

## Remodelamento Cardíaco e Expressão da ILK Diferem entre os Gêneros após Infarto do Miocárdio

*Gender-Based Differences in Cardiac Remodeling and ILK Expression after Myocardial Infarction*

Renato Rodrigues Sofia<sup>1,2</sup>, Andrey Jorge Serra<sup>1</sup>, Jose Antonio Silva Jr<sup>1</sup>, Ednei Luiz Antonio<sup>2</sup>, Martha Trindade Manchini<sup>1</sup>, Fernanda Aparecida Alves de Oliveira<sup>2</sup>, Vicente Paulo Castro Teixeira<sup>3</sup>, Paulo José Ferreira Tucci<sup>2</sup>

Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação - Universidade Nove de Julho (Uninove)<sup>1</sup>; Departamento de Cardiologia - Universidade Federal de São Paulo<sup>2</sup>; Departamento de Patologia - Universidade Federal de São Paulo<sup>3</sup>, São Paulo, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** O gênero pode ser decisivo no remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio.

**Objetivo:** Avaliar diferenças de gênero associadas ao remodelamento do ventrículo esquerdo (VE) após infarto do miocárdio (IM) e associadas à modulação de quinases acopladas à integrina (*integrin-linked kinases-ILK*).

**Métodos:** Ratos Wistar machos e fêmeas foram divididos em 3 grupos: grupo sham, grupo com IM de extensão moderada (tamanho: 20-39% da área do VE); grupo com IM de grande extensão (tamanho:  $\geq 40\%$  da área do VE). O IM foi produzido por oclusão coronária e as análises ecocardiográficas foram obtidas após 6 semanas para avaliar a extensão do IM, bem como a morfologia e função do VE. RT-PCR em tempo real e Western blot foram realizados para quantificar a ILK no miocárdio.

**Resultados:** A extensão do IM foi semelhante entre os gêneros. O IM resultou em disfunção sistólica e aumento do tamanho do VE no final da diástole e da sístole em função do tamanho da área necrótica para ambos os sexos. Ratos fêmeas com IM de grande extensão apresentaram dilatação diastólica e sistólica inferior a de ratos machos, mas a disfunção do VE foi semelhante em ambos os sexos. Os níveis gênicos e proteicos de ILK aumentaram em ratos fêmeas com infartos de extensão moderada e grande, mas apenas ratos machos com infartos de grande extensão apresentaram níveis alterados de mRNA do ILK. Uma correlação linear negativa foi observada entre as dimensões do VE e a expressão de ILK em ratos fêmeas com IM de grande extensão.

**Conclusões:** A expressão de ILK pós-IM variou de maneira gênero-específica, e os níveis mais elevados de ILK observados em fêmeas podem ser suficientes para melhorar a geometria do VE, mas não suficientes para melhorar a função do VE. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(2):124-130)

**Palavras-chave:** Remodelamento Atrial; Infarto do Miocárdio; Identidade de Gênero; Proteínas Serina-Treonina Quinases/metabolismo; Ratos.

### Abstract

**Background:** Gender can influence post-infarction cardiac remodeling.

**Objective:** To evaluate whether gender influences left ventricular (LV) remodeling and integrin-linked kinase (ILK) after myocardial infarction (MI).

**Methods:** Female and male Wistar rats were assigned to one of three groups: sham, moderate MI (size: 20–39% of LV area), and large MI (size:  $\geq 40\%$  of LV area). MI was induced by coronary occlusion, and echocardiographic analysis was performed after six weeks to evaluate MI size as well as LV morphology and function. Real-time RT-PCR and Western blot were used to quantify ILK in the myocardium.

**Results:** MI size was similar between genders. MI resulted in systolic dysfunction and enlargement of end-diastolic as well as end-systolic dimension of LV as a function of necrotic area size in both genders. Female rats with large MI showed a lower diastolic and systolic dilatation than the respective male rats; however, LV dysfunction was similar between genders. Gene and protein levels of ILK were increased in female rats with moderate and large infarctions, but only male rats with large infarctions showed an altered ILK mRNA level. A negative linear correlation was evident between LV dimensions and ILK expression in female rats with large MI.

**Conclusions:** Post-MI ILK expression is altered in a gender-specific manner, and higher ILK levels found in females may be sufficient to improve LV geometry but not LV function. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(2):124-130)

**Keywords:** Atrial Remodeling; Myocardial Infarction, Gender Identity; Protein-Serine Threonine Kinases/metabolism; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Andrey Jorge Serra •

Rua Ararari, 159, Vila Esperança. CEP 03650-040, São Paulo, SP – Brasil

E-mail: andreyserra@gmail.com, andreyserra@uninove.br

Artigo recebido em 19/09/13, revisado em 18/11/13, aceito em 17/01/14.

