

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO DESENVOLVIMENTO DA
FIBROSE E DA REGENERAÇÃO EM MODELO DE CRIONJÚRIA CARDÍACA EM
ZEBRAFISH

CURITIBA

2023

REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO DESENVOLVIMENTO DA
FIBROSE E DA REGENERAÇÃO EM MODELO DE CRIONJÚRIA CARDÍACA EM
ZEBRAFISH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, na área de concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luz, Rebeca Bosso dos Santos, 1998-

Avaliação da participação de macrófagos no desenvolvimento da fibrose e da regeneração em modelo de crioinjúria cardíaca em *Zebrafish* / Rebeca Bosso dos Santos Luz. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

Orientador: Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga.

1. Infarto do miocárdio. 2. Regeneração. 3. Fibrose. 4. Macrófagos. I. Braga, Tércio Teodoro, 1985-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **REBECA BOSSO DOS SANTOS LUZ** intitulada: **Avaliação da participação de macrófagos no desenvolvimento da fibrose e da degeneração em modelo de crioinjúria cardíaca em zebrafish**, sob orientação do Prof. Dr. TÁRCIO TEODORO BRAGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

07/02/2023 13:27:19.0

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/02/2023 12:50:05.0

LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/02/2023 10:40:26.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha família e ao meu namorado, pois sem o apoio deles eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai por ter escolhido investir na educação minha e das minhas irmãs, à minha mãe pelo cuidado desde sempre, apoio e compreensão, às minhas irmãs que sempre foram as minhas companheiras, Ingrid pelas alegrias e Tata por ter sido minha guia na UFPR e durante toda a minha vida.

Agradeço também ao Leonardo, meu namorado que me acompanha desde a graduação e sempre com muita paciência me ajudou e me escutou quando estava frustrada com o mestrado, além da concreta ajuda com o trabalho, por ter me acolhido em Curitiba e por ter me dado forças para continuar.

Também agradeço à Lais, por toda a colaboração e ensinamentos científicos, pela amizade que foi construída neste período e por ter me acolhido no caos de São Paulo.

Agradeço ao Prof. Tércio pela orientação, ajuda, incentivos, por acreditar no meu potencial e por estar sempre disponível quando precisava.

Agradeço aos meus colegas, ao Ollavo pela ajuda de sempre e pelas piadas, à Laura por sempre ser prestativa e ajudar com o conhecimento que eu não tinha, à Thais, por compartilhar comigo sentimentos de “sênior” no laboratório e conhecimentos do microscópio confocal, ao André pela compreensão e também ajuda com os corações, à Jordana pelos conselhos e pragmatismo e à Andressa, pela ajuda e por ter aceitado receber algumas responsabilidades de cuidados com o *zebrafish*.

Agradeço aos meus amigos, Vanessa, Felipe, Bia, Stavis, Juliano, Vitória, Thaísa, por serem meu descanso, minha rede de apoio. Agradeço em especial à Ágata, minha melhor amiga que mesmo a mais de 1000 km de distância me apoia, escuta, acolhe e cuida.

Agradeço às minhas avós, Vó Cida e Vó Lena, pelos pensamentos e cuidados de longe, em forma de desejos e orações.

Agradeço à CAPES e ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa. Aos professores do PPGMPP pelos ensinamentos e apoio. Ao ICC, pela oportunidade de realizar *cell sorting*. Agradeço a todos os professores parceiros deste trabalho: professor Rilton de Freitas, professor Fernando Dias, professora Maritana Mela, professora Jaísa, os quatro da Universidade Federal do Paraná (UFPR), professora Alessandra Sussulini da Universidade de Campinas (Unicamp) e o professor Niels Olsen da Universidade de São Paulo (USP).

Agradeço também à técnica Flávia pela atenção e paciência com os experimentos do MALDI, à Mariana, Camila, Juliana e Luan pela ajuda com os experimentos em São Paulo.

Agradeço à minha psicóloga por ter realizado um trabalho muito importante comigo neste período e às pessoas que fazem parte da terapia em grupo idealizado por ela e que me ajudaram a ter forças na reta final do trabalho.

Por fim, agradeço a todos que não foram mencionados, mas que foram importantes neste processo.

“É necessário se espantar, se indignar e se contagiar, só assim é possível mudar a realidade.” — Nice da Silveira

“I didn’t want to just know names of things. I remember really wanting to know how it all worked.” — Elizabeth Blackburn

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM), acompanhado de outras doenças cardíacas, é a principal causa de morte no mundo atualmente. O infarto é causado pela isquemia do miocárdio, o que desencadeia a necrose local. Após a lesão, é essencial que ocorra o reparo, que nos mamíferos culmina com a formação da fibrose. Embora o reparo pós infarto nestes organismos seja bem conhecido, a função dos macrófagos nos diferentes momentos deste processo ainda não é bem elucidada, principalmente em momentos tardios. Portanto, para resolver esta lacuna, este trabalho se dedicou a padronizar adaptação do modelo de crioinjúria cardíaca no *zebrafish* (*Danio rerio*) e também a caracterizar macrófagos tardios presentes no reparo da lesão. A crioinjúria cardíaca é uma lesão que ocorre por baixas temperaturas e simula o IAM em *zebrafish* por causar necrose semelhante à que ocorre em mamíferos. O *zebrafish*, por sua vez, é capaz de regenerar o coração, e, portanto estudar os macrófagos neste contexto poderá auxiliar no desenvolvimento de terapias mais específicas. Para a caracterização do modelo, foram realizadas leituras de eletrocardiograma (ECG) em animais em 3 dias pós injúria (dpi) e em animais sham, cortes histológicos e também foi realizada a técnica *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) *imaging* com objetivo de caracterizar o perfil de lipídios no local da lesão. Para identificar a migração das populações de macrófagos, análises de citometria de fluxo foram realizadas. Análises de lipidômica de macrófagos foram adquiridas para identificar o perfil lipídico destas células, em diferentes tempos após a lesão e com o mesmo objetivo, obtivemos cDNA de célula única de macrófagos obtidos de animais em 7 e 21 dpi, material este que será sequenciado em experimentos de *single cell mRNA sequencing* (scRNAseq) e trará dados do perfil transcricional destas células, principalmente aquelas presentes em momentos tardios. Por fim realizamos a padronização da confecção de lipossomas encapsulados com ácido zoledrônico, como forma de depletar os macrófagos e assim entender melhor sua função. Portanto, nosso trabalho auxilia em uma maior compreensão dos perfis dos macrófagos durante o processo de regeneração cardíaca de *zebrafish* após crioinjúria e também no entendimento da função elétrica cardíaca deste animal neste contexto. Como resultados, conseguimos obter leituras claras do ECG, mas não encontramos diferenças no tempo pós lesão analisado, observamos infiltrado inflamatório e deposição de colágeno nos cortes histológicos, mas não obtivemos análises significativas dos dados do experimento utilizando a técnica MALDI *imaging*. As análises de citometria demonstraram que em tempos tardios de reparo da lesão não há diferença entre a quantidade dos perfis de macrófagos e com a lipidômica foi possível encontrar algumas diferenças de lipídios nos macrófagos entre os tempos após a lesão analisados.

Palavras-chave: *Zebrafish*; macrófagos; fibrose; regeneração; infarto agudo do miocárdio; crioinjúria.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI), accompanied by other heart diseases, is the leading cause of death in the world today. Infarction is caused by myocardial ischemia, which triggers local necrosis. After an injury, the repair is essential, which in mammals culminates in the formation of fibrosis. Although post-infarction repair in these organisms is well known, the function of macrophages at different times in this process is still not well understood, especially at late times. Therefore, to solve this gap, this work was dedicated to standardizing the adaptation of the cardiac cryoinjury model in zebrafish (*Danio rerio*) and also to characterizing late macrophages present in the lesion repair. Cardiac cryoinjury is an injury that occurs due to low temperatures and simulates AMI in zebrafish by causing necrosis similar to that which occurs in mammals. Zebrafish, in turn, is capable of regenerating the heart, and therefore studying macrophages in this context may help in the development of more specific therapies. For the characterization of the model, electrocardiogram (ECG) readings were performed in animals at 3 days post-injury (dpi), and in sham animals, histological sections and the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging technique was also performed to characterize the lipid profile at the site of injury. To identify the migration of macrophage populations, flow cytometry analyzes were performed. Macrophage lipidomics analyses were acquired to identify the lipid profile of these cells, at different times after injury, and with the same objective, we obtained cDNA from single-cell macrophages obtained from animals at 7 and 21 dpi, material that will be sequenced in experiments of single-cell mRNA sequencing (scRNAseq) and will bring data on the transcriptional profile of these cells, mainly those present at later times. Finally, we standardized the manufacture of encapsulated liposomes with zoledronic acid, as a way to deplete macrophages and thus better understand their function. Therefore, our work helps in a better understanding of the profiles of macrophages during the cardiac regeneration process of zebrafish after cryoinjury and also in the understanding of the cardiac electrical function of this animal in this context. As a result, we were able to obtain clear ECG readings, but we did not find differences in the time after the injury was analyzed, we observed inflammatory infiltrate and collagen deposition in the histological sections, but we did not obtain significant analyzes of the experimental data using the MALDI imaging technique. Cytometry analyzes showed that at late times of injury repair, there is no difference between the number of macrophage profiles, and with lipidomics it was possible to find some differences in lipids in macrophages between the analyzed times after injury.

Keywords: Zebrafish; macrophages; fibrosis; regeneration; acute myocardial infarction; cryoinjury.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Posicionamento dos eletrodos | 31 |
| FIGURA 2 – Aparato de sublimação da matriz | 34 |
| FIGURA 3 – Imagens leituras de ECG..... | 39 |
| FIGURA 4 – Gráfico demonstrando amplitude da onda P de ECG | 40 |
| FIGURA 5 – Gráfico demonstrando amplitude da onda T de ECG | 40 |
| FIGURA 6 – Gráfico demonstrando amplitude da onda QRS de ECG | 41 |
| FIGURA 7 – Gráfico demonstrando intervalos das ondas de ECG | 41 |
| FIGURA 8 – Histologias sham e crioinjúria | 43 |
| FIGURA 9 – <i>Dot plots</i> citometria sham e crioinjúria 13 e 21 dpi | 44 |
| FIGURA 10 – Histograma citometria sham e crioinjúria 13 e 21 dpi..... | 45 |
| FIGURA 11 – Quantificação de células mpeg+ e de células TNF α + | 46 |
| FIGURA 12 – Aplicação da matriz em lâmina contendo amostras..... | 47 |
| FIGURA 13 – Exemplo de aplicação ideal da matriz | 47 |
| FIGURA 14 – Delineamento das amostras sham para MALDI | 48 |
| FIGURA 15 – Delineamento das amostras crioinjúrias para MALDI | 48 |
| FIGURA 16 – <i>Roc plot</i> de um determinado íon detectado em 3 dpi | 49 |
| FIGURA 17 – Imagem de espectro de íon em todas as amostras | 49 |
| FIGURA 18 – Análise de PCA da lipidômica de 13 e 07 dpi | 51 |
| FIGURA 19 – <i>Volcano plot</i> dos lipídios encontrados na análise de lipidômica de 13 e 7 dpi..... | 52 |
| FIGURA 20 – Dados obtidos do cDNA extraído para scRNAseq de 07 dpi | 53 |
| FIGURA 21 – Dados obtidos do cDNA extraído para scRNAseq de 21 dpi | 53 |
| FIGURA 22 – Dados de diâmetro do lipossoma após 2 dias da confecção | 53 |
| FIGURA 23 – Dados de diâmetro do lipossoma após 2 dias da confecção | 54 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ACN | Acetona |
| AppCCI2p | Adenosina 5'- β,γ -diclorometileno trifosfato |
| BIOPOL | Laboratório de Biopolímeros |
| CCL7 | <i>Chemokine ligand 7</i> |
| CCL2 | <i>Chemokine ligand 2</i> |
| CCR2 | <i>Chemokine receptor type 2</i> |
| cDNAs | DNAs complementares |
| CEFAP | Centro de Facilidades para a Pesquisa |
| CEUA/BIO – UFPR | Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CoA | Coenzima A |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| DAN | <i>1,5 diaminonaphthalene</i> |
| DLS | <i>Dinamic Light Scaterring</i> |
| DOPE | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine |
| DPI | Dias pós injúria |
| DSPC | Distearoylphosphatidylcholine |
| ECG | Eletrocardiograma |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| FACS | <i>Fluorescence-activated single cell sorting</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| HESI | <i>Heated Electrospray</i> |
| HIF1 α | <i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> |
| HMGB1 | <i>High mobility group box 1</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HSP | <i>Heat shock proteins</i> |
| IAM | Infarto agudo do miocárdio |

| | |
|---------------|--|
| ICB | Instituto de Ciências Biomédicas |
| ICC | Instituto Carlos Chagas |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-1 α | Interleucina 1 α |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| ILR | Receptor de interleucina |
| IPEC | Instituto para Pesquisa do Câncer |
| ITO | <i>Indium Tin Oxide</i> |
| LC-MS | <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| LIP-CLO | Lipossomas encapsulados com clodronato |
| LIP-ZOL | Lipossomas encapsulados com ácido zoledrônico |
| LIT | Laboratório de Imunologia de Transplantes |
| MALDI | <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i> |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMP | Metaloproteinase |
| mpeg | <i>macrophage-expressed gene 1</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OSM | Oncostatina-m |
| P | <i>Postnatal day</i> |
| PANK | <i>Pantothenate kinase</i> |
| pb | Pares de base |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PFA | Paraformaldeído |
| RAGE | <i>Advanced glycation end-products</i> |
| RCF | <i>Relative centrifugal force</i> |
| RMN | Centro de Ressonância Magnética Nuclear |
| RPE | <i>Random priming and extension</i> |
| SCB | Setor de Ciências Biológicas |
| scRNAseq | <i>Single Cell RNA Sequencing</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |

| | |
|--------------|---|
| SMA | <i>α-smooth muscle actin</i> |
| SPARC | <i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i> |
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator of Transcription 3</i> |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor β</i> |
| TLRs | <i>Toll like receptors</i> |
| TNF α | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| TSP-1 | Trombospondina |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| Unicamp | Universidade de Campinas |
| USP | Universidade de São Paulo |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| WTA | <i>Whole Transcriptome Analysis</i> |
| ZOL | Ácido zoledrônico |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução..... | 16 |
| 2 | Objetivos..... | 18 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 18 |
| 2.2 | Objetivos específicos:..... | 18 |
| 2.2.1 | Caracterização do ambiente da lesão..... | 19 |
| 2.2.2 | Caracterização de macrófagos tardios..... | 19 |
| 3 | Justificativa..... | 19 |
| 4 | Revisão bibliográfica:..... | 19 |
| 4.1 | Reparo tecidual em infarto agudo do miocárdio de mamíferos..... | 19 |
| 4.1.1 | Fase inflamatória..... | 21 |
| 4.1.2 | Fase proliferativa..... | 22 |
| 4.1.3 | Fase de maturação..... | 23 |
| 4.2 | Macrófagos no reparo tecidual de coração de mamíferos..... | 24 |
| 4.3 | Zebrafish como modelo animal de fibrose cardíaca..... | 26 |
| 4.4 | Macrófagos no reparo cardíaco de <i>zebrafish</i> | 27 |
| 4.5 | Lipossomas encapsulados como metodologia de depleção de macrófagos..... | 28 |
| 5 | Materiais e métodos..... | 29 |
| 5.1 | Manutenção dos animais..... | 29 |
| 5.2 | Procedimentos de experimentação animal..... | 30 |
| 5.3 | Eletrocardiograma..... | 31 |
| 5.4 | Histologia..... | 31 |
| 5.5 | Citometria..... | 32 |
| 5.6 | MALDI <i>imaging</i> | 33 |
| 5.7 | Lipidômica..... | 35 |
| 5.8 | Obtenção de cDNA de célula única para scRNAseq..... | 36 |
| 5.9 | Lipossoma..... | 37 |
| 5.9.1 | Confecção..... | 37 |
| 5.9.2 | Padronização..... | 38 |
| 5.10 | Análises estatísticas..... | 38 |
| 6 | Apresentação dos resultados..... | 38 |
| 6.1 | Caracterização do ambiente da lesão..... | 38 |
| 6.1.1 | Alterações elétricas cardíacas típicas de infarto..... | 38 |
| 6.1.2 | Alterações histológicas após crioinjúria cardíaca..... | 43 |
| 6.1.3 | Macrófagos totais e macrófagos inflamatórios presentes no modelo de crioinjúria..... | 44 |
| 6.1.4 | MALDI <i>imaging</i> | 47 |
| 6.2 | Caracterização de macrófagos tardios..... | 51 |
| 6.2.1 | Lipídios estão diferencialmente presentes em macrófagos após 13 e 07 dpi..... | 51 |
| 6.2.2 | Obtenção de cDNA de célula única para scRNAseq..... | 52 |
| 6.2.3 | Lipossomas..... | 54 |
| 7 | Discussão..... | 55 |
| 8 | Conclusão..... | 60 |
| | Referências bibliográficas..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

O IAM é uma lesão que ocorre na falta de suprimento sanguíneo causando necrose do tecido cardíaco. Antes da pandemia da COVID-19, doenças cardiovasculares, incluindo o IAM, eram as que mais matavam no mundo. Em 2019, 397.993 pessoas morreram em decorrência de alguma doença cardiovascular no Brasil (OLIVEIRA et al., 2022). Nos Estados Unidos, em 2020, 1 em cada 6 mortes foi resultada de IAM e a cada 40 segundos uma pessoa sofre esta lesão, segundo dados do *Center for Disease Control and Prevention*. Sabe-se que os seres humanos não possuem capacidade regenerativa no tecido cardíaco, então após esta lesão, o que ocorre é a formação de tecido fibrótico, essencial para conter o dano, mas que não recompõe a função cardíaca. Portanto, há perda no potencial de funcionamento do coração após o infarto (KUMAR et al., 2010).

Diferentemente dos mamíferos, outros animais são capazes de regenerar o coração, como o *Danio rerio*, também conhecido como *zebrafish* ou paulistinha. O *zebrafish* é um peixe teleósteo que ocorre em regiões tropicais e é usado comumente como um peixe ornamental. Ele possui a capacidade de regenerar completamente todos os órgãos e apêndices, como a cauda, o que, adicionado à sua transparência em estágios iniciais da vida, o faz um modelo de estudo da regeneração e fibrose importante (GEMBERLING et al., 2013).

Estudos utilizando o *zebrafish* como modelo de regeneração cardíaca são recentes e os modelos foram sendo aprimorados. A crioinjúria cardíaca é um modelo de infarto interessante por gerar uma resposta fibrótica e inflamatória semelhante à que ocorre em mamíferos, sendo então o melhor modelo para se estudar e entender sobre o processo fibrótico e regenerativo (BEFFAGNA, 2019). Portanto, compreender o que leva estes peixes a regenerarem completamente o coração após crioinjúria ajudará a responder questões e futuramente desenvolver terapias para remediar danos causados pelo infarto em seres humanos.

Os macrófagos, por sua vez, são células fagocíticas do sistema imune que, além de participarem da defesa contra agentes infecciosos, também atuam mantendo a homeostasia e no reparo, regeneração e fibrose tecidual, este último papel que será então tema do presente estudo (GORDON, 2003). Estudos comprovaram este papel crucial dos macrófagos no processo de reparo tecidual em vários modelos de lesão, tanto em modelos murinos como no *zebrafish* após crioinjúria cardíaca. Estes estudos foram conduzidos através da depleção destas células, utilizando lipossomas encapsulados com

clodronato (LIP-CLO) e demonstraram que após passado o tempo em que o reparo deveria ter ocorrido, quando os macrófagos são depletados a lesão permanece.

