina e eosina (H&E), que os animais tratados no ZT12 tiveram um infiltrado inflamatório mais proeminente, além de maior deposição de material eosinofílico amorfo característico de necrose tecidual. Marcação do coração com o corante Evans Blue, indicou que o ISO induziu um aumento da morte celular similar nos animais tratados, independentemente do ZT. Por meio do uso do PicroSirius, observou-se que o ISO não induziu deposição de colágeno total, resultado que foi confirmado com o modelo transgênico reporter MYH7-YFP. Neste modelo, os cardiomiócitos fluorescem ao expressar a proteína MYH7, que está envolvida com o estresse cardíaco principalmente por fibrose. O perfil do infiltrado inflamatório presente no tecido cardíaco foi avaliado por citometria de fluxo, onde observamos um

aumento de leucócitos (células CD45⁺), neutrófilos (células Ly6G⁺), macrófagos (células CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{int}CD64^{high}) e monócitos (células CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}CD64^{int}) restrito aos animais tratados no ZT12. Sabendo que os macrófagos compreendem um tipo celular importante na patogênese da CT, decidimos investigar seus subtipos por um *gating* adicional na citometria de fluxo. Enquanto foi observado um aumento de células CCR2⁺MHC-II^{high} nos animais tratados em ambos os ZTs, o aumento de macrófagos CCR2⁻MHC-II^{low} monócitos CCR2⁺MHC-II^{low} foi restrito aos animais tratados no ZT12. Por fim, não verificamos um aumento de células CCR2⁻MHC-II^{high} nos animais tratados com ISO em ambos os ZTs. Este resultado foi confirmado por imunofluorescência, onde encontramos um aumento da marcação do CD68 nos animais tratados no ZT12 vs ZT0. Em conjunto, estes resultados indicam que o recrutamento de monócitos para o coração é maior no ZT12. Desta forma, resolvemos avaliar a presença de remodelamento e do infiltrado inflamatório 24h após o insulto com ISO, que representa o tempo em que os monócitos começam a se infiltrar no coração. 24h após o tratamento com ISO, apenas animais tratados com ISO no ZT0 apresentaram um aumento da razão HW/BW e perda de peso. Análise da área da fibra muscular indicou a ocorrência de hipertrofia em animais tratados em ambos os ZTs. Por imunofluorescência, houve um aumento da marcação com CD68 apenas nos animais ISO ZT12. Com isso, concluímos que a resposta inflamatória que ocorre em resposta ao ISO sofre uma influência temporal, sendo mais severa na fase escura do que na clara. Estes dados são importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na CT e reforçam a importância do entendimento acerca do impacto do horário do dia para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Palavras-chave: Coração. Takotsubo. Inflamação. Ciclo Claro-Escuro. Isoproterenol.

ABSTRACT

Takotsubo cardiomyopathy (TC) represents an important cause of hospitalizations for acute cardiac events. It occurs mainly in postmenopausal women in response to stressors of emotional or physical origins, where release of catecholamines hyperstimulates cardiac tissue leading to its deleterious effects. It is known that cardiac events, such as acute myocardial infarction, occur more frequently at certain times of day. Similarly, physiological events that participate in the pathogenesis of these diseases, such as inflammation, also show a circadian rhythm. Therefore, the aim of this study was to evaluate the temporal impact on cardiac remodeling that occurs in CT induced by a high dose of isoproterenol (ISO), with a focus on the inflammatory component.

For this, we used female mice, C57BL/6 (8 to 12 weeks of age), divided into 4 groups: (1) mice treated with saline at the ZT0 (7 am, CTRL ZT0); (2) mice treated with ISO -/- 300mg/kg at ZT0, ISO ZT0), and the groups (3) and (4) treated in the same way at ZT12 (which corresponds to 7:00 pm, CTRL ZT12 and ISO ZT12). Three days after treatment the animals were sacrificed and cardiac tissue was collected. There was a greater increase in cardiac mass normalized by body weight and tibia length (HW/BW and HW/TL) in animals treated with ISO at ZT12 vs ZT0. In addition, there was a greater weight loss in the animals treated in ZT12 vs ZT0. Confirming the HW/TL ratio data, we observed using the WGA probe that ISO induces a greater increase in cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) in animals treated at ZT12 vs ZT0. It was also observed by the hematoxylin and eosin (H&E) labeling that the animals treated in ZT12 had a more prominent inflammatory infiltrate, in addition to greater deposition of amorphous eosinophilic material characteristic of tissue necrosis. Heart staining with the Evans Blue dye indicated that ISO induced a similar increase in cell death in treated mice, regardless of the ZT. By using the PicroSirius, we found that ISO did not induce total collagen deposition, a result that was confirmed with the MYH7-YFP transgenic reporter model. In this model, cardiomyocytes fluoresce when expressing the MYH7 protein, which is involved in cardiac stress mainly through fibrosis. The profile of the inflammatory infiltrate present in the cardiac tissue was evaluated by flow cytometry, where we observed an increase in leukocytes (CD45⁺ cells), neutrophils (Ly6G⁺ cells), macrophages (CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{int}CD64^{high} cells) and monocytes (CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}CD64^{int}) restricted to animals treated in ZT12.

Knowing that macrophages comprise an important cell type in the pathogenesis of CT, we decided to investigate their subtypes by an additional gating in flow cytometry. While an increase in CCR2⁺MHC-II^{high} cells was observed in animals treated in both ZTs, the increase in CCR2⁺MHC-II^{low} macrophages and CCR2⁺MHC-II^{low} monocytes was restricted to mice treated at ZT12. Finally, we did not observe an increase in CCR2⁺MHC-II^{high} cells in the animals treated with ISO in both ZTs. This result was confirmed by immunofluorescence, where we found an increase in CD68 staining in animals treated in ZT12 vs ZT0. Taken together, these results indicate that monocyte recruitment to the heart in response to ISO is greater in ZT12. Therefore, we decided to assess the presence of remodeling and inflammatory infiltrate 24h after the ISO insult, which represents the time when monocytes begin to infiltrate in heart. 24h after ISO treatment, only animals treated with ISO in ZT0 showed an increase in the HW/BW ratio and weight loss. Analysis of CSA indicated the occurrence of hypertrophy in animals treated in both ZTs. By immunofluorescence, we observed that there was an increase in CD68 labeling only in ISO ZT12 animals. Thus, we conclude that the inflammatory response that occurs in response to ISO is temporally influenced, being more severe in the dark phase than in the light one. These data are important for understanding the mechanisms involved in TC and highlight the importance of understanding the impact of the time of the day for the development of more effective therapeutic strategies.

Keywords: Heart. Takotsubo. Inflammation. Light-Dark Cycle. Isoproterenol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais gatilhos da cardiomiopatia de Takotsubo (CT)	18
Figura 2: A patogênese da CT leva a alterações funcionais no coração.....	19
Figura 3: A ativação dos β -ARs nos cardiomiócitos induz o aumento da contratilidade	22
Figura 4: Subpopulações distintas de macrófagos habitam o tecido cardíaco dependendo do estado homeostático	27
Figura 5: O cerne do relógio molecular no coração.....	32
Figura 6: Esquema demonstrando o delineamento experimental para tratamento dos animais com ISO -/-	37
Figura 7: Delineamento experimental dos animais sacrificados 24h após o tratamento com ISO	38
Figura 8: Avaliação da viabilidade celular utilizando o Evans Blue	39
Figura 9: Avaliação da re-expressão da β -MHC utilizando o animal reporter MYH7-YFP	40
Figura 10: Estratégia de gating das subpopulações leucocitárias	42
Figura 11: Variação de peso 72h após o tratamento com ISO.....	47
Figura 12: Relação HW/BW e HW/TL 72h após o tratamento com ISO.....	48
Figura 13: Avaliação da CSA 72h após o tratamento com ISO.....	49
Figura 14: Deposição de colágeno por PicroSirius Red 72h após o tratamento com ISO	50
Figura 15: Figuras <i>whole donut</i> dos corações corados com PicroSirius Red 72h após o tratamento com ISO	51
Figura 16: Avaliação da re-expressão de β -MHC por imunofluorescência 72h após o tratamento com ISO	52
Figura 17: Imunofluorescência para NFAT 72h após o tratamento com ISO.....	53
Figura 18: Figuras <i>whole donut</i> dos corações corados com H&E 72h após o tratamento com ISO	54
Figura 19: Imunofluorescência para CD68 72h após o tratamento com ISO.....	56
Figura 20: Avaliação da presença de leucócitos, neutrófilos e macrófagos por citometria de fluxo 72h após o tratamento com ISO.....	57
Figura 21: Subpopulações macrocitárias presentes no coração avaliadas por citometria de fluxo 72h após o tratamento com ISO.....	58

Figura 22: Avaliação da morte celular por Evans Blue 24h após o tratamento com ISO	59
Figura 23: Western Blotting para ASC e Caspase-1 72h após o tratamento com ISO	61
Figura 24: Gráfico de perda de peso corporal 24h após o tratamento com ISO	62
Figura 25: Avaliação das razões HW/BW e HW/TL 24h após o tratamento com ISO	63
Figura 26: Avaliação da CSA 24h após o tratamento com ISO	64
Figura 27: Imunofluorescência para CD68 24h após o tratamento com ISO	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de aspectos clínicos da CT e o IAM.....	24
Tabela 2: Relação de anticorpos com seus respectivos números de catálogo, marcas e diluições utilizados no experimento de citometria de fluxo.....	42
Tabela 3: Anticorpos primários e sondas fluorescentes utilizados nos experimentos.	43
Tabela 4: Anticorpos secundários utilizados para os experimentos de imunofluorescência.	43
Tabela 5: Relação dos anticorpos e diluições utilizadas para os experimentos de Western Blotting.....	45
Tabela 6: Anticorpos secundários para os experimentos de Western Blotting.....	46

LISTA DE ABREVIATURIAS E UNIDADES

μM	Micromolar
$\beta 1\text{-AR}$	Receptor Adrenérgico $\beta 1$
$\beta 2\text{-AR}$	Receptor Adrenérgico $\beta 2$
AC	Adenilato Ciclase
ACK	Tampão de Lise ACK
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
BMAL1	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like Protein 1</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
BW	Body Weight (peso corporal)
CCM	<i>Cardiomyocyte Clock Mutante Mice</i>
CCR2	Receptor de Quimiocina c-c do tipo 2
CD	Carótida Direita
CE	Carótida Esquerda
CK	Creatina Quinase
CKB	<i>Cardiomyocyte-specific BMAL1 Knockout Mice</i>
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput</i>
CMLVs	Células do Músculo Liso Vascular
CRY	Criptocromo
CSA	Cross Sectional Area (área transversal dos cardiomiócitos)
CT	Cardiomiopatia de Takotsubo
CXCL10	Ligante 10 de quimiocinas com motivo C-X-C
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride</i>
DB	Digestion Buffer
EB	Evans Blue
E-box	<i>Enhancer Box</i>
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
GPCRs	G protein-coupled receptors (receptores acoplados à proteína G)
GPR68	Receptor Acoplado a Proteína G 68
HW	Heart Weight (peso do coração)
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio

IL-6	Interleucina 6
IP	Intraperitoneal
ISO	Isoproterenol
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
β -MHC	Cadeia Pesada de Miosina do Tipo Beta
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
NA	Noradrenalina
NFAT	Fator Nuclear das Células T
NIS	Nationalwide Patient Sample
NLRP3	<i>Pyrin Domain-Containing protein 3</i>
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
OCT	Optimal Cutting Tissue
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDE	Fosfodiesterase
PER	Proteína Período
PFA	Paraformaldeído
PKA	Proteína Quinase A
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS-T	Tris-Buffered Saline
TL	Tíbia Length (comprimento da tíbia)
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
ZT0 e ZT12	<i>Zeitgeber 0 e Zeitgeber 12</i>

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 A cardiomiopatia de Takotsubo	17
1.2 A sinalização adrenérgica no coração	20
1.3 Os aspectos clínicos da CT	23
1.4 Os aspectos inflamatórios da CT	25
1.5 O controle circadiano e a maquinaria circadiana no coração	29
2. OBJETIVO GERAL	35
2.1 Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Grupos experimentais e a indução farmacológica da CT	36
3.3 Avaliação da viabilidade celular por Evans Blue.....	38
3.4 Avaliação da re-expressão de β -MHC utilizando um camundongo reporter (Myh7-YFP)	39
3.5 Caracterização das células imunes por citometria de fluxo.....	41
3.6 Imunofluorescência	42
3.7 Avaliação da deposição de colágeno por PicroSirius Red	44
3.8 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting	44
3.9 Análise estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1 O tratamento leva a uma perda de peso maior dos animais tratados no ZT12	47
4.2 O ISO induz um aumento maior do peso do coração no ZT12	48
4.3 Há uma hipertrofia maior dos cardiomiócitos no ZT12	49
4.4 O tratamento não induz um aumento da deposição de colágeno total no coração	50
4.5 O ISO não induz um aumento de células YFP+ dos animais reporter MYH7-YFP	51
4.6 O tratamento com ISO induz um aumento de NFAT apenas no ZT12	52
4.7 O tratamento com ISO induz mais alterações morfológicas no coração no ZT12	53
4.8 O tratamento com ISO induz um aumento da expressão <i>in situ</i> de CD68 restrito ao ZT12	55
4.9 Há uma inflamação cardíaca mais severa nos animais tratados com ISO no ZT12	56
4.10 O tratamento com ISO induz morte celular em ambos os ZTs.....	58
4.11 Avaliação da expressão de proteínas envolvidas com a ativação do inflamassomo NLRP3.....	60
4.12 Há perda de peso corporal restrita ao ZT0 24h após o tratamento com ISO	61
4.13 O tratamento com ISO aumenta a razão HW/BW apenas no ZT0.....	62

4.14	Há aumento da CSA em ambos os ZTs 24h após o tratamento	63
4.15	O tratamento com ISO induz um aumento dos níveis de células CD68+ apenas no ZT12	64
5.	DISCUSSÃO	67
6.	CONCLUSÃO.....	77
7.	REFERÊNCIAS	79

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A cardiomiopatia de Takotsubo

Também denominada síndrome de Takotsubo, síndrome do coração partido, cardiomiopatia de estresse ou cardiomiopatia de Takotsubo (CT), esta doença acomete principalmente mulheres no período pós menopausa, onde o fator protetor do estrógeno ao coração é perdido (AKASHI; NEF; LYON, 2015). Deshmukh e colaboradores analisaram os dados de um estudo clínico publicado em 2008 pela NIS (do inglês, *Nationwide Patient Sample*, USA), que demonstrou que mais de 90% dos casos da CT acometiam pessoas acima dos 50 anos de idade, sendo que mais de 90% destes pacientes eram mulheres (DESHMUKH; KUMAR; PANT; RIHAL *et al.*, 2012).

A doença está relacionada com uma miríade de gatilhos emocionais inespecíficos como a perda de entes queridos, luto, fins de relacionamentos, desastres naturais (como tsunamis ou terremotos) e até mesmo com a recepção de más notícias do cotidiano (AKASHI; NEF; LYON, 2015). Fatores físicos também são relevantes, como anemia, utilização de drogas de abuso, atentados contra a própria vida, cirurgias e doenças crônicas (SINGH; KHAN; GAMBLE; SCALLY *et al.*, 2022) A Figura 1 sumariza os principais gatilhos emocionais e físicos envolvidos no aparecimento da CT.

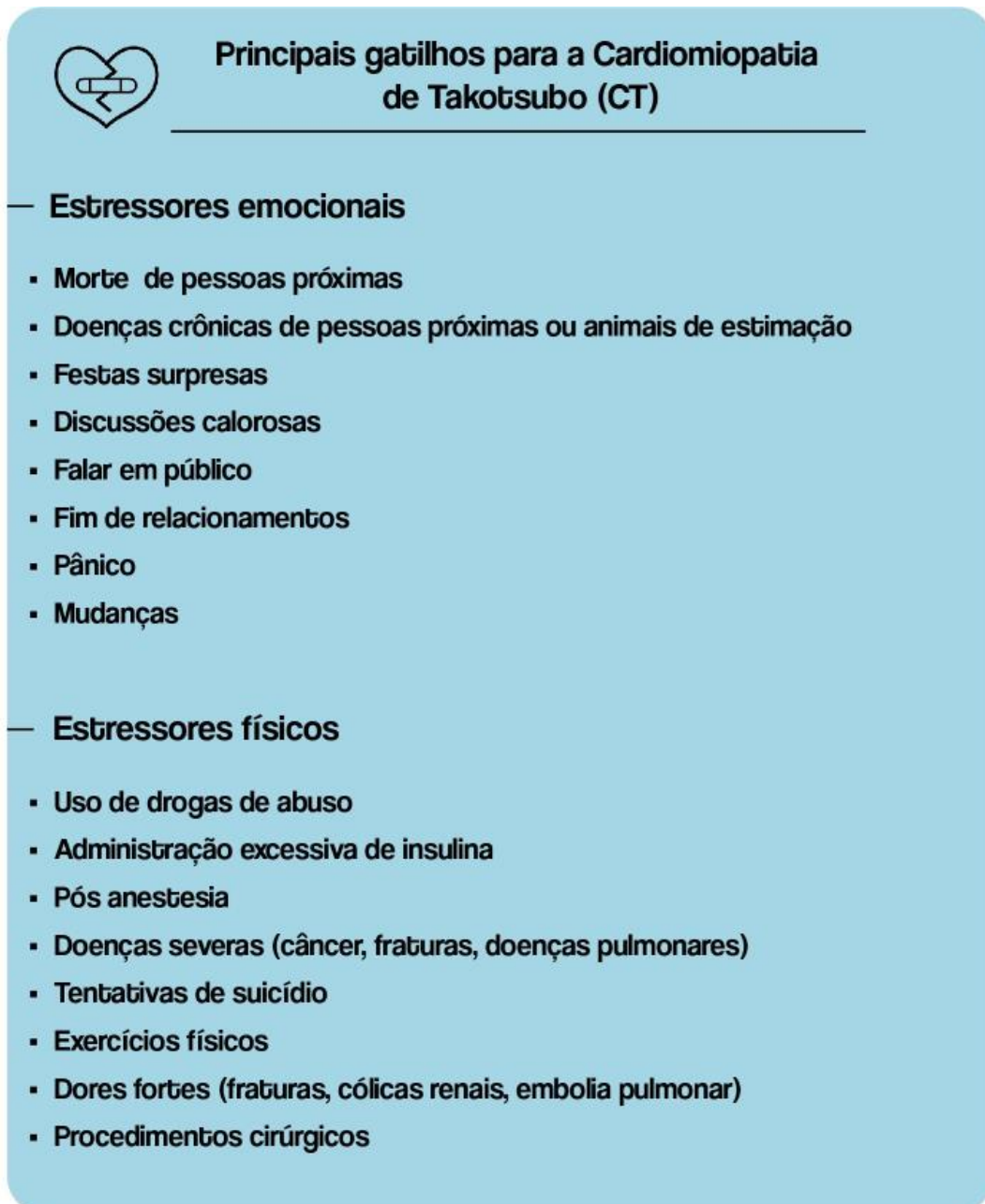


Figura 1: A CT também é conhecida como cardiomiopatia de estresse, que pode ser de origem emocional como também física. Destaca-se o fato de que outras doenças, como cânceres ou fraturas, podem desencadear a CT. Figura adaptada de (AKASHI; NEF; LYON, 2015).

Do ponto de vista da patologia, é sabido que a CT em sua fase aguda induz importantes alterações nos vasos periféricos e coronárias (levando a isquemia do miocárdio), diminuição da função cardíaca (por diminuição da fração de ejeção e aumento da pós-carga), hipocinesia do ápice e hipercontratilidade da base do ventrículo esquerdo, além de diversas alterações eletrofisiológicas, (SINGH; KHAN; GAMBLE; SCALLY *et al.*, 2022), estruturais e inflamatórias (PELLICCIA; KASKI; CREA; CAMICI, 2017). Apesar da inespecificidade etiológica, em sua progressão

fisiopatológica há a participação de alguns componentes bioquímicos inequívocos, com liberação aguda de noradrenalina no sangue pela glândula suprarrenal, que agirá em seus receptores conhecidos como receptores adrenérgicos (SINGH; KHAN; GAMBLE; SCALLY *et al.*, 2022). Alterações funcionais durante a fase aguda doença, como aumento da pós-carga, pressão arterial e vasoespasmo vêm devido a hiperestimulação destes receptores adrenérgicos no coração, como sumarizado na Figura 2.

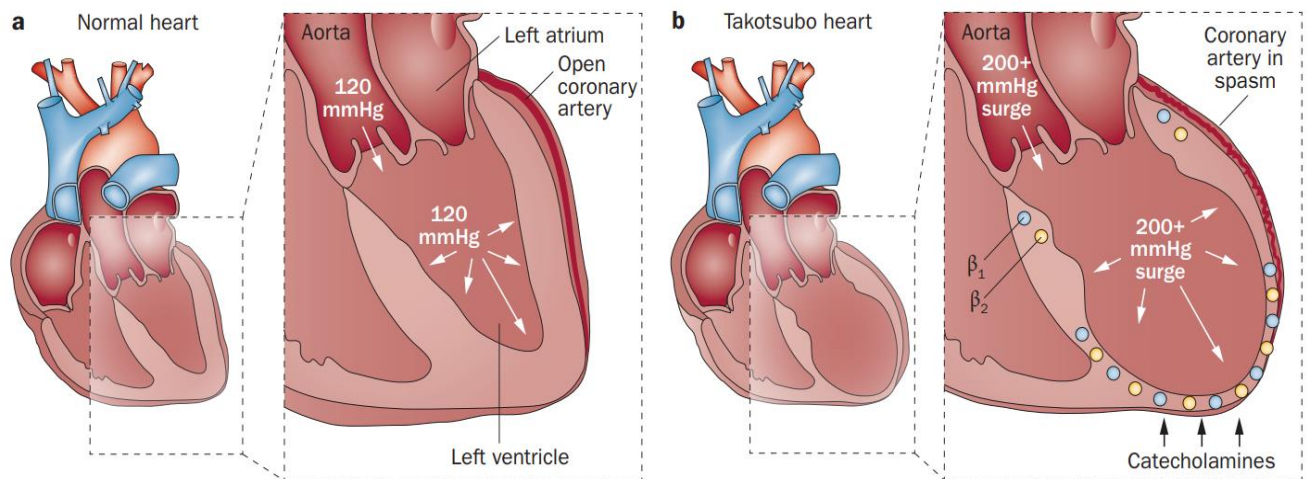


Figura 2: A patogênese da CT leva a alterações funcionais no coração. Desenho esquemático representando as alterações fisiológicas e patológicas durante a fase aguda da CT. Em (A), observa-se a pós carga no coração em seu estado basal. O painel (B) representa o tecido cardíaco durante a fase aguda da CT, onde há um aumento transiente da pós-carga e da pressão arterial devido ao aumento da resistência vascular periférica; vasoespasmo das coronárias levando a isquemia do miocárdio e, por último, uma disfunção do ápice do miocárdio devido a ativação suprafisiológica dos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos. Esta ativação diferencial entre o ápice e a base do tecido leva a uma hipocinesia característica da patogênese da CT. Figura retirada de (AKASHI; NEF; LYON, 2015).

A ativação destes receptores é saudável ao coração em seu estado basal, onde estão envolvidos em diversos mecanismos fisiológicos e adaptativos do órgão, e estão distribuídos de forma díspar pelo miocárdio se concentrando principalmente no ápice do tecido, onde a inervação simpática é escassa. Porém, na CT, há uma ativação suprafisiológica do receptores beta-adrenérgicos devido aos altos níveis de catecolaminas circulantes, o que resulta nas diversas alterações patológicas supracitadas, podendo progredir para insuficiência e falência do tecido cardíaco (LEFKOWITZ; ROCKMAN; KOCH, 2000). Neste tópico, aprofundaremos um pouco a discussão sobre a sinalização adrenérgica no coração, e sobre os aspectos clínicos, inflamatórios e adrenérgicos da CT.

1.2 A sinalização adrenérgica no coração

O coração é um órgão completo e complexo, e além de sua função primordial de bombear sangue repleto de nutrientes e oxigênio para os órgãos e tecidos, também pode exercer diversas outras funções fisiológicas em uma dança integrada com diversos outros sistemas (GAVAGHAN, 1998). Esta complexidade funcional é em parte possível devido a complexa rede celular e bioquímica do coração, que é composto por células endoteliais, fibroblastos, cardiomiócitos (que são as unidades contráteis) e células imunes, como os macrófagos e células dendríticas (LITVINUKOVA; TALAVERA-LOPEZ; MAATZ; REICHART *et al.*, 2020). Apesar destas células apresentarem funções e atividades específicas, elas trabalham em conjunto e em sincronia pela manutenção da homeostase tecidual, muitas vezes regulando a atividade, proliferação e fisiologia umas das outras (LITVINUKOVA; TALAVERA-LOPEZ; MAATZ; REICHART *et al.*, 2020).