DOI: 10.5935/abc.20140113

## Introdução

Sabe-se que mulheres na pré-menopausa apresentam menor risco de doenças cardiovasculares quando comparado a homens da mesma idade<sup>1</sup>. No entanto, existem dados conflitantes a respeito das diferenças de gênero em relação à resposta cardíaca adaptativa durante o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio (IM). Neste sentido, embora alguns estudos tenham mostrado um remodelamento cardíaco pior em roedores machos pós-IM, outros pesquisadores não encontraram diferenças de gênero ou remodelamento cardíaco pior em fêmeas<sup>2,3</sup>.

Dos possíveis mecanismos pelos quais o gênero pode afetar o remodelamento do ventrículo esquerdo (VE) pós-IM, o hormônio sexual feminino estrógeno tem sido o mais frequentemente estudado<sup>4,6</sup>. O sistema cardiovascular é influenciado não só pelo estrógeno, mas também por múltiplos fatores moleculares que podem determinar diferenças significativas entre os sexos, e que estão presentes no coração saudável<sup>7</sup>. De fato, as diferentes características do miocárdio normal levam ao pressuposto lógico de que diferentes respostas moleculares ocorrem entre os sexos em resposta ao IM. Neste sentido, vários estudos indicaram o papel fundamental de quinases acopladas à integrina (*integrin-linked kinases*—ILK) no miocárdio isquêmico. ILK é um efetor crucial na via de sinalização de Akt,<sup>8,9</sup> é regulado positivamente<sup>10</sup> e é capaz de promover a regeneração cardíaca após IM<sup>11</sup>. Além disso, a terapia gênica com ILK melhora o remodelamento cardíaco em ratos pós-IM e está associada com o aumento da angiogênese, redução da apoptose, e aumento da proliferação de cardiomiócitos<sup>12</sup>.

Visto que as diferenças de gênero associadas ao remodelamento do VE pós-IM não são claras, realizamos este estudo utilizando um modelo de ratos com IM através de um método confiável e abrangente para examinar as diferenças de gênero no remodelamento do miocárdio<sup>13-15</sup>. Considerando que estudos anteriores têm demonstrado que ILK influencia o remodelamento do VE, também examinamos o efeito do gênero sobre a expressão de ILK no miocárdio pós-IM.

## Métodos

### Animais e cirurgia para indução de IM

O presente estudo está de acordo com o Manual de Cuidados e Uso de Animais de Experimentação publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH) dos EUA (publicação No. 85-23, revisada em 1985), e de acordo com a política e regulamentação do Reino Unido descrita no *Journal of Physiology*<sup>16</sup> e Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, Brasil. Ratos Wistar machos e fêmeas com 10 semanas de idade foram submetidos à cirurgia para indução de infarto do miocárdio ou à cirurgia sham. Após anestesia com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), a artéria coronária descendente anterior esquerda foi ocluída perto da sua origem, utilizando um método

anteriormente descrito<sup>13-15</sup>. Ratos sham-operados foram tratados da mesma forma, exceto que a ligadura não foi amarrada. Ratos machos e fêmeas foram divididos em um grupo sham, um grupo experimental com IM de extensão moderada (tamanho do infarto: 20-39% da área do VE), ou um grupo com IM de grande extensão (tamanho do infarto:  $\geq 40\%$  da área do VE).

### Avaliação da extensão do IM, geometria e função do VE

Seis semanas após a oclusão da artéria coronária ou cirurgias sham, os animais foram anestesiados conforme descrito acima e as avaliações foram realizadas utilizando um transdutor de 12 MHz acoplado a um ecocardiógrafo modelo HP Sonos-5500 (Hewlett-Packard, Califórnia, EUA) como previamente descrito<sup>14,15</sup>. A extensão do IM foi medida utilizando um corte transversal 2D do VE nos planos basal, médio e apical. As medições do perímetro do endocárdio (PE) e comprimento do segmento infartado (CSI) para cada corte transversal foram obtidos em diástole. A extensão do infarto para cada segmento (ESI), representada como a proporção do perímetro do VE em cada corte transversal, foi calculada pela equação:  $ESI (\%) = CSI/PE \times 100$ . O IM foi definido por ecocardiografia como qualquer segmento com ecogenicidade aumentada e/ou alteração da espessura do miocárdio, ou movimento sistólico (hipocinesia, acinesia, ou discinesia). As áreas transversais diastólica (ADVE) e sistólica (ASVE) do ventrículo esquerdo foram medidas por meio de imagens 2D usando cortes basais, médios, e apicais. O valor final correspondeu à média aritmética das medidas dos 3 cortes. A função sistólica foi avaliada pela variação da área fracional (VAF) de acordo com a seguinte equação:  $VAF = AD-AS/AD \times 100$ .