Além disso, sabe-se que estas células possuem plasticidade fenotípica, ou seja, apresentam várias funções, contrapondo com a visão anterior de que os macrófagos se apresentavam apenas em dois fenótipos: inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2) (MOSSER E EDWARDS, 2008). A transição de perfis destas células ocorre durante o processo fibrótico e de reparo, portanto compreender as diferentes funções dos macrófagos é essencial, principalmente em momentos tardios após a lesão, já que estas células não estão completamente caracterizadas. Portanto, este trabalho tem como um objetivo aprofundar o conhecimento sobre esta população celular.

Uma forma de estudar os macrófagos é depletando-os, o que pode ser feito por meio de ferramentas genéticas ou através de LIP-CLO, como mencionado anteriormente. Os LIP-CLO têm sido amplamente utilizados internacionalmente. São nanopartículas capazes de serem fagocitadas pelos macrófagos liberando o fármaco dentro da célula, onde ele produz um efeito tóxico que causa a morte da mesma (KALRA E BALLY, 2013). No entanto, a importação de soluções prontas, produzidas apenas no exterior, é ineficaz e não apresenta o efeito desejado, devido ao prazo de validade das mesmas. Portanto, tem-se a necessidade de confecção destes. Todavia o clodronato deixou de ser fabricado, e por isso ele foi substituído neste trabalho pelo ácido zoledrônico, fármaco que pertence à mesma classe e possui o mesmo efeito final.

Estudar o reparo tecidual contribuirá para o entendimento dos processos de fibrose cardíaca, o que pode auxiliar o desenvolvimento de novas terapias com maior direcionamento. Neste estudo, foram realizadas análises de ECG, histologia, citometria de fluxo, lipidômica, MALDI *imaging* e obtenção de cDNA de célula única para realização de scRNAseq, além da padronização da confecção do lipossoma encapsulado com ácido zoledrônico.

O ECG é o exame mais utilizado em diagnóstico do IAM. Ele avalia a repolarização do ventrículo a prática desta técnica em *zebrafish* é recente, foi estabelecida em 2006, por Milan e colaboradores (MILAN et al., 2006) com o objetivo de avaliar o prolongamento do intervalo QT induzido por droga. Esta técnica também pode ser utilizada para avaliar o infarto após crioinjúria cardíaca (LIU et al., 2016), como também para identificar alterações na função elétrica cardíaca após modificações genéticas relacionadas à doenças cardiovasculares (LENNING et al., 2018), por exemplo. Portanto, é uma técnica importante para a caracterização da crioinjúria.

Além do ECG, técnicas como citometria, para a avaliação quantitativa do número de células no ambiente da lesão e a histologia, como forma de avaliar o padrão tecidual geral, e MALDI *imaging* também são importantes para a caracterização da lesão. O MALDI *imaging* é uma técnica que utiliza princípios da espectrometria de massa para adquirir um panorama de metabólitos, lipídios, peptídeos ou proteínas. As amostras são cortes histológicos depositados em uma lâmina própria do equipamento que possui carga, facilitando a ionização das moléculas que serão analisadas. Para obter então a informação sobre quais moléculas estão presentes na amostra, ela é excitada com um laser, tornando possível a ionização destas. As moléculas ionizadas são detectadas pelo detector e após são identificadas através de sua razão massa/carga.

Portanto, este trabalho demonstrou alterações nos intervalos QT, QTc e JT das leituras de ECG entre animais crioinjuriados em 3 dpi e controle, espessamento do epicárdio e infiltrado inflamatório em dias iniciais após a crioinjúria e que em 13 e 21 dpi há pouca variação no número de macrófagos totais e inflamatórios. Adicionalmente, foi encontrado espectro lipídico diferencial entre 03 e 07 dpi e 13 e 07 dpi, após análise de MALDI *imaging*, assim como em análises de lipidômica em 13 e 07 dpi. Por fim, foram obtidos cDNA de célula única que serão utilizados para dar prosseguimento ao experimento de scRNAseq e foi padronizada metodologia de quantificação do ZOL. Portanto, este trabalho contribui para um melhor entendimento do processo de regeneração cardíaca do *zebrafish*, após crioinjúria, principalmente por demonstrar diferentes lipídios presentes de forma distinta nos tempos analisados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo caracterizar o ambiente da lesão cardíaca e investigar diferentes perfis de macrófagos na regeneração do coração, utilizando o modelo de crioinjúria cardíaca de *zebrafish*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE DA LESÃO

- Aprimorar metodologia de dissociação das células cardíacas do *zebrafish*;
- Avaliar a cicatriz fibrótica e o ambiente celular através de histologia, citometria e MALDI *imaging*
- Estabelecer metodologia de obtenção de eletrocardiograma e avaliar a função elétrica cardíaca de animais que sofreram crioinjúria, comparando com animais sham;

2.2.2 CARACTERIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS TARDIOS

- Distinguir diferentes populações de macrófagos através de análises de lipidômica;
- Obter cDNA de célula única a fim de realizar posteriormente sequenciamento;

3 JUSTIFICATIVA

O infarto atinge o mundo todo e é um tipo de lesão que causa complicações e pode levar à falência cardíaca. Não existe tratamento que restaure o tecido perdido, apenas para amenizar as consequências do infarto. Além disso, a inflamação está presente em todos os processos de reparo, na fibrose e regeneração. Os macrófagos estão presentes nesta fase, mas também em momentos menos inflamatórios, auxiliando na conclusão do reparo. Compreender como estas células transitam entre diferentes funções auxiliará no entendimento do processo total e servirá como base para aplicações futuras. Estudar os diferentes perfis de macrófagos no contexto de lesão cardíaca pode gerar dados que no futuro auxiliarão no desenvolvimento de terapias que de fato curem a cicatriz fibrótica.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

4.1 REPARO TECIDUAL EM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO DE MAMÍFEROS

Segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, entre 2010 e 2021 foram diagnosticados 1.066.194 de infarto agudo do miocárdio (IAM). Já as doenças cardiovasculares no geral (doença coronariana, cerebrovascular, arterial periférica, cardíaca reumática, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia

pulmonar), que são as principais causas de morte no mundo, são a causa de cerca de 17.9 milhões de mortes todo ano, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). O tratamento envolve a manutenção dos fatores de risco, que são: tabagismo, dietas não saudáveis, obesidade, sedentarismo, uso excessivo de álcool e diabetes. Também é necessária a intervenção farmacológica, a depender do estado do paciente, para aqueles que são de risco e que já sofreram IAM, por exemplo. Alguns medicamentos utilizados são: betabloqueadores, aspirina, inibidores da enzima conversora de angiotensina e estatinas. Estes são apenas remediadores das consequências do infarto, em outros casos, somente a intervenção cirúrgica trata as doenças (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022).

A principal causa de lesão cardíaca em humanos é a isquemia, ou seja, desbalanço entre demanda e oferta de oxigênio ao músculo cardíaco (FRANGOGIANNIS, 2015), ocasionando infarto na área afetada. As causas mais comuns da isquemia são a arteriosclerose e a doença coronariana. Ao término do processo, em mamíferos, tem-se uma cicatriz fibrótica não funcional, que ao longo do tempo pode gerar complicações, como a redução da capacidade de bombeamento do coração, piora progressiva da lesão e hipertrofia, o que pode levar à insuficiência cardíaca (RICHARDSON, 2018). Apesar de existirem tratamentos que amenizam as consequências do infarto, o único tratamento totalmente eficaz é o transplante cardíaco, que é invasivo, difícil e demorado. Portanto, terapias alternativas são necessárias. Para isso, precisa-se entender a base dos mecanismos do infarto.

O infarto em mamíferos é muito bem caracterizado. Em um evento de isquemia, os cardiomiócitos possuem energia para manter as contrações cardíacas por apenas 60 segundos de isquemia. Para diminuir danos, a contração é reduzida através da diminuição da disponibilidade de cálcio e inibição das funções das proteínas contráteis, permitindo que os cardiomiócitos gastem energia mais lentamente, aumentando a duração dela. Esse mecanismo é efetivo se o suprimento sanguíneo for restaurado (reperfusão) dentro de 4 a 5 minutos (FRANGOGIANNIS, 2015). Estudos também demonstraram que após a reperfusão, viu-se uma grande correlação entre o tamanho da área de risco e o tamanho da área infartada. Pode-se concluir então que a reperfusão afeta diretamente a intensidade do infarto e sua patologia (COPE et al., 1997).

O diagnóstico do infarto é feito através da avaliação dos níveis séricos de troponina cardíaca e também por ECG. Esta última técnica é utilizada para classificar o infarto, podendo ser *ST-segment elevation myocardial infarction* (STEMI) ou *non-ST-segment*

elevation myocardial infarction (NSTEMI). O STEMI atinge toda a parede do miocárdio, enquanto que o NSTEMI não. Essas classificações usam como base a elevação ou não do segmento ST durante o infarto. Este é o intervalo entre o final do complexo QRS e o início da onda T, indicando repolarização inicial do ventrículo. A principal causa do STEMI é a oclusão da artéria coronária, na maioria das vezes é consequência de arteriosclerose (VOGEL et al., 2019).

Como o infarto em mamíferos leva à fibrose, há a perda de células funcionais do tecido, principalmente cardiomiócitos, cerca de um bilhão destas células morrem após a lesão. Recentemente foram levantadas evidências que sugerem que, ao contrário do que se acreditava os cardiomiócitos possuem capacidade de divisão, porém bastante reduzida. Ao longo da vida, o ser humano renova uma pequena porcentagem de seus cardiomiócitos, 1% em jovens e 0,5% em idosos. A divisão ocorre após estímulos do ambiente causando desdiferenciação e reentrada no ciclo celular destas células, como é o que ocorre com no *zebrafish* em lesões cardíacas (BLANKESTEIJN, 2020). Todavia, isso ainda não é suficiente para que o coração humano adulto apresente uma regeneração como a presente neste peixe.

No entanto, estudos demonstraram que corações de camundongos neonatos em estágio de desenvolvimento P (*postnatal day*) 1 conseguem regenerar o coração, sem a formação de cicatriz fibrótica, em modelos de ressecção apical e de infarto (PORRELLO ET AL, 2013). Porém, esta capacidade é perdida assim que eles atingem o estágio P7.

Apesar da incapacidade de regeneração cardíaca dos humanos, após o infarto é necessário que a lesão seja reparada. Este processo pode ser dividido em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (FRANGOGIANNIS, 2015).

4.1.1 FASE INFLAMATÓRIA

A fase inflamatória é essencial para a contenção da lesão, eliminação de debris celulares e da matriz extracelular (MEC) e de fatores liberados após a lesão. A percepção do infarto ocorre através da liberação das chamadas alarminas. São moléculas produzidas por células necróticas que ativam células do sistema imune inato, as primeiras a serem recrutadas para o local da lesão, principalmente neutrófilos. Alguns exemplos de alarminas são: *high mobility group box 1* (HMGB1), proteínas da família S100, RNAs extracelulares, interleucina 1 alfa (IL-1 α), *heat shock proteins* (HSP), ATP, fragmentos da

matriz extracelular, produtos da ativação do sistema complemento e espécies reativas de oxigênio (EROS) (FRANGOGIANNIS, 2015).

A HMGB1 é bastante estudada, ela atua através da ativação do *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE). Esta última molécula participa do recrutamento de leucócitos através da regulação da expressão de citocinas e quimiocinas (KOHNO ET AL, 2009). As outras alarminas atuam através de outros receptores da imunidade inata, como a família dos *toll like receptors* (TLRs), TLR2, TLR3, TLR4 e receptores de interleucina (ILR) (FRANGOGIANIS, 2015). São diferentes moléculas que possuem mecanismos diferentes, mas que possuem o mesmo objetivo final: ativar sinais inflamatórios que vão recrutar células do sistema imune inato para eliminação de debris.

Após reconhecimento das alarminas através de receptores específicos, ocorre a ativação da via de transdução de sinal NF- κ B, que promove a transcrição de genes codificantes de citocinas. As principais citocinas presentes neste contexto são: IL-1, *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1). A IL-1 promove ativação de moléculas de adesão, produção de quimiocinas, recrutamento de leucócitos e também atua na regulação dos fibroblastos. Já o TNF α , induz a produção de citocinas através de células inflamatórias e a IL-6 ainda não possui função bem definida. As quimiocinas também são induzidas nesta fase inicial, elas atuam principalmente no recrutamento de leucócitos (FRANGOGIANNIS, 2015). Por fim, após eliminação de debris, ocorre a deposição de uma matriz temporária de fibrina (DOBACZEWSKI ET AL, 2006), que tem como função apoiar leucócitos, fibroblastos e células vasculares que foram recrutadas. Como todo processo inflamatório, esta fase precisa ser regulada para não se transformar em uma inflamação crônica.

4.1.2 FASE PROLIFERATIVA

A inibição da inflamação marca o início da fase proliferativa. O próprio término da eliminação de debris, a apoptose de neutrófilos e sua eliminação por fagócitos induzem a liberação de citocinas anti-inflamatórias como: interleucina 10 (IL-10), *transforming growth factor β* (TGF- β), anexina 1, lactoferrina (BOURNAZOU ET AL, 2009), de forma direta e indireta, sendo esta última através de macrófagos. O processo de fagocitose de debris e corpos apoptóticos também induz a expressão de lipídios pró-resolutivos pelos macrófagos (SOEHNLEIN E LINDBOM, 2010). A inibição da inflamação também é feita

através do bloqueio dos receptores ativos na fase inflamatória, como os TLRs (O'NEILL, 2008).

Os fibroblastos são as células mais abundantes durante a fase proliferativa. Estas células mudam de perfil e passam a ser miofibroblastos com diferentes origens e funções, como: síntese de componentes da matriz, proliferação e expressão de proteínas contráteis como a *α -smooth muscle actin* (α -SMA) (SHINDE E FRANGOIANNIS, 2014). Essa transição e ativação dos fibroblastos são mediadas por fatores de crescimento, como o TGF- β , angiotensina II e proteínas da matriz (DAVIS E MOLKENTIN, 2014).

A fase proliferativa é então caracterizada pelo cessamento da inflamação, impedimento de sinais inflamatórios e de degradação da MEC. É também neste momento que ocorre a deposição de elementos essenciais da MEC como o colágeno. Trombospondina (TSP-1), osteopontina, *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) e a periostina, são exemplos de macromoléculas depositadas na MEC, mas sem possuir função estrutural e sim de sinalização. Estas moléculas são responsáveis pelas funções da fase proliferativa, ativação de fibroblastos e de macrófagos (FRANGOIANNIS ET AL, 2015).

4.1.3 FASE DE MATURAÇÃO

A fase de maturação é a finalização do reparo, onde ativações que foram promovidas na fase proliferativa são inibidas. Os miofibroblastos perdem suas funções (REN ET AL., 2002), as macromoléculas da MEC diminuem, tem-se então como produto final uma cicatriz fibrótica madura. Esta é uma fase do reparo que ainda não é muito estudada tanto em humanos e camundongos quanto em outros modelos como o *zebrafish*.

Após estabelecimento da cicatriz fibrótica, o miocárdio sofre remodelação e hipertrofia, que dependem do tamanho da cicatriz. A depender da intensidade da lesão, pode ocorrer dilatação ventricular, o que pode levar à falência cardíaca. Outras complicações também podem ocorrer após infarto, principalmente do tipo STEMI. É o caso de arritmias cardíacas (alteração na frequência cardíaca), trombo de ventrículo esquerdo e complicações mecânicas (ruptura do músculo papilar, aneurisma ventricular esquerdo, ruptura do septo ventricular e ruptura da parede muscular), que são mais raras (VOGEL ET AL, 2019).

4.2 MACRÓFAGOS NO REPARO TECIDUAL DE CORAÇÃO DE MAMÍFEROS

O processo de reparo do infarto é complexo e pode ser dividido em três fases, como foi explicado acima. Os macrófagos estão presentes nas três fases abordadas, assumindo diferentes perfis ao longo do tempo, contrastando com os neutrófilos, que são recrutados para permanecerem apenas na fase inflamatória. Em mamíferos, a maioria dos macrófagos presentes no reparo do coração são recrutados, derivados de monócitos. Existe uma pequena porção de macrófagos cardíacos, que são residentes e possuem função de homeostase. Estas células ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que são minoria no reparo do coração, apesar de serem importantes nas três fases. Os macrófagos residentes são caracterizados, em camundongos e humanos, por não expressarem *chemokine receptor type 2* (CCR2), enquanto que os recrutados não expressam. A maior população de macrófagos encontrada durante o reparo é então derivada de monócitos, que se mantém no local da lesão até o fim do reparo, através de proliferação celular (HONOLD E NAHRENDORF, 2018).

Os primeiros monócitos recrutados possuem perfil inflamatório, com características fagocíticas, o que contribui para a limitação e resolução da inflamação (NAHRENDORF ET AL, 2007). Assim como os neutrófilos, estes macrófagos são responsáveis pela secreção de metaloproteinases (MMP) e outras enzimas proteolíticas que degradam a MEC, auxiliando na fagocitose e também aumentando os sinais inflamatórios. Além disso, estas células neste momento também secretam IL-1, TNF α e IL-6 (KIM ET AL, 2021). Durante as fases posteriores, estas células também possuem a função de regulação, isso ocorre através da liberação de fatores anti-inflamatórios após fagocitose. Esses fatores trazem para os macrófagos uma característica protetora. Estudos já demonstraram que existe uma relação entre quantidade destas células e capacidade regenerativa, ou seja, animais que regeneram possuem mais macrófagos na lesão no momento do reparo do que aqueles que não possuem essa habilidade (DE COUTO, 2019).

Os macrófagos também participam da angiogênese e estimulam a fibrose que ocorre durante o reparo, tanto de forma direta, diferenciando-se em células semelhantes às células endoteliais, quanto de forma indireta, através da produção de ligantes de Wnt (LEOR ET AL, 2016), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), TGF- β e IL-10 (KIM ET AL, 2021). Nas fases tardias, os macrófagos são derivados de monócitos e expressam Ly6C (HILGENDORF ET AL, 2015). Estes apresentam características anti-inflamatórias, como contribuição para a deposição de colágeno, ativando fibroblastos e também

diretamente, visto que um estudo demonstrou uma regulação positiva do colágeno em macrófagos tanto de *zebrafish* quanto de mamíferos, após lesão (SIMÕES ET AL, 2020). Estes macrófagos tardios também modulam a atividade das MMP e possuem características proliferativas (BEVAN ET AL, 2020).

Apesar de parecer contraditório o fato de os macrófagos serem cardioprotetores em processos lesivos e, ao mesmo tempo, também promoverem a fibrose, um estudo demonstrou que estas células também estão envolvidas na regulação do processo fibrótico excessivo. Quando em ambiente de hipóxia, através do fator de transcrição *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF1 α), ocorre a transcrição da oncostatina-m (OSM) que inibe diretamente a ativação de fibroblastos que acontece através do TGF- β 1 (ABE ET AL, 2019).