No coração, um importante mecanismo sinalizador vem a partir das terminações nervosas autonômicas simpáticas e parassimpáticas, sendo a primeira mais concentrada nos ventrículos em relação aos átrios e responsável por regular a maturação, função e mecanismos de reparo cardíacos (KIMURA; IEDA; FUKUDA, 2012). Estes neurônios, também conhecidos como neurônios adrenérgicos, liberam no terminal sináptico diversos neurotransmissores que desempenham variadas funções no coração, sendo o mais conhecido deles a noradrenalina (NA) (KIMURA; IEDA; FUKUDA, 2012). Também conhecida como norepinefrina, a NA é uma molécula pertencente à classe das monoaminas (ou catecolaminas) que desempenha sua atividade a partir da interação com seus receptores, conhecidos como receptores adrenérgicos (ARs) (LEFKOWITZ; ROCKMAN; KOCH, 2000). Os receptores adrenérgicos mais relevantes para o controle das funções cardíacas são os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ ($\beta 1$ -AR e $\beta 2$ -AR), e pertencem à classe dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (LEFKOWITZ; ROCKMAN; KOCH, 2000). Aqui, é relevante citar que a proporção e localização dos β -ARs pelo coração é díspar, tanto no que tange a proporção de $\beta 1$ -ARs em comparação aos $\beta 2$ -ARs, que é de 3:1, quanto a distribuição destes receptores que se concentram principalmente na porção apical dos ventrículos (TRANTER; WRIGHT; SIKKEL; LYON, 2013).

Os GPCRs são uma família de receptores de superfície celular envolvidos na transdução de sinais extracelulares, cuja estrutura trespassa a membrana celular sete vezes e possuem sítios de regulação intra e extracelulares (ALFONSO-PRIETO;

NAVARINI; CARLONI, 2019). A porção citoplasmática destes receptores é acoplada a uma classe de proteínas chamadas de proteínas G, que possuem duas subunidades funcionais (α e $\beta\gamma$, Figura 3), que se desprendem das proteínas G ativadas para exercer diversos efeitos intracelulares coordenados, como a regulação da atividade de enzimas, proteínas e até de outros receptores (ALFONSO-PRieto; NAVARINI; CARLONI, 2019). Os principais tipos de proteínas G no contexto cardiovascular são as proteínas G_i , G_s e G_q , onde cada uma delas quando ativada promove uma resposta molecular única a partir de segundos mensageiros (LEFKOWITZ; ROCKMAN; KOCH, 2000). Nos cardiomiócitos, quando os β_1 -AR e β_2 -ARs são ativados pela noradrenalina, há uma mudança na conformação estrutural destas proteínas que culmina na ativação da proteína G_s , que responde liberando suas subunidades α e $\beta\gamma$ no meio intracelular (LEFKOWITZ; ROCKMAN; KOCH, 2000). A subunidade α possui um papel primariamente estimulatório, que age ativando uma enzima conhecida como adenilato ciclase (AC), responsável por catalisar a produção de um segundo mensageiro intracelular, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Figura 3) (SYROVATKINA; ALEGRE; DEY; HUANG, 2016).

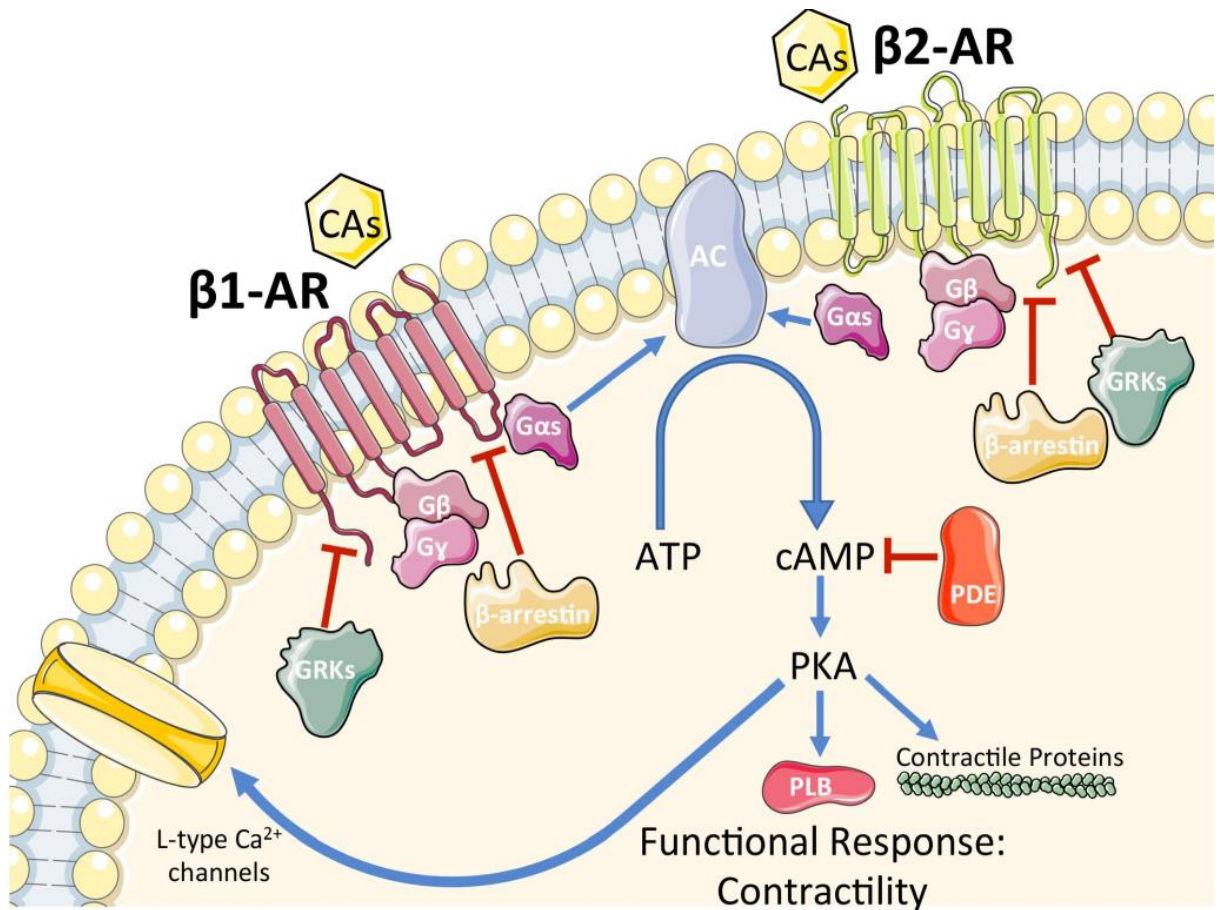


Figura 3: A ativação dos β -ARs nos cardiomiócitos induz o aumento da contratilidade. Figura ilustrativa demonstrando a via de sinalização após ativação dos β -ARs por catecolaminas (CAs). É possível visualizar que a subunidade α destes receptores ativam a AC, que aumenta a catalisação da produção de AMPc, que por sua vez ativa a PKA, que dentre outros efeitos, aumenta a contratilidade dos cardiomiócitos via aumento da concentração de íons Ca^{2+} no citosol. Importante notar que o AMPc é degradado por outra enzima, a fosfodiesterase (PDE), sendo um importante ponto de controle da via. Além disso, os β -ARs podem ser fosforilados ou internalizados por um grupo de enzimas chamado de GRKs (G protein-coupled receptor kinases) e pelas β -arrestinas, o que diminui os efeitos da ativação desta via nos cardiomiócitos. Figura adaptada de: (DE LUCIA; EGUCHI; KOCH, 2018).

O AMPc, dentre outras ações, atua aumentando a atividade de uma enzima chamada proteína quinase A (PKA), que passa a catalisar com maior eficiência a fosforilação de diversos outros alvos bioquímicos. Este aumento da atividade da PKA além de interferir em diversas outras vias de sinalização celulares, eleva os níveis de Ca^{2+} no citoplasma conduzindo a um aumento da função contrátil dos cardiomiócitos (SYROVATKINA; ALEGRE; DEY; HUANG, 2016). De forma antagônica, quando há a ativação de um receptor que esteja acoplado à proteína G_i , onde seu efeito se dá principalmente via inibição da adenilato ciclase, há diminuição dos níveis de AMPc e assim, da contratilidade dos cardiomiócitos. Aqui, simplificada, fica clara a

relevância do equilíbrio entre ativação e inativação destes receptores para a manutenção da saúde fisiológica cardiovascular. Em diversas circunstâncias patológicas como a hipertensão, insuficiência cardíaca e na CT, há um desequilíbrio entre estas vias sinalizadoras excitatórias e inibitórias, levando a progressão da doença e possivelmente, perda funcional (LOHSE; ENGELHARDT; ESCHENHAGEN, 2003).

1.3 Os aspectos clínicos da CT

Os sinais e sintomas da CT muito se assemelham aos apresentados por pacientes que sofrem o infarto agudo do miocárdio (IAM), como angina, dispneia, além de alterações eletrofisiológicas no coração como elevação do segmento ST e/ou inversão da onda T. Além disso, é observado choque cardiogênico, fibrilação ventricular e aumento dos níveis séricos de troponina C (PELLICCIA; KASKI; CREA; CAMICI, 2017). Porém, uma diferença diagnóstica relevante é que durante a CT não há obstrução ou rompimento de vasos coronarianos, eventos característicos de doenças arteriais coronarianas pré-existentes (PROKUDINA; KURBATOV; ZAVADOVSKY; VRUBLEVSKY *et al.*, 2021). A tabela 1 sumariza as principais diferenças entre os sinais clínicos e bioquímicos encontrados na CT e o IAM. O nome *Takotsubo* vem devido ao formato peculiar que o coração adquire durante o final da sístole, que muito se assemelha a um receptáculo utilizado por pescadores japoneses para pescar polvos. Esta idiosincrasia morfológica representa também um sinal clínico, que resulta da acinesia do ápice do ventrículo esquerdo, em contraste com a hipercinesia na porção basal ventricular. Apesar de muito estudada, a etiologia e patogênese da CT permanecem pouco desvendadas, no entanto supõe-se que disfunções vasculares, neuroendócrinas, estimulação simpática e alterações na microcirculação cardíaca sejam o cerne para sua progressão fisiopatológica (PELLICCIA; KASKI; CREA; CAMICI, 2017). Wittstein e colaboradores demonstraram que os níveis sanguíneos de catecolaminas estavam elevados em pacientes diagnosticados com a CT, e que estes níveis eram quase 3 vezes maiores que os de pacientes que sofreram IAM (WITTSTEIN; THIEMANN; LIMA; BAUGHMAN *et al.*, 2005).

Dentre os principais fatores de risco citam-se sexo, idade, deficiência de estrógeno, e predisposições genéticas. Cerca de 80% de todos os pacientes que sofrem com a CT relatam terem passado por eventos estressores psicológicos ou físicos recentemente (PROKUDINA; KURBATOV; ZAVADOVSKY; VRUBLEVSKY *et al.*, 2021).

Epidemiologicamente, a CT acomete majoritariamente mulheres em sua fase pós-menopausa, que compreende ao período da vida onde os efeitos cardioprotetores do hormônio estrógeno são perdidos (AKASHI; NEF; LYON, 2015). Constantemente o estresse é tido como fator primordial para a patogênese da CT, onde a ativação tanto neurohumoral via sistema nervoso central (SNC)-glândula adrenal, quanto autonômica elevam os níveis locais de catecolaminas, que se encontram elevados durante a fase aguda da CT (PELLICCIA; KASKI; CREA; CAMICI, 2017). Neste contexto, o efeito cardioprotetor do estrógeno principalmente via sua atividade vasoprotetora pode facilitar a progressão da lesão cardíaca devido a toxicidade catecolaminérgica (MARAFIOTI; TURRI; MONACO, 2020). Interessantemente, cerca de 2-3% de todos os eventos agudos coronarianos são na verdade não obstrutivos, e são caracterizados como CT por angiografias e ecocardiogramas, eventos estes que normalmente têm um bom prognóstico. A mortalidade da fase aguda da CT gira em torno de 4-5% de todos os casos, e nos demais casos as anormalidades funcionais do ventrículo se resolvem dentro de dias ou semanas (MARAFIOTI; TURRI; MONACO, 2020).

Aspectos clínicos da CT e do IAM		
Doença	CT	IAM
Sintomas	Dor no peito, dispnéia, arritmias, insuficiência cardíaca, choque cardiogênico, morte súbita, pacientes majoritariamente mulheres pós menopausa (>90%)	Dor no peito, dispnéia, arritmias, insuficiência cardíaca, choque cardiogênico, morte súbita
ECG	Elevação ou depressão do intervalo ST (12% dos casos), inversão da onda T, prolongamento QTc (50% dos casos)	Elevação do intervalo ST, depressão do intervalo ST e inversão da onda T
ECO	Hipocinesia ou acinesia podem ser apical, basal ou focal	Anormalidades regionais na motilidade da parede ventricular
Angiografia	Ausência de doença coronariana obstrutiva ou indícios de desestabilização de placas ateromatosas	Presença de doença coronariana obstrutiva, ruptura de placa ateromatosa e trombo
Biomarcadores	Razão de NTproBNP/TnI é 2235 e NTproBNP/CK-MB é 678 Os níveis de TnI e CK-MB são menores que em pacientes com STEMI	Razão de NTproBNP/TnI é 82 e NTproBNP/CK-MB é 28

Tabela 1: Comparação de aspectos clínicos da CT e o IAM. Observa-se na figura que ambas as doenças possuem grande similaridade clínica, o que torna o diagnóstico ambulatorial diferencial complexo. Porém, a partir de exames como ECG, ecocardiografia (ECO), angiografias ou a avaliação de marcadores bioquímicos fica possível distinguir entre os dois eventos. CK-MB= creatina quinase; NT-proBNP= Natriuretic Peptide NTerminal Pro-B-Typ; STEMI= IAM com elevação do segmento ST;

Tn1= troponina I. Figura adaptada de: (PROKUDINA; KURBATOV; ZAVADOVSKY; VRUBLEVSKY *et al.*, 2021).

O tratamento ambulatorial envolve primariamente considerar os sintomas como sendo característicos de IAM, o que inclui inalação de oxigênio, administração de anticoagulantes, nitrovasodilatadores e bloqueadores β -ARs. Após descartar a hipótese de IAM via exames de imagem e testes bioquímicos, o tratamento prossegue com β -ARs e anticoagulantes, uma vez que há a possibilidade de permanência dos altos níveis de catecolaminas circulantes e risco de trombose e embolias (BIETRY; REYENTOVICH; KATZ, 2013). De suma importância, um componente fisiopatológico que muitas vezes é ignorado nas diretrizes de manejo da CT é a inflamação, que está presente tanto na fase aguda quanto tardia da doença e é primordial para a disfunção, formação de cicatriz e resolução.

1.4 Os aspectos inflamatórios da CT

A inflamação constitui um mecanismo essencial para a manutenção das funções fisiológicas teciduais, além de comandar os principais mecanismos de reparo diante diversas circunstâncias fisiopatológicas (CHEN; DENG; CUI; FANG *et al.*, 2018). Linfócitos B e T, macrófagos, monócitos, neutrófilos e outras células imunes representam a via de frente desta resposta, que é coordenada a partir de mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas (CHEN; DENG; CUI; FANG *et al.*, 2018). No coração, as células inflamatórias também possuem papel de destaque na homeostasia do órgão, participando por exemplo da transdução do sinal elétrico (CARRILLO-SALINAS; NGWENYAMA; ANASTASIOU; KAUR *et al.*, 2019; HULSMANS; CLAUSS; XIAO; AGUIRRE *et al.*, 2017).

O coração é formado por um conjunto de células, as miocitárias (cardiomiócitos), responsáveis pela função contrátil do órgão, e as não miocitárias, como as células endoteliais, fibroblastos e células imunes (PINTO; ILINYKH; IVEY; KUWABARA *et al.*, 2016). Até meados dos anos 2010, os detalhes da composição celular do coração eram pouco compreendidos. Foi só com a publicação do trabalho de Pinto *et al.*, 2016 que ficou estabelecida de forma mais clara a composição celular do miocárdio. No estado basal, o coração é constituído majoritariamente por células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos. Também existe uma pequena população de células

imunes que formam cerca de 5% das células cardíacas, sendo os macrófagos o tipo mais abundante (PINTO; ILINYKH; IVEY; KUWABARA *et al.*, 2016).

Um melhor entendimento sobre os macrófagos cardíacos veio com a publicação de dois trabalhos que mostraram a existência de quatro subpopulações de macrófagos no coração, sendo elas: (1) CCR2⁻MHC-II^{high}; (2) CCR2⁻MHC-II^{low}; (3) CCR2⁺MHC-II^{high}, macrófagos derivados de monócitos (origem na medula óssea); e (4) CCR2⁺MHC-II^{low}, monócitos (originados na medula óssea) (Figura 4) (EPELMAN; LAVINE; BEAUDIN; SOJKA *et al.*, 2014; LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014). No coração no estado basal, naive, a maior parte dos macrófagos cardíacos são CCR2⁻, residentes, predominantemente de origem embrionária e que se mantém no coração por proliferação *in situ*. Entretanto, quando ocorre um evento cardíaco, como o infarto ou a CT, há uma mudança na composição de macrófagos do coração (LAVINE; PINTO; EPELMAN; KOPECKY *et al.*, 2018). Nessa situação, haverá uma mudança na composição de macrófagos cardíacos, onde monócitos são recrutados da medula óssea para o coração e se diferenciam em uma população de macrófagos CCR2⁺MHC-II^{high} e monócitos CCR2⁺MHC-II^{low} (LAVINE; PINTO; EPELMAN; KOPECKY *et al.*, 2018).

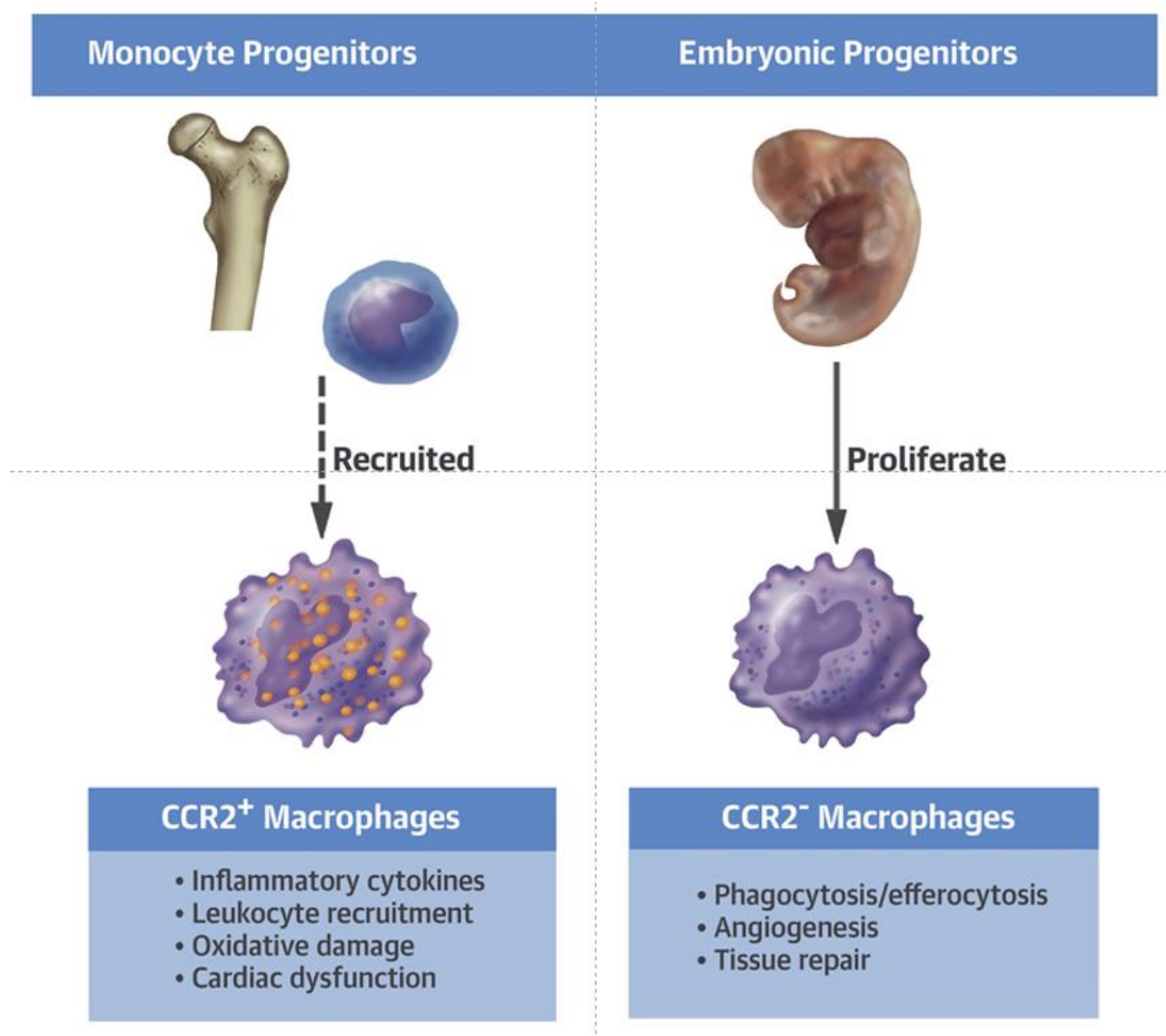


Figura 4: Subpopulações distintas de macrófagos habitam o tecido cardíaco dependendo do estado homeostático. A figura acima apresenta um resumo das funções dos macrófagos cardíacos dependendo de sua origem. Os macrófagos de origem embrionária, CCR2⁻, participam de processos como angiogênese e reparo tecidual. Porém, os macrófagos CCR2⁺, originam de monócitos da medula óssea e atuam principalmente durante lesões, estimulando a produção de citocinas, amplificando a resposta imune e reforçando a disfunção cardíaca. Figura adaptada de (LAVINE; PINTO; EPELMAN; KOPECKY *et al.*, 2018).

Vale destacar que esta mudança no perfil de macrófagos cardíacos em situações de estresse é muito relevante para a manutenção da fisiologia e reparo do órgão. Além disso, como apresentado acima as diferentes origens dos macrófagos cardíacos refletem também papéis funcionais diferentes. Os macrófagos CCR2⁻ atuam de forma a manter a homeostase do coração, como por exemplo, promovendo o desenvolvimento de coronárias no estado embrionário (LEID; CARRELHA;

BOUKARABILA; EPELMAN *et al.*, 2016) e facilitando o processo de transdução de sinal elétrico (HULSMANS; CLAUSS; XIAO; AGUIRRE *et al.*, 2017). Já as células CCR2⁺ possuem uma atividade majoritariamente pró-inflamatória, atuando por exemplo na amplificação da resposta imune no coração lesionado (LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014).

Em um dos primeiros trabalhos que descreveram o papel da inflamação durante a CT, Morel *et al.* em 2009 avaliaram a presença de leucócitos e parâmetros funcionais, estruturais e metabólicos no miocárdio de pacientes que sofreram da doença (MOREL; SAUER; IMPERIALE; CIMARELLI *et al.*, 2009). Em um trabalho mais recente, foi avaliado a presença de infiltrado inflamatório de pacientes que passaram pela CT. Cinco dias após o diagnóstico os autores observaram que o miocárdio destes pacientes continha um relevante infiltrado de macrófagos, além de um aumento global dos níveis de citocinas como IL-6 e CXCL10 e alteração da distribuição dos subtipos de monócitos no sangue (SCALLY; ABBAS; AHEARN; SRINIVASAN *et al.*, 2019). Interessantemente, cinco meses após o evento cardiovascular não foi observada a presença exacerbada de macrófagos no miocárdio, porém os níveis de IL-6 permaneceram aumentados (SCALLY; ABBAS; AHEARN; SRINIVASAN *et al.*, 2019).

Na perspectiva experimental, altas doses de isoproterenol (ISO) ou NE induzem um estresse catecolaminérgico no coração cujos sinais muito se assemelham com os achados clínicos da CT (KOLODZINSKA; CZARZASTA; SZCZEPANKIEWICZ; BUDNIK *et al.*, 2022; PAUR; WRIGHT; SIKKEL; TRANTER *et al.*, 2012). Neste modelo, além das alterações funcionais, bioquímicas e eletrofisiológicas já mencionadas foi também observado um infiltrado inflamatório formado predominantemente por macrófagos. Utilizando uma dose única de 200mg/kg de ISO em camundongos, Liao *et al.* demonstraram o impacto funcional da presença de monócitos e macrófagos no miocárdio (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). No mesmo trabalho, eles demonstraram que o tratamento com ISO também leva a um infiltrado de outras células imunes, como os neutrófilos e uma diminuição do número de linfócitos, e por último, que a depleção química dos macrófagos (pela administração de clodronato) ou o bloqueio da infiltração de macrófagos (utilizando um antagonista de receptores CCR2) previne a perda função de cardíaca dos animais tratados, o que abre espaço para possíveis perspectivas farmacoterapêuticas (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Além da inflamação, a administração

aguda de ISO em altas doses em camundongos promove morte celular, elevação dos níveis séricos de troponina C e fibrose, sem afetar a taxa de proliferação dos cardiomiócitos (WALLNER; DURAN; MOHSIN; TROUPES *et al.*, 2016). A presença de múltiplas células imunes e a ativação de variadas vias de sinalização revelam o caráter complexo e multifatorial da CT, o que pode representar um fator complicador na elucidação de sua patogênese.