Após as análises ecocardiográficas, os animais receberam uma overdose de uretano (i.e., 4,8 g/kg) e os corações foram imediatamente removidos do tórax e dissecados. Amostras de área remota do IM e a parte correspondente dos ratos sham-operados foram recolhidas, congeladas em gelo seco, e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

### Análise em tempo real por RT-PCR quantitativa

O RNA total foi isolado a partir de tecido do miocárdio utilizando TRIzol como anteriormente descrito<sup>17</sup>. A transcrição reversa foi realizada num volume de 200  $\mu\text{L}$  na presença de 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de diotretol, 0,5 mM de dNTP, e 50 ng de iniciadores aleatórios com 200 unidades da transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (Invitrogen). O produto da reação foi amplificado por PCR em tempo real utilizando um sistema de detecção modelo 7000 (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o kit de reação *SYBRGreen core* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os iniciadores utilizados foram: ILK de rato (número de acesso GenBank™: NM 133409), iniciador *forward* 5'-ACCCAACCCTCATCACACACT-3' e iniciador *reverse* 5'-GCCTCTTGCCATGTCCAAA-3'; GAPDH de rato (número de acesso GenBank™: NM 017008), iniciador *forward*: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' e *reverse*: 5'-GCCCCACGGCCATCA-3'.

### Análise por Western blotting

As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração contendo 0,1 M de NaCl, 0,01 M de Tris-HCl (pH 7,6), 0,001 M de EDTA (pH 8,0), 1% de NP-40, 10% de glicerol, 10  $\mu$ M de PMSF, 1 mM de metavanadato de sódio, 0,05 M de NAF e 22 nM de ácido ocadáico juntamente com coquetéis de inibidores da protease. O método de Lowry foi usado para a quantificação de proteína. O tecido homogeneizado foi diluído em tampão de Laemmli e fervido durante 5 minutos, e as proteínas (60  $\mu$ g) foram separadas por eletroforese utilizando mini gel de poliacrilamida a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletrotransferência. O bloqueio foi realizado com 5% de leite desnatado durante 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram sondadas com um anticorpo policlonal anti-ILK de coelho purificado por cromatografia de afinidade (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em tampão TBS-T (50 mM de Tris-HCl, 154 mM de NaCl (pH 7,5), em 0,1% de Tween 20), acrescido de 2% de leite desnatado. Após 12 horas de incubação à temperatura ambiente, as membranas foram lavadas em TBS-T (3 vezes de 10 minutos) e incubadas durante 2 horas com imunoglobulina biotilada anti-coelho (Vector Laboratories, CA, EUA), diluída a 1:200 em TBS-T acrescido de 2% de leite desnatado. As membranas foram lavadas em TBS-T (3 vezes de 10 minutos) e incubadas durante 1 hora em estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (Vector Laboratories, CA, EUA). Após a lavagem, os reagentes de quimiluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) foram aplicados às membranas, que em seguida foram expostas a um filme de raios-X (Amersham) e as proteínas foram quantificadas por análise de densitometria. Igual quantidade de proteína foi retirada por *stripping* e a membrana foi novamente incubada com um anticorpo anti-GAPDH (1:2000, Proteimax Biotecnologia, Brasil).

### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software SPSS 13.0 (Analytical Software, Chicago, Chicago, IL, EUA), e os

valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para verificar a distribuição estatística aproximadamente normal e a homogeneidade das variâncias, respectivamente. Análise de variância a dois fatores seguida pelo pós-teste de Bonferroni foram usados para detectar diferenças significativas na normalidade da amostra. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram aplicados para amostras não-normais. As correlações entre os níveis de ILK e as áreas do VE pós-IM foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Além disso, modelos de regressão linear multivariada foram desenvolvidos (1) para avaliar a correlação entre gênero e os parâmetros estruturais e funcionais do VE pós-IM e (2) a correlação entre os níveis proteicos de ILK e as áreas do VE pós-IM. A significância das análises estatísticas foi determinada utilizando um nível alfa  $\leq 0,05$ .

## Resultados

### Sobrevida após oclusão coronária

Um total de 41 ratos machos e 28 ratos fêmeas foram submetidos a oclusão coronária. Vinte e quatro horas após a oclusão, 18 ratos machos (44%) e 2 ratos fêmeas (7%) morreram. Seis semanas após a oclusão coronária, 2 ratos machos e 2 fêmeas morreram. Além disso, 1 macho e 3 fêmeas foram excluídos por não apresentarem sinais de IM.

### Extensão do IM, geometria e função do VE

Os dados ecocardiográficos estão apresentados na Tabela 1. A extensão do IM foi semelhante em ratos machos e fêmeas para os grupos com infarto moderado e grande. As fêmeas sham apresentaram diferenças significativas nas dimensões da câmara do VE em comparação com os ratos machos sham. No entanto, quando o tamanho da câmara do VE foi analisado em função do peso corporal, este parâmetro não diferiu entre os sexos. Seis semanas após o IM, as dimensões cardíacas no final da diástole e no final da sístole estavam significativamente aumentadas.