Já foi demonstrado que a depleção de macrófagos no coração de camundongos neonatos e *zebrafish* causa a falha na regeneração cardíaca (LEOR ET AL, 2016). Através de citometria de fluxo, comparando camundongos P1 e P14 em diferentes tempos após infarto, descobriu-se que os macrófagos estão presentes no processo de regeneração. Foi demonstrado que há uma maior quantidade destas células em 07 dpi em ambos os estágios de desenvolvimento, sendo em maior quantidade em animais P1. Para entender a função, estas células foram depletadas através da injeção intraperitoneal de lipossomas encapsulados com clodronato. As injeções foram feitas em 3 dpi para que macrófagos de 7 dpi fossem depletados, em animais P1. Os resultados obtidos demonstraram um menor infiltrado de macrófagos e permanência da cicatriz fibrótica em 7 e 21 dpi, o que não foi visto em animais controles. Portanto, concluiu-se que estas células são essenciais para a resolução da lesão, em camundongos neonatos, o que aponta relevância para o objeto de estudo deste trabalho (AURORA ET AL, 2014).

Um outro estudo demonstrou que macrófagos residentes são essenciais para prevenir a fibrose e promoverem a angiogênese (REVELO ET AL, 2021), o que pode explicar porque camundongos neonatos possuem capacidades regenerativas e os adultos não. Outras diferenças também são observadas em estudos comparando estes dois modelos animais. Há maior presença de macrófagos residentes em camundongos neonatos, estes também apresentam menor expressão de citocinas inflamatórias como *chemokine ligand 2* (CCL2), *chemokine ligand 7* (CCL7), interleucina 1 β (IL-1 β), TNF α e IL-6 e também menor estresse oxidativo (LAVINE ET AL, 2014). O fator de transcrição STAT3, que atua na transcrição de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, regulando proliferação celular, apoptose e a inflamação, também está presente em

camundongos neonatos e em *zebrafish*, mas não em camundongos adultos, em modelo de infarto (LEOR ET AL, 2016).

4.3 ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL DE FIBROSE CARDÍACA

O *Danio rerio*, mais conhecido como *zebrafish* ou paulistinha, é um peixe de água doce que pertence à família Cyprinidae. É um modelo experimental que inicialmente chamou a atenção para a sua transparência em estágio embrionário e larval, o que facilita o estudo da embriologia (LAWSON E WEINSTEIN, 2002). Apesar de parecerem distantes, o *zebrafish* e os mamíferos possuem 70% de semelhança genética. Além disso, este modelo animal é fácil de manusear, ocupa pouco espaço por conta do seu tamanho e possui rápido desenvolvimento, possibilitando ensaios em menos tempo. Outra vantagem deste modelo é a facilidade de manipulação genética, possibilitando a criação de uma infinidade de modelos transgênicos (RYAN ET AL, 2021). Recentemente o *zebrafish* ganhou destaque por sua capacidade regenerativa, pois consegue regenerar todos os apêndices e órgãos, inclusive o coração. Desde que essa habilidade foi descoberta (RICHARDSON, 2018), ele passou a ser usado como modelo experimental para entender os processos de reparo, regeneração e fibrose. Entender como este animal possui tal habilidade, ajudará a desenvolver terapias para tratar processos fibróticos em seres humanos.

O coração do *zebrafish* é dividido entre um átrio e um ventrículo, diferente do humano, que possui dois átrios e dois ventrículos, mas a histologia destes dois órgãos é muito semelhante. A habilidade de regeneração cardíaca deste peixe foi descoberta por Poss e colegas (POSS ET AL, 2002) utilizando o modelo de ressecção de 20% do ventrículo, eles descobriram que em 60 dias o *zebrafish* regenera completamente a porção que foi retirada. Em 2011 desenvolveu-se o método da crioinjúria que consiste em expor uma pequena porção do ventrículo do coração e então encostar por alguns segundos uma sonda, feita de cobre ou outro metal, congelada, a baixa temperatura lesiona o coração. Esse modelo possui maior semelhança ao processo fibrótico que ocorre em mamíferos, por conta da formação de uma cicatriz de colágeno entre 7 e 14 dpi e também apresenta uma resposta inflamatória semelhante (GONZÁLEZ-ROSA ET AL, 2011).

O comportamento das células inflamatórias no coração do *zebrafish* após a crioinjúria foi demonstrado recentemente por (BEVAN ET AL, 2020). Neste trabalho, a pesquisadora e colaboradores demonstraram que, assim como é visto em outros modelos

de regeneração, como na regeneração caudal (NGUYEN-CHI ET AL, 2017), primeiramente há uma migração de neutrófilos e macrófagos, com perfis inflamatórios que expressam TNF α , por exemplo, e permanecem até o terceiro dia após a lesão. A partir do quarto dia inicia-se o processo resolutivo, com atividade de fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos pró-resolutivos, que deixam de expressar TNF α e têm como pico o 7 dpi, quando a cicatriz já está formada. Os neutrófilos nesse momento são raros e macrófagos pró-resolutivos estão presentes em grande quantidade até 14 dpi, quando começam a diminuir e em 21 dpi já existe em pequena quantidade. O colágeno I é o componente de matriz mais presente, começa a ser depositado a partir do dia 03 e está em maior quantidade no dia 07, também há deposição de fibrina. A partir de 14 dpi a cicatriz de colágeno começa a diminuir, sendo já mínima no em 21 dpi e 60 dpi não é mais vista (BEVAN ET AL, 2020). Portanto, as fases iniciais até a deposição de colágeno, são conservadas em humanos. O ponto que difere os dois organismos é que o *zebrafish* após 14 dpi consegue resolver a cicatriz de colágeno.

4.4 MACRÓFAGOS NO REPARO CARDÍACO DE *ZEBRAFISH*

Como mencionado anteriormente, as três fases do reparo cardíaco pós-infarto são conservadas em humanos, ou seja, ocorrem de forma semelhante. Portanto, pode-se concluir que os macrófagos são igualmente essenciais neste processo. Como dito acima, já se sabe que estas células estão presentes na regeneração cardíaca do *zebrafish*, mas outros estudos buscaram entender sua função neste processo através da depleção dos macrófagos. Estas pesquisas utilizaram LIP-CLO para depleção em diferentes tempos e foi descoberto que quando os macrófagos não estão presentes, há menor deposição de colágeno, quando depletados em momentos iniciais e persistência desta molécula quando depletados após 3 dpi, assim como maior deposição de fibrina, diminuição da atividade dos cardiomiócitos e falha na resolução da cicatriz (BEVAN ET AL, 2020 e CHARLES ET AL, 2016).

Muitos pesquisadores tentam entender como uma única célula, o macrófago, pode estar presente em todas as fases do reparo cardíaco. Algumas moléculas foram relacionadas a funções que ocorrem em momentos específicos. Hong Ma e colaboradores realizaram scRNAseq de células não-cardiomiócitos obtidas em 02, 07 e 14 dpi, utilizando o modelo de crioinjúria cardíaca. Esta técnica permite a separação das células, extração individualizada do RNA e através de marcações, após sequenciamento, é possível

diferenciar populações celulares. Com isso, os pesquisadores separaram os macrófagos em 5 clusters (MC) com base em diferenças de expressão. O MC1 foi caracterizado por expressar os genes *il1b*, *tnfa* e *csf3b* que são tipicamente inflamatórios e está presente em 02 e 07 dpi. Já MC2 apresentou características de apresentação de antígenos, expressando os genes *cd74a* e *mhc2dab* e foi encontrada em 14 dpi. MC3 foi designado como fagocitário, apresentou os genes *cd63* e outros relacionados a catepsina, esteve presente majoritariamente em 02 dpi. MC4 apresentou um perfil proliferativo, o que pode indicar uma transição entre os macrófagos iniciais e macrófagos tardios. Por fim, MC5 demonstrou características inflamatórias, também esteve presente no início do reparo (02 e 07 dpi) e apresentou genes relativos a granulina, com funções de eliminação de debris fagocitados (MA ET AL, 2021).

Este estudo é de extrema importância para o entendimento da transição de perfis de macrófagos que ocorre ao longo do reparo cardíaco. Mas ele conseguiu descrever os momentos mais iniciais e inflamatórios, ainda é necessário descrever os macrófagos tardios, que estão presentes em 21 dpi, por exemplo. No entanto, este objetivo é um desafio por conta da quantidade de células presentes, o que é um fator limitante em termos de técnica. Como dito anteriormente, os macrófagos no dia 21 são mais escassos (BEVAN ET AL, 2020) e o *zebrafish* por conta de seu tamanho, possui naturalmente menos células.

4.5 LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COMO METODOLOGIA DE DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS

Desenvolvido por Rooijen no final da década de 80 e início da década de 90 (ROOIJEN E SANDERS, 1994), o meio mais usado no mundo para depletar macrófagos é o LIP-CLO. Lipossomas são vesículas lipídicas que possuem característica hidrofílica e hidrofóbica (AKBARZADEH ET AL, 2013).

Os lipossomas são então o meio necessário para a entrega do fármaco. Uma vez dentro da célula, o LIP-CLO é degradado pelas enzimas lisossomais dos macrófagos, liberando o clodronato. Este, é metabolizado ao composto adenosina 5'- β , γ -diclorometileno trifosfato (AppCCI2p), que é análogo ao ATP, e devido a esta característica, é tóxico para a célula em grandes quantidades. A morte celular é a consequência da inibição da síntese de ATP, o que causa falha na síntese de proteínas, afetando sinalizações celulares, por exemplo (FRITH ET AL, 1997).

O clodronato e o ácido zoledrônico (ZOL) são fármacos pertencentes à classe dos bifosfonatos, mas de diferentes subclasses. Eles se diferenciam pelo ZOL possuir um nitrogênio no radical da cadeia principal, pertencendo então à classe dos bifosfonatos nitrogenados, acompanhado do pamidronato, o alendronato, pertencentes à segunda geração e o risedronato, que pertence à terceira geração, com o ZOL. Apesar desta diferença, ambos possuem a mesma função biológica, são utilizados para o tratamento da osteoporose e outros distúrbios ósseos em que há discrepância entre a absorção e a remodelação óssea. No entanto, o ZOL pode induzir a morte celular por outro mecanismo além do mesmo utilizado pelo clodronato, pode atuar inibindo a farnesil fosfato sintase, o que impede a prenilação de proteínas (SCHMEEDA ET AL., 2013).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

No trabalho foram utilizados peixes *zebrafish* adultos, de linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry;TNF α :GFP), Tg (mpeg:mCherry) e selvagens (AB), advindos do biotério da USP e do biotério da UFPR. As linhagens transgênicas mencionadas são resultados de modificações genéticas que adicionam a um promotor uma determinada proteína fluorescente que pode ser usada em diversos tipos de experimentos para identificar o que o promotor codifica. Neste caso, a linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry;TNF α :GFP) possui a proteína fluorescente mCherry acoplada ao promotor de mpeg, uma proteína característica de macrófagos e a *Green Fluorescent Protein* (GFP) acoplada ao promotor TNF α .

Os animais foram mantidos na Rack para *zebrafish* da marca Alesco® no biotério da UFPR e foram alimentados pelo menos duas vezes ao dia. A alimentação foi feita com ração e artêmias. A ração é da marca Zeigler, com diferentes floculações denominadas AP 50, AP 100, AP 250 e AP 450 e são administradas de acordo com a idade dos peixes. Para os adultos, foram utilizadas rações AP 450 e/ou 250 e artêmias da marca Artêmia Salina do RN cultivadas no próprio laboratório, que possui fotoperiodização de 14 horas-luz e 10 horas escuro.

Todo o trabalho foi realizado com zelo e o cuidado necessário para manter os padrões elevados de bioética e humanidade. Os participantes da pesquisa foram aprovados no Curso de Manipulação Animal pela UFPR. Todas as experimentações

animais descritas no presente estudo foram conduzidas na UFPR e na USP e foram aprovadas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da UFPR (CEUA/BIO – UFPR), sob o número 1217 e 1218, e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, sob o número 7283200722, certificando que os procedimentos utilizados estão de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Cuidado e Uso de Animais para fins Científicos e de Ensino, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as diretrizes internacionais para experimentação animal.

5.2 PROCEDIMENTOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Para a crioinjúria, foi seguido o protocolo de (GONZÁLEZ-ROSA E MERCADER, 2012) Foi utilizada uma sonda feita por nós com um fio de cobre, que foi congelada em nitrogênio líquido fornecido pelo Centro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da UFPR. Para a cirurgia, os animais foram colocados em um *becker*, contendo tricáína a 0,016% e, quando eles não respondem mais a estímulos, posicionados em uma bucha comum de plástico úmida e cortada no sentido do comprimento, na parte amarela, com o pericárdio para cima. Com o auxílio de uma pinça cirúrgica, a pele que envolve a cavidade cardíaca foi levantada para que um pequeno corte pudesse ser feito nela, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para expor o coração. Após, a sonda congelada foi gentilmente encostada no coração por 24 segundos, para que a lesão pudesse ocorrer. Finalizado o procedimento, o animal foi transferido para um aquário com água ambientada e reanimado gentilmente pipetando água do próprio aquário nas guelras do peixe. As cirurgias de sham foram feitas utilizando com base o mesmo artigo, da mesma forma, mas com a sonda em temperatura ambiente.

Para a coleta dos corações, os animais foram eutanasiados por choque hipotérmico e preparados na bucha da mesma forma que é feita para a crioinjúria, mas os cortes foram feitos em locais diferentes. Inicialmente separou-se as guelras do animal com auxílio da pinça e fez-se um corte com a tesoura entre elas. Fez-se mais um corte horizontal na base do pericárdio, acima do intestino, de forma que a pele entre os cortes foi removida, assim o coração foi exposto. Com uma pinça o coração foi coletado pelo seu bulbo arterial.

5.3 ELETROCARDIOGRAMA

Para a obtenção do ECG, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Eles foram posicionados da mesma forma, com o ventre voltado para cima, e os eletrodos posicionados superficialmente, mas de forma com que ficassem fixos, acima do coração, em cima do coração e em cima do intestino, conforme indicado na figura 1. Os eletrodos foram adaptados por nós por conta do tamanho dos animais, utilizamos agulhas de quiroacupuntura de 0,25 mm de espessura como pontos finais dos eletrodos, método adaptado do protocolo de Zhao (Zhao *et al.*, 2019). Foram feitas leituras em animais controles (número amostral = 5) e animais 3 dpi (número amostral = 4).

As leituras foram feitas em parceria com o laboratório de Fisiologia da Contração Muscular, do professor Dr. Fernando Dias, do departamento de Fisiologia do SCB da UFPR. O equipamento usado para leitura foi o PowerLab 26T da ADInstruments, o amplificador de sinal Bridgeamp da mesma empresa. A leitura foi obtida utilizando o software do equipamento, os filtros utilizados foram de 20 mV e amplificação de 100 Hz e de 20 mV e amplificação de 50 Hz. O tempo máximo em que o animal ficou em análise e em processo de anestesia foi de 10 minutos.

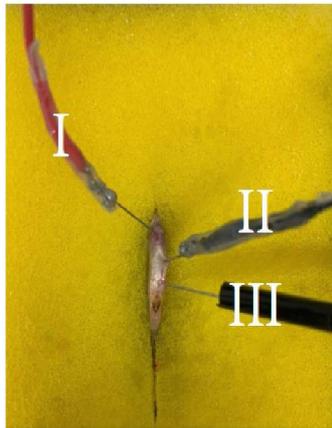


Figura 1.: Posicionamento dos eletrodos no animal. Eletrodo I é o positivo, eletrodo II o negativo e o eletrodo III o fio-terra. Fonte: Laura Nicolazzi.

5.4 HISTOLOGIA

As histologias foram feitas em parceria com a professora Dr. Maritana do Departamento de Biologia Celular do SCB da UFPR. Os animais foram lesionados com crioinjúria e sham e os corações foram coletados como descrito acima, em 03, 07, 13 e 21

dpi, foram utilizados 5 animais por grupo (BEVAN ET AL, 2020) e fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em temperatura ambiente por 16 horas. Após, os corações foram lavados três vezes de 30 minutos cada em álcool 70%.

As desidratações dos corações foram feitas embebendo-os nas seguintes soluções, seguindo os determinados tempos: 15 minutos em álcool 80%, 85% e 90%, nesta ordem, seguindo o mesmo tempo; 4 lavagens de 10 minutos cada em álcool absoluto; 10 minutos em solução de 50% de álcool absoluto e 50% de xilol; 10, 5 e 2 minutos em xilol, desta forma a desidratação termina e o material foi embocado em parafina a 60° C por 2 h.

Os cortes foram feitos utilizando micrótomo. Eles foram desparafinizados nas lâminas, corados e desidratados por imersão em diferentes soluções e em diferentes tempos. A desparafinização foi feita da seguinte forma: 3 minutos em xilol; 3 minutos em álcool 100%; 3 minutos em álcool 90%; 3 minutos em álcool 80%; 3 minutos em álcool 70% e lavados 2x por imersão com água destilada. As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson, da seguinte forma: 2 minutos em Hematoxilina de Harris; 6 minutos de lavagem em água corrente; 2 lavagens por imersão em água destilada; 30 s em Fucsina Ácida de Ponceau; 2 minutos em Ácido Fosfomolibdico a 1%; 6 minutos em Azul de Anilina a 1%; 1 minuto em água acética e álcool acético, respectivamente, ambos a 1%. Após processo de coloração, os cortes foram desidratados da seguinte forma: 1 minuto em álcool 95%; 2 lavagens de 3 minutos em álcool 100%, utilizando soluções diferentes para cada lavagem; 3 minutos em xilol e mais 3 minutos em xilol, onde as lâminas foram mantidas para seguirem para o processo de montagem. As lâminas secaram durante 24 h e a análise delas foi feita seguindo os parâmetros do artigo (GONZÁLEZ-ROSA ET AL, 2011).

5.5 CITOMETRIA

Os animais utilizados para a citometria foram da linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry;TNF α :GFP). Foram feitas as análises em 13 e 21 dpi, com número experimental de: sham 13 dpi = 8; crio 13 dpi = 8; sham 21 dpi = 5 e crio 21 dpi = 5. Os animais foram eutanasiados e seus corações foram coletados conforme descrito anteriormente. Os corações foram digeridos seguindo protocolo de dissociação que foi melhorado por nós. Após a coleta, os corações foram coletados e lavados em tubos *ependorfs* contendo 500 μ L de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1x, sobre gelo. Após,

foram imersos e gentilmente triturados com tesoura cirúrgica em tubos *eppendorfs* contendo 500µL de solução de dissociação, que consiste em 0,25 mg/mL de colagenase IV, 0,5 mg/mL de DNase I e PBS 1x. Os tubos foram posicionados em *thermomixer* à 34 °C por no máximo 20 minutos à 300 rpm para que as ações das enzimas ocorressem. A reação foi neutralizada colocando os tubos em gelo e adicionado 1 volume de solução de PBS 1x contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Após, a suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm por 8 minutos à 4° C, ressuspendida em solução de PBS 1x contendo 2% de SFB, que foi filtrada em *cell strainer* de 40 µm. A suspensão final foi então centrifugada novamente a um *relative centrifugal force* (RCF) de 400 por 10 minutos à 4° C, o sobrenadante foi descartado e a solução foi ressuspendida em PBS 1x em tubos *facs* para a realização da citometria. O citômetro utilizado foi o LSRFortessa X-20, da facility FLUIR do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da USP.

5.6 MALDI *IMAGING*

O MALDI *imaging* é uma técnica de espectrometria de massa acoplada ao imageamento, na qual é realizado o processamento de cortes de amostras em lâminas, como na histologia. Os cortes são envoltos por uma matriz, que é excitada e ioniza moléculas da amostra, que são detectadas pelo detector de massas. Para que isso seja possível, a lâmina utilizada precisa ser recoberta por *indium tin oxide* (ITO), um composto que possui condutividade elétrica e é transparente, ideal para a técnica.

