



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FERNANDO PEREIRA CARLOS**

**REPERCUSSÃO DA TERAPIA COMBINADA DE CARVEDILOL E**  
**FOTOBIMODULAÇÃO NO REMODELAMENTO CARDÍACO EM**  
**RATOS INFARTADOS**

São Paulo, SP

2017



**FERNANDO PEREIRA CARLOS**

**REPERCUSSÃO DA TERAPIA COMBINADA DE CARVEDILOL E  
FOTOBIMODULAÇÃO NO REMODELAMENTO CARDÍACO EM  
RATOS INFARTADOS**

Tese de Doutorado apresentado ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biofotônica da Universidade Nove de  
Julho (UNINOVE).

**Orientador:** Prof. Dr. Andrey Jorge

São Paulo, SP

2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Carlos, Fernando Pereira.

Repercussão da terapia combinada de carvedilol e fotobiomodulação no remodelamento cardíaco em ratos infartados. / Fernando Pereira Carlos. 2017.

54 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Dr. Prof. Andrey Jorge Serra.

1. Esporte Para Mudança Social. 2. Empreendedorismo Social. 3. Inclusão Social. 4. ETEC de Esportes.

I. Serra, Andrey Jorge.

II. Título.

CDU 615.831

Sao Paulo, 13 de dezembro de 2017.

TERMO DE APROVACAO

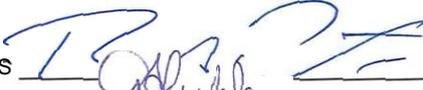
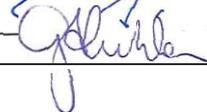
Aluno (a): Fernando Pereira Carlos

Titulo da Tese: "R epercussão da terapia combinada de carvedilol e fotobiomodulação no remodelamento cardiaco em ratos infartados"

Presidente: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA 

Membro: PROF DR. JOSE ANTONIO SILVA JUNIOR 

Membro: PROF DR

RENATO ARAUJO PRATES   
Membro: PROF". DR.º GISELA ARSA DACUNHA 

Membro: PRDF°. DR°. FER NANDA DE CORDO BA LANZA 

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Andrey Jorge Serra pela oportunidade, pelos estímulos, paciência, apoio, e por ter sido fonte de grande inspiração na área da pesquisa. Para mim foi satisfação de tê-lo como orientador.

Agradeço ao Profa. Dr. Martha Trindade Manchini, que coorientou e mostrou-se uma grande amiga nesta caminhada, serei eternamente grato!

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo de Tarso pelos ensinamentos sobre a técnica do laser.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Tucci por ter me acolhido no seu laboratório de Fisiologia Cardíaca da Unifesp e ter me permitido a oportunidade de participar das reuniões científicas, da realização do meu protocolo experimental.

Agradeço a todo corpo docente do programa de Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho e a ajuda da secretária Priscila Kelly Souza Cunha.

Agradeço a UNINOVE pela oportunidade, acredito que sem o seu apoio meu sonho não teria se concretizado.

Agradeço a minha amiga de pós-graduação, Vanessa Grandinetepela parceria.

Agradeço aos meus amigos de laboratório em especial, Ednei, Flavio, Leslie, Helenita, Eduardo Santana por terem me apoiado, me ajudado na coleta de dados e material biológico!

Agradeço aos meus amigos, familiares e alunos que tiveram paciência e por acreditarem no meu sonho. Em especial, agradeço a minha esposa Priscila Carvalho Pereira e filha Sophia Carvalho Pereira, pela ajuda, companheirismo e compreensão nesta fase de minha vida.

Agradeço a CAPES e CNPq por todo apoio financeiro!

E por fim, agradeço a todas as pessoas que me ajudaram de forma direta ou indiretamente!

## RESUMO

### REPERCUSSÃO DA TERAPIA COMBINADA DE CARVEDILOL E FOTOBIMODULAÇÃO NO REMODELAMENTO CARDÍACO EM RATOS INFARTADOS

A insuficiência cardíaca é uma causa importante de morbidade e mortalidade no mundo todo e responsável pelo elevado número de hospitalizações. A ativação de mecanismos neuro-hormonais e inflamação persistente tornam-se deletérios em longo prazo pela estimulação do remodelamento ventricular. O laser de baixa intensidade (LBI) é uma ferramenta promissora para atenuar o remodelamento cardíaco consequente ao infarto do miocárdio (IM). Menciona-se que estudos prévios da literatura pontuaram a repercussão isolada do LBI, em que sua ação somada ou comparada à terapia farmacológica padrão da insuficiência cardíaca não foi investigada. Assim, analisamos o efeito do Carvedilol e da fototerapia com LBI no remodelamento cardíaco pós-infarto em ratos. Utilizamos animais wistar fêmeas que foram randomizadas em cinco grupos experimentais (protocolo 88061506115): SHAM; infartado não tratado (IM); infartado + carvedilol (IMC); infartado + LBI (IML); infartado+LBI+carvedilol (IMCL). O LBI ( $\lambda$  830 nm, 100 mW, 200 s, 20 J) foi aplicado transtorácico três vezes por semana entre os arcos costais. Os animais submetidos ao tratamento com carvedilol receberam doses diárias de 1mg/100g. Os dados biométricos foram coletados logo após o sacrifício, em que se analisou os pesos do coração e ventrículo esquerdo (VE) e o teor de água pulmonar ( $H_2O$ ). Os parâmetros hemodinâmicos do VE foram avaliados em condições basais com implante intra-VE de cateter MILLAR e transdutor de fluxo posicionado na porção ascendente da aorta. As seguintes variáveis foram obtidas: pressão sistólica (PS); pressão diastólica final ( $PD_2$ ); derivada temporal da pressão positiva (+dP/dt) e negativa (-dP/dt); débito cardíaco; trabalho sistólico. Os marcadores inflamatórios (interleucina 1 $\beta$ , interleucina 6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral alfa) foram analisados pelo método ELISA. Apenas animais com infartos  $\geq 37\%$  foram incluídos no estudo. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e ANOVA (pos-hoc: Bonferroni). Demonstramos que o LBI não afetou a relação entre peso do coração/peso corporal entre os grupos, mas combinado ao carvedilol atenuou o aumento da relação peso do VE/peso corporal induzido pelo IM. O  $H_2O$  foi atenuado por todas as terapias. A PS foi significativamente reduzida em todos os grupos

infartados. O aumento da  $PD_2$  pós-IM foi reduzido com todos os tratamentos. Ambos  $+dP/dt$  e  $-dP/dt$  foram reduzidas com o IM e não afetadas pelas terapias. O DC foi similar entre os grupos. As citocinas pró-inflamatórias foram moduladas pelo LBI e quando combinado ao carvedilol. Nossos resultados são o primeiro a demonstrar os efeitos do LBI combinado ao carvedilol e que considerações de desempenho físico, de biometria cardiopulmonar e morfofuncionalidade parecem ser semelhantes. No entanto, observamos o efeito anti-inflamatório do LBI ser mais evidente do que a terapia farmacológica. Além disso, a combinação das terapias resultou em atenuação da hipertrofia miocárdica e melhora da FEAT do VE.