Tanto a resposta imune em circunstâncias patológicas quanto o tônus adrenérgico no coração são afetados por um mecanismo de controle ubíquo ao organismo e ainda não totalmente compreendido: a maquinaria cronobiológica. O tempo é a dimensão e variável preponderante de controle deste sistema, onde durante as 24h do dia e dependendo da idade, alterações nos ritmos circadianos impactam a saúde dos órgãos e sistemas de forma distinta, podendo culminar em predisposições para diversos tipos de doenças, incluindo as cardiovasculares. No próximo tópico discutiremos brevemente a organização geral deste sistema e o seu impacto na fisiologia cardíaca.

1.5 O controle circadiano e a maquinaria circadiana no coração

Todas as funções biológicas dos organismos vivos estão sujeitas a um controle cíclico de suas atividades, que no planeta Terra geralmente é modulado em ressonância com o ciclo dia-noite (ou claro-escuro) (AYYAR; SUKUMARAN, 2021). Esse mecanismo adaptativo fundado solidamente pela progressão evolutiva, é também conhecido como ritmo circadiano (do latim, *cerca de um dia*) devido a oscilação das funções biológicas durante o período de 24h, que refletem a rotação da Terra em seu próprio eixo e em torno do Sol (REDDY; REDDY; SHARMA, 2022). O ciclo sono-vigília, tônus muscular, atividade autonômica, síntese e secreção de diversos hormônios, dentre várias outras funções vitais, são reguladas por uma maquinaria bioquímica interna e oscilatória, que antecipa as necessidades circadianas ambientais e adapta o organismo a estes padrões (AYYAR; SUKUMARAN, 2021). Os estímulos capazes de estimular esta maquinaria circadiana, também conhecidos como pistas, sincronizadores, *zeitgeber* (do alemão: doador de tempo) ou *clock inputs* são variados como a temperatura do ambiente, ingestão de comida e o principal deles: a luz (RUAN; YUAN; ELTZSCHIG,

2021). Estas pistas são responsáveis por ativar genes e vias bioquímicas específicas que regulam as respostas moleculares e funcionais, oscilando durante as 24h de um dia. Estas oscilações funcionais circadianas são muito importantes para a sobrevivência e manutenção do bem-estar fisiológico, uma vez que antecipam as necessidades funcionais do organismo que inequivocamente são díspares durante o dia. A cronobiologia estuda o impacto destas oscilações na função e bioquímica dos órgãos e sistemas, seguindo padrões temporais em circunstâncias patológicas e homeostáticas (RUAN; YUAN; ELTZSCHIG, 2021).

Nos mamíferos a maquinaria cronobiológica, denominada de relógio biológico, pode ser geograficamente compartimentalizada em duas: o relógio central, ou oscilador central, que está localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e os relógios biológicos periféricos, que estão presentes em todas outras células e tecidos do organismo (LOWREY; TAKAHASHI, 2011). Trabalhos pioneiros demonstraram que lesões experimentais em ratos na região do SNC que compreende o NSQ afetam negativamente o comportamento circadiano do organismo. Por exemplo, Aguilar-Roblero et al., 1986 demonstraram que uma lesão no NSQ de ratos perturba o comportamento de ingestão de água durante o dia, reforçando a importância do NSQ na ritmicidade de comportamentos vitais (AGUILAR-ROBLERO; GARCIA-HERNANDEZ; AGUILAR; ARANKOWSKY-SANDOVAL *et al.*, 1986). O mais surpreendente é que, neste mesmo trabalho, após os animais lesionados receberem transplante do NSQ de animais saudáveis o comportamento basal de ingestão de água fora restaurado (AGUILAR-ROBLERO; GARCIA-HERNANDEZ; AGUILAR; ARANKOWSKY-SANDOVAL *et al.*, 1986).

O principal estímulo (ou sincronizador) do relógio central é a luz, sendo que o caminho anatômico que ele percorre até o NSQ é de satisfatória intuitividade: a energia eletromagnética vinda dos fótons presentes na luz excita um conjunto de células especializadas presentes na retina, as células ganglionares, gerando um potencial de ação (UMEMURA; YAGITA, 2020). Este estímulo é integrado e enviado até o NSQ pelo trato retino-hipotalâmico, a partir do nervo óptico, sendo os principais neurotransmissores responsáveis por integrar o sinal luminoso em respostas biológicas o glutamato e o PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) (UMEMURA; YAGITA, 2020). Por sua vez, o NSQ responde oscilando a expressão de diversos genes, chamados de genes de relógio (ou *clock genes*), que estão envolvidos

em diversas alças de retroalimentação positivas e negativas (KONOPKA; BENZER, 1971; RIJO-FERREIRA; TAKAHASHI, 2019).

A primeira descrição destes chamados 'genes do relógio' veio em 1971, onde Konopka e Benzer *et. al* descreveram o *locus* gênico da proteína period (PER) em *Drosophila* (KONOPKA; BENZER, 1971). Desde então, o conhecimento da importância e funções destes genes do relógio se expandiu bastante, sendo a primeira descrição deles no tecido cardíaco feita por Oishi *et. al* (OISHI; SAKAMOTO; OKADA; NAGASE *et al.*, 1998). As proteínas que são codificadas por estes genes exercem diversas funções bioquímicas regulatórias, como promoção ou inibição da transcrição de outros genes ou inibição e ativação de fatores de transcrição envolvidos na regulação genômica (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019).

As proteínas que regulam positivamente a expressão dos genes de relógio são principalmente a BMAL1 (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like Protein 1*) e a CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput*), que formam um heterodímero no citoplasma e migram para o núcleo celular (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019) (Figura 5). No genoma, elas ligam-se a região E-box (ou *enhancer box*, CACGTG) da região gênica promotora de diversas proteínas da maquinaria de relógio, aumentando a transcrição de diversas proteínas como as PER1-2 (*Period Circadian Protein Homologue 1,2*) e CRY1-2 (*Cryptochrome 1 e 2*), que são reguladoras negativas da maquinaria de relógio (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019) (Figura 5). Após isso, há um aumento de PER e CRY no citoplasma, onde ao formarem um heterodímero PER/CRY translocam-se para o núcleo celular para modular a expressão de BMAL1/CLOCK, regulando negativamente sua própria expressão (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019) (Figura 5).

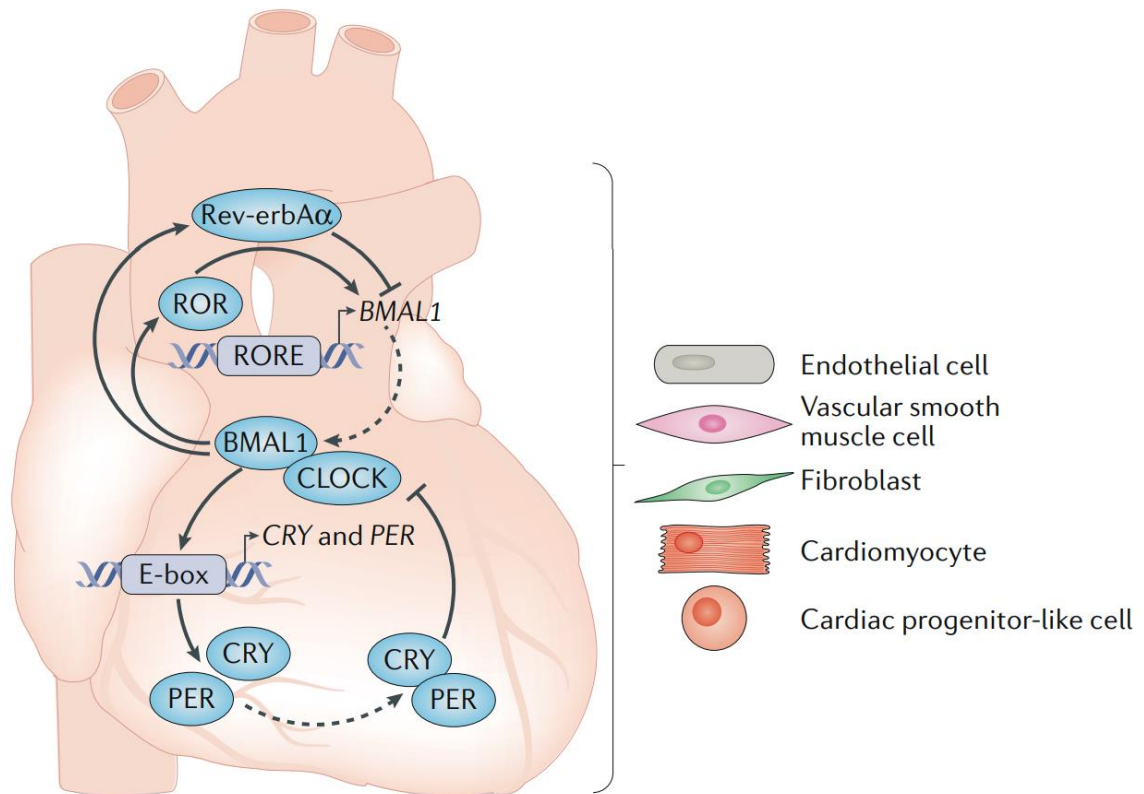


Figura 5: O cerne do relógio molecular no coração. Esta maquinaria representa um conjunto de *loops* de transcrição e tradução gênicas, com diversas alças de *feedback* positivo e negativo. No coração, esta maquinaria está presente em todas as células do órgão, como as células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos. Quando ocorre a heterodimerização das proteínas CLOCK e BMAL1, elas se ligam a regiões E-box do DNA modulando a transcrição de uma variedade de genes. Um destes genes codifica para as proteínas PER e CRY, que se heterodimerizam e regulam negativamente a atividade de CLOCK e BMAL1. CLOCK e BMAL1 também ativam ROR e Rev-ErbA α , que respectivamente ativam e inibem a transcrição gênica de BMAL1. A expressão e atividade destas proteínas flutua circadianamente, representando um mecanismo de controle e regulação de diversas funções em todas as células, órgãos e sistemas. Figura retirada de: (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019).

Outras proteínas, entretanto, modulam negativamente a expressão de PER e CRY, como a ROR α , β , γ e REV-ERB α , β , que constituem a alça alternativa deste complexo proteico e também têm sua expressão regulada positivamente pelo complexo CLOCK/BMAL1 (SAINI; JASKOLSKI; DAVIS, 2019). Complementarmente, a atividade destas proteínas pode também ser afetada por mecanismos de ajuste pós-transcricional e até mesmo epigenéticos como acetilação, desacetilação e miRNAs (ETCHEGARAY; LEE; WADE; REPPERT, 2003).

Já é bem conhecido o fato de que alterações no ciclo circadiano ou nos genes de relógio tem uma influência na fisiologia cardíaca (CRNKO; DU PRE; SLUIJTER; VAN LAAKE, 2019). As funções cardiovasculares como a pressão arterial, o tônus simpático e os padrões de condução elétrica no miocárdio são alterados durante o dia (PORTALUPPI; TISEO; SMOLENSKY; HERMIDA *et al.*, 2012). É sabido por exemplo que alguns eventos clínicos cardiovasculares como o IAM e angina pectoris ocorrem com maior frequência em intervalos específicos do dia, como nas primeiras horas da manhã, o que geralmente compreende ao período de maior atividade dos seres humanos (CHELLAPPA; VUJOVIC; WILLIAMS; SCHEER, 2019). Estas observações epidemiológicas demonstram que o coração é afetado pelas variações cíclicas de estressores ambientais também em circunstâncias patológicas (PORTALUPPI; TISEO; SMOLENSKY; HERMIDA *et al.*, 2012). Em um modelo de isquemia-reperfusão (I/R) foi demonstrado que os camundongos submetidos à intervenção no ZT12 (que compreende às 7h da noite, normalmente quando as luzes dos biotérios se apagam, ou fase de maior atividade dos camundongos) tiveram uma área de infarto quase 3,5 vezes maior em comparação com os animais submetidos ao mesmo procedimento no ZT0 (que compreende às 7h da manhã, quando as luzes do biotério se acendem, ou fase de menor atividade dos animais) (DURGAN; PULINILKUNNIL; VILLEGAS-MONTOYA; GARVEY *et al.*, 2010). Adicionalmente, após um mês de reperfusão a área de infarto e fibrose estavam maiores, além de haver uma perda maior da função contrátil dos cardiomiócitos dos animais que sofreram a isquemia no ZT12 (DURGAN; PULINILKUNNIL; VILLEGAS-MONTOYA; GARVEY *et al.*, 2010). Estes desfechos diurnos de resposta foram abolidos ou atenuados quando a intervenção foi realizada em camundongos CCM (do inglês: *Cardiomyocyte Clock Mutant*), que têm a maquinaria cronobiológica dos cardiomiócitos disfuncional (DURGAN; PULINILKUNNIL; VILLEGAS-MONTOYA; GARVEY *et al.*, 2010).

Utilizando a mesma linhagem de espécimes CCM e camundongos onde BMAL1 foi deletada (CBK ou *Cardiomyocyte-specific BMAL1 Knockout Mice*) apenas nos cardiomiócitos, Durgan *et. al* demonstraram que estas proteínas são importantes para o remodelamento das células cardíacas (DURGAN; TSAI; GRENETT; PAT *et al.*, 2011). Em ambos os modelos foi observado um aumento do peso dos ventrículos, tamanho dos cardiomiócitos e do mRNA de genes relacionados a hipertrofia cardíaca (*anf* e *mcip1*) (DURGAN; TSAI; GRENETT; PAT *et al.*, 2011). Além disso, ele submeteu os camundongos CCM e CBK a um desafio com ISO em dois horários do

dia ZT0 e ZT12. Nestas condições, os animais selvagens apresentaram uma hipertrofia cardíaca 5 vezes maior (e um aumento 6 vezes maior do mRNA que codifica para *anf*) quando tratados com ISO no ZT0 vs ZT12, onde esta variação diurna da resposta cardíaca ao ISO não fora observada nos animais CCM (DURGAN; TSAI; GRENETT; PAT *et al.*, 2011). Estes dados sugeriram pela primeira vez que a maquinaria circadiana dos cardiomiócitos é importante para a adaptação do tecido a estímulos hipertróficos (DURGAN; TSAI; GRENETT; PAT *et al.*, 2011). Faz-se evidente aqui que tanto o remodelamento cardíaco induzido por ISO quanto os eventos de caráter isquêmico, em camundongos, estão sujeitos a uma oscilação diurna que é dependente das proteínas do relógio biológico.

Ambos estes processos patológicos, como a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida por ISO ou o remodelamento cardíaco em um modelo de I/R são patogenicamente dependentes, até certo ponto, da resposta inflamatória tecidual, que também possui uma ritmicidade circadiana característica. Inúmeras funções imunes são moduladas de forma circadiana como a proliferação de linfócitos (ESQUIFINO; SELGAS; ARCE; MAGGIORE *et al.*, 1996), a atividade de células natural killers (NK) (ARJONA; SARKAR, 2005), a ritmicidade da resposta imune humoral (FERNANDES; HALBERG; YUNIS; GOOD, 1976) e o número de diversas células imunes no plasma e seus subtipos (KAWATE; ABO; HINUMA; KUMAGAI, 1981).

Em um trabalho publicado recentemente, Shigehiro Ohdo *et al.* demonstraram que a doença renal crônica induz uma inflamação cardíaca e fibrose e que, além disso, estes eventos são atenuados em animais que possuem a proteína CLOCK mutada. Os camundongos foram submetidos a uma nefrectomia, onde foi correlacionado o aumento da expressão do receptor GPR68 (*G protein-coupled receptor 68*) nos monócitos circulantes à inflamação e fibrose cardíacas (YOSHIDA; MATSUNAGA; NAKAO; HAMAMURA *et al.*, 2021). Desta forma, é natural e justo inferir que o coração também é suscetível a variações circadianas na progressão de doenças cardiovasculares cujo componente inflamatório seja primordial ou relevante. Logo, avaliar a influência temporal nos padrões de resposta imune na inflamação cardíaca induzida por ISO pode ser, *ipso facto*, um relevante passo em direção à elucidação da patogênese da CT.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência temporal na resposta imune cardíaca em um modelo agudo de inflamação induzido por ISO.

2.1 Objetivos específicos

1. Verificar se o tratamento com ISO induz alterações celulares e morfológicas importantes no coração, como hipertrofia do tecido (relação peso do coração por peso corporal e comprimento da tibia), deposição de colágeno (por PicroSirius) e aumento da área transversal dos cardiomiócitos (CSA), utilizando a sonda fluorescente WGA (*Wheat Germ Agglutinin*);
2. Avaliar o perfil de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, utilizando as técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência (para marcadores de macrófagos como o CD68);
3. Averiguar se o grau de lesão no tecido cardíaco é diferencial entre os grupos, tratando os animais com o corante Evans Blue, que tem alta afinidade por células necróticas ou com baixa viabilidade;
4. Avaliar a expressão de proteínas envolvidas com o processo inflamatório como NLRP3, Caspase-1 e ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos utilizamos camundongos fêmeas (uma vez que o sexo é determinante para o modelo), tendo idade de 10 a 12 semanas, pesando de 20-25g. Todos os experimentos foram realizados seguindo protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)(CEUA 175/2021). Para os experimentos utilizados espécimes das seguintes linhagens: C57BL/6J (Selvagens) e camundongos reporter β -MHC (Myh7-YFP) Myh7tm1Unc (MGI:3776012). Os camundongos foram alocados em biotérios de criação e experimentação, com temperatura (22-24°C) e umidade controladas, mantidos em um ciclo claro-escuro 12-12h e com disponibilidade de ração e água *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais e a indução farmacológica da CT

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais: Grupo controle ZT0 (CTRL ZT0), animais que foram tratados com solução salina estéril às 7h da manhã; grupo ISO ZT0, animais tratados às 7h da manhã com isoproterenol (estereoisômero -/-, Sigma, I6504-1G) na dose única de 300 mg/kg, por via intraperitoneal (IP); grupo controle ZT12 (CTRL ZT12) e ISO ZT12. Durante o tratamento os animais tiveram acesso a água de ração *ad libitum*. Após as 72h de tratamento, um período em que há um influxo importante de células imunes no coração, principalmente macrófagos, os espécimes foram sacrificados por deslocamento cervical no mesmo horário do dia em que foram tratados (ZT0 ou ZT12). A dose de ISO administrada conduz a uma lesão aguda no tecido cardíaco canonicamente conhecida como CT (WILSON; CHEYNE; BROWN; KERR *et al.*, 2018). Após isso, foi realizada uma toracotomia e o coração perfundido com 5mL de solução DB (de Digestion Buffer) gelada para retirada de todo o sangue dos ventrículos e das coronárias. Em seguida o tecido foi retirado, pesado e dividido em dois: uma metade foi congelada em nitrogênio líquido alocada em tubos de plástico autoclavados para experimentos de biologia molecular (Western Blot), e a outra

metade foi alocada em receptáculos (criomoldes) contendo Optimal Cutting Tissue (OCT®, TissueTek, USA) para criopreservação e levados para freezer a -20°C . Para mensurar o comprimento da tíbia dos espécimes, o tecido ósseo da pata posterior direita dos animais foi retirado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, e o comprimento mensurado utilizando um paquímetro.

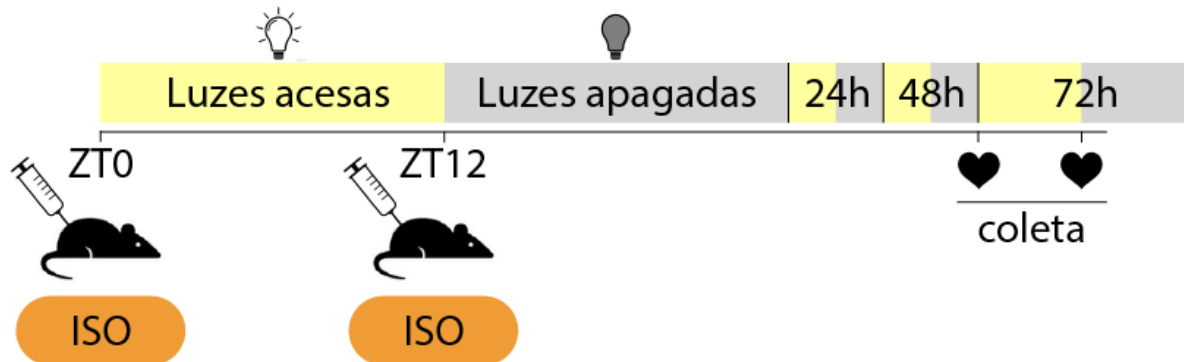


Figura 6: Esquema demonstrando o delineamento experimental para tratamento dos animais com ISO $-/-$ na dose única de 300 mg/kg, IP. Os animais do grupo CTRL/ISO ZT0 foram tratados no momento em que as luzes do biotério se acenderam (às 7h). Já os animais dos grupos CTRL/ISO ZT12 foram tratados quando as luzes do biotério se apagaram (às 19h). Após 72h do tratamento, os animais foram sacrificados em seus respectivos ZTs. Para tratamento e sacrifício dos animais no ZT12, fora utilizada uma lâmpada vermelha, que emite uma luz que não é visível para os olhos dos espécimes.

Em outro protocolo experimental, porém, decidimos avaliar de forma mais aguda as alterações no tecido cardíaco. Para isso, tratamos os animais da mesma forma que no item anterior, nos ZTs 0 e 12, porém os sacrificamos 24h depois, seguindo o mesmo protocolo. O tecido cardíaco em seguida foi pesado, limpo e processado conforme o protocolo de 72h. A Figura 7 ilustra de forma esquemática o delineamento experimental.

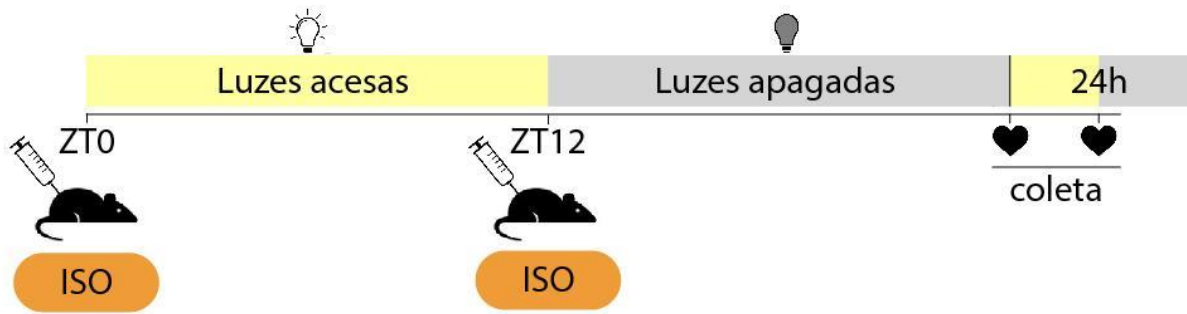


Figura 7: delineamento experimental dos animais sacrificados 24h após tratamento com ISO. Os animais foram tratados no ZT0 e ZT12, porém sacrificados 24h após o tratamento com ISO. Os corações foram processados da mesma forma que os animais sacrificados 72h após o tratamento.