**Tabela 1 – Características ecocardiográficas dos animais**

	Fêmeas			Machos		
	Placebo	IM de moderada extensão	IM de ampla extensão	Placebo	IM de moderada extensão	IM de ampla extensão
N	7	9	12	8	8	12
PC (g)	232 $\pm$ 23*	227 $\pm$ 8#	262 $\pm$ 22\$†	343 $\pm$ 56	322 $\pm$ 12	300 $\pm$ 24‡
Extensão do IM (%)	---	32 $\pm$ 7	47 $\pm$ 6	---	33 $\pm$ 9	46 $\pm$ 6
ADVE (mm <sup>2</sup> )	2,5 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,8‡	5,4 $\pm$ 1,5†	3,2 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,6‡	8,2 $\pm$ 0,7\$‡
ASVE (mm <sup>2</sup> )	0,8 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 0,8‡	3,9 $\pm$ 0,9\$†	1,2 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,8‡	5,7 $\pm$ 1,1\$‡
ADVE/PC (mm <sup>2</sup> /g)	0,011 $\pm$ 0,002	0,020 $\pm$ 0,003‡	0,020 $\pm$ 0,004†	0,010 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,002‡	0,027 $\pm$ 0,002\$‡
ASVE/PC (mm <sup>2</sup> /g)	0,003 $\pm$ 0,0006	0,013 $\pm$ 0,003‡	0,015 $\pm$ 0,004†	0,003 $\pm$ 0,0006	0,010 $\pm$ 0,002‡	0,019 $\pm$ 0,004\$‡
VAF (%)	67 $\pm$ 2	34 $\pm$ 10‡	26 $\pm$ 16‡	63 $\pm$ 4	36 $\pm$ 11‡	29 $\pm$ 14‡

PC: peso corpóreo; ADVE: área diastólica do ventrículo esquerdo; ASVE: área sistólica do ventrículo esquerdo; VAF: variação da área fracional; IM: infarto do miocárdio; \*  $p < 0,05$  em comparação com ratos machos sham-operados; #  $p < 0,05$  em comparação com ratos machos com IM de extensão moderada; †  $p < 0,05$  em comparação com ratos machos com IM de grande extensão; ‡  $p < 0,05$  em comparação com os respectivos animais sham; §  $p < 0,05$  em comparação com IM de extensão moderada.

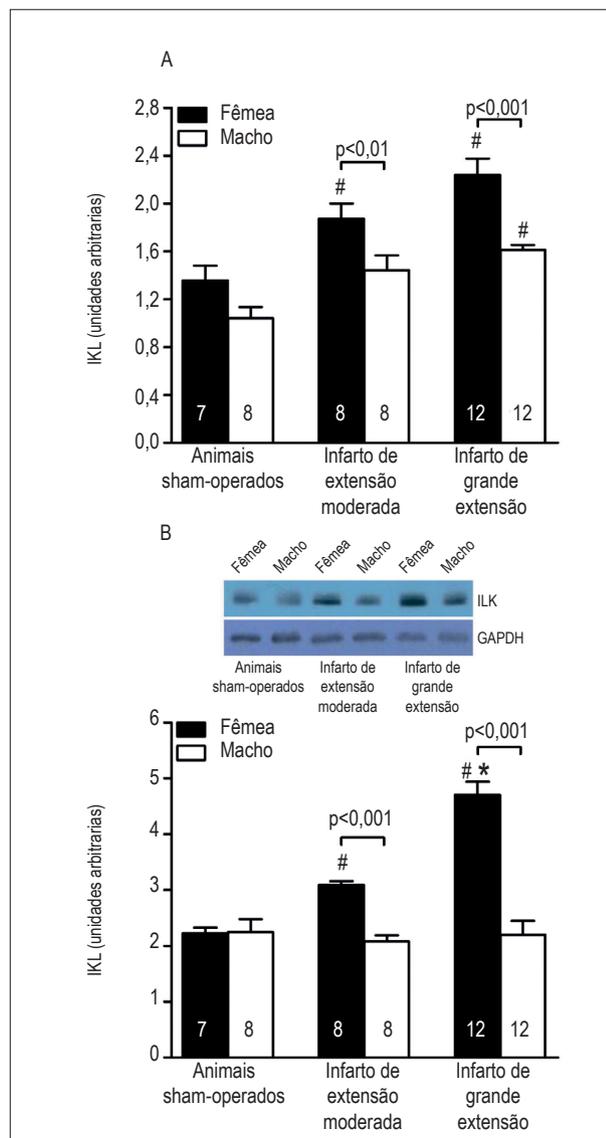
Além disso, as áreas do VE foram significativamente aumentadas em ratos machos e fêmeas, em função da extensão do IM. Na análise realizada, observamos que o sexo feminino influenciou favoravelmente o remodelamento do VE em resposta ao IM. Assim, ao considerar os animais com IM de grande extensão, as fêmeas apresentaram uma menor dilatação diastólica e sistólica do VE. De fato, quando avaliados de acordo com o peso corporal, os ratos machos apresentaram uma câmara do VE maior que a das fêmeas. Além disso, ratos machos e fêmeas com infartos de extensão moderada e grande apresentaram uma diminuição na função do VE, e essa diminuição foi semelhante em ambos os sexos.