**Palavras-chave:** remodelamento cardíaco, insuficiência cardíaca, fotobiomodulação, laser de baixa intensidade, carvedilol, desempenho físico

**ABSTRACT****REPERCUSSION OF COMBINED CARVEDILOL THERAPY AND PHOTOBIOMODULATION IN HEART REMODELING IN INFARTED RATS**

Heart failure is an important cause of morbidity and mortality worldwide and responsible for the high number of hospitalizations. Activation of neurohormonal mechanisms and persistent inflammation become deleterious in the long term by stimulating ventricular remodeling, overcoming further deterioration to an already weakened heart. Low level laser therapy (LLLT) is a promising tool to attenuate cardiac remodeling resulting from myocardial infarction (MI). It is mentioned that previous studies of the literature have pointed to the isolated repercussion of LLLT, in which its action added or compared to standard pharmacological therapy of heart failure was not investigated. Thus, the objective was to analyze the effect of Carvedilol and LLLT in post-infarct cardiac remodeling in rats. Female wistar rats were randomized into five experimental groups: SHAM; untreated infarct (IM); infarcted + carvedilol (IMC); infarcted + LBI (IML); infarcted + LBI + carvedilol (IMCL). The LLLT ( $\lambda$  830 nm, 100 mW, 200 s, 20 J) was applied transthoracic three times weekly between the costal arcs. Animals receiving carvedilol received daily doses of 1mg/100g. Biometric data were collected after sacrifice, in which the heart and left ventricle (LV) and the pulmonary water content (H<sub>2</sub>O). The hemodynamic parameters of the LV were evaluated at baseline with intra-VE implantation of a MILLAR catheter and flow transducer positioned in the ascending portion of the aorta. The following variables were obtained: systolic pressure (PS); Final diastolic pressure (PD<sub>2</sub>); derivative of positive pressure (+ dP / dt) and negative (-dP / dt); Cardiac output; Systolic work. Only animals with infarctions  $\geq 37\%$  were included in the study. Inflammatory markers (interleukin 1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor alpha) were analyzed by the ELISA method. Only animals with

infarctions  $\geq 37\%$  were included in the study. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and ANOVA (post-hoc: Bonferroni). LLLT did not affect the heart weight / body weight ratio between groups, but combined with carvedilol attenuated the increase in LV weight / body weight ratio induced by MI.  $H_2O$  was attenuated by all therapies. PS was significantly reduced in all infarcted groups. The increase in post-MI PD2 was reduced with all treatments. Both  $+ dP / dt$  and  $-dP / dt$  were reduced with MI and unaffected by therapies. The CD was similar between groups. The proinflammatory cytokines were modulated by LLLT and when combined with carvedilol. Our results are the first to demonstrate the effects of LLLT combined with carvedilol and what considerations of physical performance, cardiopulmonary biometry and morphofunctionality appear to be similar. However, we observed the anti-inflammatory effect of LBI to be more evident than pharmacological therapy. In addition, the combination of therapies resulted in attenuation of myocardial hypertrophy and improvement of FAC.

**Key words:** cardiac remodeling, heart failure, photobiomodulation, low level laser therapy, carvedilol.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS:**

+dP/Dt	Derivada da pressão/derivada de tempo positiva
AdVE	Áreas do ventrículo esquerdo ao final da diástole
AsVE	Área do ventrículo esquerdo ao final da sístole
Bax	Proteína pró- apoptótica
Bcl 2	Proteína anti-apoptótico ( <i>B-celllymphoma 2</i> )
Bpm	Batimentos por minuto
CARV	Carvedilol
DCVs	Doenças cardiovasculares
-dP/Dt	Derivada da pressão/derivada de tempo negativa
dT/dT	Taxa de derivação de tensão desenvolvida
ECO	Ecocardiografia
FC	Frequência cardíaca
FEAT	Fração de encurtamento da área transversa
IC	Insuficiência cardíaca
IM	Infarto do miocárdio
J	Joules
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
LBI	Laser de baixa intensidade
mg/ml	Miligrama por mililitro
MHZ	Megahertz
MI	Mililitros
mW	Miliwatts
Pd2	Pressão diastólica final
PE	Contorno endocárdio
PS	Pressão sistólica
RAH	Comprimento das regiões acinéticas
TD <sub>máx</sub>	Tensão desenvolvida máxima
TR	Tensão de repouso
TS	Trabalho sistólico
VE	Ventrículo esquerdo
W/cm <sup>2</sup>	Watts por centímetro quadrado
α-1	Alfa-1

$\beta$

Beta

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Desenho experimental .....	20
<b>Figura 2.</b> Evolução do ganho de peso corporal dos grupos experimentais.....	27
<b>Figura 3.</b> Avaliação da velocidade máxima de corrida realizada em teste de esforço máximo conduzido em esteira rolante.....	28
<b>Figura 4.</b> Dado biométricos cardiopulmonares dos grupos experimentais com 31 dias de seguimento do estudo.....	29
<b>Figura 5.</b> Caracterização do tamanho do infarto do miocárdio e morfologia do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos experimentais com três e 30 dias de seguimento experimental.....	30
<b>Figura 6.</b> Dados funcionais do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por ecocardiografia Doppler nos grupos experimentais com três e 30 dias de seguimento experimental.....	31
<b>Figura 7.</b> Dados hemodinâmicos do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por cateterismo intraventricular e registros de fluxo aórtico dos grupos experimentais com 31 dias de seguimento do estudo.....	32
<b>Figura 8.</b> Expressão proteica de citocinas inflamatórias no miocárdico remoto ao infarto e, em área correspondente para o grupo SHAM, com 31 dias de seguimento do estudo.....	33

**LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1-</b> Protocolo de irradiação laser .....	24
--	----

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2 . Objetivos específicos .....	20
<b>3. MÉTODOS</b> .....	21
3.1. Animais estudados .....	21
3.2. Grupos experimentais .....	22
3.3. Modelo experimental de IM .....	23
3.4. Ecocardiograma .....	23
3.5. Teste de esforço físico .....	24
3.6. Preparação, ministração e análise antagônica do Carvedilol .....	25
3.7. Parâmetros de irradiação com LBI .....	27
3.8. Estudo hemodinâmico .....	28
3.9. Análise de citocinas inflamatórias .....	28
3.10 Análise estatística .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1. Massa corpórea dos animais .....	30
4.2. Desempenho físico.....	31
4.3. Teor de água no pulmão e hipertrofia miocárdica .....	31
4.4. Dados morfofuncionais do VE .....	32
4.5. Estudo hemodinâmico do VE .....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>8. ANEXO 1</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV), tendo como consequência o infarto agudo do miocárdio (IM), possuem papel de destaque na redução da capacidade funcional e aumento da morbimortalidade mundial e nacional<sup>1, 2</sup>.

Há estimativas que indicam que três milhões de indivíduos são afetados pelo IM e mais de 400 mil novos casos são registrados anualmente<sup>3, 4</sup>. Destes, aproximadamente 50% dos pacientes vão a óbito em cinco anos após o diagnóstico e, cerca de 40% vão a óbito no período de 12 meses após a primeira hospitalização por insuficiência cardíaca (IC)<sup>5, 6</sup>.

Desperta interesse o fato de parcela substancial dos pacientes acometidos pelo IM desenvolverem IC no curso do tratamento, resultando, assim, em diminuição da sobrevida, piora da qualidade de vida e que da funcionalidade do paciente<sup>3, 4</sup>. Nessa perspectiva, a cardiopatia isquêmica constitui problema de saúde pública mundial e ônus econômico elevado<sup>7-9</sup>. Toma-se como exemplo os gastos americanos com indivíduos diagnosticados com insuficiência cardíaca, em que as despesas extrapolam 30 bilhões de dólares ao ano<sup>6</sup>.