3.3 Avaliação da viabilidade celular por Evans Blue

Neste protocolo experimental, utilizamos o corante Evans Blue (EB) para quantificar a viabilidade das células cardíacas após tratamento com ISO. Como já descrito em protocolo prévio (BURCHFIELD; DONG; SAKATA; GAO *et al.*, 2010; VIJAYARAGHAVAREDDY; ADHINARAYANREDDY; VEMANNA; SREEMAN *et al.*, 2017), o EB possui grande afinidade por células em processo de morte celular não programada, ou necrose. Nestas condições, a membrana celular torna-se mais permeável, permitindo o acúmulo de EB no citoplasma. O acúmulo do corante nas células pode ser identificado por microscopia de campo claro ou de fluorescência, utilizando o laser de comprimento de onda 555 nm, permitindo assim a quantificação da porcentagem de células positivas para o EB (EB+) por campo. Aqui, utilizamos camundongos fêmeas C57BL/6J, tendo de 10-12 semanas de idade e pesando de 20-25g. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais e tratados com ISO em ambos os ZTs exatamente como descrito no item 3.2. Porém, 6h após a inoculação de ISO nos ZT0 e ZT12 os animais foram tratados com EB 1% nos ZT6 e ZT18, dissolvido em solução salina estéril, no volume de 10 μ L/g de animal, por via IP. Uma vez que o processo de morte celular após o tratamento com ISO nesta dose concentra-se principalmente no período de 16-24h após a inoculação, sacrificamos os animais 24h após o tratamento com ISO, ou 16h após o EB. Dadas as 24h de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no ZT0 e ZT12, sendo no ZT12 com o auxílio de uma lâmpada vermelha. Após isso, foi realizada uma toracotomia e o coração perfundido com 5mL de solução DB (do inglês:

digestion buffer) gelada para retirada do máximo de sangue dos ventrículos. Em seguida o tecido foi retirado, e colocado em um tubo de plástico contendo paraformaldeído (PFA) 4% por 24h, para fixação. Após isso, o mesmo tecido fora colocado em outro tubo contendo 10mL de uma solução de sacarose 30%, *overnight*. Esta etapa consistiu no processamento inicial do tecido, que em seguida foi colocado em um criomolde contendo OCT®, que posteriormente foi levado para freezer -20°C. Finalmente, os crioblocos foram cortados em um criostato na espessura de 10 μ M, e colocados em uma lâmina ordinária de vidro gelatinizada (gelatinizar as lâminas é relevante para manter o tecido fixo na superfície do vidro durante o preparo para a microscopia de fluorescência). Os cortes foram então analisados em um microscópio confocal LSM 880 (Zeiss), localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB/UFMG.

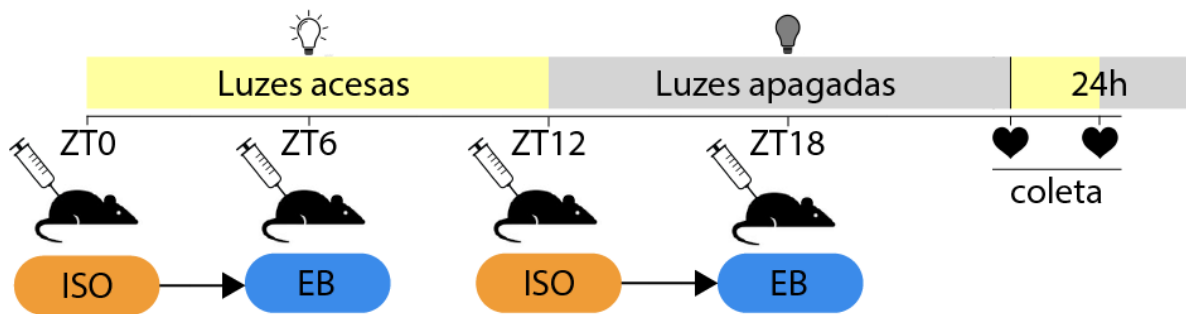


Figura 8: Avaliação da viabilidade celular utilizando o Evans Blue. Os animais foram tratados com o EB na concentração de 1% e volume de 10 μ L/g de animal nos ZT6 e ZT18, 6h após o tratamento com ISO ou solução salina nos ZT0 e ZT12. 24h após o tratamento com ISO e EB os animais foram sacrificados e o tecido cardíaco coletado para análise em um microscópio confocal, utilizando o laser de comprimento de onda 633 nm.

3.4 Avaliação da re-expressão de β -MHC utilizando um camundongo reporter (Myh7-YFP)

A proteína miosina de cadeia pesada do tipo β ou β -MHC está presente nos cardiomiócitos principalmente em seu período maturacional mais tênue, deixando de ser expressa conforme o animal cresce. Porém, em situações patológicas onde o coração encontra-se estressado, principalmente quando há deposição de matriz extracelular (MEC) ou fibrose no interstício cardíaco, esta proteína volta a ser produzida e serve como um marcador bioquímico importante. Neste animal

transgênico, quando a β -MHC é expressa nos cardiomiócitos uma proteína fluorescente é expressa em conjunto, servindo assim como um reporter para a expressão da proteína. A proteína fluorescente em questão é a YFP, ou *yellow fluorescent protein*, cuja emissão fluorescente têm seu pico no comprimento de onda de ~540 nm e podendo ser verificado por microscopia de fluorescência. Neste protocolo experimental, os animais reporter Myh7-YFP foram manejados exatamente da mesma forma que os animais dispostos no item 4.2.1, do tratamento, sacrifício e processamento das lâminas:

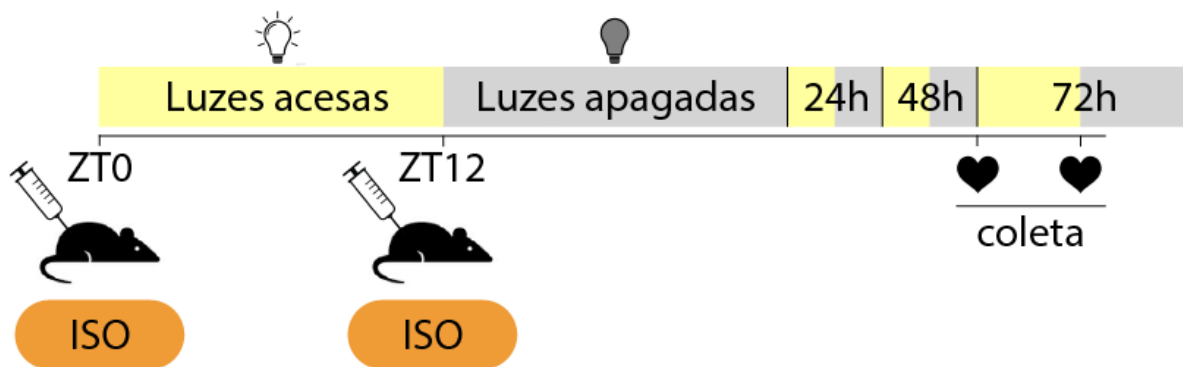


Figura 9: Avaliação da re-expressão da β -MHC utilizando o animal reporter Myh7-YFP. A β -MHC quando re-expressa em adultos é um marcador importante de estresse cardíaco, principalmente quando há deposição de MEC e fibrose. Tratamos os animais Myh7-YFP com ISO +/- na dose única de 300mg/Kg, IP nos ZT0 e ZT12. 72h após o tratamento os animais foram sacrificados, e o coração processado para experimento de microscopia de fluorescência.

As lâminas contendo os tecidos cortados na espessura de 12 μ M passaram por um processamento prévio antes de irem para o microscópio de fluorescência, a fim de identificar a membrana das células presentes no corte e seus núcleos. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 25min, de forma a retirar qualquer umidade excessiva presente na superfície do material. Após isso, colocamos PFA 4% para fixação química dos cortes, suficientemente para cobrir todo o tecido, e transferimos as lâminas em uma câmara úmida, por 15min. Em seguida foi realizada uma lavagem do PFA utilizando tampão fosfato salino (PBS) 1x, seguindo uma incubação dos tecidos com a sonda fluorescente WGA (ab178444 1:200 em PBS), que liga-se a glicoproteínas presentes na membrana celular, na concentração de 10 mol/L por 15 minutos (Esta sonda emite fluorescência no comprimento de onda ~488

nm). Terminado este passo, as lâminas foram novamente lavadas com PBS 1x e incubadas com 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma, D9542), que se liga ao núcleo celular, na concentração de 10 µmol/L por 5 minutos. O DAPI possui uma faixa de emissão fluorescente que vai do 364-454 nm quando ligado ao DNA. Por fim, as lâminas foram lavadas mais uma vez com PBS 1x para retirar o excesso de DAPI e montadas utilizando uma solução de glicerol 60% como meio de montagem, sob lamínula de vidro.

3.5 Caracterização das células imunes por citometria de fluxo

O protocolo foi realizado seguindo método já padronizado em trabalhos anteriores (LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014; ROCHA-RESENDE; WEINHEIMER; BAJPAI; ADAMO *et al.*, 2019; ROCHA-RESENDE; YANG; LI; KREISEL *et al.*, 2020). Os animais dos quatro grupos foram eutanasiados por deslocamento cervical e o coração coletado, perfundido com solução DB e pesado. O tecido cardíaco foi cortado e digerido com Colagenase I (Sigma; 300 U/mL) e DNase I (Sigma; 60 U/mL) em um volume final de 3 mL de HBSS por 30 minutos à 37° C sob agitação. Depois deste período, 6 mL de uma solução de HBSS (2% FBS/2% BSA) foram adicionados para bloquear a atividade enzimática. O material digerido foi filtrado utilizando um filtro de 40µM e centrifugado (400 xg, 5 min). Eritrócitos foram lisados utilizando tampão ACK (ACK Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) (12 minutos no gelo). As células remanescentes foram ressuspensas em 200uL de tampão de FACS (2% FBS, 2 µM EDTA em PBS estéril) e incubadas com os anticorpos apresentados na tabela 2 por 40 min à 4°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACS. Os dados foram adquiridos no equipamento BD LSRFortessa, do Laboratório Institucional em Pesquisa em Biomarcadores, da Faculdade de Farmácia, e nas análises estão expressos em número de células/mg de tecido. A análise da citometria de fluxo foi feita utilizando o software FlowJo v10. Após o *gating* das células CD45+, demonstrado na Figura 10, os *doublets* foram excluídos.

A

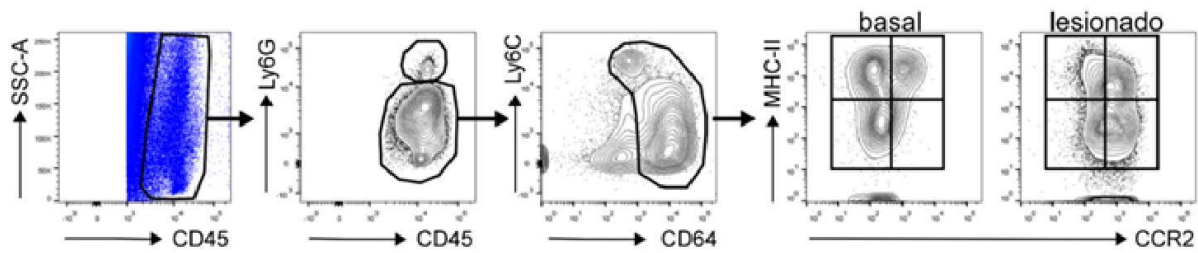


Figura 10: Estratégia de *gating* das populações leucocitárias. Em A, leucócitos são as células CD45⁺; neutrófilos são células CD45⁺Ly6G⁺; monócitos são células CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}CD64^{int}; macrófagos são células CD45⁺Ly6G⁻Ly6C^{int}CD64^{high}. O pool de macrófagos e monócitos foi analisado em um *gating* subsequente para avaliar a expressão dos marcadores MHC-II e CCR2. Células mortas e doublets foram excluídos da análise. Legenda: int=intermediário.

Anticorpo	Catálogo	Marca	Diluição
CD45 (PerCP-Cy5)	#103132	BioLegend	1:500
Ly6G (FITC)	#127606	BioLegend	1:500
CD64 (PE)	#139304	BioLegend	1:500
Ly6C (APC)	#128016	BioLegend	1:500
MHC-II (APC-Cy7)	#107628	BioLegend	1:500
CCR2 (BV421)	#150605	BioLegend	1:500

Tabela 2: Relação de anticorpos com seus respectivos números de catálogo, marcas e diluições utilizados no experimento de citometria de fluxo.

3.6 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, os cortes foram fixados com uma solução de PFA 4% por 15 minutos, no fim sendo lavados com PBS 1x. Em seguida, os cortes transversais foram incubados com WGA por 15 minutos, seguindo uma lavagem com PBS 1x. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado utilizando uma solução de BSA 3% diluída em PBS 1x-0.3% de Triton-X por 30 minutos, em câmara úmida. Após lavar o BSA 3% utilizando BSA 1%, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos

primários: anti-CD68 e anti-NFAT (fator nuclear das células T). Os anticorpos foram diluídos na mesma solução de bloqueio e incubados em câmara úmida a 4°C overnight. No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1x e incubados com os anticorpos secundários por 2h a 4°C. Os controles negativos foram realizados utilizando o mesmo protocolo, porém na ausência dos anticorpos primários. Após as 2h, as lâminas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI por 5 minutos. Por fim, o excesso de DAPI foi retirado lavando as lâminas com PBS 1x e as lâminas montadas utilizando glicerol 60%, sob lamínulas de vidro. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio de fluorescência da Zeiss ApoTome, no aumento de 20x, e a quantificação do sinal fluorescente foi feita utilizando o software Zen (Blue Edition, versão 2.5). O sinal fluorescente capturado foi normalizado pela respectiva área selecionada para análise. As tabelas contendo os anticorpos primários e secundários utilizados para os experimentos encontram-se a seguir

Anticorpos Primários e sondas fluorescentes	Catálogo	Marca	Diluição
Rat Anti-CD68	MCA1957	BioRad	1:400
Mouse Anti NFAT	sc-8405	Santa Cruz Biotechnology	1:200
DAPI	D8417	Sigma Aldrich	1:500
WGA	W32464	ThermoFisher	1:250

Tabela 3: Anticorpos primários e sondas fluorescentes utilizados nos experimentos.

Anticorpos Secundários	Catálogo	Marca	Diluição
Alexa 488 Goat Anti Rat	A11006	ThermoFisher	1:200
Alexa 488 Goat Anti Mouse	A11001	ThermoFisher	1:200

Tabela 4: Anticorpos secundários utilizados para os experimentos de imunofluorescência.

3.7 Avaliação da deposição de colágeno por PicroSirius

O SiriusRed é um corante histológico que marca em vermelho o colágeno total presente no tecido. Aqui, utilizamos um protocolo de hidratação e desidratação do tecido antes de incubar com a solução de SiriusRed, conforme descrito em (HADI; MOUCHAERS; SCHALIJ; GRUNBERG *et al.*, 2011). Esta minimiza o *background* de marcação do corante no interstício cardíaco, otimizando a qualidade das imagens e das análises. Após esta etapa de hidratação, os cortes foram incubados na solução de SiriusRed por 45 minutos exatos. Este tempo de incubação com PicroSirius é crucial para a ótima coloração do tecido, onde tempos superiores podem aumentar o *background* de forma irreversível e tornar inviável as análises. Após o PicroSirius, os cortes passaram por mais uma etapa de desidratação, e por último incubados em solução de ácido clorídrico a 0,01 mol/L por 1:30 min. Finalmente, as lâminas foram seladas utilizando Entellan™ (Merck) sob lamínula de vidro. As imagens foram capturadas em microscópio de campo claro (Zeiss), em aumento de 40x, e analisadas utilizando o software Image ProPlus (versão 4.5.0.29). Toda a marcação vermelha presente no tecido foi considerada deposição de colágeno total, e o valor foi normalizado pela respectiva área selecionada para análise.

3.8 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting

Os tecidos cardíacos que estavam conservados em um freezer -80 foram descongelados e sofreram homogeneização por 30 minutos em um tampão de lise (NaCl, 100 mM; Trisbase, 50 mM; EDTA-2Na, 5 mM; Na₄P₂O₇·10H₂O, 50 mM; MgCl₂, 1 mM, em pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0.3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15.7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (NaF, 20 mM; Na₃VO₄, 1 mM). Após isso, performou-se a centrifugação do material por 12 min, 8.000 rpm a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi coletado e acondicionado em freezer -80°C para posterior uso. A quantificação da concentração de proteínas foi realizada seguindo o método descrito previamente (Bradford, 1976).

Para realizar o experimento *per se*, 30-40 μg de proteínas foram separados em um gel de poliacrilamida, cuja concentração do gel de separação variou de entre 10-12% de acordo com a massa molecular da proteína de interesse. Em seguida, as amostras passaram por um aquecimento a 95°C por 5 min quando o alvo era uma proteína citoplasmática, ou a 37°C por 10 min para proteínas membranares. A corrida foi realizada com uma voltagem de 120V e tempo de até 120 min. Para a transferência utilizou-se o aparelho de transferência semi-dry (BioRad), na voltagem de 20V, com o tempo de transferência variando entre 30 e 40 min. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (Tris-Buffered Saline; NaCl, 150 mM; Tris, 25 mM e 0,05% de Tween 20, em pH 8,0). O bloqueio das membranas foi performedo utilizando solução de TBS-T com leite desnatado a 5% por 1 hora, em temperatura ambiente e agitação constante. As membranas foram então incubadas overnight, a 4°C, com anticorpos primários diluídos em solução de leite 1% em TBS-T. Na tabelas **X e Y**, encontram-se os anticorpos primários e secundários utilizados para os experimentos, e suas respectivas diluições

Anticorpos Primários	Catálogo	Marca	Diluição
Rabbit anti β 2-AR	PA5-27083	ThermoFisher Scientific	1:500
Rabbit anti Caspase-1	sc-56036	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Mouse anti PYCARD (ASC)	sc-514414	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Mouse anti-GAPDH	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology	1:3000
HRP anti-HSP90 α/β	sc-13119	Santa Cruz Biotechnology	1:3000
Rabbit anti NLRP3	sc-pa579740	Santa Cruz Biotechnology	1:2000

Tabela 5: Relação dos anticorpos e diluições utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

Anticorpos Secundários	Catálogo	Marca	Diluição
Anti-Rabbit	A0545	Sigma-Aldrich	1:15000
Anti-Mouse	A2554	Sigma-Aldrich	1:15000

Tabela 6: Anticorpos secundários e suas diluições para os experimentos de Western Blotting.

3.9 Análise estatística

Os dados foram estratificados e a normalidade testada utilizando o software GraphPad Prism. Caso a distribuição normal dos dados fosse atestada, o teste estatístico One Way ANOVA era aplicado seguindo o pós teste estatístico de Tukey. Inobstante, aplicamos o teste estatístico paramétrico mais indicado pelo software. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0.05$, e o erro será apresentado como erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 O tratamento leva a uma perda de peso maior dos animais tratados no ZT12

72h após administrarmos o ISO no ZT0 (7h da manhã) e ZT12 (19h), os animais foram pesados antes dos sacrifícios. Os espécimes tratados no ZT12 tiveram uma variação de peso maior do que os animais tratados no ZT0, como é possível observar na Figura 11. É importante salientar que após o tratamento com ISO, é característico haver uma perda de mobilidade dos animais. Por isso, colocamos ração no fundo da gaiola destes animais tratados, para facilitar a sua alimentação e limitar os vieses. Sem embargo, os animais tratados com ISO tiveram uma perda de peso estatisticamente relevante, como demonstrado na Figura 11.

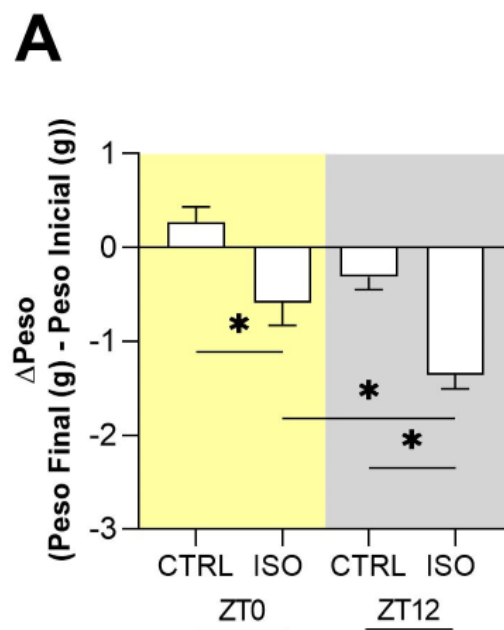


Figura 11: Os animais tratados com ISO no ZT12 perdem mais peso. Três dias após o tratamento com ISO observamos que os animais tratados no ZT12 perderam mais peso do que os animais tratados no ZT0, como pode ser observado na imagem. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.2 O ISO induz um aumento maior do peso do coração no ZT12

Em seguida, decidimos avaliar as alterações morfométricas no tecido cardíaco 72h após o tratamento com ISO. Após os animais serem sacrificados e o tecido cardíaco limpo, retirado e pesado, a massa do coração (em mg) fora então normalizada pelo peso corporal do animal (em g) e pelo comprimento da tíbia (em mm). Houve um aumento do peso do coração tanto corrigido pelo peso corporal quanto pelo comprimento da tíbia dos animais tratados em ambos os ZTs, como pode ser observado na Figura 12:

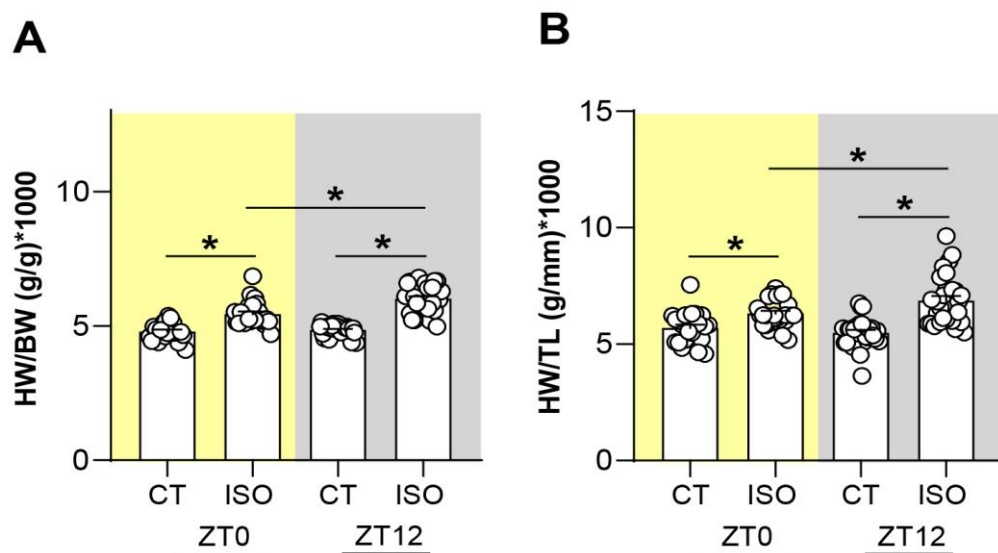


Figura 12: O tratamento com ISO induz um aumento maior do peso do coração corrigido pelo peso corporal e pelo tamanho da tíbia no ZT12. Como pode ser observado nos gráficos, o tratamento com ISO eleva a massa do tecido cardíaco corrigido pelo peso corporal **(A)** e pelo comprimento da tíbia **(B)** em ambos os ZTs. Porém de forma importante, há um aumento maior do peso do coração dos animais tratados no ZT12 vs ZT0. Legenda: HW= heart weight (peso do coração); BW= body weight (peso corporal); TL= tibia length (comprimento da tíbia). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.3 Hipertrofia da fibra cardíaca está mais exacerbada em animais tratados com ISO no ZT12

Após obtermos os dados do aumento do peso dos corações, decidimos avaliar se estaria havendo alterações hipertróficas a nível celular dos cardiomiócitos. Para isso, utilizamos cortes transversais do tecido cardíaco que foram processados utilizando a sonda fluorescente WGA, que têm afinidade por glicoproteínas presentes na membrana celular. Desta forma, torna-se possível mensurar a área das células presentes no tecido. Importante reforçar que coletamos a área apenas dos cardiomiócitos que se apresentaram em projeção transversal, para obtermos a área transversal (cross sectional area, ou CSA) destas células. Como pode ser observado na Figura 13, houve um aumento da CSA dos cardiomiócitos dos animais tratados em ambos os ZTs. Porém, este aumento foi maior no ZT12 vs ZT0.