Análises de regressão linear multivariada foram realizadas para avaliar a correlação entre o gênero e os parâmetros estruturais e funcionais do VE pós-IM (Tabela 2).

A extensão do IM não se correlacionou significativamente com o gênero. No entanto, o sexo masculino foi significativamente associado com maior área diastólica e sistólica do VE após o ajuste dos dados para a extensão do IM e peso corpóreo. Não houve correlação significativa entre gênero e VAF após o ajuste dos dados para a extensão do IM, área diastólica e sistólica do VE, e peso corpóreo.

#### O gênero determina a expressão diferencial de ILK pós-IM

Não houve diferença significativa na expressão de ILK entre ratos machos e fêmeas sham-operados (Figura 1A). O IM aumentou significativamente a expressão do mRNA de ILK em ratos fêmeas em comparação com as fêmeas sham-operadas correspondentes. A expressão do mRNA de ILK foi maior em fêmeas com IM de grande extensão em comparação com fêmeas com infartos moderados, mas esta diferença não foi significativa. Em ratos machos, os níveis de ILK foram significativamente maiores em animais com IM de grande extensão. Notavelmente, o gênero afetou significativamente a expressão de mRNA de ILK pós-IM. As fêmeas com IM de tamanho moderado e grande apresentaram níveis mais elevados de ILK comparados com animais do sexo masculino com estas mesmas áreas de IM. A Figura 1B mostra os níveis proteicos de ILK detectados por Western blotting. Tal como foi observado com os resultados do nível de expressão gênica, o gênero não afetou os níveis de ILK no tecido do miocárdio nos grupos sham-operados. No entanto, os níveis proteicos de ILK foram regulados



**Figura 1** – Quantificação dos níveis de mRNA (A) e proteicos (B) de ILK no miocárdio de ratos machos e fêmeas sham-operados e submetidos a infarto, respectivamente. Os níveis de ILK estão representados em função da extensão do IM. O tamanho da amostra é indicado nas barras. #  $p < 0,001$  em relação aos animais sham-operados; \*  $p < 0,001$  em relação aos animais com IM de extensão moderada.

**Tabela 2** – Análise multivariada entre o gênero e os parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio

	Coefficiente $\beta$ padronizado	Valor de t	Valor de p
Gênero - extensão do IM <sup>a</sup>	- 0,13	- 0,93	0,9
Gênero - ADVE <sup>b</sup>	0,530	5.533	< 0,001
Gênero - ASVE <sup>c</sup>	0,483	4.931	< 0,001
Gênero - VAF <sup>d</sup>	- 0,14	- 0,174	0,8

<sup>a</sup>Modelo 1: regressão linear múltipla para a associação do gênero e extensão do infarto do miocárdio (IM); <sup>b</sup>Modelo 2: regressão linear múltipla para a associação do gênero e da área diastólica do ventrículo esquerdo (ADVE) após ajuste dos dados para a extensão do IM e peso corpóreo; <sup>c</sup>Modelo 3: regressão linear múltipla para a associação do gênero e área sistólica do ventrículo esquerdo (ASVE) após ajuste dos dados para a extensão do IM e peso corpóreo; <sup>d</sup>Modelo 4: regressão linear múltipla para a associação do gênero e variação de área fracional (VAF), após ajuste dos dados para o tamanho do IM, peso corpóreo, ADVE e ASVE.

positivamente em função da extensão do IM para o sexo feminino. Por outro lado, os níveis de ILK não foram alterados no tecido do miocárdio em ratos machos infartados. Notavelmente, o gênero foi um fator determinante para a expressão diferencial de ILK pós-IM, considerando que um nível proteico significativamente maior de ILK foi observado em fêmeas em comparação com ratos machos.