O remodelamento cardíaco que sucede ao IM desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção do ventrículo esquerdo (VE). É de consenso que, no miocárdio injuriado não há restabelecimento da viabilidade celular e, assim, coexistem alterações genéticas, estruturais e bioquímicas que convergem em deterioração da capacidade funcional cardíaca a longo prazo e, conseqüente, o aparecimento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e/ou morte súbita<sup>10</sup>.

Na vigência de deterioração da função sistólica ventricular e dilatação cavitária, as pressões de enchimento são relativamente altas para sustentar o débito cardíaco e perfusão tecidual. Acresça-se maior atuação do sistema nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona que atuam para restaurar a pressão arterial por meio de vasoconstrição e retenção hídrica. Todavia, na IC, a homeostase cardíaca é inexistente, haja deficiência persistente do VE para manter a ejeção sanguínea em relação à demanda do organismo<sup>11</sup>.

Menciona-se a complexidade dos mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco pós-infarto e na gênese da IC, os quais ainda

padecem de investigação<sup>12</sup>. Destaque a atuação neuroendócrina como importante participante na patogênese da IC. Há informações sólidas acerca da hiperativação do sistema nervoso simpático em pacientes com IC, principalmente representada pelo aumento dos níveis séricos de noradrenalina. Em geral, quanto maior a ativação do sistema nervoso simpático, pior o prognóstico para IC<sup>13</sup>. Decorre que, há vasoconstrição proveniente do aumento da resistência vascular sistêmica, aumentando a carga cardíaca, o que onera o desenvolvimento de pressão do VE insuficiente<sup>14</sup>. Além disso, a hiperatividade simpática resulta em diminuição no número e na sensibilidade dos receptores beta-1-adrenérgicos cardíacos, contribuindo para dessensibilizar o miocárdio ao estímulo adrenérgico<sup>13</sup>. O aumento das concentrações séricas e, também local, da noradrenalina pode diretamente induzir hipertrofia dos cardiomiócitos por meio do agonismo beta-adrenérgico ou, secundariamente, estimular o crescimento celular via ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona<sup>10, 15</sup>.

Outro importante participante da gênese ou acentuação dos efeitos deletérios da IC perfaz a exacerbação inflamatória. Toma-se como exemplo informações que associam diretamente o *status* pró-inflamatório com a presença de ruptura cardíaca, progressão acelerada para a IC e aumento da mortalidade pós-infarto<sup>16, 17</sup>. Assim, é corriqueiro o achado de inflamação persistente na IC e comumente expresso pelo aumento dos níveis de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6). Ganha destaque o TNF-alfa, citocina essencial para ativação do catabolismo corpóreo, em que sua elevação está relacionada à caquexia cardíaca e miopatia muscular esquelética<sup>12</sup>.

A gravidade inerente a IC requer terapia farmacológica otimizada para atenuar o remodelamento cardíaco, melhorar a evolução prognóstica e aumentar a funcionalidade do paciente<sup>18</sup>. Dentre os medicamentos que compoem o tratamento da IC, os betabloqueadores são considerados “pilares” da base farmacológica desde meados dos anos noventa, em que os benefícios constituem aumento da taxa de sobrevivência, melhora da qualidade de vida, aumento sustentado da fração de ejeção e redução de morte súbita<sup>19</sup>. Tais benefícios podem ser atribuídos aos efeitos antiarrítmicos, anti-isquêmicos e anti-apoptóticos dos beta-bloqueadores. Adiciona-se, ainda, a ação anti-

inflamatória induzida pelos beta-bloqueadores quando iniciados na fase aguda do IM. Toma-se como exemplo um estudo recente que ministrou beta-bloqueador em ratos infartados, em que o carvedilol atenuou a disfunção ventricular concomitante a menor infiltração miocárdica de células inflamatórias e expressão de citocinas pró-inflamatórias<sup>18, 20-22</sup>.

Estudos importantes como CIBIS II<sup>23</sup>, COPERNICUS<sup>24</sup> e MERITH-HF<sup>25</sup> estabeleceram respectivamente o carvedilol, bisoprolol e metoprolol como drogas de evidência relevante para modificar favoravelmente a sobrevida. Os betabloqueadores são recomendados para todos os pacientes com disfunção ventricular, sendo bem tolerados por 90% dos pacientes com IC<sup>23-25</sup>. Menciona-se que, em alguns casos, os betabloqueadores são contra-indicados devido a piora da IC, bradicardia acentuada e hipotensão.

É importante mencionar que a atuação farmacológica na IC não é plenamente efetiva, circunstância que pode ser pautada pela piora progressiva da função cardíaca da IC em associação com alta taxa de mortalidade. De fato, há necessidade de análise da repercussão das ferramentas existentes no momento para o tratamento da IC e criação de alternativas inovadoras que produzam resultados mais positivos. No campo de intervenções não-farmacológicas, a fotobiomodulação possui resultados intrigantes ao considerar-se diferentes estudos em nível experimental<sup>26, 24</sup>

O primeiro relato do uso da fotobiomodulação em modelo experimental de IM foi publicado por Whittaker et al.<sup>27</sup>, em que a irradiação com laser de baixa intensidade (LBI) atenuou as alterações morfológicas cardíacas impostas pelo IM. A redução do tamanho do infarto e formação de tecido cicatricial e o aumento de fatores pró-angiogênicos são achados bem documentados por diversos grupos de pesquisa<sup>25, 28, 29, 29</sup>. A pesquisa do nosso grupo também é atuante nessa área de investigação, em que demonstramos atenuação da disfunção VE, menor expressão tecidual de citocinas pró-inflamatórias e aumento sérico de óxido nítrico em ratos infartados submetidos a LBI<sup>30</sup>.

Apesar dos resultados positivos inerentes ao LBI, não há relatos de estudos clínicos. É concebível que a dificuldade técnica na construção de um equipamento de LBI para ser empregado em humanos constitua um complicador importante. Todavia, certas limitações metodológicas em estudos experimentais também podem contribuir para a decisão da aplicação clínica do

LBI no tratamento do IM. Em recente revisão sistemática de literatura<sup>26</sup>, que compõe parte dessa tese de doutoramento, nós destacamos alguns pontos acerca da fototerapia com LBI: (a) estudos prévios são heterogêneos em relação a gênero, dispositivo de laser, parâmetros de irradiação e números de irradiações; (b) a composição dos grupos experimentais não respeita fatores de inclusão fundamentais, como exemplo, a distribuição dos animais com tamanhos de infarto equivalentes; (c) procedimento de cegamento é pouco reportado; (d) não há estudos longitudinais, em que a aplicação do LBI foi durante todo o curso de evolução para IC pós-infarto. Esse último aspecto é importante, como recentemente publicado por nosso grupo<sup>31</sup>. Decorre que, a única irradiação de LBI após oclusão coronariana em ratos resultou em atenuação da disfunção ventricular apenas na fase aguda do IM (três dias pós-occlusão coronária). Todavia, na descontinuidade das irradiações, a disfunção cardíaca foi evidente e similar aos animais infartados não tratados ao longo de cinco semanas de seguimento.