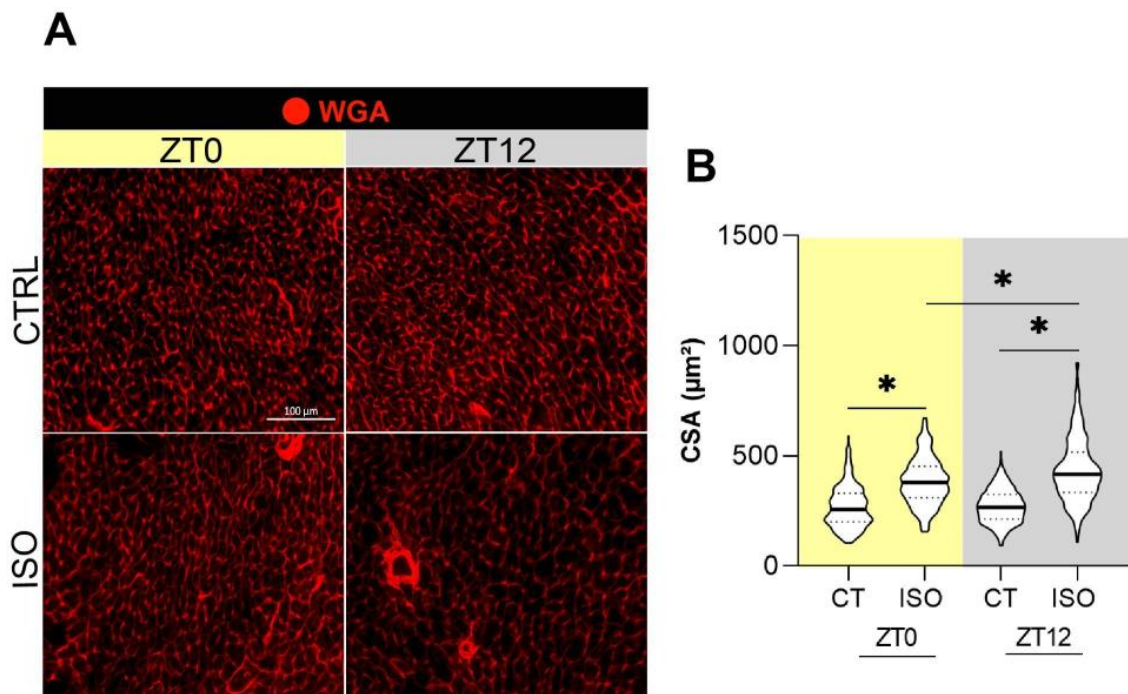


Figura 13: O tratamento com ISO induz um aumento maior da área transversal dos cardiomiócitos no ZT12. Avaliamos a CSA dos cardiomiócitos utilizando a sonda fluorescente WGA, que têm afinidade pela membrana celular, como pode ser observado na imagem **A**, em vermelho. Após isso, quantificamos a área das células em corte transversal e observamos um aumento da CSA em ambos os ZTs após tratamento com ISO, porém este aumento é maior no ZT12. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.4 Tratamento com ISO não induz um aumento da deposição de colágeno total no coração

Como houve um processo de remodelamento hipertrófico do coração após a intoxicação catecolaminérgica, decidimos avaliar a deposição de matriz extracelular no interstício do tecido. Para isso, realizamos um experimento histológico utilizando a coloração de PicroSirius, que marca com a coloração vermelha toda a matriz colágena presente no tecido. Como pode ser observado na Figura 14 e Figura 15, não houve aumento da deposição de colágeno total após três dias de tratamento com ISO.

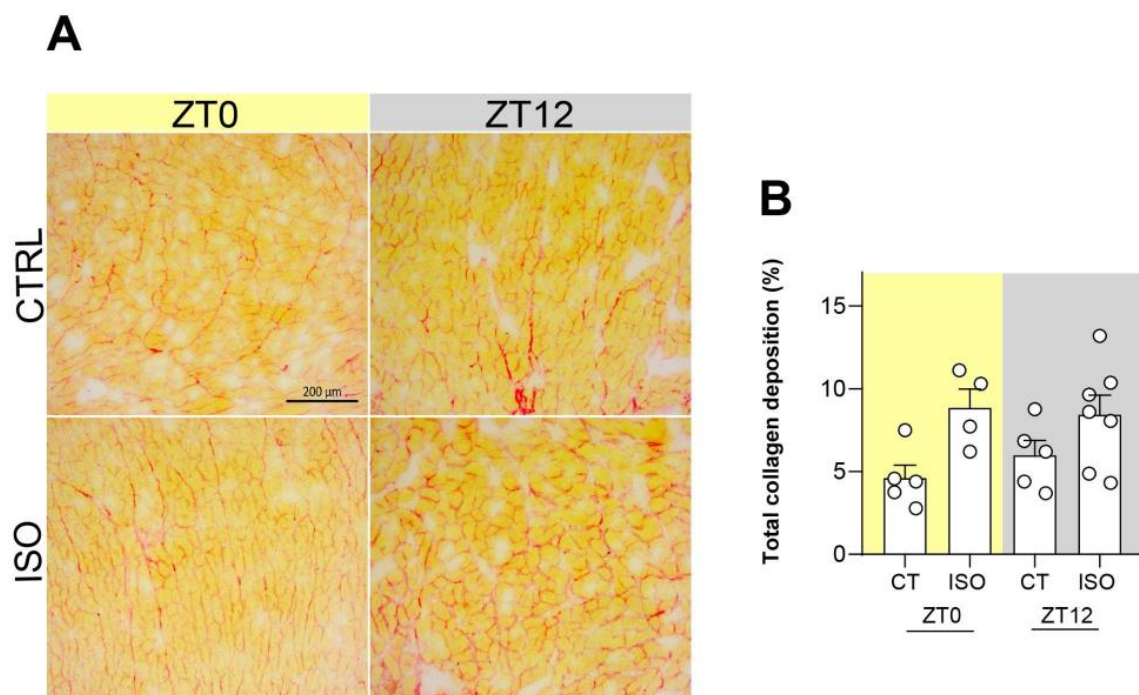


Figura 14: o tratamento com ISO não induz um aumento da deposição de colágeno total no tecido cardíaco. Como pode ser observado no painel representativo acima, em **(A)**, não há aumento estatisticamente significativo da deposição de colágeno no interstício do coração. O gráfico de barras em **(B)** indica a quantificação do sinal vermelho presente nos cortes, que representa o colágeno presente entre as células cardíacas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

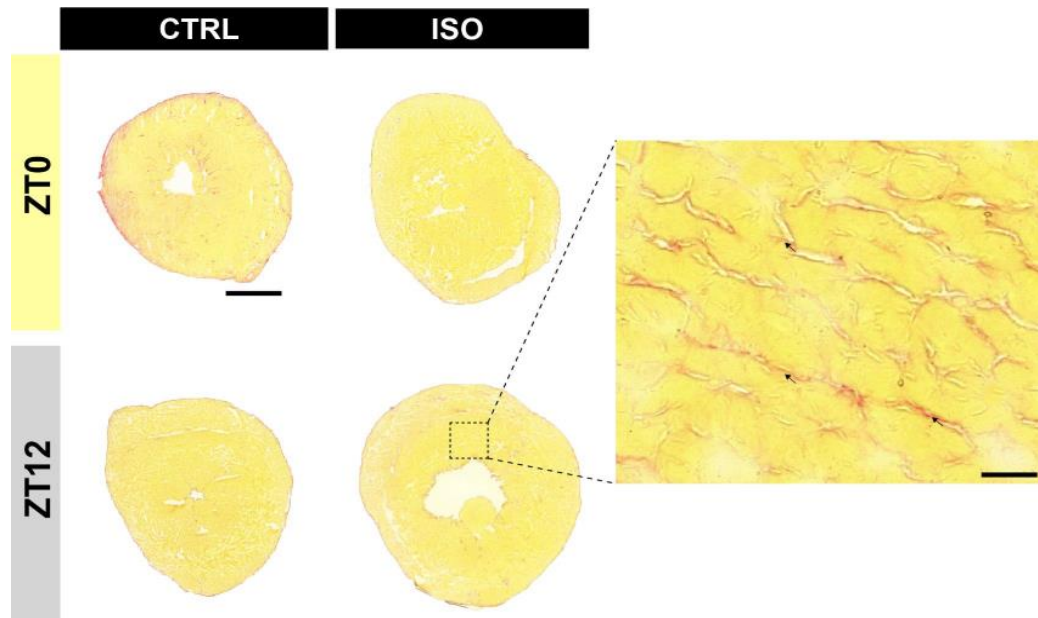


Figura 15: imagens representativas de cortes transversais do coração inteiro, demonstrando que o ISO não induz aumento da deposição de colágeno. A figura acima demonstra um corte do coração inteiro (whole donut) após o tratamento com ISO em ambos os ZTs. Como pode ser visto na imagem ampliada do grupo ISO ZT12, o tratamento não induziu um aumento da deposição de colágeno total. As setas pretas indicam a presença de colágeno intersticial entre as células do parênquima cardíaco. Barra de escala = 2000 μ M (coração inteiro) e 50 μ M na figura ampliada.

4.5 O ISO não induz um aumento de células YFP+ dos animais reporter MYH7-YFP

Após obtermos os resultados do experimento de deposição de colágeno total, decidimos avaliar como estaria a expressão da cadeia pesada de miosina do subtipo β (β -MHC), também conhecida por MYH7. Esta proteína é expressa em camundongos no coração principalmente durante o desenvolvimento embrionário, e deixa de ser expressa conforme o espécime amadurece, sendo substituída pelo subtipo α (α -MHC). Porém, em situações de estresse, principalmente quando há deposição de matriz extracelular no coração, a β -MHC é reexpressa, sendo um indicativo de fibrose cardíaca. Tratamos os animais reporter MYH7-YFP com ISO, porém não verificamos significância estatística entre os grupos analisados, como pode ser visto na Figura 16:

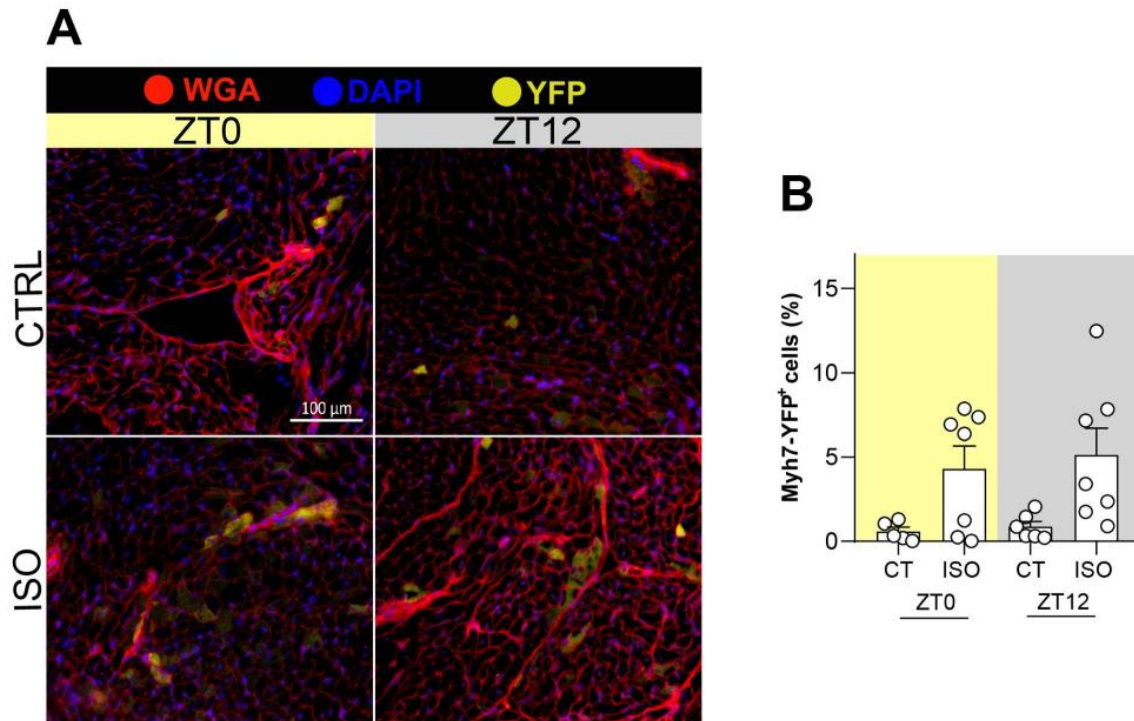


Figura 16: O tratamento com ISO não induz um aumento da reexpressão do β -MHC em animais reporter MYH7-YFP. Como pode-se visualizar na imagem (A), não há um aumento da porcentagem de cardiomiócitos YFP+ no coração após o tratamento com ISO. Em (B), temos um gráfico de barras resumindo a porcentagem de células YFP+ pelo total de células presentes em cada corte. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.6 O tratamento com ISO induz um aumento de NFAT apenas no ZT12

Após os resultados anteriores demonstrarem uma possível hipertrofia do tecido após o tratamento com ISO, decidimos avaliar a expressão de componentes relacionados às vias de sinalização hipertróficas no coração. Por imunofluorescência avaliamos as concentrações *in situ* do NFAT, um fator de transcrição que além de estar envolvido na hipertrofia cardíaca também participa da resposta inflamatória. Constatamos que houve um aumento da expressão do NFAT apenas no ZT12 após o tratamento com ISO, corroborando com os resultados anteriores que apontavam uma hipertrofia cardíaca mais acentuada nos animais tratados neste horário do dia. Como é possível visualizar na imagem A da Figura 17, houve um aumento da intensidade do sinal fluorescente do NFAT, em verde, apenas nos animais tratados no ZT12. Em B,

representamos a quantificação deste sinal normalizado pela área em um gráfico de barras.

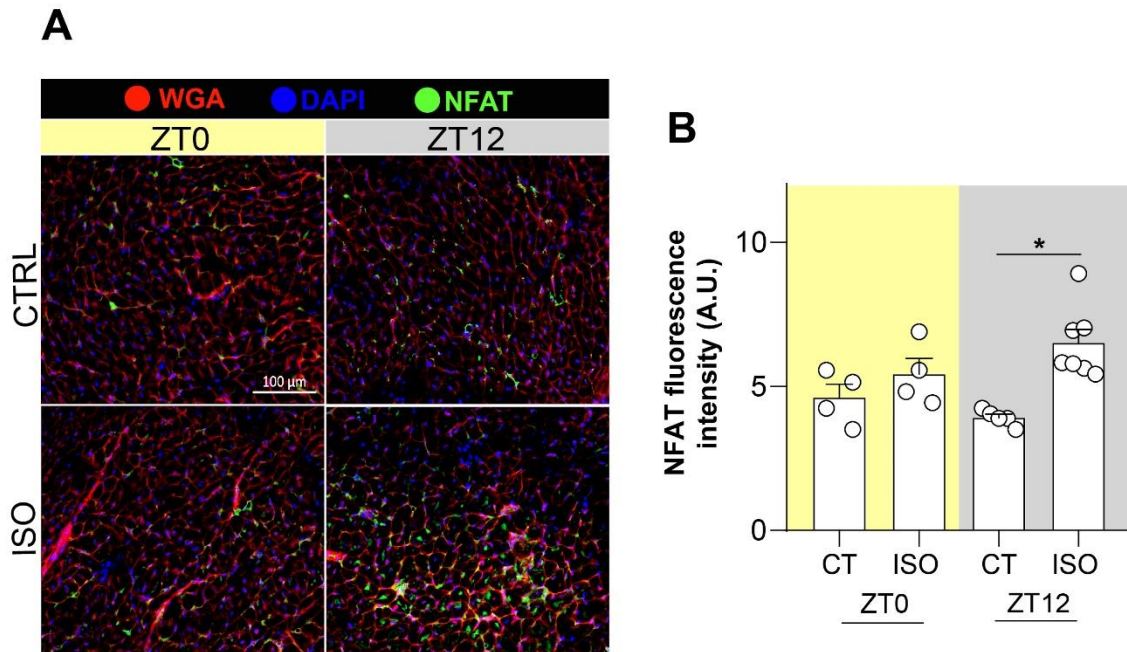


Figura 17: O tratamento com ISO induz um aumento da expressão de NFAT apenas no ZT12. O NFAT é um fator de transcrição nuclear envolvido com a hipertrofia cardíaca e inflamação, e geralmente encontra-se elevado em situações de estresse. Na imagem (A) pode-se observar um painel representativo contendo cortes transversais do tecido cardíaco processados por imunofluorescência. O azul representa o DAPI (que marca o núcleo das células), em vermelho o WGA (para visualização da membrana celular) e em verde o sinal do NFAT. O gráfico B representa a quantificação da intensidade do sinal fluorescente verde, do NFAT. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

Até aqui, constatamos que o tratamento com ISO induz uma hipertrofia cardíaca mais exacerbada nos animais tratados no ZT12, desta forma, achamos interessante avaliar as alterações morfológicas e celulares que estariam envolvidas na resposta pró-hipertrofica diferencial após o tratamento com ISO, entre os ZTs.

4.7 O tratamento com ISO induz mais alterações morfológicas no coração no ZT12 72h após o insulto

Realizamos um experimento histológico utilizando hematoxilina e eosina (H&E), e um experimento de imunofluorescência em cortes criopreservados do tecido cardíaco,

sendo o alvo escolhido para a imunofluorescência o CD68, que é uma proteína muito expressa por macrófagos residentes e monócitos (*pan-macrophage marker*). Primeiramente para o experimento de H&E (Figura 18), nos animais tratados com ISO há presença relevante de células imunes no parênquima tecidual, com discrepante diferença no padrão de distribuição deste infiltrado entre os ZTs. No ZT0, é possível analisar a presença de um infiltrado discreto, difuso e muitas vezes próximo a vasos sanguíneos. Este infiltrado encontra-se principalmente no material extracelular, entre os cardiomiócitos, onde possivelmente exercem os seus efeitos fagocíticos. Também há a presença de um material amorfo eosinofílico indicativo de necrose tecidual, em diversas regiões do corte.

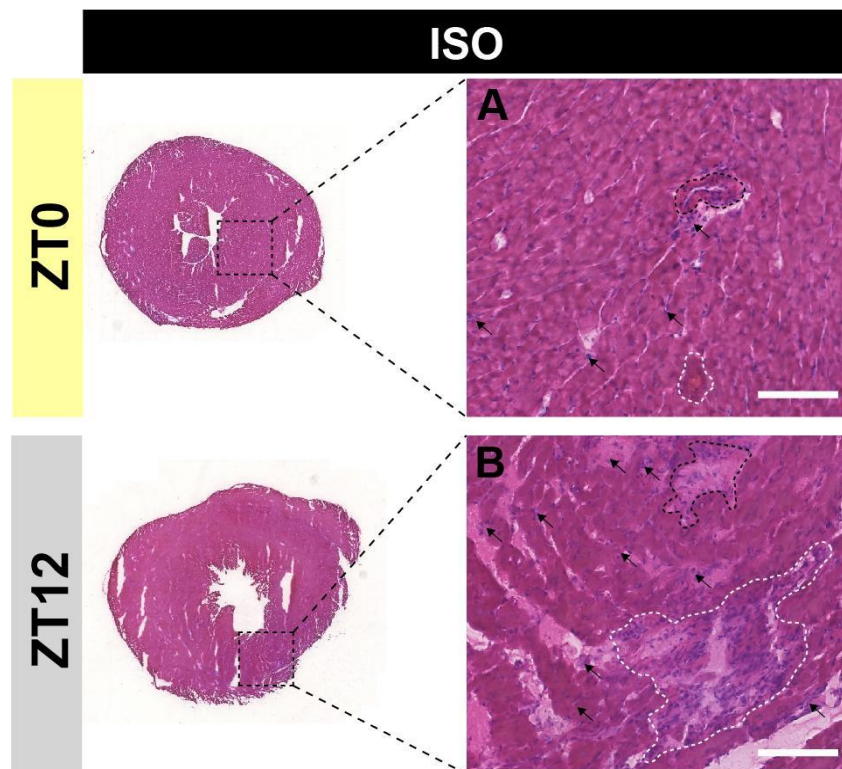


Figura 18: O tratamento com ISO induz alterações histopatológicas e a presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco após 72h. Como é possível observar no painel acima de um corte transversal do tecido cardíaco corado com H&E, o tratamento com ISO induz alterações histopatológicas no parênquima cardíaco. Em **(A)**, as setas pretas indicam a presença de células imunes difusas pela área fotografada. A área circunscrita pontilhada em branco indica a presença de um pequeno vaso, onde em seu entorno é possível avaliar a presença de células imunes. A área pontilhada em branco indica a presença de um material amorfo eosinofílico depositado no tecido, sendo indicativo de necrose tecidual. Em **(B)**, é nítida a presença mais pronunciada de infiltrado inflamatório no tecido, mais distribuído e agregado em regiões do coração, como representado pela área pontilhada

em branco. As setas pretas indicam a presença de células imunes difusas pelo tecido, e a área pontilhada em preto um material amorfo eosinofílico depositado no tecido, que também está presente em outras regiões do corte, sendo um indicativo relevante de necrose tecidual. Barra de escala = 100µM.

Entretanto, no ZT12 a presença de células imunes no tecido é categoricamente mais abundante. Ora este infiltrado encontra-se disperso pelo tecido, outra se acumula em *clusters* de células imunes, com a presença de deposição de material amorfo eosinofílico em seu interior. Nestes animais, a presença de alterações histopatológicas indicativas de necrose tecidual é muito mais abundante, com uma presença difusa de matéria eosinofílica e amorfa por todo o corte. As células imunes presentes no corte também se encontram entre os cardiomiócitos.

4.8 O tratamento com ISO induz um aumento da fluorescência *in situ* de CD68 restrito ao ZT12

Após notarmos pelo experimento histológico de H&E que houve, qualitativamente, mais alterações histomorfológicas no parênquima cardíaco quando os animais eram tratados com ISO no ZT12, decidimos avaliar de forma progressivamente mais quantitativa os motivos. Por verificarmos a presença de um infiltrado inflamatório, decidimos realizar um experimento de imunofluorescência para o CD68, uma proteína que é expressa em macrófagos. De forma imperativa, observamos que o tratamento com ISO induziu um aumento do sinal fluorescente para o CD68 restrito ao ZT12, como pode ser visto na Figura 19A-B. Importante notar que o sinal fluorescente se apresenta difuso pelo parênquima tecidual (Figura 19A), aglomerados em *clusters*, ou grumos, assim como fora observado pelo experimento de H&E (Figura 18).

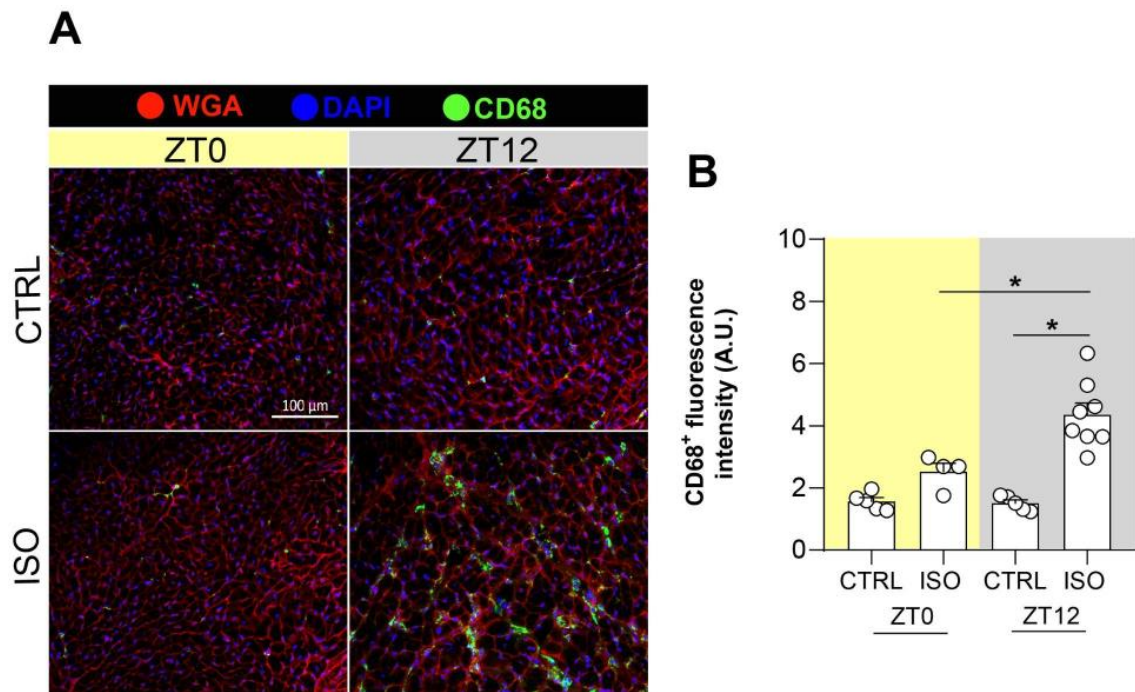


Figura 19: Há um aumento de células CD68+ apenas no ZT12 após tratamento com ISO. A partir de um experimento de imunofluorescência para a proteína CD68, presente em macrófagos e monócitos, observamos um aumento restrito ao ZT12. Em **(A)** é possível observar uma elevação do sinal apenas no ZT12, que foi confirmado pela quantificação da intensidade do sinal fluorescente representado no gráfico de barras **(B)**. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.9 A inflamação cardíaca mais grave é observada nos animais tratados com ISO no ZT12

Após observarmos um aumento da hipertrofia e da expressão *in situ* de CD68 após o tratamento com ISO mais proeminente nos animais tratados no ZT12, decidimos avaliar o perfil de células inflamatórias no coração por citometria de fluxo. Uma vez que a inflamação é um componente homeostático importante quando há remodelamento cardíaco hipertrófico, realizamos um experimento de citometria de fluxo nos animais tratados nos ZT0 e ZT12. Três dias após o tratamento com ISO, foi observada uma diferença estatística no número de leucócitos cardíacos entre o grupo controle e o grupo tratado no ZT12, como pode ser observado na Figura 19-A. Ao contrário, no ZT0, não foi observado aumento significativo no número de leucócitos no coração dos animais do ZT0. Além disso, comparando ambos os grupos tratados com ISO, foi observado um aumento significativo de quase 3 vezes no número de

leucócitos no coração dos animais tratados com isoproterenol do ZT12 em comparação ao ZT0. Um perfil semelhante foi observado para o número de neutrófilos (Figura 19-B) e macrófagos/monócitos (Figura 19-C).