Para o experimento, foram utilizados animais sham e animais que sofreram crioinjúria após 03, 07, 13 e 21 dpi e foram utilizados 3 animais por grupo. As lesões, cirurgias e coletas foram realizadas conforme descrito anteriormente. Após a coleta, os corações foram lavados em PBS 1x, sobre gelo, depositados individualmente em moldes de carboximetilcelulose (CMC) e congelados. As amostras foram seccionadas em criostato à – 20° C, cortes sequenciais foram realizados e depositados em duas lâminas revestidas com ITO, fornecidas prontas pela Bruker®, e em uma lâmina comum de histologia.

A matriz utilizada foi a 1,5 *diaminonaphthalene* (DAN). A aplicação foi feita por sublimação, utilizando vácuo. A lâmina foi posicionada no sublimador conforme figura 2B. Gelo e água são depositados em compartimento acima da lâmina, a fim de criar diferença de temperatura e resfriá-la. A matriz é então depositada ao fundo do sublimador, em contato indireto com o banho de sal, o sublimador é posicionado acima de banho de sal à

90° C e acoplado a sistema de vácuo, conforme a figura 2. Após montagem do conjunto, foram cronometrados 10 minutos para que ocorresse a sublimação da matriz.

A análise foi feita utilizando o equipamento MALDI-TOF/TOF autoflex Max da Bruker® do departamento de bioquímica do SCB da UFPR, com o método que detecta íon de até 800 m/z, utilizado para detecção de lipídios. Foram utilizados os *softwares fleximaging* e o *flexcontrol* para a obtenção dos dados e o *software SCiS LAB*, todos da Bruker®.

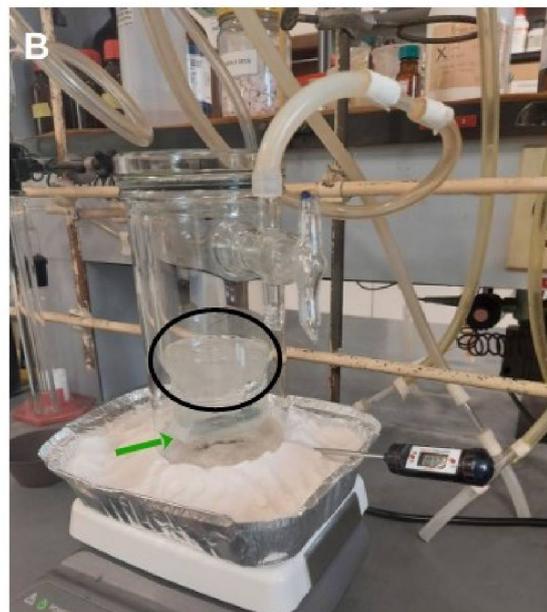
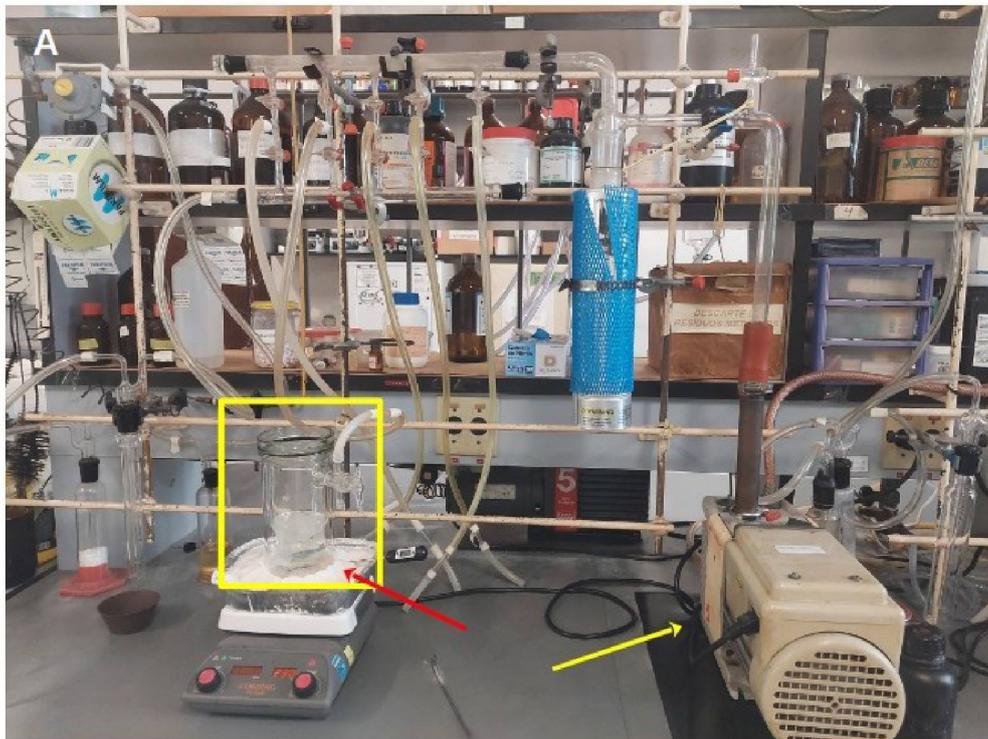


Figura 2: Imagens representativas do sistema de sublimação utilizado para a aplicação da matriz DAN nas lâminas das amostras para o MALDI *imaging*. A figura A demonstra todo o sistema, a seta vermelha indica o banho de sal, sob o qual o sublimador (retângulo amarelo) está posicionado e a seta amarela indica a bomba de vácuo que é acoplada ao sublimador. A figura B demonstra o sublimador em maior proximidade. A lâmina é fixada no local indicado pela seta verde, abaixo do compartimento onde é adicionada água com gelo (círculo preto).

5.7 LIPIDÔMICA

Para a lipidômica, animais da linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry) foram lesionados com crioinjúria e os seus corações foram coletados em 03, 07, 13 e 21 dpi (BEVAN ET AL, 2020), utilizando metodologia anteriormente descrita. O número experimental utilizado foi de 7 animais para a geração de número experimental técnico de 1. Os corações foram dissociados seguindo protocolo que foi melhorado por nós, o mesmo utilizado para as análises de citometria, descrito anteriormente. Os macrófagos foram sorteados através de sua marcação fluorescente mCherry, utilizando o filtro PE. O citômetro utilizado foi o *Fluorescence-activated single cell sorting* (FACS) Aria II do Instituto Carlos Chagas (ICC) de Curitiba. As células separadas por *cell sorting* foram coletadas em tubos *ependorfs* contendo PBS e congeladas em freezer à -80° C para posterior análise.

A lipidômica foi feita por meio do *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS), em parceria com o laboratório da professora Dr. Alessandra Sussulini do Instituto de Química da Unicamp. Para esta análise, foi utilizada a coluna C18 de titânio, com tamanho de 100 mm x 2,1 mm e 1,9 µm de espessura, a uma temperatura de 40° C. O MS utilizado foi *Orbitrap Thermo Q-Exactive* com a fonte *Heated Electrospray* (HESI), vazão de 250 µL/min, tempo de corrida de 14 min e o volume injetado foi de 5 µL. As fases foram as seguintes: Fase A: 40% de acetona (ACN) e 60% de H₂O combinado a 10 mM de Acetato de amônia (NH₄Ac); Fase B: 10% de ACN e 90% de Isopropanol também acompanhado de NH₄Ac. A corrida foi programada de forma a utilizar gradiente, alternando entre a Fase A e a Fase B ao longo do tempo. Isto foi feito da seguinte forma: de 0 a 2 min, 40% da Fase B; de 2 a 6 min, 50% da Fase B; de 6 a 9 min 70% da Fase B, de 8 a 11 min 100% da Fase B; 11 a 14 min 40% da Fase B.

5.8 OBTENÇÃO DE CDNA DE CÉLULA ÚNICA PARA SCRNASEQ

Esta técnica foi realizada a fim de caracterizar e distinguir subpopulações distintas de macrófagos pró-resolutivos e pró-fibróticos. Animais da linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry) foram lesionados com crioinjúria e os seus corações foram coletados em 07 e 21 dpi, utilizando metodologia anteriormente explicada. Os corações foram digeridos utilizando o mesmo protocolo para a análise de citometria e lipidômica. Em seguida, as células totais do coração foram contadas na câmara de Neubauer para serem carregadas no cartucho do *BD Rhapsody Express Single Cell Analysis System*, da BD® um total de 40.000 células.

Para a obtenção de célula única, lise celular e obtenção dos RNAs, foi utilizado o *Enhanced Cartridge Reagent Kit* e a obtenção do cDNA foi feita utilizando o *BD Rhapsody cDNA Kit*, ambos da BD®. Estas etapas foram feitas quatro vezes, cada grupo foi processado em um cartucho diferente, assim como as suas *Polymerase Chain Reactions* (PCR) (descritas abaixo).

Foi realizado um ensaio de *Whole Transcriptome Analysis* (WTA), que detecta a expressão global de RNAs codificantes e não-codificantes. A biblioteca foi preparada utilizando o *WTA Amplification Kit*. O controle de qualidade das PCRs foi feito utilizando *Qubit dsDNA HS Assay Kit* e o sistema *Agilent 4200 TapeStation D5000 ScreenTape Assay* em dois momentos. O primeiro, após a PCR do produto de *random priming and extension* (RPE) e o segundo após a *Targeted Index PCR*. O scRNAseq foi realizado em conjunto com o Laboratório de Imunologia de Transplantes (LIT) e o Laboratório de Interações Neuroimunes, ambos do ICB IV da USP.

O sequenciamento e posteriores análises de bioinformática, serão realizados no Instituto para Pesquisa do Câncer (IPEC), em Guarapuava-PR, utilizando o NovaSeq 6000 System – Illumina.

5.9 LIPOSSOMA

5.9.1 CONFECÇÃO

O lipossoma foi composto pelos lipídios 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) e distearoylphosphatidylcholine (DSPC). O solvente utilizado para solubilizar os lipídios foi o clorofórmio. Para uma solução com volume final de 8 mL, utilizamos 16 mg de DSPC, 1,48 mg de DOPE e 8 mL de clorofórmio. A solução contendo os lipídios foi processada no rota-evaporador, imerso em banho de água à 50° C por cerca de 15 min ou até que o clorofórmio fosse evaporado, formando um filme no interior do balão. O rota-evaporador utilizado está localizado no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL). Após, adicionou-se o mesmo volume que foi adicionado de clorofórmio, de solução PBS 1x para os lipossomas controle e solução contendo o ZOL diluído em PBX 1x. Estes balões foram imersos em banho de glicerina à 70° C por 1 h, para que a reação ocorra e as nanopartículas se formem, encapsulando o líquido do conteúdo dos balões.

5.9.2 PADRONIZAÇÃO

O lipossomas tiveram seu tamanho mensurado através da técnica de *Dinamic Light Scattering* (DLS) utilizando o equipamento ZETASIZER NANO ZS da Malvern Instruments and PANalytical (Egham, Surrey, United Kingdom) localizado no BIOPOL. As análises foram feitas em triplicatas após 2 e 7 dias da confecção do lipossoma. A quantificação do ZOL presente nos lipossomas foi feita por meio de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) utilizando o equipamento da marca Shimadzu, modelo LC-20 AD com injetor manual, detector UV-Vis localizado no BIOPOL. Utilizamos a coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1 mL/min, coluna à 25° C e detecção em 220 e 215 nm. A fase móvel utilizada foi composta de 20% de metanol e 80% de PBS contendo tetra-nbutil amônio e o tempo de corrida foi de 20 minutos. Foi adicionada uma etapa de limpeza da coluna com metanol.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises do ECG foram obtidas através da comparação entre grupo controle não lesionado e animais crioinjuriados 3 dpi. Foram avaliadas as diferenças de amplitude e de intervalo entre as ondas T e P e o complexo QRS. Para as diferenças de amplitude entre o complexo QRS foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e múltiplas comparações e para ondas T e P foi utilizado o teste T não pareado. Para as diferenças de intervalo foi utilizado o ANOVA *mixed-effects* comparando a média de cada linha entre os grupos (controle e crioinjúria 3 dpi). Na citometria, os grupos sham e crioinjúria foram comparados entre 13 e 21 dpi utilizando ANOVA de duas vias. Foi considerado valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism 8.0.1*.

6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE DA LESÃO

6.1.1 ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDÍACAS TÍPICAS DE INFARTO

A fim de verificar se a função elétrica cardíaca do animal que sofreu crioinjúria foi alterada, realizamos o ECG do *zebrafish*. Esta técnica foi padronizada pela primeira vez em nosso laboratório e, como consequência, foram necessários ajustes e vários testes

para a realização da mesma, como o controle da temperatura na sala de experimentação, confecção de eletrodos especiais para o modelo e padronização da concentração de anestésico utilizada. Com isso, foram obtidas análises claras de animais controle e 3 dpi, com leitura limpa, pouco ruído, ondas T, P e complexo QRS bem definidos (figura 3 B-D). Além disso, foi possível realizar o procedimento posicionando o eletrodo positivo no olho do animal. Esta forma é menos invasiva e promoveu também uma leitura boa, porém com maior ruído de base (figura 3A) e poderá ser aplicada na pesquisa.

Não observamos diferença estatística nas amplitudes das ondas entre os grupos controle e crio 3 dpi, como mostram figuras 4, 5 e 6. No entanto, quando analisamos os intervalos QT e QTc (início do complexo QRS até o final da onda T, corrigido (c)), JT (final do QRS e final da onda T) e o *T peak T end* (intervalo entre o pico e o final da onda T) observamos diferença significativa (figura 7). A figura 3 demonstra que a leitura de animais crio 3 dpi apresentou inversão da onda T (figura 3C) e onda T normal (figura 3D) e que o animal controle apresentou inversão da onda T (figura 3B), portanto, não foi observada diferença neste parâmetro de IAM.

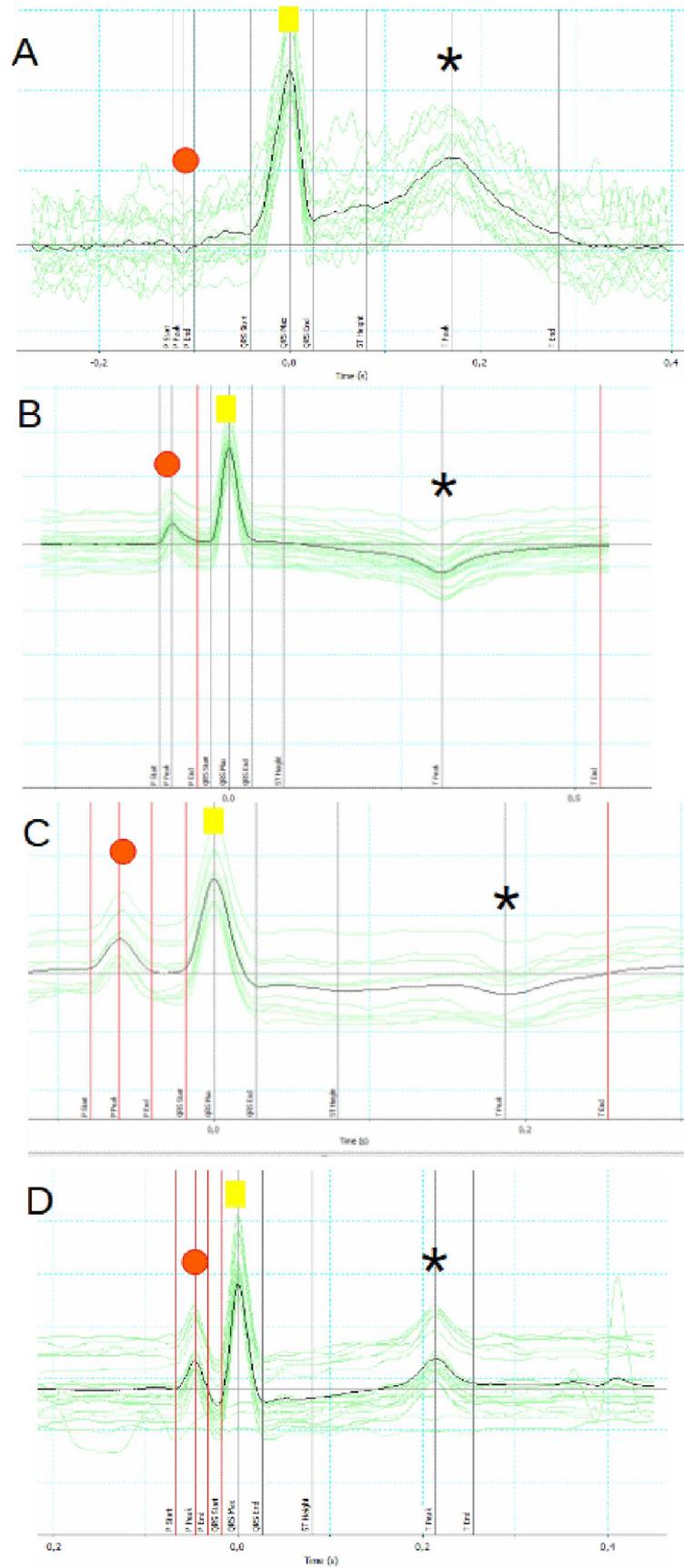


Figura 3: Cada imagem representa a média da leitura do ECG de um animal. Animal controle que passou por leitura com o eletrodo positivo posicionado no olho (A) de animal controle com eletrodos posicionados no coração (B) e animais lesionados em 3 dpi (C e D). Pode ser observado que a leitura no olho também

demonstra as 3 principais ondas, onda P (esfera vermelha), QRS (retângulo amarelo) e T (asterisco), porém com ruído de base, como é observado nas outras leituras na posição convencional, sem ruído de base. A imagem B representa um animal controle sem lesão, a imagem C um animal 3 dpi com inversão da onda T e a imagem D um animal 3 dpi com onda T normal. O delineamento das ondas não traz resultados visuais significativos, pois ambos controle e lesionado apresentaram inversão da onda T.

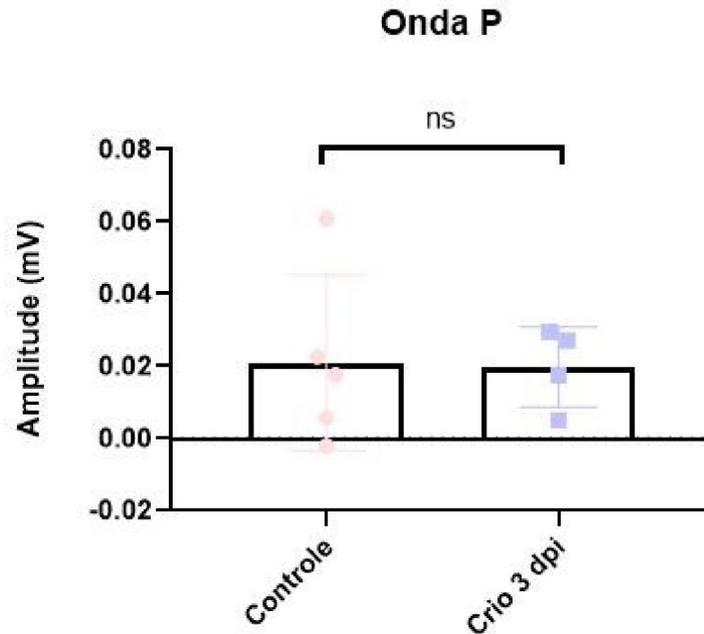


Figura 4: Gráfico que representa a média das amplitudes das ondas P obtidas de animais controle (n=5) e que sofreram a crioinjúria após 3 dpi (n=4). No eixo Y há a representação dos valores da amplitude em mV. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados para $p < 0,05$.