Em síntese, as informações precedentes situam a terapia farmacológica com Carvedilol como parte integrante do manejo clínico pós-IM, conceito que também é aportado em estudos experimentais. Não obstante, a incidência de IC pós-infarto ainda constitui problema clínico evidente, em que muitos pacientes evoluem com severa disfunção cardíaca e óbito. Em que pese os benefícios da terapia não farmacológica com LBI, as informações disponíveis são provenientes de estudos experimentais com limitações metodológicas importantes e, o número escasso de estudos não permite aportar com solidez a translação dessa intervenção para clínica. Assim, esse estudo foi estruturado para analisar o efeito da terapia com Carvedilol e LBI no remodelamento cardíaco pós-infarto em ratos. Nossa hipótese e o laser e o carvedilol possuem efeitos análogos na IC pós-infarto. Ademais, a ação da terapia combinada também constitui objeto de estudo.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Analisar o efeito da terapia farmacológica com o beta-bloqueador Carvedilol e da fototerapia com LBI no remodelamento cardíaco pós-infarto em ratas.

### **2.2. . Objetivos específicos**

- a) Analisar a repercussão do Carvedilol e LBI na aptidão física;
- b) Determinar a repercussão do Carvedilol e LBI na hipertrofia miocárdica;
- c) Avaliar se o Carvedilol e LBI podem manter a disfunção cardíaca em ratas infartadas;
- d) Analisar o efeito anti-inflamatório do Carvedilol e LBI em ratas infartadas.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Animais estudados

Foram utilizadas 128 ratas de linhagem Wistar-EPM, de aproximadamente oito semanas de vida, pesando entre 180 a 250 gramas, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME – EPM, São Paulo, SP). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em ambiente com temperatura controlada (22° C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com água e ração *ad libitum* (Nuvilab). Os experimentos foram conduzidos em acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH, Pub 85-23, revisado em 1985)” e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP (CEUA N°: 8806150615).

Todos os animais foram avaliados com ecocardiograma para determinar o tamanho do infarto e posterior randomização por meio de sorteio. Os animais que apresentaram tamanhos de IM  $\geq 37\%$  do VE foram incluídos no estudo. Este critério de inclusão foi pautado em dados previamente publicados por nosso grupo, em que tamanho de infarto  $\geq 37\%$  constitui fator determinante de acentuado remodelamento cardíaco e reduzida sobrevida em ratas<sup>32</sup>. O grupo SHAM foi submetido a todos os procedimentos efetuados nos grupos infartados, todavia, não foi realizada a oclusão coronariana ou qualquer forma de tratamento (receberam apenas água contendo os compostos utilizados para diluir o Carvedilol e posicionamento do *spot* do LBI com equipamento desligado). O desenho experimental pode ser visualizado na Figura 1.

### 3.2. Grupos experimentais

1. **SHAM (n = 10):** animais falsos operados que foram mantidos com ração e água por período de 31 dias.
2. **IM não tratado (IM; n = 10):** animais que foram submetidos à oclusão coronária para produção de IM e mantidos por período de 31 dias.
3. **IM tratado com Carvedilol (IMC; n = 10):** animais que foram submetidos à oclusão coronária, para produção de IM, tratados com Carvedilol mantidos com ração e água, por um período de 31 dias.
4. **IM tratado com LBI (IML; n = 10):** animais que foram submetidos à oclusão coronária, para produção de IM, tratados com Laser e mantidos com ração e água, por um período de 31 dias.
5. **Carvedilol + LBI (IMCL; n = 10):** animais que foram submetidos à oclusão coronária, para produção de IM tratados com Carvedilol e laser, mantidos com ração e água, por período de 31 dias.

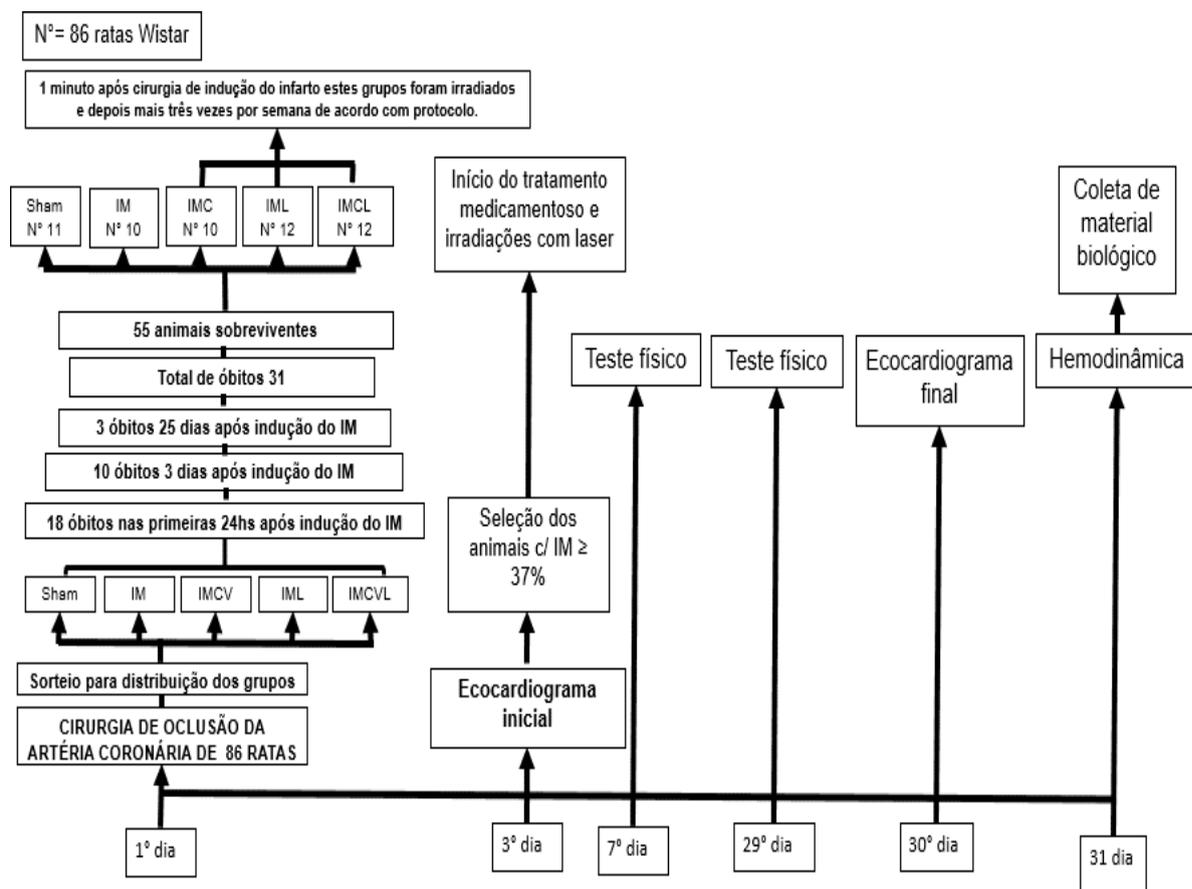


Figura 1. Desenho experimental.