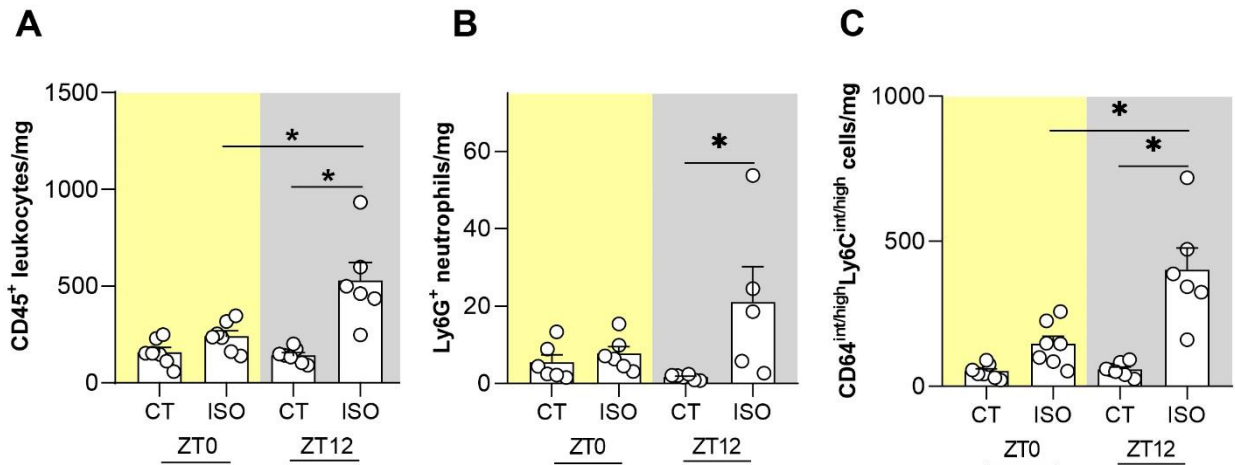


Figura 20: Tratamento com ISO induz aumento significativo do número de leucócitos, neutrófilos e macrófagos/monócitos no coração apenas no ZT12. Gráficos de barras demonstrando o número de leucócitos (A), neutrófilos (B) e macrófagos/monócitos no coração (C), quantificados em um experimento de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

Como os macrófagos são o tipo celular que mais aumentou nestas condições experimentais, nós decidimos investigar as subpopulações de macrófagos envolvidas neste fenótipo. Para isso, realizamos um *gating* subsequente para avaliar a expressão dos marcadores MHC-II e CCR2. A Figura 20 detalha a composição de macrófagos cardíacos nos ZT0 e ZT12 nos animais tratados com isoproterenol. Foi observado um aumento significativo no número de macrófagos derivados de monócitos (CCR2⁺MHC-II^{high}) nos animais tratados com isoproterenol tanto ZT0 quanto no ZT12, sem diferença estatística entre os ZTs (Figura 20-A). Adicionalmente, foi observado um aumento significativo no número de monócitos (CCR2⁺MHC-II^{low}) nos animais tratados com ISO no ZT12, o que não foi observado no ZT0 (Figura 20-B). Mais interessante ainda é que houve um aumento em mais de 3 vezes no número de monócitos CCR2⁺MHC-II^{low} no grupo ZT12/ISO quando comparado ao grupo ZT0/ISO mostrando que existe um influxo maior de monócitos para os corações dos animais tratados à noite (figura 20-B). Foi também observada diferença estatística entre os

ZT0 e ZT12 quanto ao número de macrófagos CCR2-MHC-II^{low} nos corações tratados com ISO (Figura 20-D), mas sem alteração no número de células CCR2-MHC-II^{high} (Figura 20-C).

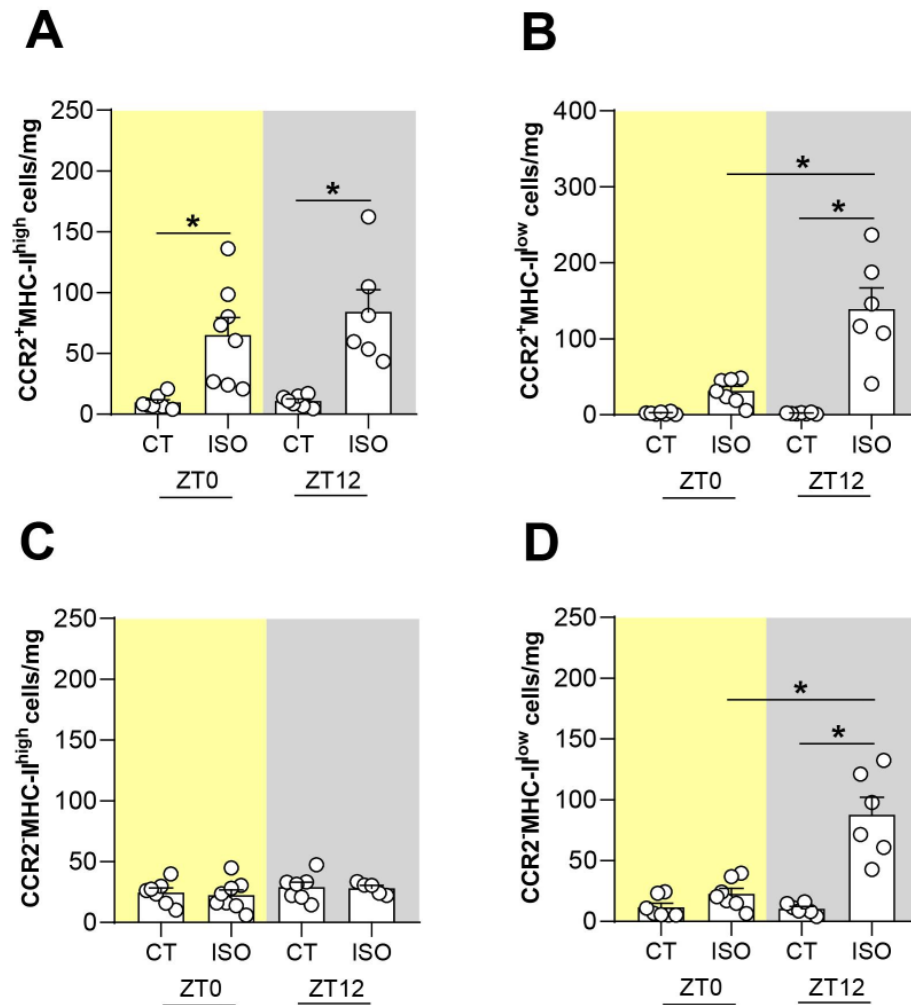


Figura 21: Tratamento com ISO leva a aumento do número de monócitos no tecido cardíaco quase 3 vezes maior no ZT12 em comparação ao ZT0. Gráficos de barra representando a quantificação do número de macrófagos CCR2⁺MHC-II^{high} (A), CCR2⁻MHC-II^{high} (C) ou CCR2⁻MHC-II^{low} (D) e monócitos CCR2⁺MHC-II^{low} (B) no tecido cardíaco, por citometria de fluxo, após 3 dias de tratamento com ISO na dose única de 300mg/kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.10 O tratamento com ISO induz morte celular em ambos os ZTs

Após os resultados anteriores indicarem que o ISO induz um maior influxo de leucócitos, neutrófilos e principalmente macrófagos/monócitos no ZT12, partimos para investigar se haveria grau de lesão diferencial entre os ZTs que justificasse estes achados. Como a morte celular e necrose tecidual são um dos componentes iniciais da patogênese da CT, investigamos-nas por um experimento onde utilizamos o Evans Blue, um corante que possui afinidade por células necróticas. Este corante acumula-se em azul nestas células, tornando possível sua visualização em microscopia de campo claro ou de fluorescência, no comprimento de onda de 555 nm, como demonstrado na imagem a da Figura 22A:

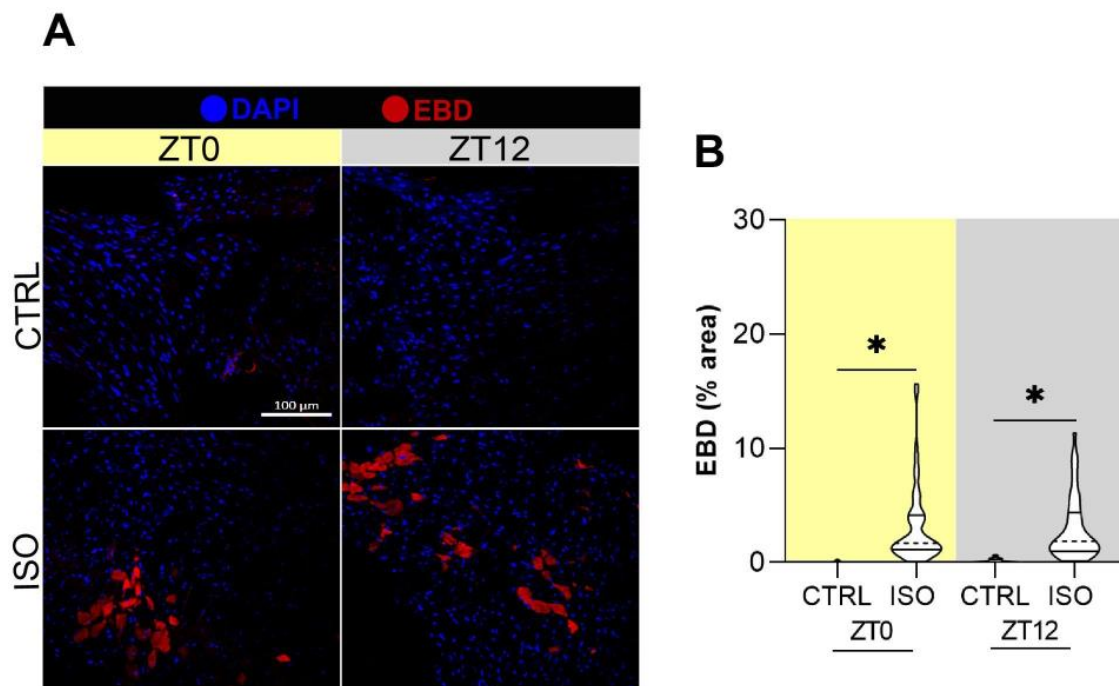


Figura 22: O tratamento com ISO induz um aumento da morte celular em ambos os ZTs. Os animais foram tratados com ISO nos ZT0 e ZT12 e após 6h de tratamento (ZT6 e ZT18), fora injetado o Evans Blue Dye (EBD) a 1%. Verificamos na imagem **A** que houve um aumento de células positivas para o Evans Blue (representadas em vermelho no painel representativo) nos animais tratados com ISO. Porém, este aumento não foi distinto entre os grupos. Legenda: EBD= Evans Blue Dye. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

A quantificação do número de células que acumularam o corante por campo, nos demonstrou que houve um aumento da porcentagem de células necróticas após o tratamento com ISO, em ambos os ZTs, sem diferença entre eles (Figura 22B). Sendo

assim, nossa hipótese é de que há um recrutamento diferencial de macrófagos para o coração no ZT12. Para começar a investigar isto, decidimos avaliar a expressão proteica do inflamassomo NLRP3, envolvido com a resposta imune diante tratamento com ISO.

4.11 Avaliação da expressão de proteínas envolvidas com a ativação do inflamassomo NLRP3

Após constatararmos pela citometria de fluxo que estava havendo um recrutamento diferencial de monócitos no ZT12, sem diferenças no grau de lesão entre os ZTs, e pela imunofluorescência para CD68 uma presença maior de macrófagos no ZT12, nos perguntamos quais seriam as razões moleculares para tal fenômeno. Primeiramente decidimos avaliar a expressão proteica de proteínas *downstream* à ativação do inflamassomo NLRP3 72h após o tratamento com ISO. O inflamassomo NLRP3 é um componente importante no remodelamento cardíaco induzido por ISO (SUETOMI; WILLEFORD; BRAND; CHO *et al.*, 2018). Para isso, avaliamos a expressão proteica total de ASC (também conhecida por PYCARD ou do inglês *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), uma proteína que forma um dímero com a caspase-1 para ativar a via *downstream* do NLRP3. Como pode ser observado nos gráficos de barra da Figura 23, os dados ainda permanecem estatisticamente inconclusivos.

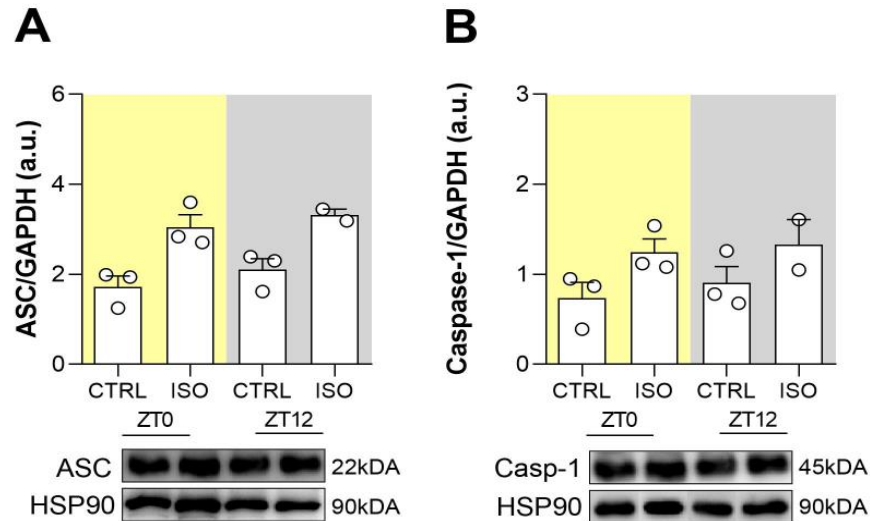


Figura 23: avaliação da expressão proteica de ASC e Caspase-1. Como pode ser observado nos gráficos de barra acima, avaliamos a expressão das proteínas ASC (**A**) e Caspase-1 (**B**), envolvidas na ativação do inflamassomo NLRP3. Entretanto, até então os dados permanecem inconclusivos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

Diante destes resultados, nos perguntamos se haveria alterações prévias às 72h ocorrendo no coração que justificassem os fenômenos observados após 3 dias de tratamento. Logo, decidimos avaliar se 24h após o tratamento com ISO haveria já modificações no coração, incluindo presença de infiltrado inflamatório, uma vez que os monócitos começam a adentrar no tecido neste tempo.

4.12 Há perda de peso corporal restrita ao ZT0 24h após o tratamento com ISO

Como pode ser observado na Figura 24, apenas os animais tratados no ZT0 perderam, de forma significativa, peso após o tratamento com ISO. Este resultado foi muito importante, pois nos indicou um perfil distinto de modificações corpóreas nos espécimes 24h após o tratamento com ISO, onde verificamos uma perda de peso maior nos animais tratados no ZT12 72h após o desafio (Figura 11). Em seguida,

avaliamos as medidas do peso cardíaco normalizado pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia, sendo uma observação inicial da hipertrofia cardíaca.

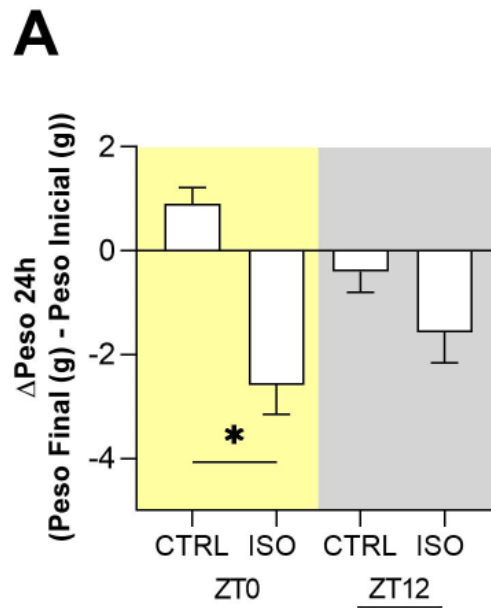


Figura 24: os animais tratados com ISO e sacrificados 24h depois perdem peso somente no ZT0. Após observarmos um aumento de citocinas pró-inflamatórias apenas nos animais tratados no ZT12, notamos que esses animais perderam peso apenas no ZT0, evidência observável no gráfico de barras (A). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.13 O tratamento com ISO aumenta a razão HW/BW apenas no ZT0

Como é possível analisar na Figura 25, a seguir, os animais tratados com ISO obtiveram uma maior razão HW/BW apenas quando receberam o fármaco no ZT0. Este dado contrasta com o dos animais tratados e sacrificados após 72h, onde tanto a razão BW/HW quanto BW/TL aumentaram em ambos os ZTs, porém com um aumento maior no ZT12. É importante ressaltar que houve perda de massa corpórea apenas no grupo de animais tratados com ISO no ZT0. Sendo assim, neste ponto a razão HW/BW não representou um indício importante de hipertrofia cardíaca, pois também não observamos um aumento da razão HW/TL (Figura 25B). Desta forma, seria interessante investigar se estariam havendo alterações a nível tecidual nos cardiomiócitos 24h após o tratamento com ISO, que foi o que fizemos em sequência.

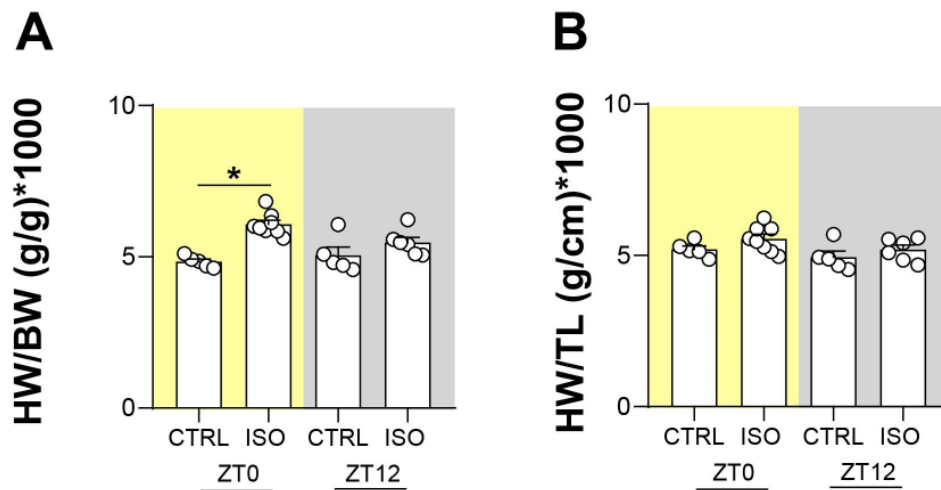


Figura 25: 24h após a administração de ISO apenas os animais tratados no ZT0 têm um aumento da razão HW/BW. Como é possível observar no gráfico de barras em **(A)**, apenas os animais tratados no ZT0 têm um aumento do peso do coração normalizado pelo peso corporal. Em **(B)** não observamos diferenças estatisticamente significativas, dado que contrasta com os obtidos nos animais sacrificados 72h após o insulto com ISO. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

4.14 Há aumento da CSA em ambos os ZTs 24h após o tratamento

Como é possível avaliar na Figura 26, o tratamento com ISO induziu um aumento da CSA em ambos os ZTs, porém, sem diferença entre os animais tratados no ZT0 vs ZT12. Apesar de não termos observado aumento do peso do coração corrigido pela tibia (HW/TL) nos ZTs, o tratamento demonstrou ter impacto em alterações morfoestruturais a nível tecidual dos cardiomiócitos, neste tempo.

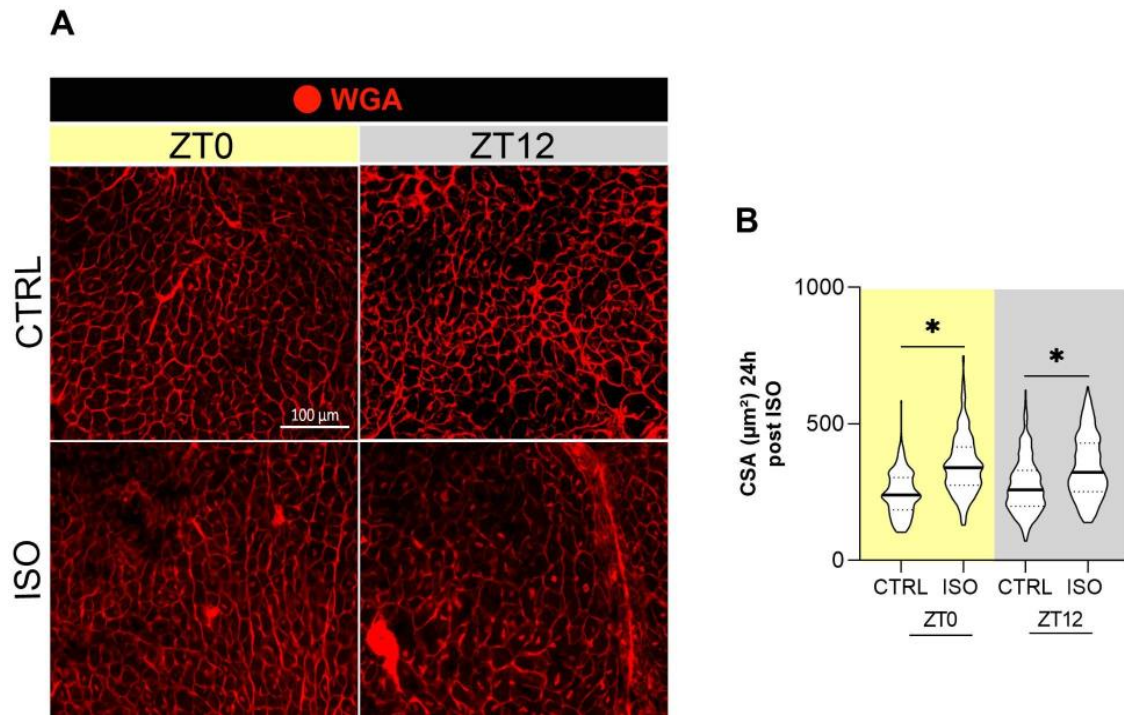


Figura 26: O tratamento com ISO induz um aumento da CSA em ambos os ZTs. Como é possível observar acima, o tratamento com ISO induziu um aumento da área transversal dos cardiomiócitos em ambos os ZTs. Em **(A)**, observa-se em vermelho que houve um aumento da área das células transversas após o tratamento com ISO, fato consagrado pela quantificação da área destas células, representado pelo gráfico de barras em **(B)**. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Kruskal-Wallis

A despeito do contraste notado com os animais sacrificados após 72h de tratamento, decidimos avaliar a presença de células inflamatórias no parênquima cardíaco 24h após o tratamento com ISO, utilizando o anticorpo anti-CD68. Este dado seria de suma importância para começar a entender melhor as alterações cardíacas que ocorrem 72h após o tratamento, onde há relevante presença de infiltrado inflamatório no coração e indícios de influxo maior de monócitos no ZT12.

4.15 O tratamento com ISO induz um aumento dos níveis de células CD68+ apenas no ZT12

O painel representativo na Figura 27 indica um experimento de imunofluorescência realizado nos cortes transversais cardíacos dos animais sacrificados 24h após o

tratamento com ISO. A quantificação da intensidade de fluorescência indica que houve um aumento dos níveis de CD68+ restrito ao ZT12. Este resultado é consonante com o dos animais sacrificados 72h após o tratamento com ISO, onde também houve um aumento da intensidade de fluorescência de CD68 apenas no ZT12.