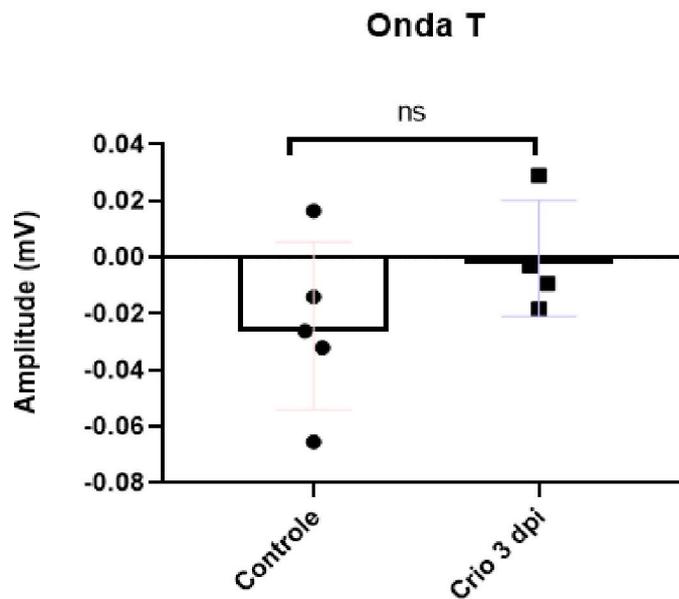


Figura 5: Gráfico que representa a média das amplitudes das ondas T de animais controle (n=5) e que sofreram a crioinjúria após 3 dpi (n=4). No eixo Y há a representação dos valores da amplitude em mV. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados para $p < 0,05$.

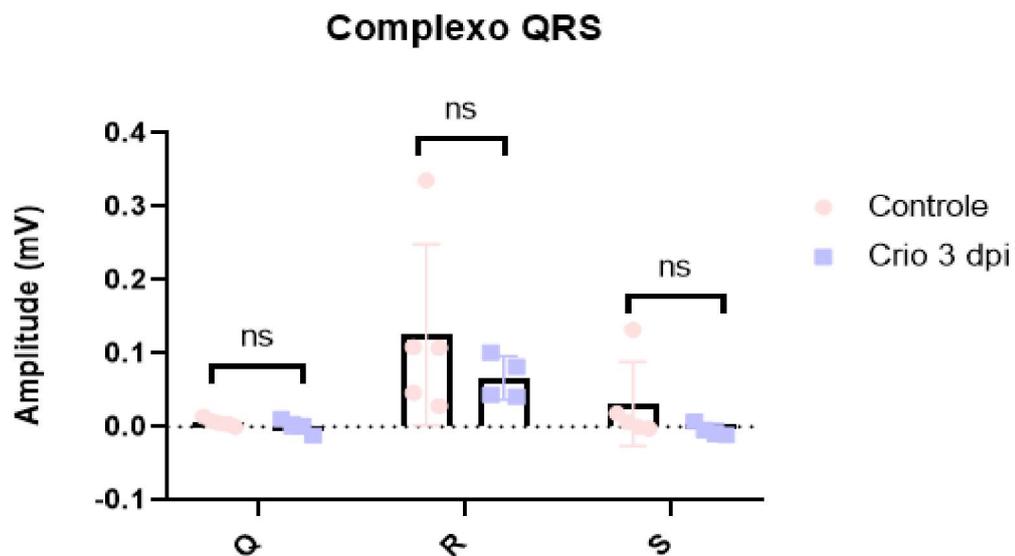


Figura 6: Gráfico que representa a média das amplitudes das ondas pertencentes ao complexo QRS de animais controle (n=5) e que sofreram a crioinjúria após 3 dpi (n=4). No eixo Y há a representação dos valores da amplitude em mV. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados para $p < 0,05$.

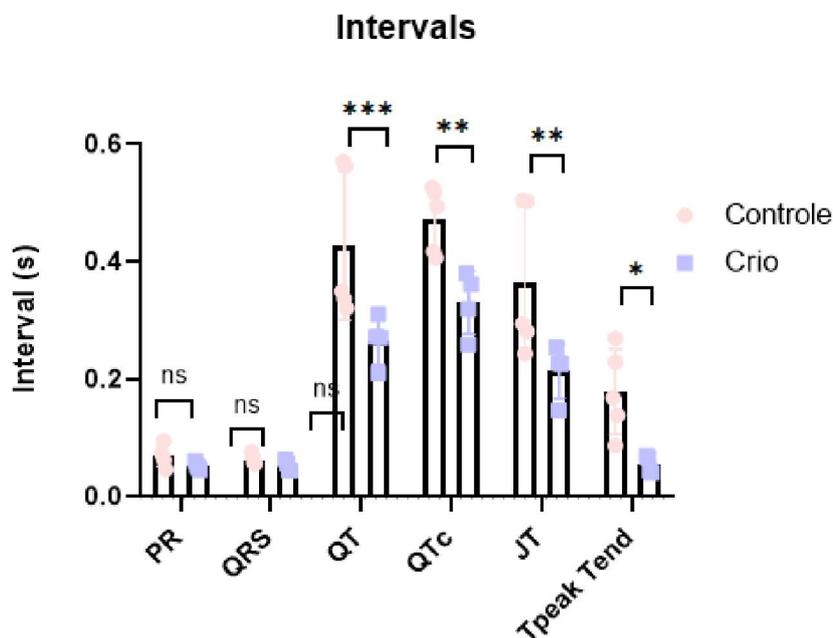


Figura 7: Gráfico demonstra a quantificação dos intervalos PR (início da onda P ao início do complexo QRS), QRS (intervalo entre o complexo QRS), QT, QTc, JT e Tpeak Tend de animais controle, em rosa (n=5) e que sofreram a crioinjúria após 3 dpi (n=4), em azul. Foi demonstrado que não houve diferença significativa apenas entre PR e QRS. No restante dos intervalos houve uma significativa redução no grupo crio 3 dpi. QT ** $p = 0,004$; QTc * $p = 0,14$; JT ** $p = 0,08$; Tpeak Tend * $p = 0,42$.

6.1.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS APÓS CRIOINJÚRIA CARDÍACA

Para avaliar o dano causado pela crioinjúria no coração, a fim de verificar se nosso modelo representa o que é exposto na literatura, realizamos cortes histológicos dos corações de animais que sofreram lesão e cirurgia sham. Os resultados demonstraram um espessamento do epicárdio ventricular, na área da lesão (polígonos amarelos), em 03 e 07 dpi (figura 8 B, B1, D, D', respectivamente), quando se compara com o não lesionado, sham (figura 8 A, A', C e C'). Esta alteração praticamente não estava mais presente em 21 dpi (figura 8 H e H'), indicando regeneração do tecido (GONZÁLEZ-ROSA ET AL, 2011). Também foi observado infiltrado inflamatório em 03, 07 e 13 dpi (contornos amarelos, figura 8 B, B1, D, D', F e F', respectivamente), o que indica um processo inflamatório e de reparo da lesão. Porém, estas células também diminuíram em 21 dpi (figura 8 F, F', H e H'), sinalizando a finalização do reparo. Em 13 dpi foi encontrada deposição de colágeno no local da lesão (contorno amarelo em figura 8 F e F'), no interior do coração, a borda neste caso, está com infiltrado inflamatório e também em processo de regeneração. Em 21 dpi, foi observada uma grande quantidade de hemácias no interior do coração, indicadas pela seta vermelha (figura 8 H e H').

Obtivemos métricas e observações semelhantes às publicadas anteriormente, como o espessamento do epicárdio ventricular no local da lesão (GONZÁLEZ-ROSA ET AL, 2011; CHARLES ET AL., 2016); XU ET AL., 2019) e o infiltrado inflamatório mais presente em 03 e 07 dpi (BEVAN ET AL, 2020). Portanto, ambas alterações encontradas, indicam que nosso modelo é eficaz em promover a crioinjúria.

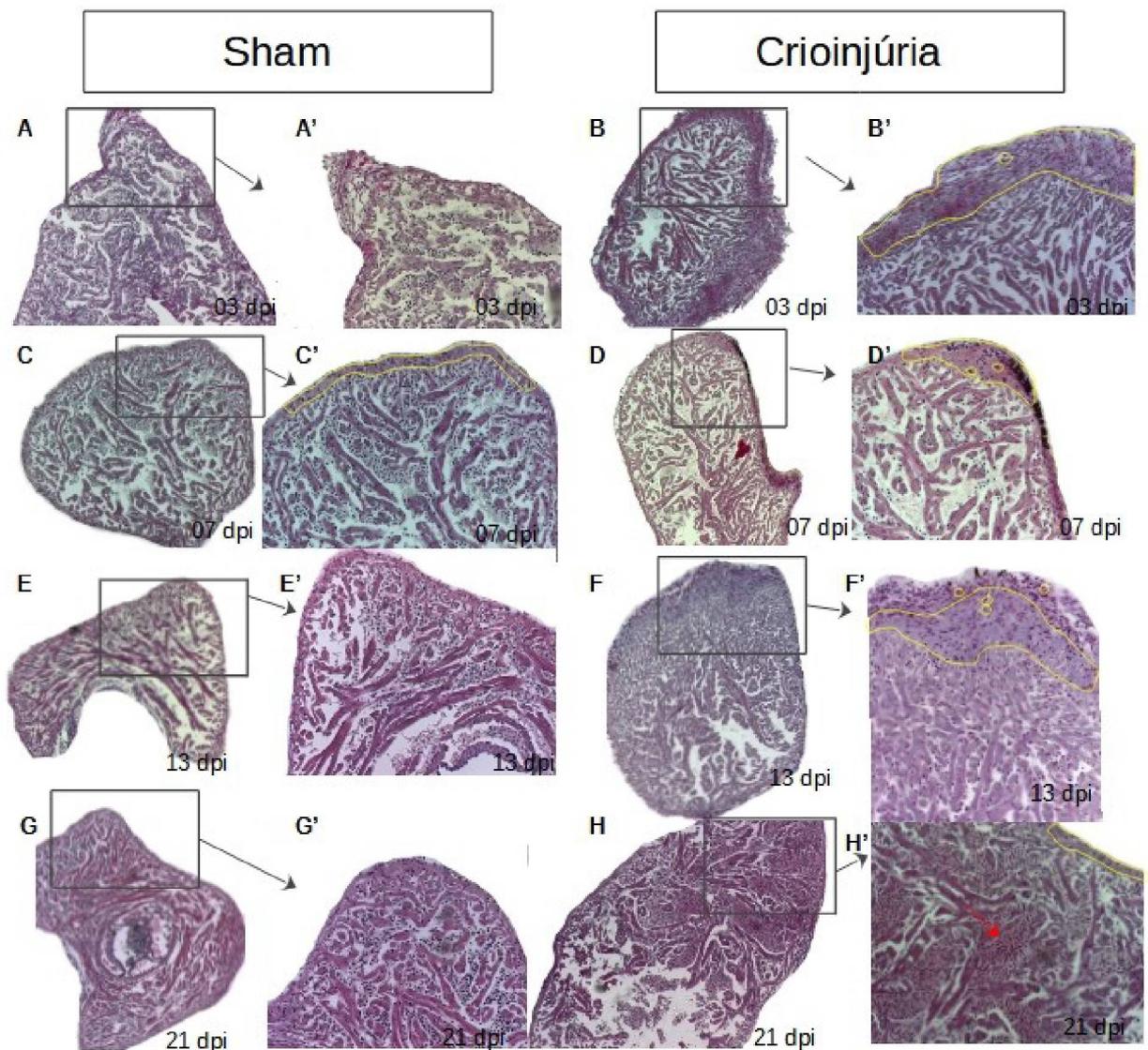


Figura 8: Imagens de cortes histológicos representando um animal para cada grupo que sofreu crioinjúria (coluna direita) e um animal para cada grupo que sofreu cirurgia sham (controle) (coluna esquerda) coletados após 03 (A, A', B e B'), 07 (C, C', D, D'), 13 (E, E', F, F') e 21 (G, G', H, H') dpi, em aumento de 10x (A - H) e 20x (A' - H'). Os cortes foram corados com Tricômico de Masson, em rosa tem-se os cardiomiócitos e em roxo os núcleos dos eritrócitos e de leucócitos. No contorno amarelo pode ser observado espessamento da parede do epicárdio (B', D' e H'), indicando processo lesivo inicial e que diminui com o tempo. Em F' o contorno amarelo representa deposição de colágeno. Círculos em amarelo representam leucócitos e seta vermelha hemácias.

6.1.3 MACRÓFAGOS TOTAIS E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS PRESENTES NO MODELO DE CRIOINJÚRIA

Análises de citometria foram realizadas com o objetivo de caracterizar o infiltrado de macrófagos na crioinjúria, utilizando linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry;

TNF α :GFP). Estes animais possuem marcação para macrófagos (mpeg) em vermelho e TNF α , esta última molécula é produzida por estas células e é característica da inflamação.

Nossas análises foram divididas em dois dias, por conta da quantidade de animais, sendo que cada n amostral biológico representa um número experimental de cinco corações, tanto após crioinjúria como para o grupo sham. Os grupos analisados (13 e 21 dpi) são momentos em que o infiltrado inflamatório é escasso. Portanto, não observamos diferença estatística entre a quantidade de macrófagos (mpeg+TNF α -) e na quantidade de macrófagos positivos para TNF α (mpeg+ TNF α +) (figuras 9, 10 e 11).

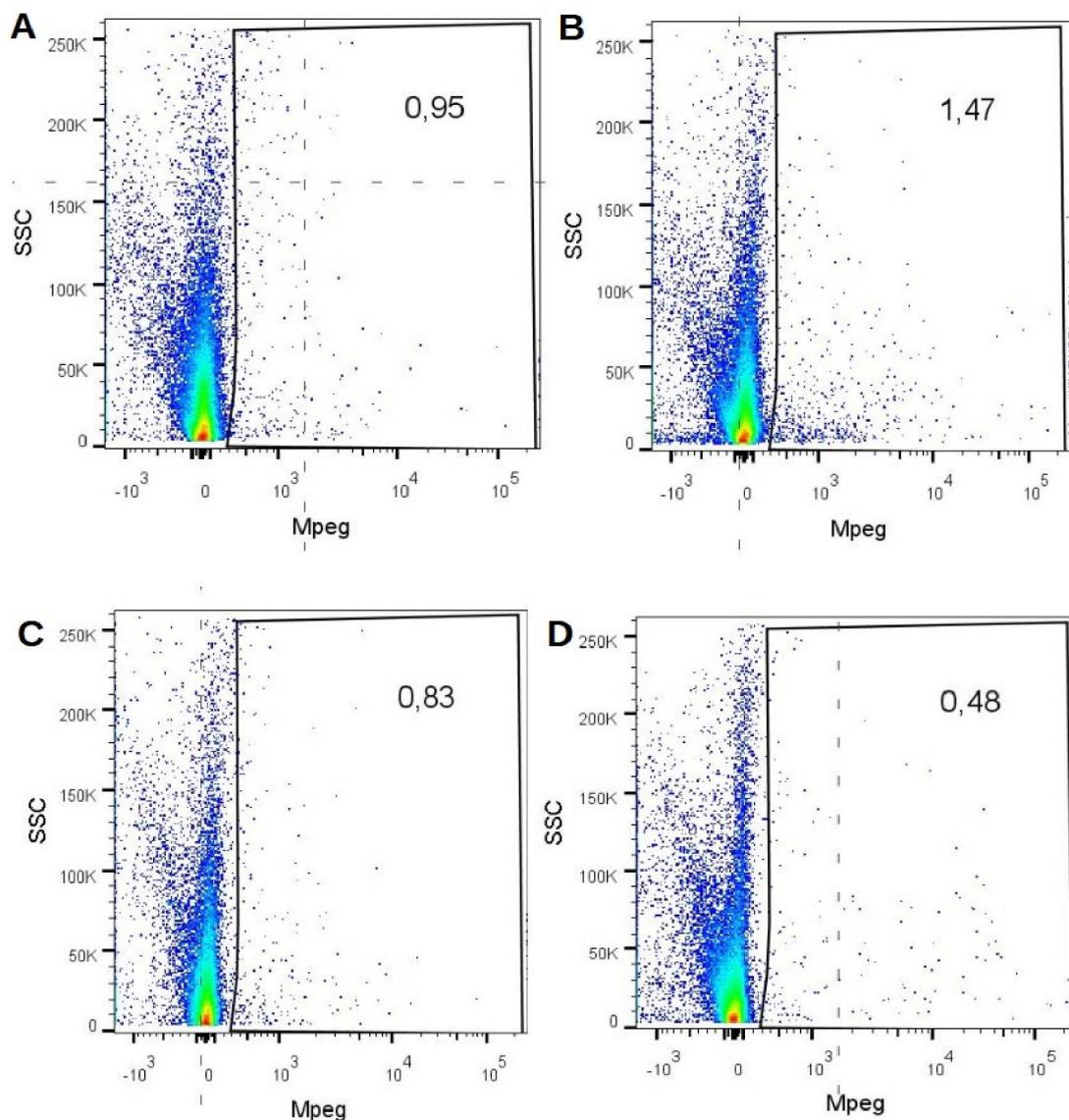


Figura 9: Gráficos de *dotplot* demonstrando a intensidade de fluorescência da proteína mCherry, indicando a presença de macrófagos mpeg+ em animais sham 13 dpi (figura A), 21 dpi (figura D) e após crioinjúria em 13 dpi (figura B) e 21 dpi (figura D). No eixo Y tem-se o SSC, indicando a complexidade das células e no eixo X a intensidade de fluorescência. Os macrófagos são indicados dentro do *gate* (retângulo preto). Os animais 13 dpi, sham e crioinjúria, apresentaram respectivamente, 0,95% e 1,47% de macrófagos no

coração. Já os animais 21 dpi, sham e crioinjúria, apresentaram respectivamente, 0,83% e 0,48% de macrófagos no coração. (Cada gráfico representa a citometria de um coração, o n experimental total foi de: sham 13 dpi = 8; crio 13 dpi = 8; sham 21 dpi = 5 e crio 21 dpi = 5).