### **3.3. Modelo experimental de IM**

A técnica de “produção” do infarto é adaptada por Pfeffer<sup>33</sup> e padronizada em nosso laboratório<sup>34</sup>. Os animais foram anestesiados com Isoflorano (Cristália, Itapira - SP, Brasil), submetidos à intubação orotraqueal e ventilados com pressão positiva em ventilador para roedores (Rodent ventilador Mod 683, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Após tricotomia, realiza-se toracotomia no hemitórax esquerdo, no espaço intercostal em que o coração impacta o gradeado costal, em seguida, realiza-se ampliação do espaço intercostal com auxílio de pinça hemostática, seguida de compressão do hemitórax direito no sentido lateral, permitindo a exteriorização do coração. A artéria coronária interventricular anterior é identificada e aplicado um ponto com fio de sutura prolene 6-0 cerca de 1 mm abaixo do bordo anteroinferior do átrio esquerdo. Provoca-se hiperinsuflação pulmonar para que ocorra expansão do pulmão esquerdo e a toracotomia foi fechada por sutura em bolsa previamente preparada na parede do tórax. Posteriormente aos procedimentos cirúrgicos para a recuperação anestésica, os animais foram colocados separadamente em gaiolas expostas a pouca luz, evitando-se a manipulação e o estresse do animal. Após a recuperação da anestesia, os animais receberam uma injeção subcutânea de cloridrato de tramadol (5 mg/kg) associado a 50 mg/kg de dipirona, intramuscular a cada 8 horas para o controle da dor por três dias<sup>35</sup>. O procedimento de ministração do tramadol e dipirona também foi realizado nos animais pertencentes ao grupo SHAM.

### **3.4. Ecocardiograma**

Todos os animais foram submetidos à análise por ecocardiografia Doppler no 3º dia após o IM. O exame foi repetido ao final da quarta semana de seguimento (30 dias). Após anestesia com mistura de Cetamina (50 mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA) e Xilazina (10 mg/Kg, Anesadan®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA) e tricotomia da face anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e três eletrodos foram colocados nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultâneo à imagem ecocardiográfica. Esta técnica é consolidada em nosso laboratório, sendo utilizada em outros estudos<sup>37-39</sup>. Foi utilizado o aparelho HP

SONOS 5500®, que possibilita obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional, além da velocidade de fluxo por efeito Doppler espectral, com profundidade de 3 cm e transdutor de 12 MHz. As imagens em cortes transversais do VE foram gravadas em fitas de vídeo para posterior análise. Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras). No modo bidimensional, foram analisadas as áreas do VE ao final da diástole (AdVE) e ao final da sístole (AsVE). A presença de IM e sua extensão, e a função sistólica e diastólica do VE, também foram analisadas. O tamanho do IM foi estimado por padronização previamente descrita em nosso laboratório por Moisés<sup>38</sup>. A cicatriz do IM foi avaliada pela relação entre comprimento das regiões acinética e/ou hipocinéticas (RAH) e o perímetro total do contorno endocárdico (PE) em três níveis transversais do VE (nível das bordas das cúspides da valva mitral, dos músculos papilares e da região apical). A função sistólica do VE foi avaliada pela fração de encurtamento da área transversa (FEAT) com a seguinte equação:  $FEAT = [(AdVE - AsVE) / AdVE] \times 100\%$ . O valor final foi obtido pela média das FEAT calculadas nos planos medial e apical do VE. A função diastólica foi determinada por meio dos índices derivados da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral obtido por técnica Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se a amostragem de volume próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas: [1] Onda E: maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular; [2] Onda A: maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral; [3] Relação E/A: razão entre a velocidade máxima das ondas E e A. A curva de velocidade de fluxo sistólico na artéria pulmonar no plano para-esternal transversal da base foi determinada com amostra de volume do Doppler pulsátil posicionada após o plano valvar. Um padrão específico para hipertensão pulmonar foi analisado: a identificação de entalhe no gráfico da curva do Doppler causado pela redução abrupta da velocidade do fluxo de saída do ventrículo direito<sup>38, 40</sup>.

### **3.5. Teste de esforço físico**

O teste de esforço foi aplicado no 7º (avaliação inicial) e 29º (avaliação final) dias de experimento. Os animais foram submetidos a três dias de familiarização

ao exercício em esteira rolante antes da condução do teste de esforço(Panlab/Harvard-ApparatusOxylet System, Harvard BioscienceCompany, Massachusetts, EUA): 1º dia - 25 cm/s (5 minutos), 34 cm/s (5 minutos) e 42 cm/s (5 minutos); 2º dia - 25 cm/s (4 minutos), 34 cm/s (4 minutos), 42 cm/s (4 minutos) e 50 cm/s (3 minutos); 3º dia - os animais realizaram exercício por 16 minutos com as seguintes velocidades: 25 cm/s (2 minutos), 34 cm/s (2 minutos), 42 cm/s (2 minutos), 50 cm/s (2 minutos), 59 cm/s (2 minutos), 67cm/s (2 minutos), 75 cm/s (2 minutos) e 84 cm/s (2 minutos). O teste de esforço foi caracterizado por período de aquecimento de dois minutos a 25 cm/s, então, a velocidade da esteira foi aumentada 9 cm/s a cada dois minutos até os animais atingirem a exaustão<sup>36</sup>.

### **3.6. Preparação, ministração e análise antagônica do Carvedilol**

O Carvedilol, de pureza de 99%, foi disponibilizado pelo laboratório Baldacci (São Paulo, SP, Brasil). O fármaco foi dissolvido como previamente descrito por Weiet al. (2000) em pequeno volume de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1% de ácido acético em água. A ministração foi iniciada três dias após oclusão coronária, sendo mantida até o final do seguimento. A quantidade de Carvedilol foi ministrada de acordo com o peso corporal dos animais e a dose é distribuída de acordo com a ingestão de água diária determinada em estudo piloto.

Para conhecer a quantidade de ingestão hídrica, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas por 24 horas para registro da quantidade de água ingerida, o que correspondeu à 28 mL/dia. Para as preparações, 174,825 mg de Carvedilol foram diluídos em 0,5 mL de DMSO, com acréscimo de 490 mL de água, em agitação estéril. Pautados em estudo piloto, estima-se que para cada 28,6 ml de solução, os animais ingeriram 1mg/100g/diade Carvedilol. Esta dose de Carvedilol demonstrou eficiência em atenuar o remodelamento cardíaco pós-infarto em ratos, em associação com efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-apoptóticos<sup>41-43</sup>. Os animais dos grupos SHAM, IM e IML receberam apenas água contendo DMSO e ácido acético diluídos na concentração descrita acima. A diluição da droga foi ajustada semanalmente para acompanhar a variabilidade de peso corporal dos animais ao longo do estudo.



### 3.7. Parâmetros de irradiação com LBI

A aplicação do LBI foi realizada um minuto após IM de forma transtorácica, repetindo-se três vezes por semana, durante quatro semanas de tratamento com os animais sedados. A caneta do dispositivo foi posicionada em nove pontos distintos próximo do 5° espaço intercostal com o objetivo de abranger a maior área possível do VE (parede lateral, parede livre, e região septal). A Tabela 1 ilustra os parâmetros de irradiação empregados no estudo. Reporta-se que os parâmetros de foram definidos com base em estudo em vigor em nosso laboratório, em que o objetivo consiste em determinar qual o melhor parâmetro de irradiação para gerar benefícios mais pronunciados no remodelamento cardíaco pós-infarto.