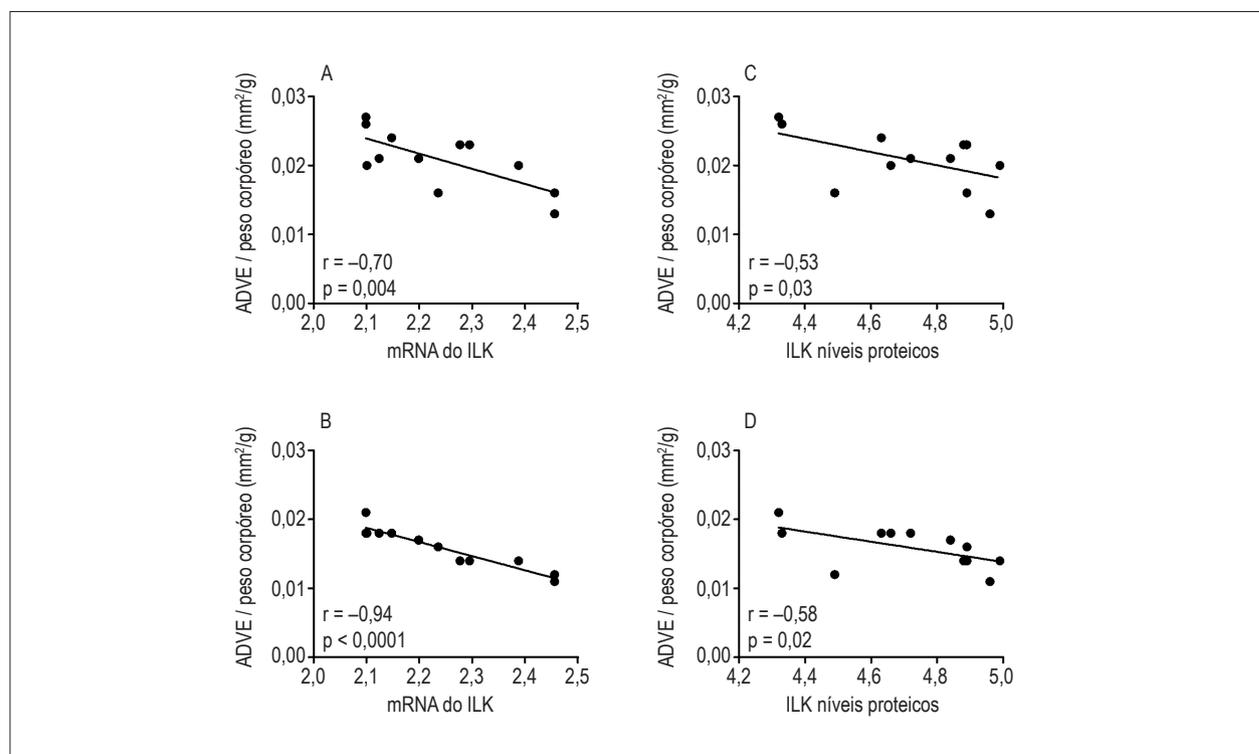
### Correlação entre a expressão de ILK e a geometria do VE

Como anteriormente comentado, as fêmeas apresentaram uma dilatação menor do VE considerando IMs de grande extensão. Além disso, houve aumento da expressão de ILK pós-IM nas fêmeas em comparação com ratos machos. Visto que estudos anteriores com abordagens de terapia gênica demonstraram que a expressão aumentada de ILK no miocárdio pode reduzir a dilatação do VE pós-IM<sup>12</sup>,

a análise de correlação entre as áreas do VE e os níveis de ILK foi realizada em ratos fêmeas com IM de grande extensão (Figura 2). Houve uma correlação linear negativa entre as áreas transversais diastólica e sistólica do VE e a expressão de ILK. Esta correlação manteve-se significativa mesmo após a aplicação de um modelo de regressão linear multivariada (Tabela 3). Assim, o aumento da expressão de ILK está associado com ADVE e ASVE menores em ratos fêmeas. No entanto, este resultado não foi observado em ratos machos.

### Discussão

Sabe-se que mulheres na pré-menopausa são menos susceptíveis ao desenvolvimento de doença cardíaca coronária, e insuficiência cardíaca parece ser menos frequente e menos grave do que em homens<sup>1</sup>. Embora estudos anteriores



**Figura 2** – Análise de correlação entre a expressão gênica de ILK (Painel: A-B) e proteica de ILK (Painel: C-D) e as áreas diastólica (ADVE) e sistólica (ASVE) do ventrículo esquerdo em função do peso corporal em ratos fêmeas com IM de grande extensão.

**Tabela 3** – Análise multivariada entre a expressão proteica de ILK e área do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio em ambos os sexos

	Coefficiente $\beta$ Padronizado	Valor de t	Valor de p
ADVE (fêmeas)	0,716	5,228	< 0,001
ADVE (machos)	- 0,088	- 0,459	0,6
ASVE (fêmeas)	0,749	5,769	< 0,001
ASVE (machos)	- 0,204	- 1,064	0,2

ADVE: área diastólica do ventrículo esquerdo; ASVE: área sistólica do ventrículo esquerdo.

tenham mostrado diferenças de gênero no remodelamento do VE pós-IM, os dados são inconclusivos. Chen e cols.<sup>18</sup> relataram que ratos fêmeas estudadas com ecocardiografia apresentaram dilatação do VE e disfunção sistólica maiores que ratos machos após 4 semanas de IM. Em contraste, Litwin e cols.<sup>3</sup> verificaram dilatação do VE e disfunção sistólica comparáveis entre ratos fêmeas e machos 6 semanas pós-IM. Similarmente, Bridgman e cols.<sup>19</sup> observaram dilatação do VE e disfunção sistólica comparáveis entre camundongos machos e fêmeas 6 semanas pós-IM. Por outro lado, observamos que ratos fêmeas com IM de grande extensão apresentaram menor dilatação do VE 6 semanas pós-IM em comparação com ratos machos com IM de extensão similar. Estes resultados estão de acordo com estudos em camundongos. Cavaşin e cols.<sup>2</sup> observaram que camundongos machos apresentaram dilatação do VE e disfunção sistólica mais acentuada 12 semanas pós-IM. Da mesma forma, Shioura e cols.<sup>20</sup> verificaram que camundongos machos apresentaram dilatação do VE e disfunção sistólica mais acentuadas 10 semanas pós-IM. Ainda não é possível explicar os resultados incoerentes da literatura comparando o remodelamento do VE pós-IM entre machos e fêmeas. É possível que o emprego de diferentes espécies de animais (por exemplo, camundongos e ratos), ovariectomizadas ou com ovário intacto, os diferentes tempos de observação, a separação dos grupos de acordo com a extensão do IM, e as diferentes idades dos animais possa ter contribuído para os resultados divergentes da literatura.