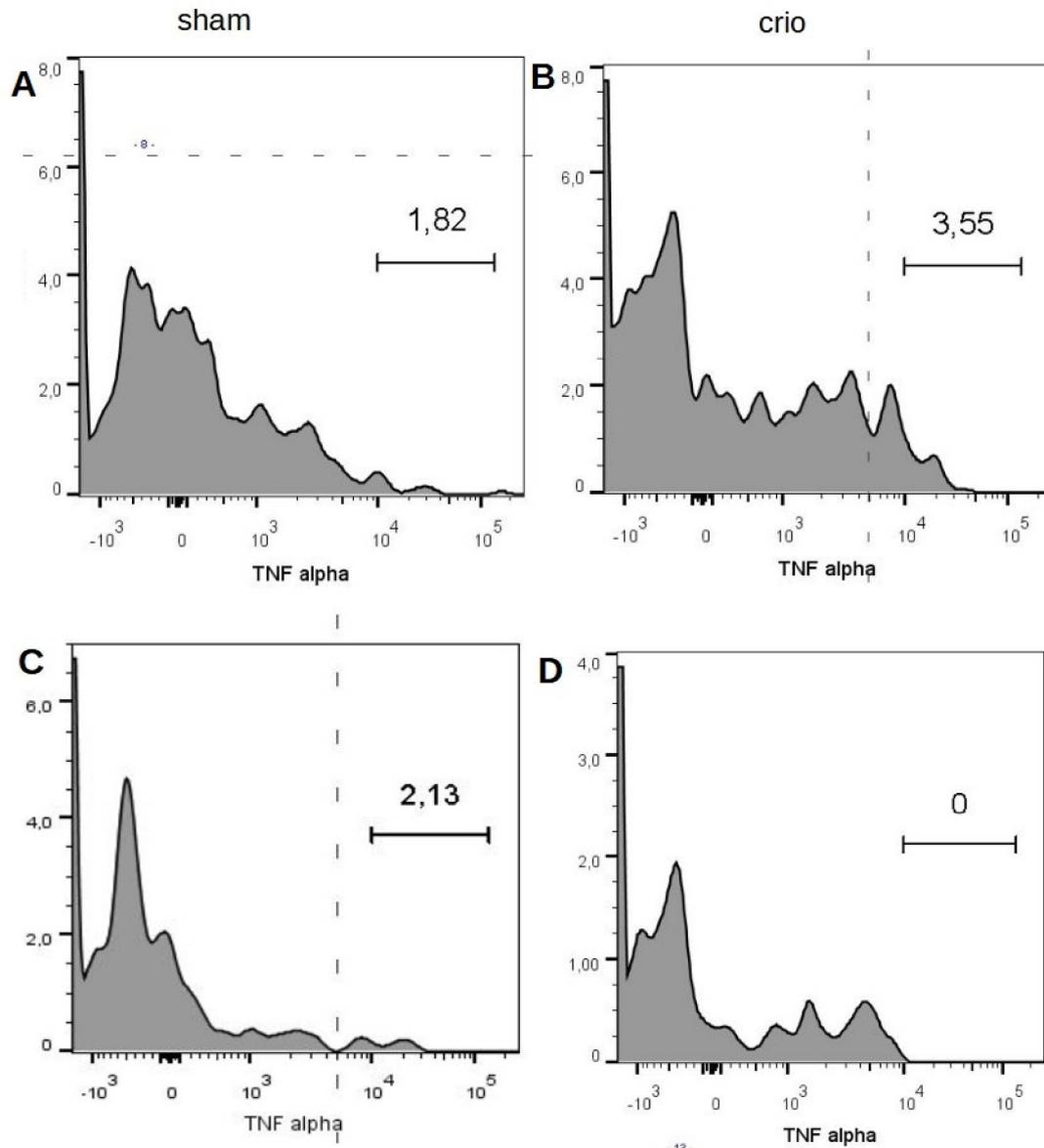


Figura 10: Gráficos de histograma demonstrando a intensidade de fluorescência da proteína GFP, indicando a presença de TNF dentro da população de macrófagos mpeg+ (eixo X) em animais sham 13 dpi (figura A), 21 dpi (figura D) e após crioinjúria em 13 dpi (figura B) e 21 dpi (figura D). Os macrófagos positivos para TNF (TNF+) são indicados à direita da linha pontilhada, dentro do *gate*. Os animais 13 dpi, sham e crioinjúria, apresentaram respectivamente, 1,82% e 3,55% de macrófagos TNF+ no coração. Já os animais 21 dpi, sham e crioinjúria, apresentaram respectivamente, 2,13% e 0% de macrófagos TNF+ no coração. Estes gráficos são relativos aos macrófagos representados nos *dotplots* da figura X e cada gráfico representa a citometria de um coração, o n experimental total foi de: sham 13 dpi = 8; crio 13 dpi = 8; sham 21 dpi = 5 e crio 21 dpi = 5).

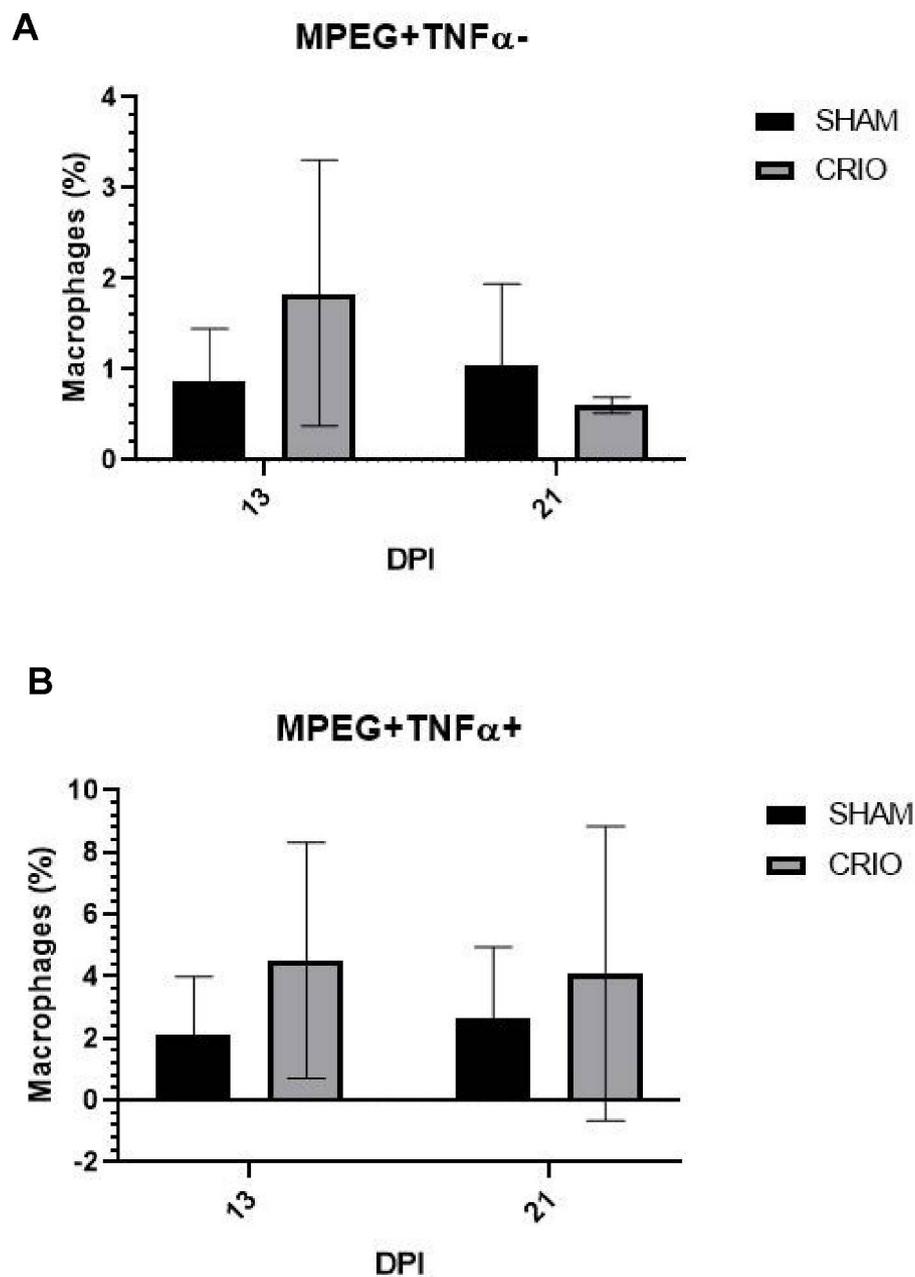


Figura 11: Gráficos demonstrando a quantificação de macrófagos em 13 e 21 dpi. O gráfico A demonstra no eixo y a porcentagem total de macrófagos mpeg+ dentro do coração de sham e animais lesionados (crio). O gráfico B representa no eixo y a porcentagem de macrófagos mpeg+TNF α +, dentro da porcentagem de macrófagos mpeg+ totais. Não houve diferença significativa nas quantidades destas células nas duas condições (número experimental: sham 13 dpi = 8; crio 13 dpi = 8; sham 21 dpi = 5 e crio 21 dpi = 5).

6.1.4 MALDI IMAGING

Esta técnica da forma que foi utilizada, possui caráter exploratório e de caracterização do padrão geral da amostra. A aplicação da matriz na lâmina de ITO não foi homogênea (figura 12) e a camada formada foi mais espessa do que o ideal (figura

13). Porém, este resultado gerou dados para a padronização do protocolo de sublimação, que será utilizado nas próximas aplicações.

As amostras foram delineadas utilizando *softwares* do equipamento, o *flexanalysis* e o *flexcontrol*, que limitam o local que será detectado pelo laser. As figuras 14 e 15, demonstram o delineamento dos corações sham e que sofreram crioinjúria, respectivamente (n experimental biológico de 3 por grupo). Duas amostras de 21 dpi do grupo sham e as três do grupo crio foram perdidas durante a sublimação.



Figura 12: Imagem da lâmina de ITO escaneada. A camada branca é a deposição da matriz DAN. Pode ser observado que ela está mais espessa quando se compara com a imagem B, com a deposição ideal, e também está heterogênea em alguns pontos.

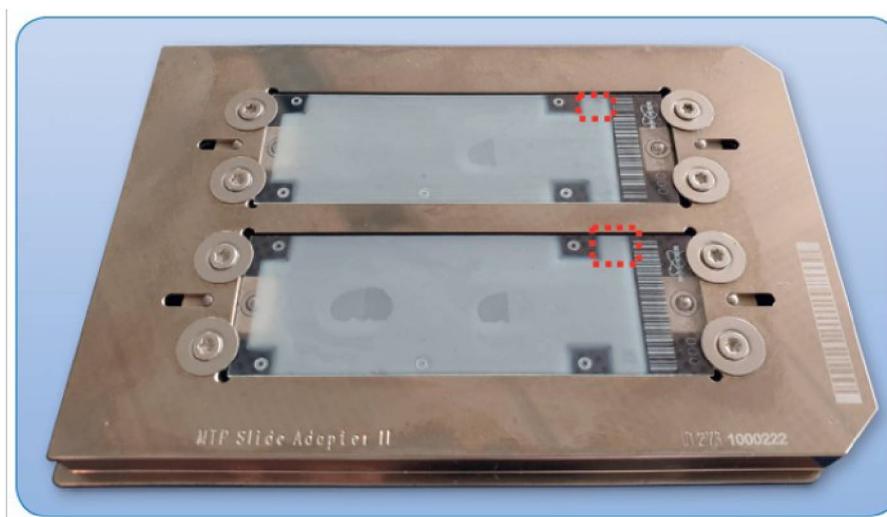


Figura 13: Exemplo do adaptador para as lâminas, que é inserido no equipamento, contendo lâminas com aplicação ideal da matriz. Ao centros das lâminas tem-se as amostras destacadas com mais transparência. Pode ser observado que a matriz, em branco fosco, está aplicada de forma homogênea e forma uma camada menos espessa do que aquela formada em nossa aplicação. Fonte: manual da Bruker®.



Figura 14: Delineamento das amostras de corações sham dos grupos 21, 13, 07 e 03, respectivamente da esquerda para a direita.



Figura 15: Delineamento das amostras de corações que sofreram crioinjúria dos grupos 13, 07 e 03, respectivamente da esquerda para a direita.

Os resultados são obtidos comparando o espectro médio dos íons detectados em regiões, que podem ser segmentadas. Neste trabalho, as regiões comparadas foram as médias das três amostras de cada grupo. Portanto, comparamos os cortes inteiros dos grupos 03 dpi com o 07 dpi e do 13 dpi com o 07 dpi. A versão disponível do *software* utilizado para a análise dos dados, permite apenas a comparação entre duas regiões.

Portanto, ao compararmos 03 dpi com 07 dpi, observamos 7 íons que estavam presentes em 03 dpi, mas não em 07 dpi, após a análise de *ROC plot* (figura 16) realizada pelo *software*. Da mesma forma, também encontramos 2 íons presentes em 13 dpi, mas não em 07 dpi. No entanto, quando observamos a imagem que representa a intensidade de um dos íons identificados (figura 17), é possível notar a presença deste também em grupos sham 03 e 13 dpi e crio 13 dpi.

Os íons encontrados em 03 dpi, mas não em 07 dpi possuem as seguintes massas: 258.084 m/z, 259.068 m/z, 280.072 m/z, 282.077 m/z, 311.052 m/z, 312.083 m/z e

467.195 m/z. Já os íons encontrados em 13 dpi, mas não em 07 dpi, possuem as seguintes massas: 259.068 e 258.084 m/z. Buscaremos em bases de dados lipídicas a identificação dos compostos encontrados, vamos comparar os achados com dados da literatura e com análises de MALDI *imaging* de corações de humanos que sofreram IAM.

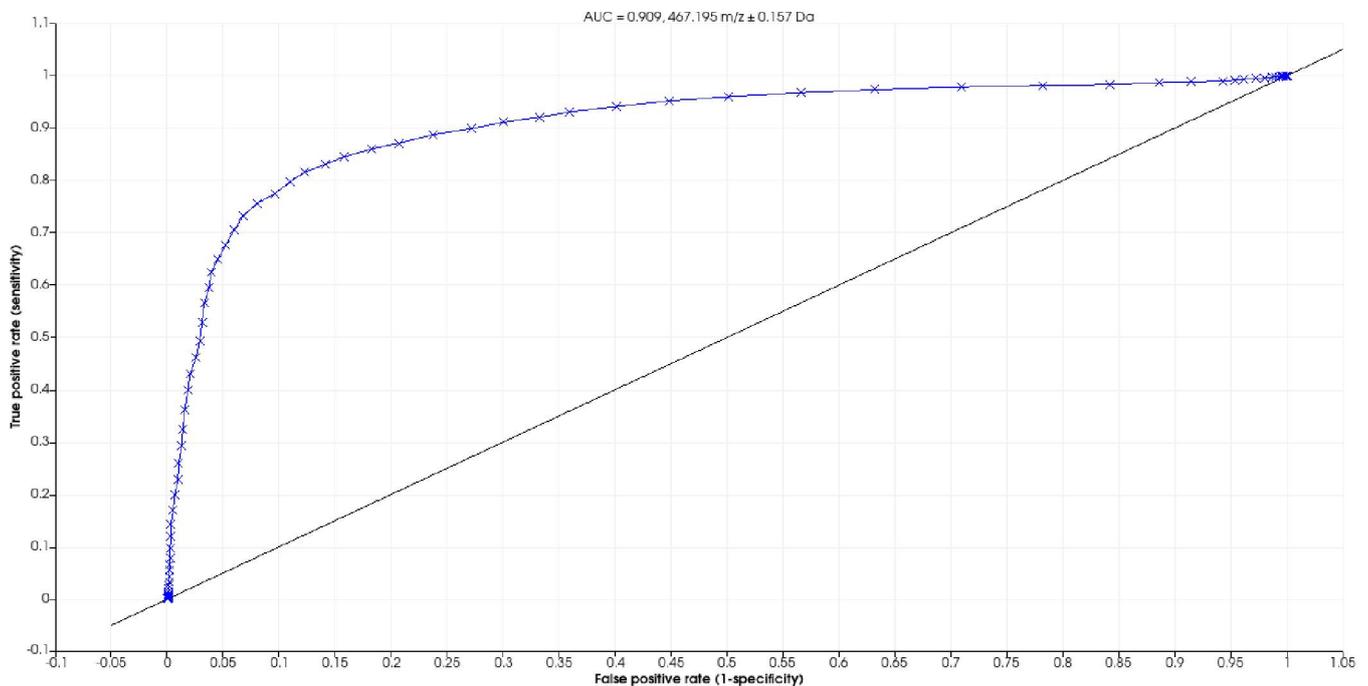


Figura 16: Exemplo de gráfico ROC plot demonstrando que o íon indicado, que possui massa de 467.195 m/z, está presente em crío 03 dpi, mas não está presente em crío 07 dpi. O gráfico quantifica o nível da informação testada ser verdadeira ou falsa. Para que seja verdadeira, é considerada a *area under the curve* (AUC) maior que 0,9.

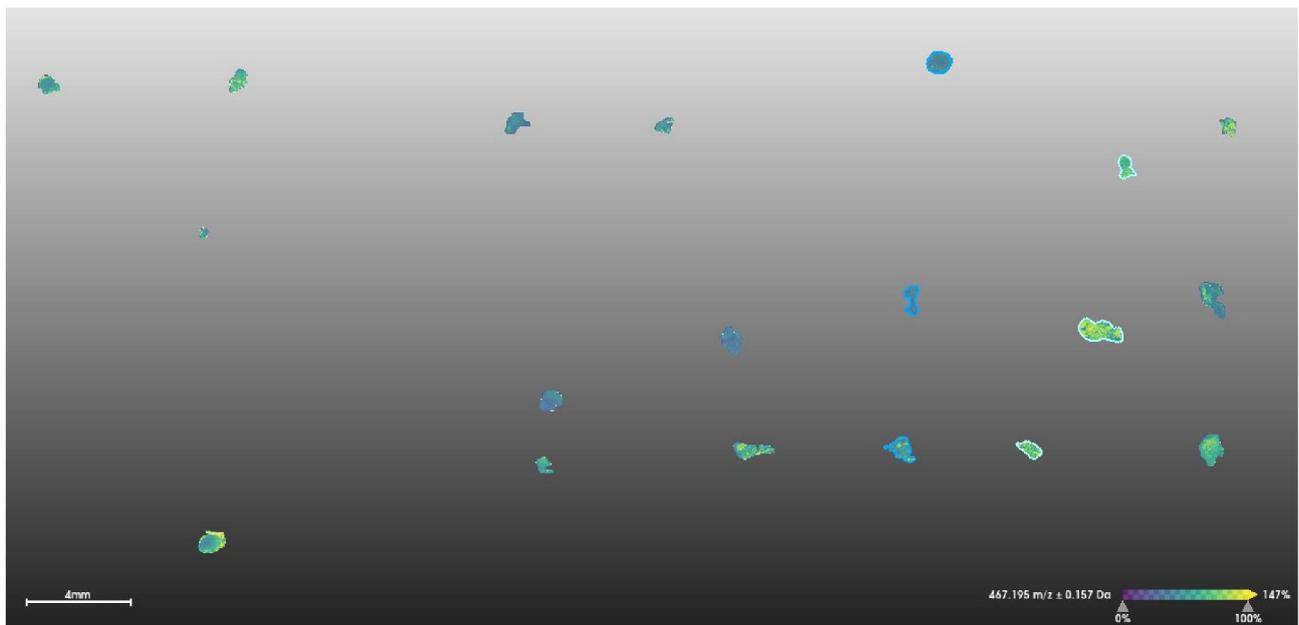


Figura 17: Imagem das amostras analisadas no MALDI *imaging*, aquelas com contorno azul-escuro são do sham 03 dpi e com contorno azul-claro, do grupo crío 03 dpi. O preenchimento das amostras demonstra a intensidade de um dos íons presentes em crío 03 dpi, mas não em crío 07 dpi, quanto mais amarelo, maior a intensidade do íon. Pode ser observado que este íon também está presente em amostras de outros dias, como grupo sham 13 dpi.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS TARDIOS

6.2.1 LIPÍDIOS ESTÃO DIFERENCIALMENTE PRESENTES EM MACRÓFAGOS APÓS 13 E 07 DPI

A avaliação do perfil lipídico dos macrófagos em diferentes tempos após lesão teve como objetivo explorar diferenças de expressão que podem estar relacionadas com perfis distintos de macrófagos. Estas análises foram realizadas por laboratório parceiro, que optou por analisar apenas os grupos 13 e 07 dpi por possuírem triplicatas destas amostras, enquanto 03 e 21 dpi não.

Foram realizadas análises de *principle component analysis* (PCA) (figura 18) e o *Volcano Plot* (figura 19). A análise de PCA (figura 18) demonstrou que os grupos 13 e 07 dpi se sobrepuseram, indicando que são semelhantes. No entanto, o *Volcano Plot* (figura 19) demonstrou 20 *features* de lipídios que estão diferencialmente presentes entre os dois grupos analisados, comparando 13 dpi em relação a 07 dpi. Foram encontrados 9 lipídios que aumentaram em 13 dpi e 11 lipídios que diminuíram no mesmo dia.