**Tabela 1.** Protocolo de irradiação.

Pontos irradiados	9
Irradiações por ponto	1
Modo	Transtorácico
Modelo	Laser AlGaInp – THERA LASER DMC
Comprimento de onda	830 nm
Potência	100 mW
Tempo por animal	200 seg
Tempo por ponto	22,22 J
Área irradiada	0,028 cm <sup>2</sup>
Energia total por animal	19,998 J
Dose	2,22J
Densidade de energia	714 J/cm <sup>2</sup>
Densidade de potência	3,57 W/cm <sup>2</sup>

### 3.8. Estudo hemodinâmico

No dia posterior ao segundo ECO, os animais foram submetidos a anestesia com Uretana (1,2 mg/kg de peso corporal (Sigma Aldrich®, Missouri, EUA) e cateterismo do VE a partir da carótida direita com micromanômetro Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, EUA) e implante de sensor de fluxo na aorta ascendente (TransonicFlowprobe, Transonic Systems Inc., NY, EUA), respectivamente. Com auxílio do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, EUA) foram computados os valores instantâneos de: frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm); pressão sistólica do VE (PSVE, em mmHg); pressão diastólica final do VE (PDfVE, em mmHg); primeira derivada temporal de pressão (+dP/dt e - dP/dt, em mmHg/s); débito cardíaco (DC, em ml/min), volume sistólico ejetado (VSE, em ml) e trabalho sistólico (TS, em g·m/batimento). O TS resultou da fórmula:  $TS = (PSVE - PDfVE) \times (VSE) \times 0,0136$ , onde 0,0136 é a constante para conversão de pressão e volume em unidades de trabalho (gramas-metro ou g·m).

### 3.9. Análise de citocinas inflamatórias

Homogenatos foram preparados a partir da porção remota ao infarto com solução Tris e inibidor de protease. A dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 foi realizada por ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) conforme orientações do fabricante (quiteOptEIA, BD Biosciences®, EUA). As placas de ELISA (Costar half-area plate-96 poços) foram sensibilizadas com 40  $\mu$ l dos anticorpos anti-citocinas específicos, diluídos em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) e carbonado de sódio (pH 9,5) específico para cada citocina (conforme recomendação do fabricante) e incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 150  $\mu$ l /poço de PBS pH 7,2- Tween-20 0,05% (PBS-Tw) e incubadas com 100  $\mu$ l de solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tw. Os padrões das citocinas foram diluídos em série (fator 2) em PBS (pH 7,2) adicionado com SFB (10%) a partir da concentração inicial recomendada

pelo fabricante. Em seguida, 100 $\mu$ l da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 120 minutos em TA. Quando necessário, as amostras eram diluídas em PBS (pH 7,2) adicionado de SFB (10%). Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-Tw e, realizada adição de 100 $\mu$ l de solução reveladora contendo TMB (Tetrametilbenzidina). A reação foi bloqueada com 50 $\mu$ l de ácido fosfórico e a leitura realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices®, EUA) a 450 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões expressas como pg/ml, utilizando o software Softmax Pro® (versão 7.0; Molecular Devices®). Obtida a concentração, os dados foram normalizados pelo teor de proteínas na amostra por técnica de Bradford. Assim, os dados finais estão expressos como pg/ $\mu$ g.

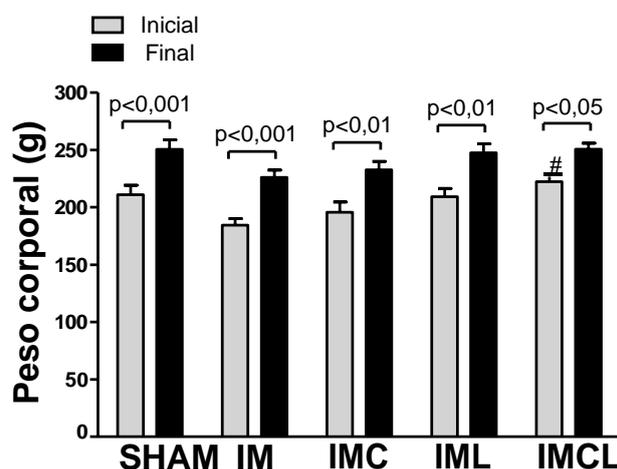
### **3.10 Análise estatística**

Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados com o programa estatístico *GraphPadPrism*, versão 5,0 (San Diego, CA, EUA). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para analisar a distribuição Gaussiana dos dados e o teste de Levene foi adotado para as análises de homogeneidade de variância. A comparação entre os grupos foi realizada com ANOVA uma ou duas vias e post-hoc de Bonferroni em dados com distribuição normal. Os dados que não apresentaram distribuição Gaussiana foram analisados com teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunns. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi adotado como nível de significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Massa corpórea dos animais

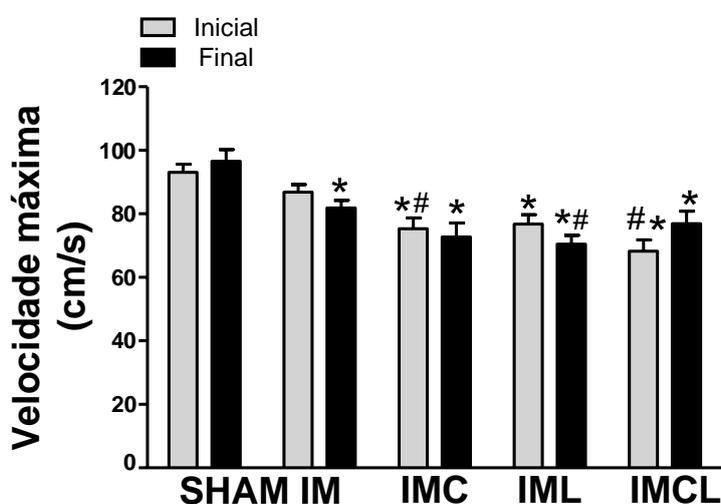
Os animais sobreviventes as primeiras 48 horas após cirurgia fictícia para indução do infarto apresentaram média das massas corpóreas similares a dos animais submetidos à oclusão coronariana (Figura 2). A única diferença significativa foi constatada na comparação dos animais alocados no grupo IMCL em comparação ao grupo IM para o momento inicial do estudo. Houve aumento significativo da massa corpórea em todos os grupos experimentais durante o seguimento do estudo. Os valores de massa corpórea ao final do estudo não foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais.



**Figura 2.** Evolução do ganho de peso corporal dos grupos experimentais ao longo do período de estudo. Inicial: corresponde a mensurações realizadas com três dias pós-infarto do miocárdio; Final: corresponde a mensurações realizadas com trinta dias pós-infarto do miocárdio. ANOVA duas vias para amostras repetidas e pós-teste de Bonferroni foram aplicados nas análises estatísticas. # $p < 0,05$  vs. grupo IM para o momento inicial.

## 4.2. Desempenho físico

O desempenho físico foi analisado em esteira rolante, em que os animais foram submetidos a corrida com cargas progressivas até incapacidade para manter o exercício. Como notado na Figura 3, os valores de velocidade máxima de corrida foram significativamente inferiores em todos os grupos infartados em comparação ao grupo SHAM ao final do estudo. Reporta-se, ainda que as terapias com carvedilol e LBI, assim como a combinação terapêutica, não surtiram efeitos positivos no desempenho físico dos animais.