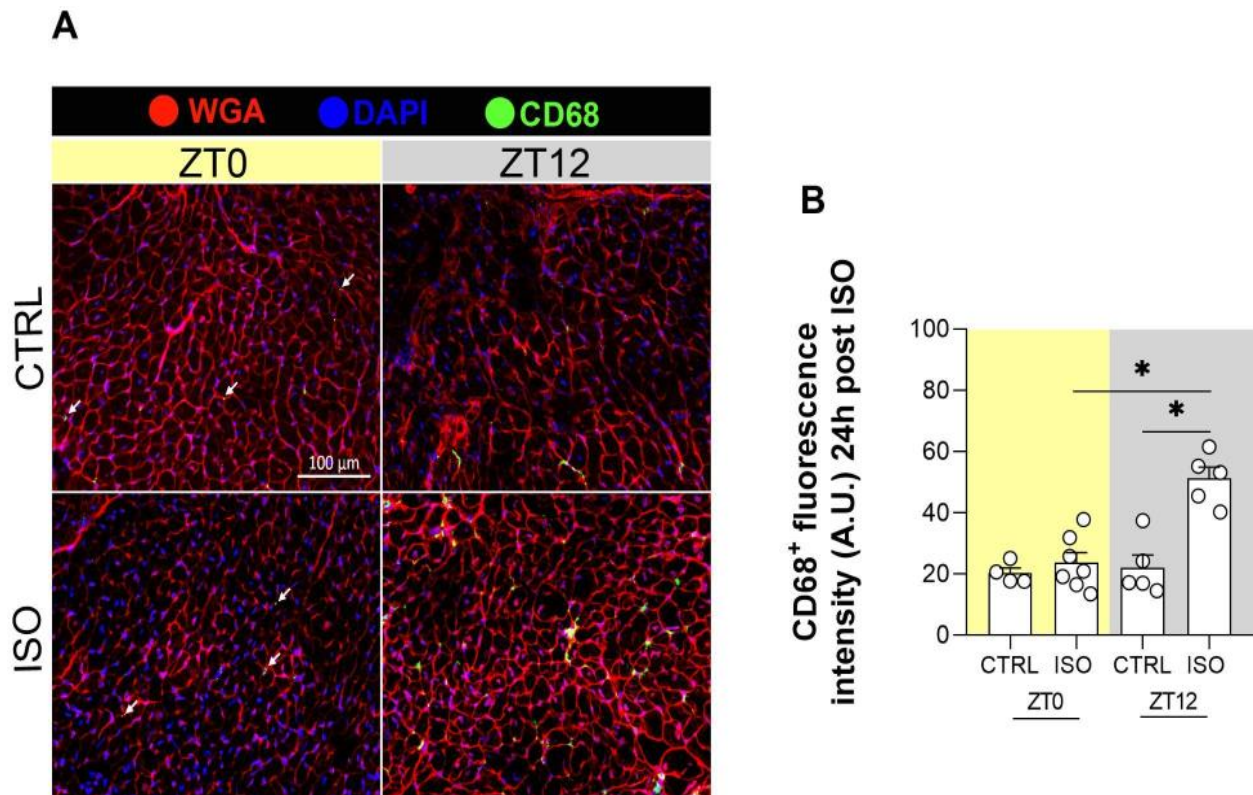


Figura 27: Há um aumento de células CD68+ restrito ao ZT12 24h após o tratamento com ISO. Como pode-se distinguir na figura acima, há um aumento do sinal em verde (A), que representa o CD68 (um marcador de macrófagos) restrito ao ZT12. A quantificação deste sinal fluorescente, que foi corrigido pela área selecionada, indicou que houve um aumento estatisticamente relevante apenas no ZT12 (B). As setas brancas nos grupos CTRL ZT0 e ISO ZT0 indicam a marcação em verde. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*p < 0.05$ vs os demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós teste estatístico Tukey.

Em suma, a análise do tecido cardíaco 24h após o desafio com ISO demonstrou que não existem diferenças no grau de hipertrofia dos cardiomiócitos (Figura 26), apesar de um aumento considerável no número de macrófagos (Figura 27). Apesar de não termos ainda investigado a fundo a identidade dessas células, nossos dados sugerem que exista uma relação causal entre o maior número de macrófagos no

coração no dia 1 (Figura 27) e o remodelamento cardíaco subsequente, 72h após o tratamento com ISO.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez a influência temporal na resposta inflamatória cardíaca após uma sobrecarga de ISO. Camundongos tratados em seu período do dia de maior atividade, durante a transição da fase clara para a escura, no ZT12, apresentaram uma hipertrofia e inflamação cardíaca mais severa em comparação com os camundongos tratados na transição da fase escura para a clara, no ZT0. Os espécimes tratados no ZT12 tiveram uma maior perda de peso (Figura 11A), hipertrofia cardíaca (Figura 12A-B) e dos cardiomiócitos (Figura 13A-B), da expressão de moléculas pró-hipertróficas (Figura 17A-B) e de forma notável, do infiltrado de leucócitos, como neutrófilos e monócitos/macrófagos (Figura 20A-C; Figura 21A-D). Estes achados podem ser compreendidos, até certo ponto, devido ao infiltrado diferencial de monócitos no ZT12. Iniciamos a investigar melhor esta hipótese, onde 24h após o tratamento com ISO, já há um aumento da fluorescência para CD68 (Figura 27). As propostas mecanísticas para a patogênese da CT ainda são obscuras, escassas e muitas vezes contraditórias. Portanto, novas evidências forjadas sob a luz da cronobiologia podem representar um avanço inestimável na compreensão desta doença, uma vez que o tempo tem se mostrado cada vez mais uma força elementar, preditiva e moderadora de todos os eventos fisiológicos e patológicos.

Os animais sacrificados após 72h de tratamento com ISO apresentaram uma maior hipertrofia do coração e celular no ZT12, em conjunto com maior expressão de NFAT. É muito importante salientar que esta resposta hipertrófica do coração é adaptativa, visando a manutenção das funções vitais e metabólicas do órgão e do organismo. Porém, se o estímulo estressor não for resolutivo, esta hipertrofia pode se tornar patológica, evoluindo para perda de função, dilatação dos ventrículos e falência cardíaca (FREY; KATUS; OLSON; HILL, 2004). A ritmicidade diurna da resposta hipertrófica dos cardiomiócitos frente a um desafio de ISO já foi descrita anteriormente por Durgan *et al.*, onde após 7 dias de tratamento com ISO em uma dose de 5mg/Kg/dia os animais apresentaram uma hipertrofia cardíaca maior quando tratados no ZT0 vs ZT12, efeito atenuado em animais CBK e CCM (DURGAN; TSAI; GRENETT; PAT *et al.*, 2011). Antagonicamente, uma semana após uma dose única de 300mg/Kg de ISO há um aumento da expressão de mRNA de ANP, BNP (proteínas

relacionadas com hipertrofia) e β -MHC (como já discutido anteriormente, ela está relacionada principalmente com a fibrose cardíaca) em camundongos, demonstrando que esta variação circadiana da resposta pró-hipertrófica pode estar relacionada com a dose de ISO administrada e o tempo de tratamento. (WALLNER; DURAN; MOHSIN; TROUPES *et al.*, 2016).

Os efeitos pró-hipertróficos do ISO no tecido cardíaco já são bem caracterizados e reconhecidos, uma vez que a ativação dos β -ARs pelo fármaco leva a um aumento do AMPc nos cardiomiócitos e outras células cardíacas que expressam esses receptores (DE LUCIA; EGUCHI; KOCH, 2018). O AMPc age ativando vias de sinalização intracelulares que, dentre diversos efeitos, elevam os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Este Ca^{2+} regula a atividade da calcineurina, que age fosforilando e induzindo a migração do NFATc (porção citoplasmática do NFAT) para o núcleo, onde exercerá os seus efeitos pró-transcricionais (CRABTREE; OLSON, 2002). O complexo calcineurina-NFAT parece ser primordial para a hipertrofia cardíaca em diversas situações fisiopatológicas, uma vez que a inibição localizada da MAPK p38 eleva a atividade do complexo calcineurina-NFAT, levando a uma cardiomiopatia hipertrófica (BRAZ; BUENO; LIANG; WILKINS *et al.*, 2003). Além disso, evidências demonstram que a translocação do NFAT para o núcleo celular da musculatura esquelética apresenta uma ritmicidade circadiana, sendo sua acrofase durante a fase escura (ZT16)(DYAR; CICILIOT; TAGLIAZUCCHI; PALLAFACCHINA *et al.*, 2015). Estes indícios da participação do NFAT na hipertrofia cardíaca são muito relevantes para o fenótipo observado em nosso trabalho, onde apenas os animais tratados no ZT12 tiveram um aumento da expressão total de NFAT (Figura 17A-B) e uma maior CSA dos cardiomiócitos 72h após o tratamento (Figura 13A-B), em comparação com o grupo tratado no ZT0. Além disso, houve um aumento das relações HW/BW e HW/TL maior nos animais tratados no ZT12 (Figura 12A-B), indicando que o coração dos animais tratados no ZT12 passa por um remodelamento hipertrófico distinto dos animais tratados no ZT0.

De suma relevância, esta hipertrofia diferencial entre os ZTs parece também ser tempo-dependente: 24h após o tratamento houve um aumento da relação HW/BW restrita aos animais tratados no ZT0 (Figura 25A-B), porém, vale citar que os animais tratados neste ZT perderam mais peso que os animais tratados no ZT12, sem alterações na relação HW/TL (Figura 24A). Além disso, notamos um aumento da CSA

dos animais sacrificados 24h após o tratamento com ISO em ambos os ZTs, sem diferença entre os grupos tratados (Figura 26A-B). Desta maneira, não se pode descartar que a hipertrofia cardíaca e o aumento da expressão de NFAT 72h após o tratamento podem ser secundárias a alterações prévias no tecido cardíaco e em outras vias de sinalização, por exemplo, na maquinaria de cálcio dos cardiomiócitos. Por exemplo, a expressão de canais iônicos apresenta uma ritmicidade circadiana, predispondo inclusive eventos arrítmicos (JEYARAJ; HALDAR; WAN; MCCAULEY *et al.*, 2012), e além disso, há um aumento da sinalização adrenérgica no coração devido a ritmicidade do tônus simpático no tecido (BIAGGIONI, 2008), o que pode predispor o coração a piores desfechos diante uma hiper estimulação adrenérgica.

Por observarmos que o coração estava sofrendo alterações estruturais e celulares devido à sobrecarga de ISO, decidimos avaliar se o tratamento estaria induzindo um aumento da deposição de matriz extracelular (MEC) no interstício do miocárdio. Utilizando o corante SiriusRed, que cora em vermelho o colágeno total presente no tecido (HADI; MOUCHAERS; SCHALIJ; GRUNBERG *et al.*, 2011), não verificamos um aumento da deposição de MEC após o tratamento com ISO, em ambos os ZTs (Figura 14A-B e Figura 15). Corroborando com este dado, ao utilizarmos animais Myh7-YFP (reporters da proteína β -MHC) não houve elevação da re-expressão desta proteína (Figura 16A-B), que está intimamente envolvida no estresse cardíaco principalmente por fibrose (PANDYA; KIM; SMITHIES, 2006). Provavelmente não constatamos um aumento da fibrose tecidual devido ao tempo após o tratamento, sendo 72h um prazo muito tenro para que haja aumento estatisticamente significativo da deposição de matriz extracelular neste modelo. Utilizando uma dose única de 200mg/Kg de ISO em camundongos, Liao e colaboradores observaram um aumento relevante da fibrose no miocárdio apenas 7 dias após o tratamento, sem alterações relevantes após 3 dias (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Em contrapartida, quatro semanas após doses únicas de 200mg/Kg e 300 mg/Kg em camundongos, Wallner *et al* não observaram aumento da deposição de colágeno total (WALLNER; DURAN; MOHSIN; TROUPES *et al.*, 2016). Assim como em outros tipos de lesões cardíacas, na CT induzida por uma alta dose de ISO o aumento da deposição de colágeno parece ocorrer entre 7 e 14 dias após o tratamento, sendo um evento adaptativo importante para a resolução da lesão e formação da cicatriz, e que em suma, se sincroniza com um processo inflamatório prévio no coração (WILSON; CHEYNE; BROWN; KERR *et al.*, 2018).

Em sequência, nos questionamos se haveria diferenças morfológicas no parênquima cardíaco entre os ZTs. Por experimento de H&E, identificamos qualitativamente uma presença importante de células imunes nos animais tratados em ambos os ZTs (Figura 18). Porém, de forma estupefaciente, a presença de células infiltradas nos animais tratados no ZT12 era maior que dos animais tratados no ZT0 (Figura 18). Além disso, o tecido dos animais tratados no ZT12 apresentou alterações histológicas mais grotescas, como maior descaracterização do parênquima, presença de material eosinofílico amorfo difuso por todo o tecido e as células imunes *per se* (Figura 18). Como já demonstrado por Liao *et. al.*, a presença de células imunes no tecido cardíaco após a superdose de ISO leva a alterações morfológicas e funcionais importantes no tecido cardíaco, incluindo aumento dos níveis de troponina C, um marcador de lesão cardíaca. (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Desta forma, uma inflamação do tecido cardíaco diferencialmente severa entre os ZTs poderia justificar as diferentes alterações morfológicas, celulares e moleculares observadas temporalmente após o tratamento com ISO. Assim como discutido anteriormente, a presença de células imunes no tecido cardíaco varia de acordo com o seu estado de homeostase, e, dentre as células presentes no coração, vale-se destacar o papel protagonista dos macrófagos em diversas funções fisiológicas (LAVINE; PINTO; EPELMAN; KOPECKY *et al.*, 2018; LITVINUKOVA; TALAVERA-LOPEZ; MAATZ; REICHART *et al.*, 2020). Em um trabalho pioneiro de Lavine *et al.*, foi demonstrado que a composição de macrófagos no miocárdio é distinta em situações fisiológicas ou patológicas: no coração em seu estado basal, a presença de macrófagos CCR2⁻ é predominante, sendo células majoritariamente de origem embrionária que se proliferam localmente no tecido (LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014). Os macrófagos CCR2⁻ independem de um circuito de sinalização específico para que sejam recrutados, pois multiplicam-se no coração principalmente *in situ* (WAGNER; KHAN; MOHSIN, 2020).

Porém, durante eventos patológicos como o IAM há uma mudança na composição destes macrófagos, onde monócitos (CCR2⁺MHC-II^{low}) vindos da medula óssea penetram o tecido cardíaco e diferenciam-se em macrófagos CCR2⁺MHC-II^{high} (BAJPAI; BREDEMEYER; LI; ZAITSEV *et al.*, 2019; LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014). Estes tipos celulares também têm funções distintas: os macrófagos CCR2⁻ têm atividades principalmente no equilíbrio do coração basal e são essenciais para processos vitais como a condução dos estímulos elétricos no

miocárdio (HULSMANS; CLAUSS; XIAO; AGUIRRE *et al.*, 2017). Já as células CCR2⁺MHC-II^{high} possuem um papel majoritariamente pró-inflamatório, e atuam reparando o tecido e amplificando a resposta imune local (EPELMAN; LAVINE; BEAUDIN; SOJKA *et al.*, 2014). Neste trabalho houve aumento significativo de leucócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos apenas nos animais tratados no ZT12 (Figura 20A-C, respectivamente). E de forma interessante, em um *gating* adicional observamos um aumento de células CCR2⁺MHC-II^{high} em ambos os ZTs (Figura 21A), porém, o aumento do número de células CCR2⁺MHC-II^{low} (Figura 20B) e CCR2⁻MHC-II^{low} (Figura 21D) foi restrito aos animais tratados no ZT12. Não notamos uma alteração do número de células CCR2⁻MHC-II^{high} (Figura 21C). Verificamos o mesmo perfil de infiltrado de macrófagos *in situ*, por imunofluorescência, onde a intensidade de fluorescência do anticorpo CD68 aumentou apenas nos animais tratados no ZT12 nos animais sacrificados 24h e 72h após o tratamento com ISO (Figura 27A-B e Figura 19A-B).

Uma vez que os resultados demonstram que o aumento da quantidade de monócitos CCR2⁺MHC-II^{low} ocorre apenas no ZT12, há indícios que o influxo de monócitos para o coração é maior durante a fase de maior atividade dos animais (ZT12). Outra possibilidade é que a adesão destas células imunes no coração lesionado oscile diurnamente. Como já demonstrado, a expressão de moléculas de adesão como ICAM1 e VCAM1 oscila de forma circadiana, podendo impactar no padrão de resposta patológica dependendo do ZT (SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013). A acrofase da expressão destas proteínas de adesão dá-se no período de maior atividade, entre o ZT12 e ZT13, e seus níveis diminuem para os menores valores durante o período de menor atividade (SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013). Uma possibilidade aqui seria avaliar o rolamento dos neutrófilos nos vasos cardíacos agudamente após o tratamento com ISO, em ambos os ZTs, a partir de um experimento de microscopia intravital. Vale ressaltar que além disso, a produção de citocinas como CCL2 ou CXCL10 pode variar diurnamente após o insulto com ISO, justificando assim o influxo diferencial de células imunes após o tratamento. Também é válido considerar a influência da expressão circadianamente oscilatória do toll-like receptor 4 (TLR4) (SILVER; BUCKLEY; HUGHES; HASTINGS *et al.*, 2018), que está envolvido nas respostas imunes inatas e adaptativas, além de ser importante na patogênese de diversas doenças cardiovasculares (FRANTZ; KOBZIK; KIM; FUKAZAWA *et al.*, 1999; KATARE; NIZAMI; PARAMESHA; DINDA *et al.*, 2020).

Nestas condições, sua expressão diurnamente distinta poderia explicar o recrutamento diferencial de leucócitos entre os ZTs.

É interessante notar que houve um aumento significativo no número de macrófagos CCR2⁺MHC-II^{low} apenas no coração dos animais tratados com ISO no ZT12. Evidências recentes indicam que monócitos/macrófagos CCR2⁺ que infiltram o coração no contexto de lesão podem perder a expressão do receptor de quimiocinas CCR2 (LAVINE; PINTO; EPELMAN; KOPECKY *et al.*, 2018) e, por isso, tornam-se CCR2⁻. Desta forma, é possível que o aumento observado no número de células CCR2⁺MHC-II^{low} 72 horas após o tratamento com ISO seja uma consequência da perda de expressão do CCR2 por uma população de macrófagos derivados da medula óssea. De maneira oposta, é possível que ocorra um aumento na proliferação de macrófagos residentes, embrionários, no coração frente ao tratamento com isoproterenol no ZT12. Estudos adicionais envolvendo o marcador específico de macrófagos embrionários TIM4 (DICK; WONG; HAMIDZADA; NEJAT *et al.*, 2022) serão necessários para investigar este fenômeno.

Em sequência, buscamos avaliar se o grau de lesão no tecido cardíaco estaria temporalmente distinto após o insulto, uma vez que a morte celular é um componente primordial para o recrutamento de células imunes no coração lesionado. Como já demonstrado, uma sobrecarga de ISO leva a um aumento da captação do corante Evans Blue pelas células cardíacas, aumento de células TUNEL⁺ e dos níveis plasmáticos de troponina I 24h após o tratamento (WALLNER; DURAN; MOHSIN; TROUPES *et al.*, 2016). Ao induzir o IAM experimentalmente nos ZT5 e ZT13, há uma maior área de infarto no ventrículo esquerdo, concentrações de troponina I, morte de cardiomiócitos e fibrose no grupo que sofreu a intervenção no ZT13 (SCHLOSS; HORCKMANS; NITZ; DUCHENE *et al.*, 2016). Para verificar se estaria havendo uma variação diurna nos padrões de morte celular do coração após o desafio, tratamos os animais com ISO nos ZT0 e ZT12 e, 6h depois, (nos ZT6 e ZT18, respectivamente), aplicamos o corante Evans Blue, que se distribui por todo o organismo e possui grande afinidade por células em processo de morte celular (BURCHFIELD; DONG; SAKATA; GAO *et al.*, 2010; VIJAYARAGHAVAREDDY; ADHINARAYANREDDY; VEMANNA; SREEMAN *et al.*, 2017). Observamos que em ambos os ZTs há aumento do percentual de células positivas para o Evans Blue sem diferença entre os ZTs (Figura 22A-B), demonstrando que potencialmente o grau de lesão evocado pelo tratamento

não seja o fator preponderante para o remodelamento hipertrófico e nem para a inflamação diferencial entre os ZTs. Este padrão de lesão no tecido cardíaco vem acompanhado de um processo inflamatório importante, com um grande repertório de células imunes atuantes dentre elas leucócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos, que agem para restaurar o equilíbrio fisiológico e resolução do processo patológico (LAVINE; EPELMAN; UCHIDA; WEBER *et al.*, 2014). Esta inflamação também é relevante no contexto da CT, sendo talvez um dos componentes centrais de sua patogênese, onde as respostas imunes aguda e tardia contribuem de formas distintas e construtivas para a progressão da doença (LYON; CITRO; SCHNEIDER; MOREL *et al.*, 2021; WILSON; CHEYNE; BROWN; KERR *et al.*, 2018).

Sendo assim, seria interessante também avaliar o perfil de células inflamatórias 24h após o tratamento com ISO, para verificar se os animais tratados no ZT12 já possuem um infiltrado inflamatório diferencial neste tempo mais breve. Como já demonstrado por Liao *et al.*, 24h após o tratamento com ISO na dose de 200mg/Kg em camundongos, há um aumento do número de macrófagos CCR2⁺ no coração (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Neste mesmo trabalho, eles observaram que o tratamento não afeta a monocitose entre 1 e 7 dias após o tratamento em camundongos (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Eles também constataram que a presença de macrófagos infiltrados no coração é essencial para a perda de função após tratamento com ISO, efeito que não foi observado em animais CCR2⁺ *knockout* (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022). Neste ponto podemos especular que de certa forma, os monócitos estão sendo atraídos para o coração de forma distinta entre os ZTs, racional que é endossado uma vez que no estado basal não se observa uma variação na concentração de monócitos Ly6C^{hi} entre os ZT0 e ZT12 no sangue. Desta forma, uma presença de um infiltrado inflamatório composto de células CCR2⁺ maior no ZT12 24h após o tratamento com ISO pode, até certo ponto, a despeito da indiferença do grau de lesão entre os ZTs, justificar as alterações moleculares, celulares e estruturais mais severas nesta fase do dia.

O principal sinal bioquímico para a expansão, progressão da resposta inflamatória e recrutamento de células imunes no contexto da isquemia cardíaca e CT são os padrões moleculares associados a lesões, ou DAMPs (do inglês: *danger associated molecular patterns*). Estes fragmentos moleculares são liberados por células

necróticas e sinalizam, *in situ*, para a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que recrutam os leucócitos do sangue (ADAMO; ROCHA-RESENDE; PRABHU; MANN, 2021; WAGNER; KHAN; MOHSIN, 2020). As primeiras células imunes que chegam ao tecido cardíaco lesionado são os neutrófilos, que são responsivos à citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (do inglês: *tumor necrosis factor alpha*), IL-1 β (do inglês: *interleukin 1 beta*), IL-6 e IL-18, produzidas pelas células adjacentes ao tecido lesionado (BOUFENZER; LEMARIE; SIMON; DERIVE *et al.*, 2015). É interessante que nesta fase da inflamação, a produção de citocinas como IL-1 β e IL-6 é essencial para a manutenção da contratilidade, sobrevivência ou morte dos cardiomiócitos e alterações na micro vasculatura cardíaca (NIAN; LEE; KHAPER; LIU, 2004). Neste contexto, os neutrófilos atuam principalmente remodelamento o interstício do coração, afetando o equilíbrio redox local pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de enzimas como a metaloproteinase 9 (MMP-9) e mieloperoxidase. Estes eventos em sincronia preparam o tecido lesionado para o processo de reparação e formação de cicatriz, que são primordiais para prevenir a ruptura do tecido cardíaco (AMULIC; CAZALET; HAYES; METZLER *et al.*, 2012). Há indícios de que durante o IAM, exista uma ritmicidade circadiana do infiltrado de neutrófilos entre os períodos de atividade dos espécimes.