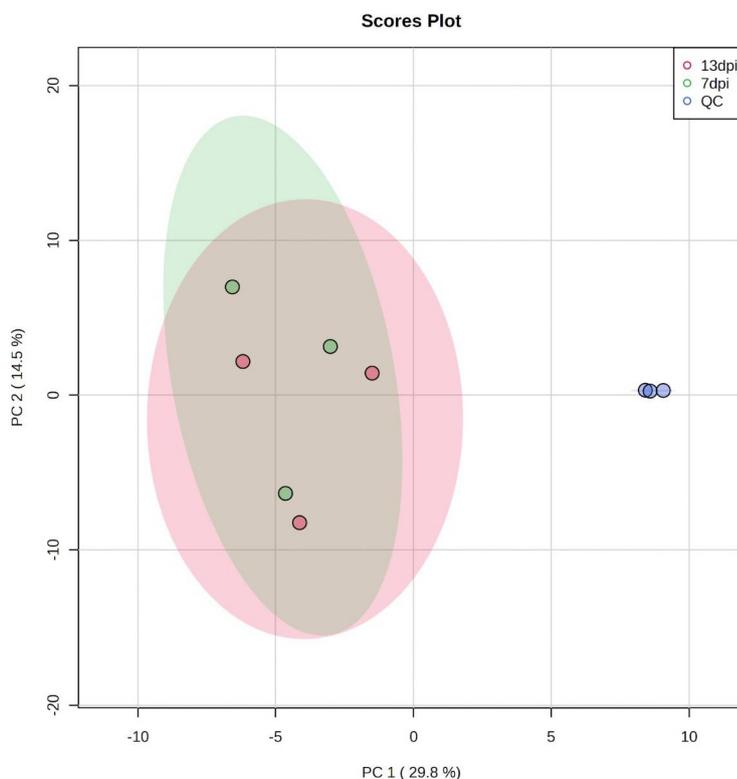


Figura 18: Análise de PCA contendo grupos 13 e 7 dpi (vermelho e verde, respectivamente) e amostras controle de qualidade (QC, azul). Os grupos lesionados se sobrepuseram.

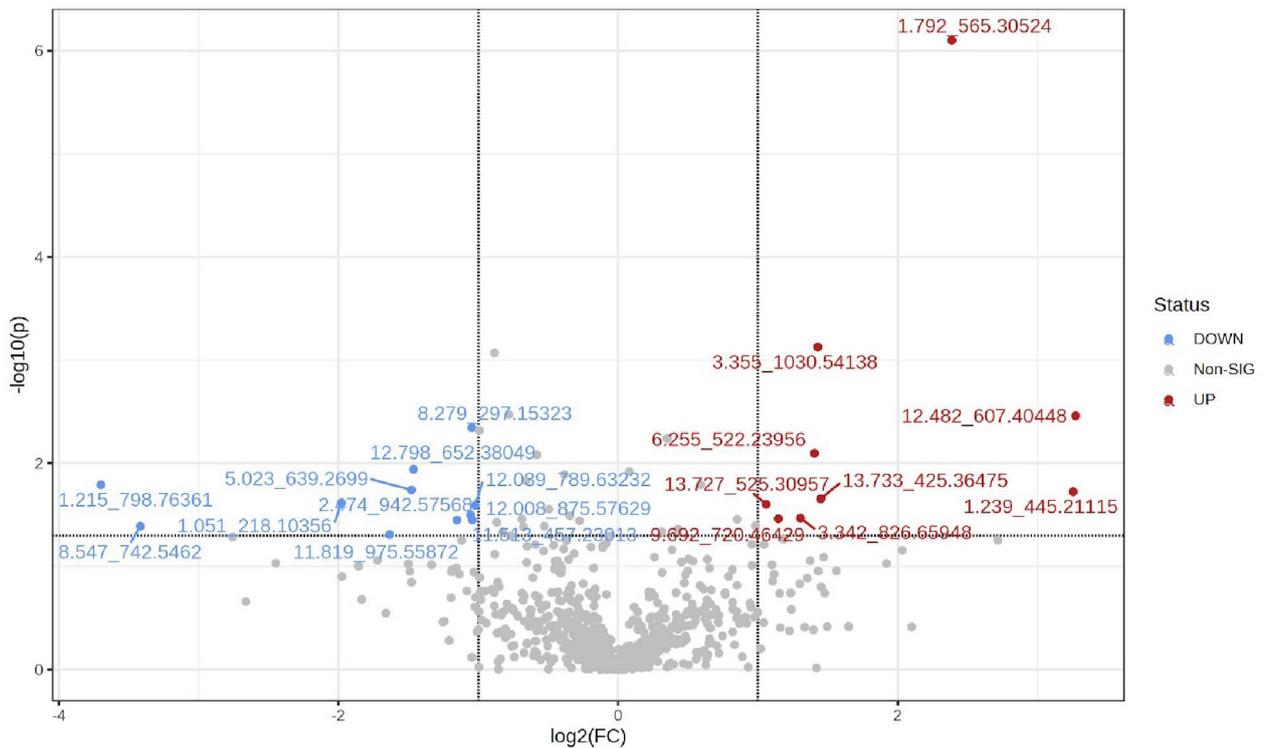
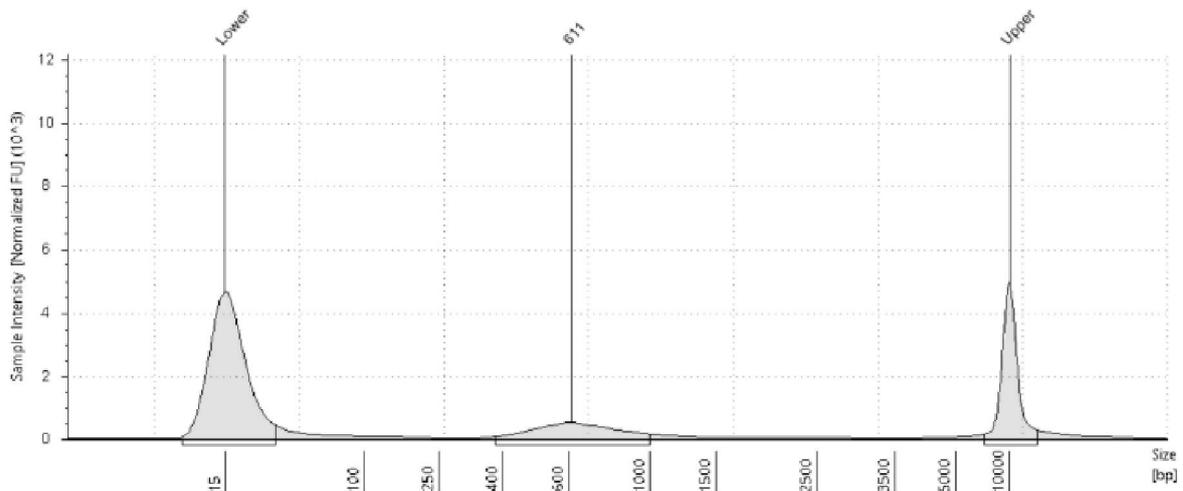


Figura 19: *Volcano plot* dos metabólitos diferenciais. Os pontos em azul representam os lipídios que diminuíram em 13 dpi, os pontos vermelhos aqueles que aumentaram em 13 dpi, os pontos cinzas representam lipídios detectados, mas sem significância estatística ($p < 0,05$), ou seja, que não aumentaram e não diminuíram em 13 dpi. Os lipídios estão identificados com o tempo de retenção (TR) e a razão massa/carga (m/z), ou seja: TR_m/z.

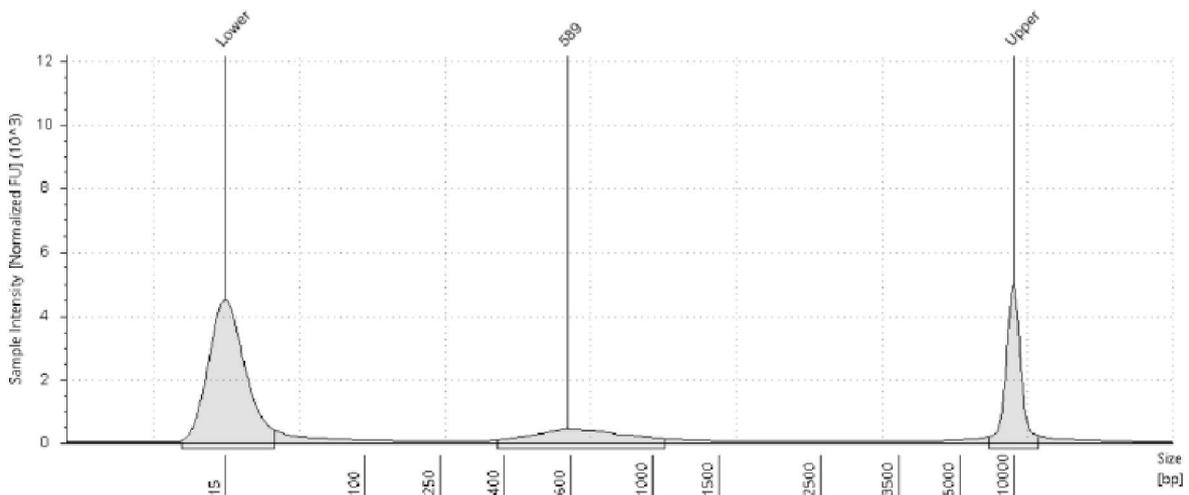
6.2.2 OBTENÇÃO DE CDNA DE CÉLULA ÚNICA PARA SCRNASEQ

O scRNAseq dos grupos 07 e 21 dpi foram realizados. As imagens abaixo (figuras 20 e 21) mostram os resultados obtidos no último ponto de controle de qualidade, após a PCR *index*. As imagens demonstram que foram obtidos cDNAs com concentração >1 ng/ μ L, entre tamanhos escolhidos para a análise, entre 250 e 1000 pares de base (pb). Essas concentrações são baixas por serem originadas de scRNAseq, no entanto são suficientes para a realização do sequenciamento, seguindo o recomendado pela fabricante.

BI: PCR Index 7**Sample Table**

| Well | Conc. [ng/μl] | Sample Description | Alert | Observations |
|------|---------------|--------------------|-------|------------------------------------|
| BI | 2.14 | PCR Index 7 | ⚠ | Caution! Expired ScreenTape device |

Figura 20: Gráfico obtido após quantificação de cDNA realizada no *TapeStation*, do grupo 07 dpi (n=14 animais, para um número experimental técnico de 1), após PCR *index*, última PCR antes do sequenciamento. No eixo x tem-se número de pb e no eixo y a intensidade da amostra. O gráfico demonstra o range escolhido para quantificação dos pb, entre 400 e 1000 pb. A tabela demonstra que foi obtida uma concentração de cDNA de 2,14 ng/μL dos tamanhos analisados, o que está dentro do esperado e é suficiente para o sequenciamento.

CI: PCR Index 21**Sample Table**

| Well | Conc. [ng/μl] | Sample Description | Alert | Observations |
|------|---------------|--------------------|-------|------------------------------------|
| CI | 2.04 | PCR Index 21 | ⚠ | Caution! Expired ScreenTape device |

Figura 21: Gráfico obtido após quantificação de cDNA realizada no *TapeStation*, do grupo 21 dpi (n=11 animais, para um número experimental técnico de 1), após PCR *index*, última PCR antes do sequenciamento. No eixo x tem-se número de pb e no eixo y a intensidade da amostra. O gráfico demonstra o range escolhido para quantificação dos pb, entre 400 e 1000 pb. A tabela demonstra que foi obtida uma concentração de cDNA de 2,04 ng/μL dos tamanhos analisados, o que está dentro do esperado e é suficiente para o sequenciamento.

6.2.3 LIPOSSOMAS

Para a confecção dos LIP-ZOL, foram utilizados lipídios sensíveis ao pH (DOPE) e à mudança de temperatura (DSPC), o que facilita sua dissociação no interior do macrófago, para possibilitar a liberação do ZOL. Foi necessário padronizar a quantidade de ZOL adicionada, o que foi feito através de injeções de diferentes concentrações do fármaco em *zebrafish* adulto, foi estabelecida a concentração de 100 µg do fármaco. Também foi necessária padronização do método de quantificação.

A quantificação do fármaco foi padronizada através de HPLC. Foi realizada uma curva padrão várias concentrações do fármaco, diluídas em água milliQ (50 µg, 60 µg, 80 µg e 100 µg). O pico de detecção do ácido zoledrônico apareceu em 17 minutos, sendo 50 µg o limite de detecção. Foi observado que após algumas análises este pico diminuía em intensidade, por isso foi adicionada uma etapa de limpeza da coluna entre as análises. Também realizamos medidas do tamanho das partículas em dois momentos para verificar a estabilidade dos lipossomas. Obtivemos tamanhos muito elevados e que diminuíram ao longo do tempo (figuras 23 e 24).

Portanto, obtivemos a padronização da metodologia de quantificação do ZOL por HPLC, que será utilizada para determinar a eficiência de encapsulamento, e obtivemos lipossomas com diâmetro maior que o esperado, por isso será realizada padronização do tempo de sonicação das partículas, para obter o diâmetro ideal.

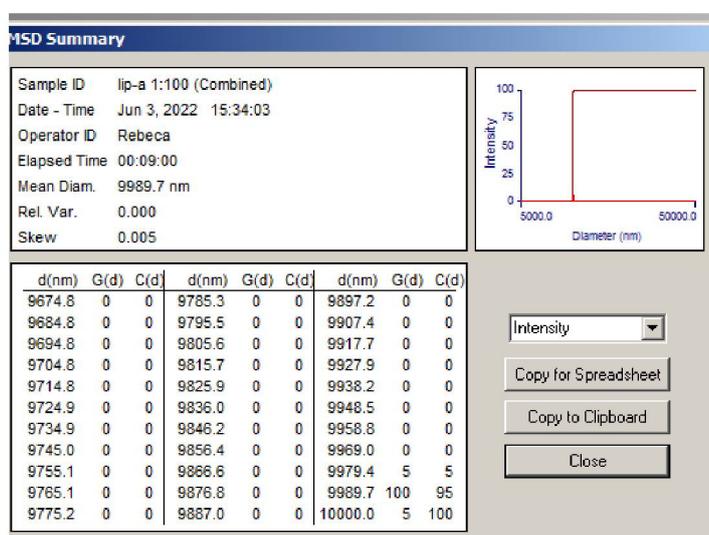


Figura 22: A imagem representa a aquisição por meio de DLS do lipossoma encapsulado com ácido zoledrônico após 2 dias da confecção. O tamanho médio das partículas foi 9987.7 nm.

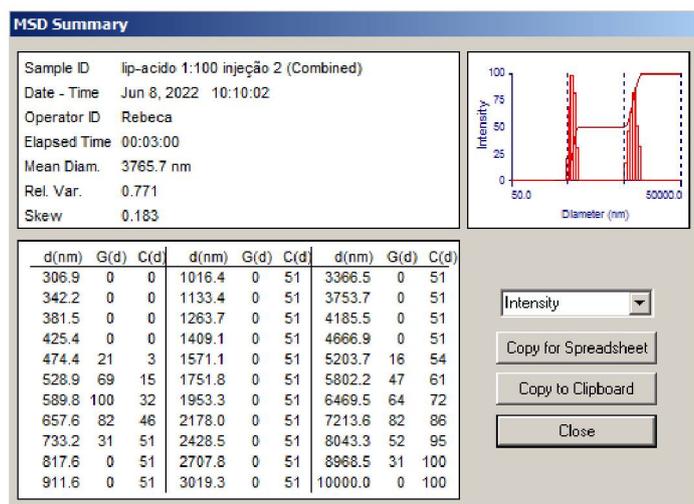


Figura 23: A imagem representa a aquisição por meio de DLS do lipossoma encapsulado com ácido zoledrônico após 7 dias da confecção. O tamanho médio das partículas foi 3765.7 nm.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, obtivemos a padronização da leitura de ECG em coração de *zebrafish*, melhorias no protocolo de dissociação do coração e do preparo de amostras para o MALDI, o que nos possibilitou caracterizar o modelo de crioinjúria no laboratório, além da realização de técnicas como citometria, scRNAseq e lipidômica. Além disso, confeccionamos lipossomas encapsulados com ácido zoledrônico (LIP-ZOL), caracterizamos o tamanho das partículas e padronizamos metodologia de quantificação deste fármaco.

Não observamos alterações no ECG significativas comparáveis com o infarto em humanos. Isso porque, em humanos, o ECG característico desta lesão possui supradesnível do segmento ST, ou onda T apiculada, características que não observamos em nossas leituras. Isso pode ser por conta da sensibilidade da técnica para avaliar IAM em *zebrafish*, mas também por conta de sua alta capacidade regenerativa.

Observamos diminuição dos intervalos QT, QTc e JT em animais 3 dpi, parâmetros utilizados como auxílio na avaliação do IAM em humanos e o prolongamento deles está associado a essa lesão também em *zebrafish* (VORNANEN E HASSINEN, 2016), no entanto, não observamos o prolongamento e sim a diminuição dos intervalos. O intervalo JT é menos utilizado para avaliação do infarto, mas, quando há dúvida na leitura, ele pode ser considerado, já que o intervalo QT pode sofrer variação no momento da leitura (ZAREBA ET AL, 2017), causadas por perturbações no ambiente e posição dos eletrodos, tanto em humanos como no *zebrafish*. No entanto, como este modelo animal é um peixe

ectotérmico, ou seja, não possui regulação de temperatura interna, a temperatura também afeta a leitura, algo que não ocorre em humanos (VORNANEN; HASSIENE, 2016). Outro ponto de variação é a anestesia. Já foi relatado que anestésias muito profundas causam supressão do sinal cardíaco (GENGE ET AL, 2016), o que além de ser uma influência no resultado, também é uma dificuldade experimental, já que o sinal cardíaco do *zebrafish* é naturalmente baixo. Por consequência das possíveis variações mencionadas, foi relatado em *zebrafish* valores de QT bastante variados, em animais selvagens sem alteração, de 250 ms a 600 ms (LIU ET AL, 2016), portanto a interpretação da leitura com o intervalo JT é necessária. No entanto, ainda que os valores do intervalo QT do *zebrafish* varie na literatura, nossos dados se mantêm significativos por mostrarem uma diminuição quando comparado com animais controles.

Estes quatro fatores de variação foram controlados no experimento. Como o nosso laboratório e o parceiro não tinham experiência com ECG de *zebrafish*, foram necessários testes até que se chegasse ao resultado final. A temperatura da sala era controlada desde o início dos experimentos, através de ar-condicionado. No entanto, percebeu-se que o sinal se mantinha bastante instável e ao longo do experimento conseguimos posicionar o eletrodo com firmeza, aproximadamente no mesmo local em todos os peixes analisados. Da mesma forma, percebemos também a influência da concentração de anestésico utilizada e a padronizamos. Os resultados apresentados são produtos dessas padronizações, que auxiliarão os trabalhos de outros alunos do laboratório e também novas mensurações em nosso modelo. Avaliar o ECG em do *zebrafish* após horas da lesão, poderá trazer resultados mais comparáveis com o humano, visto que as alterações no formato das ondas mencionadas anteriormente são observadas neste momento, inclusive em humanos.