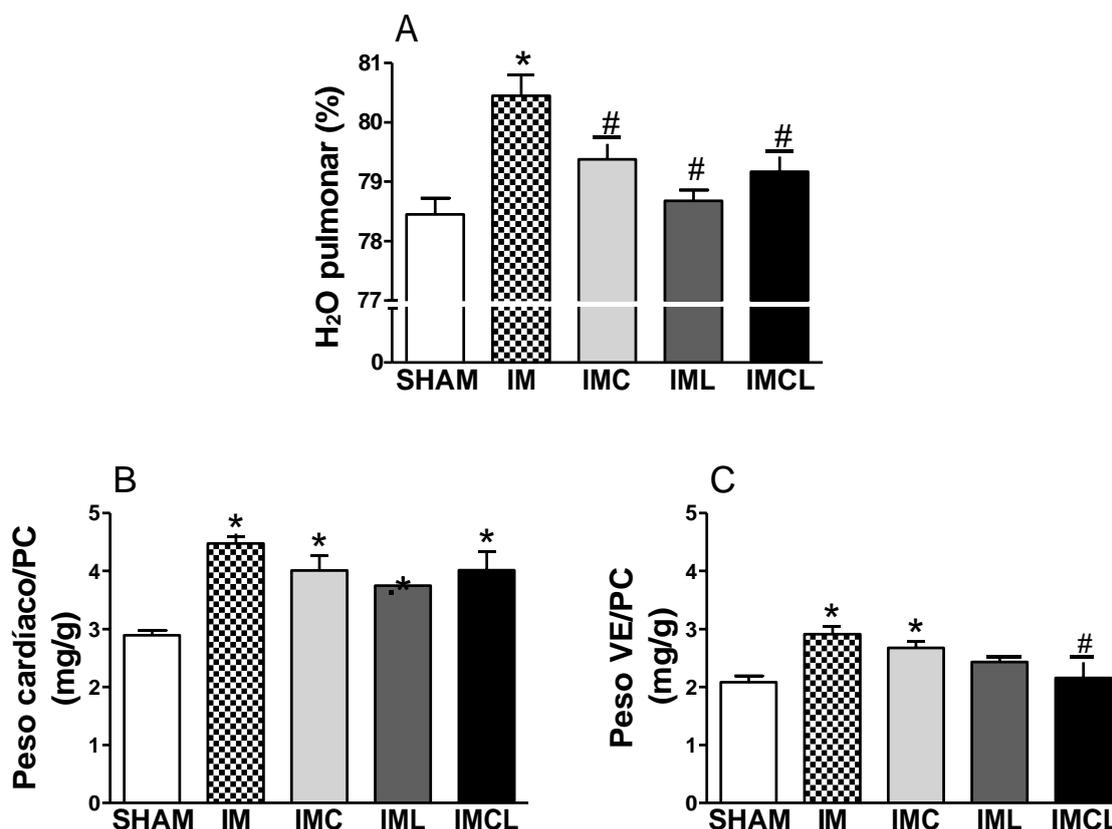


**Figura 3.** Avaliação da velocidade máxima de corrida realizada em teste de esforço máximo conduzido em esteira rolante. Inicial: corresponde a mensurações realizadas com quatro dias pós-infarto do miocárdio; Final: corresponde a mensurações realizadas com vinte e nove dias pós-infarto do miocárdio. ANOVA duas vias para amostras repetidas e pós-teste de Bonferroni foram aplicados nas análises estatísticas. \* $p < 0,05$  vs. grupo SHAM para o respectivo momento; # $p < 0,05$  vs. grupo IM para o respectivo momento.

## 4.3. Teor de água no pulmão e hipertrofia miocárdica

A congestão pulmonar é uma manifestação potencialmente fatal da IC, assim o teor de água pulmonar é comumente utilizado como marcador de IC. Como ilustrado na Figura 4A, animais infartados sem tratamento exibiram valores significativamente superior de água no pulmão em comparação ao grupo SHAM, situação que foi abolida nos grupos experimentais submetidos ao tratamento com carvedilol e LBI. Não foi constatado efeito adicional da combinação terapêutica. Quanto à análise da massa cardíaca (Figura 4B),

houve aumento nos grupos infartados sugerindo hipertrofia cardíaca. Todavia, a análise da massa do VE revelou efeito positivo do LBI ao normalizar a massa miocárdica para níveis similares ao do grupo SHAM (Figura 4C). Acresça-se, ainda, a repercussão da combinação do LBI com o carvedilol, em que a massa do VE foi significativamente menor no grupo IMCL em comparação ao grupo IM.

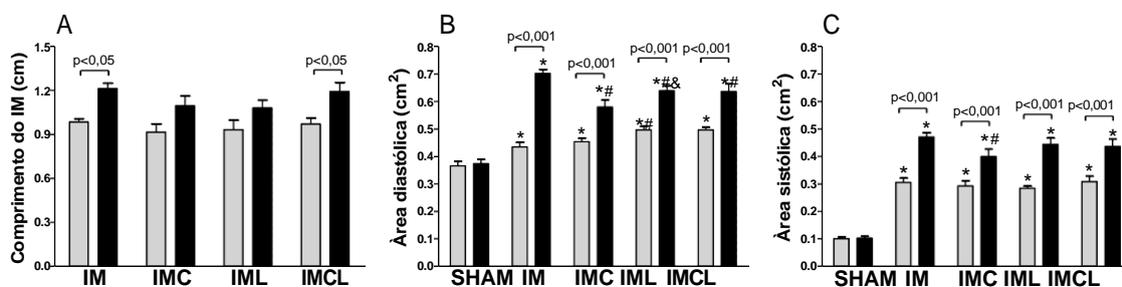


**Figura 4.** Dado biométricos cardiopulmonares dos grupos experimentais com 31 dias de seguimento do estudo. A: teor de água (H<sub>2</sub>O) no pulmão. B: peso cardíaco indexado pelo peso corporal (PC). C: Peso do ventrículo esquerdo (VE) indexado pelo PC. ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados nas análises estatísticas. \*p<0,05 vs. grupo SHAM; #p<0,05 vs. grupo IM.

#### 4.4. Dados morfofuncionais do VE

Os resultados dos tamanhos dos infartos expressos como comprimento da cicatriz estão ilustrados na Figura 5A. A análise ecocardiográfica da extensão do infarto demonstrou tamanho médio estatisticamente similar entre os grupos experimentais no início e no final do estudo. Considerando a análise destes valores com 30 dias de seguimento em relação à avaliação inicial, houve aumento significativo no tamanho da lesão nos grupos IM e IMCL.

A observação das Figuras 5B e 5C revela que as áreas diastólicas e sistólicas do VE nos grupos infartados foram significativamente maiores em comparação ao grupo SHAM. Além disso, a dilatação cavitária ao longo de 30 dias de seguimento foi um achado comum para todos os grupos infartados. Em que pese a importância das terapias, nota-se que as áreas diastólicas de todos os grupos tratados foram significativamente menores na comparação com o grupo de ratos infartados sem tratamento ao final do seguimento do estudo. Ao considerar a área sistólica do VE, a administração isolada do carvedilol foi a única intervenção que surtiu efeito significativo durante o período experimental, em que os valores de área foram significativamente inferiores ao observado no grupo IM.