Conforme observado em nosso estudo, embora ratos fêmeas com IM de grande extensão tenham apresentado a câmara do VE menor em comparação com os ratos machos com IM de extensão similar, esta diferença não se correlacionou com a melhora da função sistólica. Assim, estes dados sugerem que, apesar dos infartos de extensão semelhante, a função sistólica foi semelhante entre os sexos, apesar do remodelamento cardíaco adverso mais grave da câmara ventricular esquerda em ratos machos.

Os mecanismos ligados a uma menor dilatação do VE em fêmeas em comparação com machos pós-IM não estão completamente esclarecidos. Tem sido relatado que os hormônios sexuais femininos (e.g., estrógeno) podem ter efeitos protetores em ratos e camundongos<sup>4-6</sup>. Neste respeito, verificamos que a expressão de ILK no miocárdio foi significativamente aumentada 6 semanas pós-IM. Até onde sabemos, poucos estudos têm investigado os efeitos do IM na expressão de ILK<sup>10</sup>, e as respostas ou mecanismos moleculares envolvidos na expressão diferencial de ILK por gênero não foram esclarecidos. Assim, deve-se salientar que ratos fêmeas com IM de moderada e grande extensão apresentaram um aumento na expressão gênica e proteica de ILK comparado com ratos machos com extensão semelhante de IM. Considerando que os níveis gênicos e proteicos de ILK podem ter implicações no remodelamento cardíaco favorável, pode-se esperar que os níveis aumentados de ILK resultem em uma menor dilatação do VE em resposta ao IM em ratos fêmeas. O fato da concentração de ILK estar relacionada com uma menor câmara do VE é corroborado pela análise de correlação, conforme documentado no presente estudo. O pressuposto de que ILK tem um papel fundamental na preservação

do remodelamento do VE é apoiado por várias linhas de evidência. Ding e cols.<sup>12</sup> injetaram um vetor de adenovírus expressando ILK no tecido do miocárdio de ratos pós-IM, o que resultou na preservação do diâmetro do VE, aumento da angiogênese, proliferação de cardiomiócitos, redução do tamanho da cicatriz do infarto, e diminuição da fibrose e da apoptose. Além disso, estudos de IM em camundongos mostraram que a timosina  $\beta$ 4, uma proteína monomérica de G-actina, que interage com ILK-PINCH-1, levou à ativação de Akt e proteção cardíaca após dano isquêmico<sup>21,22</sup>. Estes estudos têm mostrado vários efeitos benéficos anti-remodelamento, incluindo infartos de menor extensão, diminuição da dilatação do VE, e melhora da função cardíaca em animais com IM tratados com timosina  $\beta$ 4 em comparação com animais com IM não tratados.

No presente estudo, nós não investigamos o mecanismo que leva a maior expressão diferencial de ILK pós-IM em fêmeas em comparação com animais machos, e até onde sabemos, não há dados da literatura a este respeito. Sendo assim, os mecanismos que levam à menor transcrição de ILK em ratos machos pós-IM quando comparado com as fêmeas, bem como os mecanismos de inibição da tradução em animais machos, precisam ser esclarecidos. O ILK é capaz de ativar múltiplas vias de sinalização cardioprotetoras que podem resultar em um melhor remodelamento do miocárdio após uma lesão isquêmica. A este respeito, a expressão de ILK no miocárdio está associada à expressão do fator de crescimento vascular endotelial e à fosforilação de óxido nítrico sintase endotelial pós-IM<sup>23</sup>. Além disso, deve-se considerar que a cardioproteção em fêmeas pode ocorrer pela via de sinalização intracelular PI3K/AKT<sup>24,25</sup>. O presente estudo não demonstrou a relação entre o fator de crescimento endotelial vascular, óxido nítrico sintase endotelial, PI3K/AKT, e ILK pós-IM e o remodelamento do VE mais favorável em fêmeas do que em machos. Esta questão é muito interessante e deve ser investigada no futuro.