Os dados encontrados na histologia estão de acordo com o observado na literatura, como o espessamento do epicárdio ventricular no local da lesão e infiltrado inflamatório. No entanto, também é observado nas histologias em outros artigos, em momentos iniciais, a deposição de fibrina e posteriormente de colágeno próximo à borda da lesão (BISE ET AL., 2020). A partir de 7 dpi já é observado, em alguns trabalhos, que este novo tecido se afasta da borda, diminui progressivamente de tamanho e é substituído pelo miocárdio regenerado (GONZÁLEZ-ROSA ET AL, 2011). Em nossas análises não observamos isto, o que pode ser devido ao tipo de coloração escolhido, já que para a visualização da deposição de colágeno e fibrina utilizam-se outras, como *acid fuchsin orange G* (AFOG) e Tricrômico de Masson Goldner (BISE ET AL, 2020; XU ET AL, 2019).

É importante realizar estas colorações futuramente para que possamos verificar estas características em nossas amostras.

Além de alterações na eletrofisiologia e na histologia cardíaca após crioinjúria, outra forma de verificar nosso modelo de lesão é a análise do infiltrado de macrófagos. O *zebrafish* é um animal de fácil manipulação genética e que possui transparência em estágios iniciais da vida. Estas qualidades permitiram a geração de animais transgênicos que expressam determinadas proteínas fluorescentes acopladas a uma outra de interesse científico, permitindo imagem, citometria e separação por *sorting*. Este é o caso das linhagens transgênicas que utilizamos para as análises de citometria. A diferenciação entre macrófagos TNF α ⁺ e TNF α ⁻ foi proposta por Nguyen-Chi e colaboradores em 2017 (NGUYEN-CHI ET AL, 2017). Após experimentos de regeneração caudal, descobriram que nas primeiras horas há um maior infiltrado de macrófagos que expressam TNF α , que é substituído cerca de 3 dias depois, por macrófagos que não mais expressam esta molécula. Este foi um marco no processo de regeneração de *zebrafish* que permitiu ser separado temporalmente o reparo, demonstrando que é essencial que se tenha uma fase inicial inflamatória e uma tardia anti-inflamatória e que os macrófagos estão presente nos dois momentos, acompanhando a mudança do ambiente.

Atualmente, esta é a única diferenciação entre os perfis de macrófagos que está disponível para o *zebrafish*, portanto, a utilizamos para verificar o perfil de macrófagos presentes após crioinjúria cardíaca. Realizamos citometria de animais que sofreram cioinjúria e animais sham para identificar os macrófagos de 13 e 21 dpi e como resultado obtivemos que macrófagos estão presentes nestes tempos, mas não houve diferença significativa na quantidade. Isso pode se explicar pois nestes tempos, os macrófagos já diminuíam, estas células estão mais presentes em 03 e 07 dpi, portanto concluiremos o experimento realizando a citometria destes dias.

Para que a citometria, a lipidômica e a obtenção do cDNA para o scRNAseq fossem realizados, foi necessária a melhoria do protocolo de dissociação do coração. É importante destacar que os macrófagos utilizados foram todos pertencentes à linhagem transgênica Tg (mpeg:mCherry; TNF α : GFP) e, portanto, possuem proteína fluorescente na membrana. A dissociação de um tecido pode danificar estas proteínas e também fragmentar as células, causando a morte celular. Para que aqueles três experimentos fossem devidamente executados, foram necessários vários testes de dissociação do coração até atingir o protocolo com menor morte celular. Os parâmetros testados foram: tipo de collagenase, tempo de ação das enzimas, temperatura ideal para a atividade da

enzima, considerando as células do *zebrafish*, rotação do *thermomixer*, concentração das enzimas (colagenase IV e DNase I) e meio de suspensão. O melhor protocolo encontrado foi o utilizado para os experimentos mencionados acima e está descrito na metodologia.

O MALDI *imaging* é uma técnica que é muito utilizada para avaliar a atuação de fármacos em tecidos, pois demonstra a localização das moléculas. Em nosso trabalho, utilizamos a técnica como uma ferramenta de análise exploratória. Esta foi a primeira vez no SCB da UFPR que este tipo de experimento foi realizado, portanto foram necessárias adaptações e padronizações. Determinamos a temperatura ideal do banho de sal, a impossibilidade de reutilização da matriz para a sublimação, a necessidade de secar a lâmina contendo os cortes para a sublimação e que é necessário realizar escaneamento da lâmina antes da sublimação, o que não precisa ser feito em cortes de tecidos maiores.

Os resultados demonstrados neste trabalho foram adquiridos durante este processo de padronização, portanto não foram realizados experimentos após ajustes do protocolo. A aplicação da matriz da amostra utilizada não foi homogênea, o que gera diferença na ionização de moléculas, por isso os espectros gerados podem ter apresentado diferença significativa por conta dessa má distribuição.

Pretendemos no futuro explorar os dados obtidos e também repetir todo o experimento, para que tenhamos uma melhor aplicação da matriz e melhor visualização das amostras na lâmina. Iremos também realizar outra análise com método de detecção diferente, para que possamos detectar proteínas.

O scRNAseq é uma técnica de sequenciamento de célula única. As células são separadas e neste momento, adicionam-se *beads* magnéticas e *sample tags* que são para que cada célula possa ser identificada no sequenciamento. No caso do *zebrafish*, a BD® não possui *sample tags* padronizadas para a venda e também não conseguimos confeccionar em nosso laboratório. Essa marcação é um anticorpo acoplado a uma sequência de oligonucleotídeos. Como para *zebrafish* os anticorpos são poucos disponíveis no mercado, não foi encontrado um ideal para a confecção da técnica com as *sample tags*. Esta molécula é essencial para que possam ser feitos vários grupos dentro de um único cartucho, ou seja, em apenas um experimento tem-se o cDNA de todos os grupos em um único tubo final. No caso da nossa pesquisa, utilizamos um cartucho para cada grupo. As desvantagens do scRNAseq ser realizado desta forma são o preço, visto que cada cartucho possui um valor alto, e o trabalho, pois não é possível fazer mais de dois grupos em um dia, já que este processo é laborioso.

Uma outra questão em se utilizar o *zebrafish* para o scRNAseq é o número de células. Inicialmente, o planejamento experimental foi realizar o *cell sorting* dos macrófagos dos corações após os tempos de lesão selecionados e então executar o scRNAseq com estas células. No entanto, segundo o protocolo recomendado pela BD®, é necessário carregar cada cartucho com cerca de 40 mil células para ao final ter a quantidade suficiente para o sequenciamento, visto que é uma técnica que se perde bastante células ao longo do processo. Ao realizarmos o *cell sorting*, não obtivemos a quantidade de macrófagos suficientes para o experimento. Portanto, decidimos executar o scRNAseq com todas as células do coração e no sequenciamento focar nos macrófagos. Uma alternativa para este problema, é utilizar outra técnica de scRNAseq, como a da empresa *10x Genomics®*, que exige uma quantidade inicial de células menor, cerca de 5 mil (HAIMBAUGH ET AL., 2022). Além disso, pode-se enriquecer as amostras dos corações com macrófagos sorteados, para que tenhamos maiores chances de identificação das populações raras destas células no sequenciamento.

O experimento de lipidômica, realizado em colaboração com o Laboratório BIOmics da Unicamp, trouxe dados importantes para o estudo. Cinco lipídios encontrados diferentemente presentes entre 13 e 07 dpi, ainda não foram caracterizados. A maioria dos lipídios identificados pertencem à classe dos glicerofosfolipídeos, estas moléculas são compostas de ácido graxo, glicerol, fosfato e álcool e são um dos principais componentes das membranas. Identificamos as subclasses dos lipídios pertencentes a esta classe: glicerofosfogliceróis, glicerofosfolipídios oxidados, glicerofosfoserina, glicerofosfocolinas, glicerofosfoetanolamina e monoacilglicerofosfatos.

Uma das moléculas que diminuiu no dia 13, é o ácido pantotênico, com massa de 218.10356 m/z, conhecido também como vitamina B5, ele participa da formação da coenzima A (CoA). Este lipídio é fosforilado pela enzima *pantothenate kinase* (PANK), gerando o ácido 4' - fosfopantotênico, onde uma cisteína é condensada e a enzima CoA sintase finaliza a síntese da CoA (KHATRI ET AL., 2016). A CoA é uma precursora do acetil-CoA, essencial para o ciclo do ácido cítrico, essencial para a oxidação de várias moléculas. Portanto, esse achado é um indício de que este ciclo diminui sua atividade de 07 dpi 13 dpi, por conta da diminuição do precursor da CoA. Da mesma forma, o acetil-CoA também participa da regulação de genes inflamatórios, como TNF- α e IFN- γ , através da acetilação de histonas, mas também promove a transcrição de IL-4, característica de perfil anti-inflamatório (NOE e MITCHELL, 2019). Portanto, a polarização de macrófagos mediada pelo acetil-CoA depende do contexto em que esta célula está inserida. As

análises dos outros lipídios identificados serão realizadas, assim como outras mencionadas ao longo do trabalho. Também serão enviadas mais amostras dos grupos 03 e 07 dpi para que a pesquisa seja completada.

A confecção de LIP-ZOL como método de depleção de macrófagos auxiliará em pesquisas brasileiras, portanto padronizamos o método de quantificação do ácido zoledrônico por HPLC. Testes iniciais foram realizados utilizando o fármaco comercial, cujo nome é Aclasta. No entanto, o princípio ativo está presente em concentração muito baixa, o que estava abaixo do limite de detecção do HPLC, para isso foi necessária a compra do princípio ativo purificado. Este foi o utilizado nos resultados mostrados. Durante a padronização da metodologia de quantificação do ZOL, foi adicionada uma etapa de limpeza da coluna, pois após algumas corridas a intensidade dos picos diminuía, sem que tivesse alterada a concentração. A hipótese levantada foi que o ZOL estava aderindo à coluna, por isso é essencial uma limpeza após cada análise. O tamanho do lipossoma encontrado é elevado e por isso é necessário padronizar o tempo de sonicação para a diminuição do tamanho e é essencial que o lipossoma seja maior que 200 nm (WU ET AL., 2019). Da mesma forma, também será realizada a validação biológica destas nanopartículas em larvas de *zebrafish* em modelo de regeneração de corte da cauda, por ser um modelo de acesso mais fácil.

8 CONCLUSÃO

O IAM possui importância global e não possui tratamento para a consequente fibrose, apenas para remediar as consequências da lesão. Por isso, é essencial realizar pesquisas básicas que ampliem o conhecimento sobre o processo que envolve a formação desta cicatriz. O presente trabalho foi essencial para contribuir com este problema. Estabelecemos novas técnicas, além de confirmar achados da literatura, como a diminuição de macrófagos em 13 e 21 dpi, obtivemos cortes histológicos típicos de crioinjúria e descobrimos diferenças na expressão de lipídios entre 13 e 07 dpi. Novos experimentos serão realizados e poderão continuar a contribuir para o entendimento do perfil dos macrófagos na regeneração após crioinjúria do coração de *zebrafish*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; TAKEDA, N.; ISAGAWA, T.; et al. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac. **Nature Communications**, p. 1–8, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10859-w>>. .
- AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; et al. Liposome: Classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013. Nanoscale Research Letters. Disponível em: <Nanoscale Research Letters>. .
- AURORA, A. B.; PORRELLO, E. R.; TAN, W.; et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1382–1392, 2014.
- BEFFAGNA, G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. August, p. 1–8, 2019.
- BEVAN, L.; LIM, Z. W.; VENKATESH, B.; et al. Specific macrophage populations promote both cardiac scar deposition and subsequent resolution in adult zebrafish. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 7, p. 1357–1371, 2020.
- BISE, T.; SALLIN, P.; PFEFFERLI, C.; JAŻWIŃSKA, A. Multiple cryoinjuries modulate the efficiency of zebrafish heart regeneration. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Nature Publishing Group UK. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68200-1>>. .
- BLANKESTEIJN, W. M. Interventions in WNT signaling to induce cardiomyocyte proliferation: Crosstalk with other pathways. **Molecular Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 90–101, 2020.
- BOURNAZOU, I.; POUND, J. D.; DUFFIN, R.; et al. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, p. 20–32, 2009.
- CHARLES, A.-S. DE P.; BISE, T.; BAIER, F.; MARRO, J.; JAZWINNSKA, A. Distinct effects of inflammation on preconditioning and regeneration of the adult zebrafish heart. **Royal Society**, v. 6, n. 160102, p. 02–12, 2016.
- COPE, K. D.; IMPASTATO, W. K.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. Volatile Anesthetics Protect the Ischemic Rabbit Myocardium from Infarction. **Anesthesiology**, v. 86, p. 699–709, 1997.

- DE COUTO, G. Macrophages in cardiac repair: Environmental cues and therapeutic strategies. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0269-4>>. .
- DAVIS, J.; MÖLKENTIN, J. D. Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 9–18, 2014.
- DOBACZEWSKI, M.; BUJAK, M.; ZYMEK, P.; et al. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. **Cell and Tissue Research**, v. 324, n. 3, p. 475–488, 2006.
- FRANGOIANNIS, N. G. Emerging roles for macrophages in cardiac injury cytoprotection, repair, and regeneration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 2927–2930, 2015. New York.
- FRITH, J. C.; MÖNKKÖNEN, J.; BLACKBURN, G. M.; RUSSELL, R. G. G.; ROGERS, M. J. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5²-(β,γ -dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 9, p. 1358–1367, 1997.
- GEMBERLING, M.; BAILEY, T. J.; HYDE, D. R.; POSS, K. D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 611–620, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>>. .
- GENGE, C. E.; LIN, E.; LEE, L.; et al. The zebrafish heart as a model of mammalian cardiac function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 171, p. 99–136, 2016.
- GONZÁLEZ-ROSA, J. M.; MARTÍN, V.; PERALTA, M.; TORRES, M.; MERCADER, N. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. **Development**, v. 138, n. 9, p. 1663–1674, 2011.
- GONZÁLEZ-ROSA, J. M.; MERCADER, N. Cryoinjury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish. **Nature Protocols**, v. 7, n. 4, p. 782–788, 2012.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.
- HAIMBAUGH, A.; MEYER, D.; AKEMANN, C.; GURDZIEL, K.; BAKER, T. R. Comparative Toxicotranscriptomics of Single Cell RNA-Seq and Conventional RNA-Seq in TCDD-Exposed Testicular Tissue. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, n. May, p. 1–15, 2022.
- HILGENDORF, I.; SWIRSKI, F. K.; ROBBINS, C. S. Monocyte fate in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 2, p. 272–279, 2015.
- HONOLD, L.; NAHRENDORF, M. in *Cardiovascular Disease*. , p. 113–127, 2017.
- KALRA, J.; BALLY, M. B. Liposomes. **Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience**, v. 605, p. 27–63, 2013.

KHATRI, D.; ZIZIOLI, D.; TISO, N.; et al. Down-regulation of coasy, the gene associated with NBIA-VI, reduces Bmp signaling, perturbs dorso-ventral patterning and alters neuronal development in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–15, 2016. Nature Publishing Group.

KIM, Y.; NURAKHAYEV, S.; NURKESH, A.; ZHARKINBEKOV, Z. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

KOHNO, T.; ANZAI, T.; NAITO, K.; et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 3, p. 565–573, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAVINE, K. J.; EPELMAN, S.; UCHIDA, K.; et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16029–16034, 2014.

LAWSON, N. D.; WEINSTEIN, B. M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. **Developmental Biology**, v. 248, n. 2, p. 307–318, 2002.

LENNING, M.; FORTUNATO, J.; LE, T.; et al. Real-time monitoring and analysis of zebrafish electrocardiogram with anomaly detection. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

LEOR, J.; PALEVSKI, D.; AMIT, U.; KONFINO, T. Macrophages and regeneration: Lessons from the heart. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 58, p. 26–33, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.012>>. .

LIU, C. C.; LI, L.; LAM, Y. W.; SIU, C. W.; CHENG, S. H. Improvement of surface ECG recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–13, 2016.

MA, H.; LIU, Z.; YANG, Y.; et al. Functional coordination of non-myocytes plays a key role in adult zebrafish heart regeneration. , p. 1–20, 2021.

MILAN, D. J.; JONES, I. L.; ELLINOR, P. T.; MACRAE, C. A. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 1, p. 269–273, 2006.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>>. .

- NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K.; AIKAWA, E.; et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 12, p. 3037–3047, 2007.
- NGUYEN-CHI, M.; LAPLACE-BUILHÉ, B.; TRAVNICKOVA, J.; et al. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e2979, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.374>>. .
- NOE, J. T.; MITCHELL, R. A. Tricarboxylic acid cycle metabolites in the control of macrophage activation and effector phenotypes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 359–367, 2019.
- O'NEILL, L. A. J. When Signaling Pathways Collide: Positive and Negative Regulation of Toll-like Receptor Signal Transduction. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 12–20, 2008.
- OLIVEIRA, G. M. M. DE; BRANT, L. C. C.; POLANCZYK, C. A.; et al. Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 118, n. 1, p. 115–373, 2022.
- PORRELLO, E. R.; MAHMOUD, A. I.; SIMPSON, E.; et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 1, p. 187–192, 2013.
- POSS, K. D.; WILSON, L. G.; KEATING, M. T. Heart regeneration in zebrafish. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2188–2190, 2002.
- REN, G.; MICHAEL, L. H.; ENTMAN, M. L.; FRANGOGIANNIS, N. G. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 71–79, 2002.
- REVELO, X. S.; PARTHIBAN, P.; CHEN, C.; et al. Cardiac Resident Macrophages Prevent Fibrosis and Stimulate Angiogenesis. **Circulation Research**, p. 1086–1101, 2021.
- RICHARDSON, R. J. Parallels between vertebrate cardiac and cutaneous wound healing and regeneration. **npj Regenerative Medicine**, v. 3, n. 1, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41536-018-0059-y>>. .
- ROOIJEN, N. VAN; SANDERS, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 83–93, 1994.
- RYAN, R.; MOYSE, B. R.; RICHARDSON, R. J. Zebrafish cardiac regeneration — looking beyond cardiomyocytes to a complex microenvironment. **EMBO reports**, v. 22, n. 11, p. 1–20, 2021. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00418-020-01913-6>>. .
- SHINDE, A. V.; FRANGOGIANNIS, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 74–82,

2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.015>>. .

SHMEEDA, H.; AMITAY, Y.; TZEMACH, D.; GORIN, J.; GABIZON, A. Liposome encapsulation of zoledronic acid results in major changes in tissue distribution and increase in toxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 3, p. 265–275, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.003>>. .

SIMÕES, F. C.; CAHILL, T. J.; KENYON, A.; et al. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 600, 2020. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-14263-2>>. .

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010. Nature Publishing Group.

VOGEL, B.; CLAESSEN, B. E.; ARNOLD, S. V.; et al. ST-segment elevation myocardial infarction. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–20, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0090-3>>. .

VORNANEN, M.; HASSINEN, M. Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology. **Channels**, v. 10, n. 2, p. 101–110, 2016. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2015.1121335>>. .

WU, Z.; KOH, B.; LAWRENCE, L. M.; et al. Liposome-Mediated Drug Delivery in Larval Zebrafish to Manipulate Macrophage Function. , v. 16, n. 2, p. 171–181, 2019.

XU, S.; LIU, C.; XIE, F.; et al. Excessive inflammation impairs heart regeneration in zebra fish breakdance mutant after cryoinjury. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, p. 117–126, 2019.

ZAREBA, W.; MCNITT, S.; POLONSKY, S.; COUDERC, J. P. JT interval: What does this interval mean? **Journal of Electrocardiology**, v. 50, n. 6, p. 748–751, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2017.07.019>>. .