Em um interessante trabalho, foi observado uma oscilação circadiana na concentração de granulócitos no sangue, sendo seu pico durante o ZT5 (SCHLOSS; HORCKMANS; NITZ; DUCHENE *et al.*, 2016). Além disso, a expressão do mRNA de moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 e citocinas como CXCL5, CXCL2, CCL3 e CCL5 no coração mostrou um pico no ZT17. Ao induzir experimentalmente o IAM, eles observaram que, o número de neutrófilos, e das concentrações de TNF- α , G-CSF, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL3 e CCL5 era maior no grupo que sofreu a intervenção no ZT13 vs ZT5 (SCHLOSS; HORCKMANS; NITZ; DUCHENE *et al.*, 2016). Por último, observaram que limitar a infiltração destes neutrófilos apresentou um efeito protetor no coração após o IAM no ZT13, diminuindo as concentrações de TNF- α , troponina-I, área de infarto, fibrose, deposição de colágeno e mitigando a perda de função (SCHLOSS; HORCKMANS; NITZ; DUCHENE *et al.*, 2016). Como os neutrófilos são a primeira linha de ataque da resposta inflamatória após diversas lesões cardíacas, e estão fisicamente relacionados com a progressão inflamatória durante estas doenças, sua atividade circadianamente oscilatória pode representar um aprofundamento mecanístico importante para melhor a compreensão dos dados

apresentados neste trabalho. Aqui, constatamos que o número de neutrófilos presentes no coração após a sobrecarga de ISO aumentou apenas no ZT12 (Figura 20A). Além disso, já foi demonstrado que os neutrófilos também podem possuir atividade fagocítica em tecidos lesionados, atuando para remover parte do material necrótico presente no local (ZIGMOND; VAROL; FARACHE; ELMALIAH *et al.*, 2012). Durante esta fase 'fagocítica' os neutrófilos entram em seu estágio final de atuação, expressando moléculas como a resolvina e lactoferrina que vão interromper a migração para o tecido e sinalizar para a apoptose destas células (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Durante a apoptose, os neutrófilos passam a expressar moléculas em sua superfície que sinalizam para a sua fagocitose por outras células imunes, principalmente os macrófagos, que constituem uma peça-chave para a progressão temporal da resposta imune local (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Uma perspectiva deste trabalho é avaliar se a expressão proteica do inflamassoma NLRP3 e de seus componentes *downstream* (ASC e Caspase-1) encontram-se distintamente ativados entre os ZT0 e ZT12, 24h e 72h após o tratamento, uma vez que sua ativação está intimamente relacionada com a produção de diversas citocinas. Por enquanto, os dados obtidos por *western blotting* permanecem estatisticamente inconclusivos. Como exemplo prático, no estresse cardíaco induzido por ISO em camundongos, na dose de 5mg/Kg, foi observado um aumento significativo das concentrações de CCL2 de 12 a 24h após o tratamento e diminuição após 72h, de CXCL10 12h após o ISO com diminuição após 24h (KARAKAS; HAASE; ZELLER, 2018). Além disso, a produção cardíaca destas citocinas após o tratamento foi dependente da ativação de NLRP3, com este fenótipo não sendo observado em animais NLRP3^{-/-} (KARAKAS; HAASE; ZELLER, 2018). Ao comparar as concentrações de CCL2 em pacientes com infarto e CT de 2-4 dias após os eventos, Pirzer *et al.* não observaram diferenças nas concentrações destas citocinas (PIRZER; ELMAS; HAGHI; LIPPERT *et al.*, 2012). Logo, pode-se perceber que a temporização ou cinética da produção destas citocinas é primordial para a sincronização da resposta imune local, obviamente dependendo do evento clínico ou modelo experimental analisado. Neste trabalho, também pretendemos avaliar por RT-PCR a expressão diurna do mRNA de citocinas envolvidas com o recrutamento de neutrófilos e monócitos (CXCL2, CCL5 para os neutrófilos e CCL2 e CCL7 para os macrófagos) 24h e 72h após o tratamento com ISO.

Até aqui, parece que o horário do dia em que os animais são expostos ao estresse catecolaminérgico é preditivo para a cinética da resposta inflamatória. Não observamos uma variação da lesão cardíaca pelo experimento com o Evans Blue, apontando que possivelmente a susceptibilidade de lesão diferencial entre os ZTs não seja o fator imperativo para as alterações morfológicas e moleculares relatadas. Porém, almejamos dosar os níveis séricos de troponina I e C após o tratamento, onde trabalhos já mostraram um aumento das concentrações deste marcador bioquímico de lesão cardíaca após administração de altas doses de ISO (LIAO; CHANG; TANG; WATANABE *et al.*, 2022; WALLNER; DURAN; MOHSIN; TROUPES *et al.*, 2016). Também é racional pensar, como já fora levantado, que a cinética das respostas inflamatórias entre os ZTs seja temporalmente distinta, devido a expressão diferencial de moléculas de adesão como VCAM1 e ICAM1. Seria relevante a partir daqui avaliar dois pontos inter relacionados: primeiro, observar se após 24h do tratamento com ISO o perfil de células inflamatórias presentes no tecido cardíaco, uma vez que um infiltrado diferencial de células imunes como os neutrófilos e macrófagos CCR2⁺ pode guiar para uma distinta severidade inflamatória. Segundo: avaliar a expressão gênica e proteica das moléculas de adesão supracitadas, além do perfil de rolamento das células imunes responsáveis pela resposta imune inata após a intoxicação catecolaminérgica.

É plausível também considerar a influência metabólica nestes fenótipos, uma vez que verificamos uma perda de peso corporal maior nos animais tratados no ZT0 vs ZT12, 24h após o tratamento com ISO (Figura 24A). Neste caso, seria interessante quantificar a razão ATP/ADP, uma estratégia categórica para avaliar a homeostase metabólica no tecido. E o mais interessante, o padrão de perda corporal se inverte 72h após o tratamento, onde os animais tratados no ZT12 perdem mais peso em comparação com os tratados no ZT0. De alguma forma, a perda aguda de massa corporal após 24h dos animais tratados no ZT0 poderia ser importante para compensar o estresse metabólico no tecido cardíaco após a sobrecarga catecolaminérgica, e possivelmente adiar a resposta inflamatória iminente. Também almejamos realizar experimentos de caráter funcional como ecocardiografia e eletrocardiograma, e a nível celular avaliar a contratilidade de cardiomiócitos isolados e o seu transiente de cálcio, para melhor caracterizar os impactos funcionais da inflamação diferencial entre os ZT0 e ZT12.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, nosso trabalho demonstrou pela primeira vez a influência temporal na resposta inflamatória cardíaca em um modelo farmacológico da CT. Os animais tratados com ISO em seu período de maior atividade, no ZT12, tiveram alterações morfométricas no coração mais graves, caracterizada principalmente por um infiltrado de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios. Como hipótese para o fenômeno, é plausível considerar a influência temporal não apenas na susceptibilidade do tecido cardíaco em receber o estresse catecolaminérgico, mas principalmente em modular a resposta imune de forma diferencial entre os ZTs. A literatura e os dados demonstram que devem ser consideradas alterações abruptas no coração, como o infiltrado de neutrófilos, produção de citocinas pró-inflamatórias e alterações metabólicas que, de diversas e síncronas maneiras, podem interferir na capacidade do coração e do organismo em responder ao insulto catecolaminérgico. Este trabalho abre um possível novo paradigma para a abordagem experimental e visão clínica da CT, além de sua patogênese.

Como limitações deste trabalho, vale-se citar principalmente a inespecificidade do modelo experimental, onde o ISO administrado distribui-se por todo o organismo, podendo interagir com quaisquer β -ARs. Apesar de na patogênese da CT o excesso de catecolaminas circulantes também interagir com todos os β -ARs disponíveis, experimentalmente não é possível simular todo o *background* fisiológico e principalmente emocional da doença, além de limitar a investigação dos mecanismos a nível dos cardiomiócitos. Para contornar este problema, há duas alternativas: utilizar um modelo que cause uma lesão especificamente no tecido cardíaco, como por exemplo a partir de camundongos que expressam o receptor da toxina diftérica especificamente nos cardiomiócitos, ou a partir de um sistema nanoestruturado, proporcionar um *delivery* cardíaco-específico do ISO. Também é válido citar a ausência da medida de parâmetros funcionais do coração após o tratamento com ISO, como ECG ou um ecocardiograma, que seriam importantes para caracterizar estrutural e fisiologicamente a CT induzida por ISO. Seria interessante também avaliar de forma tardia as alterações cardiovasculares promovidas pelo tratamento com ISO em ambos os ZTs, em intervalos de tempo como 7, 14 e 28 dias após o tratamento.

O coração poderia, por exemplo, reagir de forma distinta a um segundo insulto estressor entre os ZTs.

Em suma, as perspectivas da imunoterapia devem sempre estar associadas às idiosincrasias presentes na doença, paciente, nas lesões e, principalmente, no comportamento circadianamente oscilatório das principais alterações patológicas presentes em seus fenótipos. Seria interessante do ponto de vista experimental avaliar as possibilidades da modulação imune durante a CT e outras doenças cardiovasculares, sob o prisma do tempo. Esta área de pesquisa, aqui denominada imuno-cronoterapia, representa não apenas um desafio do ponto de vista experimental, mas uma esperança de tratamentos e intervenções clínicas mais robustas que aumentem a qualidade de vida da população.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMO, L.; ROCHA-RESENDE, C.; PRABHU, S. D.; MANN, D. L. Publisher Correction: Reappraising the role of inflammation in heart failure. **Nat Rev Cardiol**, 18, n. 10, p. 735, Oct 2021.
- AGUILAR-ROBLERO, R.; GARCIA-HERNANDEZ, F.; AGUILAR, R.; ARANKOWSKY-SANDOVAL, G. *et al.* Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. **Neurosci Lett**, 69, n. 1, p. 47-52, Aug 15 1986.
- AKASHI, Y. J.; NEF, H. M.; LYON, A. R. Epidemiology and pathophysiology of Takotsubo syndrome. **Nat Rev Cardiol**, 12, n. 7, p. 387-397, Jul 2015.
- ALFONSO-PRIETO, M.; NAVARINI, L.; CARLONI, P. Understanding Ligand Binding to G-Protein Coupled Receptors Using Multiscale Simulations. **Front Mol Biosci**, 6, p. 29, 2019.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, 30, p. 459-489, 2012.
- ARJONA, A.; SARKAR, D. K. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. **J Immunol**, 174, n. 12, p. 7618-7624, Jun 15 2005.
- AYYAR, V. S.; SUKUMARAN, S. Circadian rhythms: influence on physiology, pharmacology, and therapeutic interventions. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**, 48, n. 3, p. 321-338, Jun 2021.
- BAJPAI, G.; BREDEMEYER, A.; LI, W.; ZAITSEV, K. *et al.* Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. **Circ Res**, 124, n. 2, p. 263-278, Jan 18 2019.
- BIAGGIONI, I. Circadian clocks, autonomic rhythms, and blood pressure dipping. **Hypertension**, 52, n. 5, p. 797-798, Nov 2008.
- BIETRY, R.; REYENTOVICH, A.; KATZ, S. D. Clinical management of takotsubo cardiomyopathy. **Heart Fail Clin**, 9, n. 2, p. 177-186, viii, Apr 2013.
- BOUFENZER, A.; LEMARIE, J.; SIMON, T.; DERIVE, M. *et al.* TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. **Circ Res**, 116, n. 11, p. 1772-1782, May 22 2015.
- BRAZ, J. C.; BUENO, O. F.; LIANG, Q.; WILKINS, B. J. *et al.* Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. **J Clin Invest**, 111, n. 10, p. 1475-1486, May 2003.
- BURCHFIELD, J. S.; DONG, J. W.; SAKATA, Y.; GAO, F. *et al.* The cytoprotective effects of tumor necrosis factor are conveyed through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in the heart. **Circ Heart Fail**, 3, n. 1, p. 157-164, Jan 2010.
- CARRILLO-SALINAS, F. J.; NGWENYAMA, N.; ANASTASIOU, M.; KAUR, K. *et al.* Heart Inflammation: Immune Cell Roles and Roads to the Heart. **Am J Pathol**, 189, n. 8, p. 1482-1494, Aug 2019.
- CHELLAPPA, S. L.; VUJOVIC, N.; WILLIAMS, J. S.; SCHEER, F. Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease. **Trends Endocrinol Metab**, 30, n. 10, p. 767-779, Oct 2019.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, 9, n. 6, p. 7204-7218, Jan 23 2018.

CRABTREE, G. R.; OLSON, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. **Cell**, 109 Suppl, p. S67-79, Apr 2002.

CRNKO, S.; DU PRE, B. C.; SLUIJTER, J. P. G.; VAN LAAKE, L. W. Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. **Nat Rev Cardiol**, 16, n. 7, p. 437-447, Jul 2019.

DE LUCIA, C.; EGUCHI, A.; KOCH, W. J. New Insights in Cardiac beta-Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. **Front Pharmacol**, 9, p. 904, 2018.

DESHMUKH, A.; KUMAR, G.; PANT, S.; RIHAL, C. *et al.* Prevalence of Takotsubo cardiomyopathy in the United States. **Am Heart J**, 164, n. 1, p. 66-71 e61, Jul 2012.

DICK, S. A.; WONG, A.; HAMIDZADA, H.; NEJAT, S. *et al.* Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. **Sci Immunol**, 7, n. 67, p. eabf7777, Jan 7 2022.

DURGAN, D. J.; PULINILKUNNIL, T.; VILLEGAS-MONTOYA, C.; GARVEY, M. E. *et al.* Short communication: ischemia/reperfusion tolerance is time-of-day-dependent: mediation by the cardiomyocyte circadian clock. **Circ Res**, 106, n. 3, p. 546-550, Feb 19 2010.

DURGAN, D. J.; TSAI, J. Y.; GRENETT, M. H.; PAT, B. M. *et al.* Evidence suggesting that the cardiomyocyte circadian clock modulates responsiveness of the heart to hypertrophic stimuli in mice. **Chronobiol Int**, 28, n. 3, p. 187-203, Apr 2011.

DYAR, K. A.; CICILLOT, S.; TAGLIAZUCCHI, G. M.; PALLAFACCHINA, G. *et al.* The calcineurin-NFAT pathway controls activity-dependent circadian gene expression in slow skeletal muscle. **Mol Metab**, 4, n. 11, p. 823-833, Nov 2015.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; BEAUDIN, A. E.; SOJKA, D. K. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. **Immunity**, 40, n. 1, p. 91-104, Jan 16 2014.

ESQUIFINO, A. I.; SELGAS, L.; ARCE, A.; MAGGIORE, V. D. *et al.* Twenty-four-hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen: effect of cyclosporine. **Brain Behav Immun**, 10, n. 2, p. 92-102, Jun 1996.

ETCHEGARAY, J. P.; LEE, C.; WADE, P. A.; REPPERT, S. M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. **Nature**, 421, n. 6919, p. 177-182, Jan 9 2003.

FERNANDES, G.; HALBERG, F.; YUNIS, E. J.; GOOD, R. A. Circadian rhythmic plaque-forming cell response of spleens from mice immunized with SRBC. **J Immunol**, 117, n. 3, p. 962-966, Sep 1976.

FRANTZ, S.; KOBZIK, L.; KIM, Y. D.; FUKAZAWA, R. *et al.* Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. **J Clin Invest**, 104, n. 3, p. 271-280, Aug 1999.

FREY, N.; KATUS, H. A.; OLSON, E. N.; HILL, J. A. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? **Circulation**, 109, n. 13, p. 1580-1589, Apr 6 2004.

- GAVAGHAN, M. Cardiac anatomy and physiology: a review. **AORN J**, 67, n. 4, p. 802-822; quiz 824-808, Apr 1998.
- HADI, A. M.; MOUCHAERS, K. T.; SCHALIJ, I.; GRUNBERG, K. *et al.* Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. **Cell Oncol (Dordr)**, 34, n. 4, p. 343-354, Aug 2011.
- HULSMANS, M.; CLAUSS, S.; XIAO, L.; AGUIRRE, A. D. *et al.* Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. **Cell**, 169, n. 3, p. 510-522 e520, Apr 20 2017.
- JEYARAJ, D.; HALDAR, S. M.; WAN, X.; MCCAULEY, M. D. *et al.* Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis. **Nature**, 483, n. 7387, p. 96-99, Feb 22 2012.
- KARAKAS, M.; HAASE, T.; ZELLER, T. Linking the sympathetic nervous system to the inflammasome: towards new therapeutics for atherosclerotic cardiovascular disease. **Eur Heart J**, 39, n. 1, p. 70-72, Jan 1 2018.
- KATARE, P. B.; NIZAMI, H. L.; PARAMESHA, B.; DINDA, A. K. *et al.* Activation of toll like receptor 4 (TLR4) promotes cardiomyocyte apoptosis through SIRT2 dependent p53 deacetylation. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 19232, Nov 6 2020.
- KAWATE, T.; ABO, T.; HINUMA, S.; KUMAGAI, K. Studies of the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid. **J Immunol**, 126, n. 4, p. 1364-1367, Apr 1981.
- KIMURA, K.; IEDA, M.; FUKUDA, K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. **Circ Res**, 110, n. 2, p. 325-336, Jan 20 2012.
- KOŁODZINSKA, A.; CZARZASTA, K.; SZCZEPANKIEWICZ, B.; BUDNIK, M. *et al.* Isoprenaline induced Takotsubo syndrome: Histopathological analyses of female rat hearts. **Cardiol J**, 29, n. 1, p. 105-114, 2022.
- KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 68, n. 9, p. 2112-2116, Sep 1971.
- LAVINE, K. J.; EPELMAN, S.; UCHIDA, K.; WEBER, K. J. *et al.* Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 45, p. 16029-16034, Nov 11 2014.
- LAVINE, K. J.; PINTO, A. R.; EPELMAN, S.; KOPECKY, B. J. *et al.* The Macrophage in Cardiac Homeostasis and Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 4). **J Am Coll Cardiol**, 72, n. 18, p. 2213-2230, Oct 30 2018.
- LEFKOWITZ, R. J.; ROCKMAN, H. A.; KOCH, W. J. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. **Circulation**, 101, n. 14, p. 1634-1637, Apr 11 2000.
- LEID, J.; CARRELHA, J.; BOUKARABILA, H.; EPELMAN, S. *et al.* Primitive Embryonic Macrophages are Required for Coronary Development and Maturation. **Circ Res**, 118, n. 10, p. 1498-1511, May 13 2016.
- LIAO, X.; CHANG, E.; TANG, X.; WATANABE, I. *et al.* Cardiac macrophages regulate isoproterenol-induced Takotsubo-like cardiomyopathy. **JCI Insight**, 7, n. 3, Feb 8 2022.
- LITVINUKOVA, M.; TALAVERA-LOPEZ, C.; MAATZ, H.; REICHAERT, D. *et al.* Cells of the adult human heart. **Nature**, 588, n. 7838, p. 466-472, Dec 2020.

- LOHSE, M. J.; ENGELHARDT, S.; ESCHENHAGEN, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? **Circ Res**, 93, n. 10, p. 896-906, Nov 14 2003.
- LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. **Adv Genet**, 74, p. 175-230, 2011.
- LYON, A. R.; CITRO, R.; SCHNEIDER, B.; MOREL, O. *et al.* Pathophysiology of Takotsubo Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. **J Am Coll Cardiol**, 77, n. 7, p. 902-921, Feb 23 2021.
- MARAFIOTI, V.; TURRI, G.; MONACO, S. Important distinction between acute coronary syndromes and Takotsubo syndrome. **Nat Rev Cardiol**, 17, n. 4, p. 258, Apr 2020.
- MOREL, O.; SAUER, F.; IMPERIALE, A.; CIMARELLI, S. *et al.* Importance of inflammation and neurohumoral activation in Takotsubo cardiomyopathy. **J Card Fail**, 15, n. 3, p. 206-213, Apr 2009.
- NIAN, M.; LEE, P.; KHAPER, N.; LIU, P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res**, 94, n. 12, p. 1543-1553, Jun 25 2004.
- OISHI, K.; SAKAMOTO, K.; OKADA, T.; NAGASE, T. *et al.* Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. **Biochem Biophys Res Commun**, 253, n. 2, p. 199-203, Dec 18 1998.
- PANDYA, K.; KIM, H. S.; SMITHIES, O. Fibrosis, not cell size, delineates beta-myosin heavy chain reexpression during cardiac hypertrophy and normal aging in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 45, p. 16864-16869, Nov 7 2006.
- PAUR, H.; WRIGHT, P. T.; SIKKEL, M. B.; TRANTER, M. H. *et al.* High levels of circulating epinephrine trigger apical cardiodepression in a beta2-adrenergic receptor/Gi-dependent manner: a new model of Takotsubo cardiomyopathy. **Circulation**, 126, n. 6, p. 697-706, Aug 7 2012.
- PELLICCIA, F.; KASKI, J. C.; CREA, F.; CAMICI, P. G. Pathophysiology of Takotsubo Syndrome. **Circulation**, 135, n. 24, p. 2426-2441, Jun 13 2017.
- PINTO, A. R.; ILINYKH, A.; IVEY, M. J.; KUWABARA, J. T. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. **Circ Res**, 118, n. 3, p. 400-409, Feb 5 2016.
- PIRZER, R.; ELMAS, E.; HAGHI, D.; LIPPERT, C. *et al.* Platelet and monocyte activity markers and mediators of inflammation in Takotsubo cardiomyopathy. **Heart Vessels**, 27, n. 2, p. 186-192, Mar 2012.
- PORTALUPPI, F.; TISEO, R.; SMOLENSKY, M. H.; HERMIDA, R. C. *et al.* Circadian rhythms and cardiovascular health. **Sleep Med Rev**, 16, n. 2, p. 151-166, Apr 2012.
- PROKUDINA, E. S.; KURBATOV, B. K.; ZAVADOVSKY, K. V.; VRUBLEVSKY, A. V. *et al.* Takotsubo Syndrome: Clinical Manifestations, Etiology and Pathogenesis. **Curr Cardiol Rev**, 17, n. 2, p. 188-203, 2021.
- REDDY, S.; REDDY, V.; SHARMA, S. Physiology, Circadian Rhythm. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2022.
- RIJO-FERREIRA, F.; TAKAHASHI, J. S. Genomics of circadian rhythms in health and disease. **Genome Med**, 11, n. 1, p. 82, Dec 17 2019.

- ROCHA-RESENDE, C.; WEINHEIMER, C.; BAJPAI, G.; ADAMO, L. *et al.* Immunomodulatory role of non-neuronal cholinergic signaling in myocardial injury. **JCI Insight**, 5, Jun 4 2019.
- ROCHA-RESENDE, C.; YANG, W.; LI, W.; KREISEL, D. *et al.* Developmental changes in myocardial B cells mirror changes in B cells associated with different organs. **JCI Insight**, 5, n. 16, Aug 20 2020.
- RUAN, W.; YUAN, X.; ELTZSCHIG, H. K. Circadian rhythm as a therapeutic target. **Nat Rev Drug Discov**, 20, n. 4, p. 287-307, Apr 2021.
- SAINI, R.; JASKOLSKI, M.; DAVIS, S. J. Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects. **BMC Biol**, 17, n. 1, p. 13, Feb 18 2019.
- SCALLY, C.; ABBAS, H.; AHEARN, T.; SRINIVASAN, J. *et al.* Myocardial and Systemic Inflammation in Acute Stress-Induced (Takotsubo) Cardiomyopathy. **Circulation**, 139, n. 13, p. 1581-1592, Mar 26 2019.
- SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 3, p. 190-198, Mar 2013.
- SCHLOSS, M. J.; HORCKMANS, M.; NITZ, K.; DUCHENE, J. *et al.* The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. **EMBO Mol Med**, 8, n. 8, p. 937-948, Aug 2016.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 5, p. 349-361, May 2008.
- SILVER, A. C.; BUCKLEY, S. M.; HUGHES, M. E.; HASTINGS, A. K. *et al.* Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells. **Heliyon**, 4, n. 3, p. e00579, Mar 2018.
- SINGH, T.; KHAN, H.; GAMBLE, D. T.; SCALLY, C. *et al.* Takotsubo Syndrome: Pathophysiology, Emerging Concepts, and Clinical Implications. **Circulation**, 145, n. 13, p. 1002-1019, Mar 29 2022.
- SUETOMI, T.; WILLEFORD, A.; BRAND, C. S.; CHO, Y. *et al.* Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II delta Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. **Circulation**, 138, n. 22, p. 2530-2544, Nov 27 2018.
- SYROVATKINA, V.; ALEGRE, K. O.; DEY, R.; HUANG, X. Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. **J Mol Biol**, 428, n. 19, p. 3850-3868, Sep 25 2016.
- TRANter, M. H.; WRIGHT, P. T.; SIKKEL, M. B.; LYON, A. R. Takotsubo cardiomyopathy: the pathophysiology. **Heart Fail Clin**, 9, n. 2, p. 187-196, viii-ix, Apr 2013.
- UMEMURA, Y.; YAGITA, K. Development of the Circadian Core Machinery in Mammals. **J Mol Biol**, 432, n. 12, p. 3611-3617, May 29 2020.
- VIJAYARAGHAVAREDDY, P.; ADHINARAYANREDDY, V.; VEMANNA, R. S.; SREEMAN, S. *et al.* Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. **Bio Protoc**, 7, n. 16, p. e2519, Aug 20 2017.

WAGNER, M. J.; KHAN, M.; MOHSIN, S. Healing the Broken Heart; The Immunomodulatory Effects of Stem Cell Therapy. **Front Immunol**, 11, p. 639, 2020.

WALLNER, M.; DURAN, J. M.; MOHSIN, S.; TROUPES, C. D. *et al.* Acute Catecholamine Exposure Causes Reversible Myocyte Injury Without Cardiac Regeneration. **Circ Res**, 119, n. 7, p. 865-879, Sep 16 2016.

WILSON, H. M.; CHEYNE, L.; BROWN, P. A. J.; KERR, K. *et al.* Characterization of the Myocardial Inflammatory Response in Acute Stress-Induced (Takotsubo) Cardiomyopathy. **JACC Basic Transl Sci**, 3, n. 6, p. 766-778, Dec 2018.

WITTSTEIN, I. S.; THIEMANN, D. R.; LIMA, J. A.; BAUGHMAN, K. L. *et al.* Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. **N Engl J Med**, 352, n. 6, p. 539-548, Feb 10 2005.

YOSHIDA, Y.; MATSUNAGA, N.; NAKAO, T.; HAMAMURA, K. *et al.* Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 2783, May 13 2021.

ZIGMOND, E.; VAROL, C.; FARACHE, J.; ELMALIAH, E. *et al.* Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. **Immunity**, 37, n. 6, p. 1076-1090, Dec 14 2012.