## Conclusão

Este é o primeiro estudo a demonstrar um padrão de expressão diferencial gênero-específica de ILK pós-IM. Embora o aumento dos níveis proteicos de ILK esteja correlacionado com a menor área da câmara do VE, não encontramos diferenças significativas no desempenho do VE em função do gênero. Mais estudos são necessários para explorar a associação entre o nível de ILK, a geometria do VE, e a função cardíaca. Esta questão deve ser tratada como uma relação de causa e efeito dependente do gênero.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Sofia RR, Antonio EL, Manchini MT, Tucci PJF; Obtenção de dados: Silva Jr JA, Antonio EL, Manchini MT, Oliveira FAA, Teixeira VPC; Análise e interpretação dos dados: Sofia RR, Silva Jr JA, Oliveira FAA, Teixeira VPC; Análise estatística: Serra AJ; Obtenção de financiamento: Tucci PJF; Redação do manuscrito: Sofia RR, Serra AJ; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Serra AJ, Tucci PJF.

**Potencial conflito de interesse**

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

**Fontes de financiamento**

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

**Vinculação acadêmica**

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Renato Rodrigues Sofia pela Universidade Federal de São Paulo.

**Referências**

1. Mercurio G, Deidda M, Bina A, Manconi E, Rosano GM. Gender-specific aspects in primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2011;17(11):1082-9.
2. Cavin MA, Tao Z, Menon S, Yang XP. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci.* 2004;75(18):2181-92.
3. Litwin SE, Katz SE, Litwin CM, Morgan JP, Douglas PS. Gender differences in post-infarction left ventricular remodeling. *Cardiology.* 1999;91(3):173-83.
4. Smith PJ, Ornatsky O, Stewart DJ, Picard P, Dawood F, Wen WH, et al. Effects of estrogen replacement on infarct size, cardiac remodeling, and the endothelin system after myocardial infarction in ovariectomized rats. *Circulation.* 2000;102(24):2983-9.
5. Cavin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(5):H1560-H9.
6. Beer S, Reincke M, Kral M, Callies F, Strömer H, Dienesch C, et al. High-dose 17beta-estradiol treatment prevents development of heart failure post-myocardial infarction in the rat. *Basic Res Cardiol.* 2007;102(1):9-18.
7. Ostadal B, Netuka I, Maly J, Besik J, Ostadalova I. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection – experimental aspects. *Exp Biol Med.* 2009;234(9):1011-9.
8. Ishii T, Satoh E, Nishimura M. Integrin-linked kinase controls neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2001;276(46):42994-3003.
9. Wu C, Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol.* 2001;155(4):505-10.
10. Sopko N, Qin Y, Finan A, Dadabayev A, Chigurupati S, Qin J, Penn MS, et al. Significance of thymosin  $\beta$ 4 and implication of PINCH-1-ILK- $\alpha$ -parvin (PIP) complex in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One.* 2011;6(5):e20184.
11. Hannigan GE, Coles JC, Dedhar S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ Res.* 2007;100(10):1408-14.
12. Ding L, Dong L, Chen Z, Zhang L, Xu X, Ferro A, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction. *Circulation.* 2009;120(9):764-73.
13. Veiga EC, Antonio EL, Bocalini DS, Murad N, Abreu LC, Tucci PJ, et al. Prior exercise training does not prevent acute cardiac alterations after myocardial infarction in female rats. *Clinics.* 2011;66(5):889-93.
14. dos Santos L, Serra AJ, Antonio EL, Hull HF, Tucci PJF. Hyperbaric oxygenation applied immediately after coronary occlusion reduces myocardial necrosis and acute mortality in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(5-6):594-8.
15. Santos AA, Helber I, Flumignan RL, Antonio EL, Carvalho AC, Paola AA, et al. Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2008;15(2):163-8.
16. Drummond GB. Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):713-9.
17. Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, Antônio EL, Levy RF, Santos AA, et al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol.* 2010;588(Pt 13):2431-42.
18. Chen YF, Redetzke RA, Sivertson RM, Coburn TS, Cypher LR, Gerdes AM. Post-myocardial infarction left ventricular myocyte remodeling: are there gender differences in rats? *Cardiovasc Pathol.* 2011;20(5):e189-e95.
19. Bridgman P, Aronovitz MA, Kakkar R, Oliverio MI, Coffman TM, Rand WM, et al. Gender specific patterns of left ventricular and myocyte remodeling following myocardial infarction in mice deficient in the angiotensin II type 1a receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):H586-H92.
20. Shioura KM, Geenen DL, Goldspink PH. Sex-related changes in cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R528-R34.
21. Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, DiMaio M, Srivastava D. Thymosin  $\beta$ 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature.* 2004;432(7016):466-72.
22. Srivastava D, Saxena A, DiMaio M J, Bock-Marquette, I. Thymosin  $\beta$ 4 is cardioprotective after myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1112:161-70.
23. Xie J, Lu W, Gu R, Dai Q, Zong B, Ling L, et al. The impairment of ILK related angiogenesis involved in cardiac maladaptation after infarction. *PLoS One.* 2011;6(9):e24115.
24. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KDR, Schaefer E, et al. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res.* 2001;88(10):1020-7.
25. Sovershaev MA, Egorina EM, Andreassen TV, Jonassen AK, Ytrehus K. Preconditioning by 17 $\beta$ -estradiol in isolated rat depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1554-H62.