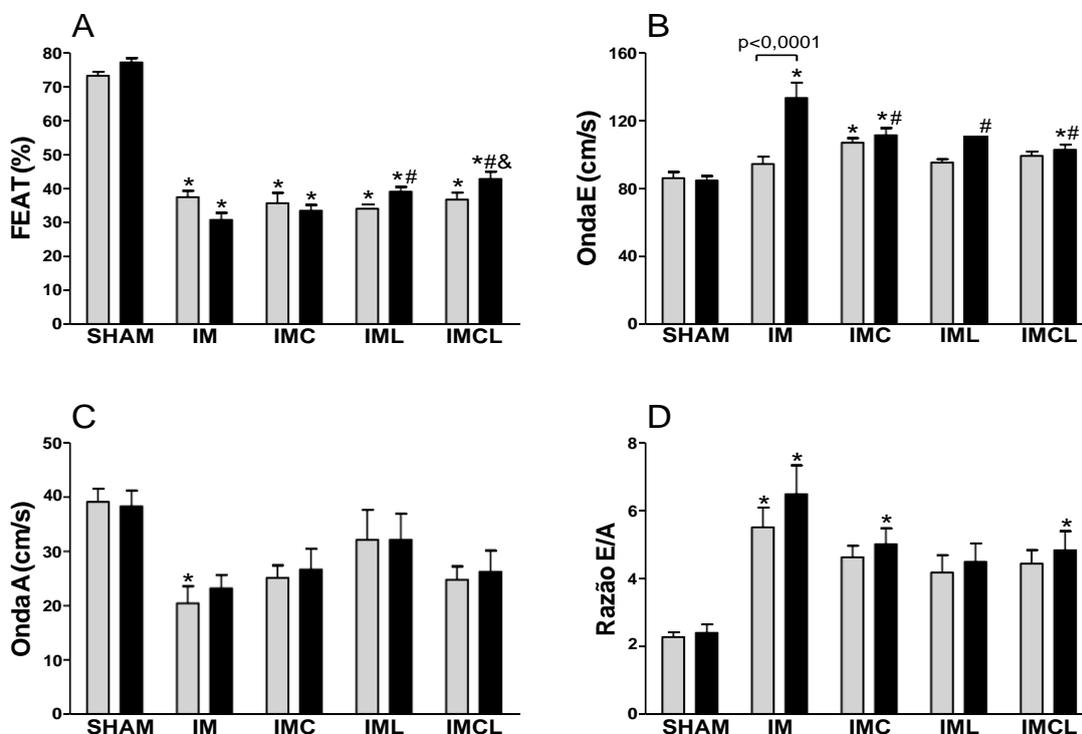
**Figura 5.** Caracterização do tamanho do infarto do miocárdio e morfologia do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos experimentais com três e 30 dias de seguimento experimental. Dados foram obtidos por técnica ecocardiográfica. A: comprimento da cicatriz do infarto do miocárdio. B: área diastólica do VE. C: área sistólica do VE. ANOVA duas vias para amostras repetidas e pós-teste de Bonferroni foram aplicados nas análises estatísticas. \* $p < 0,05$  vs. grupo SHAM; # $p < 0,05$  vs. grupo IM; & $p < 0,05$  vs. grupo IMC.

A análise da função sistólica indicou a Fração de encurtamento da área transversa (FEAT) deprimida nos animais infartados em relação aos animais SHAM's, circunstância que foi evidente no terceiro dia após oclusão coronariana (Figura 6A). Ademais, os grupos IML e IMCL apresentaram, de forma estatisticamente significativa, médias maiores que o grupo IM com 30 dias de seguimento. Além disso, a combinação de LBI e carvedilol gerou resultados mais positivos de desempenho ventricular sistólico. A função diastólica avaliada pelas velocidades máximas das ondas E e A, e pela relação E/A encontra-se também representada na Figura 6. Na velocidade máxima da onda E foi observada diferença significativa somente no grupo IM em relação

aos demais com 30 dias de experimento (Figura 6B). Como destaque, nota-se que as terapias com LBI e carvedilol resultaram em inibição do aumento da onda E e valores médios significativamente inferiores nos grupos IMC, IML e IMCL em comparação ao grupo IM.

Na análise da onda A, os valores de IM foram significativamente menores em relação aos grupos SHAM somente em exames conduzidos após o terceiro dia de oclusão coronária (Figura 6C). Menciona-se que, embora a observação da Figura 6C seja sedutora para acreditar que há valores de onda A menores nos grupos IMC e IMCL em comparação ao grupo SHAM, as comparações estatísticas não corroboram essa informação. Assim, os valores são estatisticamente indistinguíveis na comparação entre todos os grupos experimentais.

A razão E/A mostrou-se elevada no grupo IM, IMC e IMCL em relação ao SHAM para todas as análises conduzidas com 30 dias de seguimento (Figura 6D). De forma interessante, esta razão não foi alterada no grupo IML em comparação a todos os outros grupos experimentais.

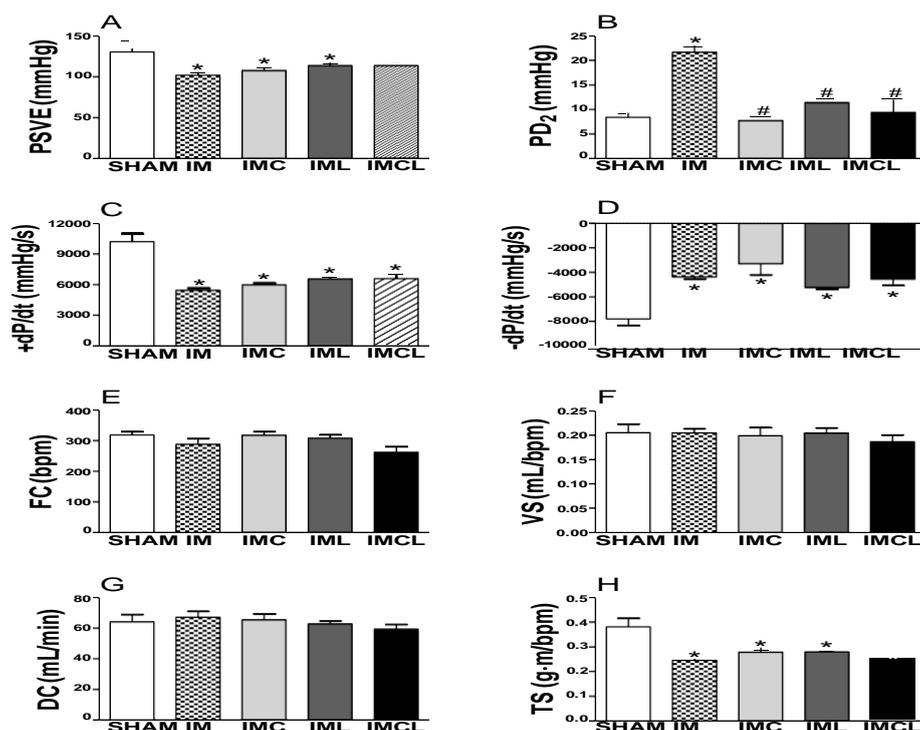


**Figura 6.** Dados funcionais do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por ecocardiografia Doppler nos grupos experimentais com três e 30 dias de seguimento experimental. A: fração de encurtamento da área transversa. B: onda E. C: onda A. D: razão E/A. ANOVA duas vias para

amostras repetidas e pós-teste de Bonferroni foram aplicados nas análises estatísticas. \* $p < 0,05$  vs. grupo SHAM; # $p < 0,05$  vs. grupo IM; & $p < 0,05$  vs. grupo IMC.

#### 4.5. Estudo hemodinâmico do VE

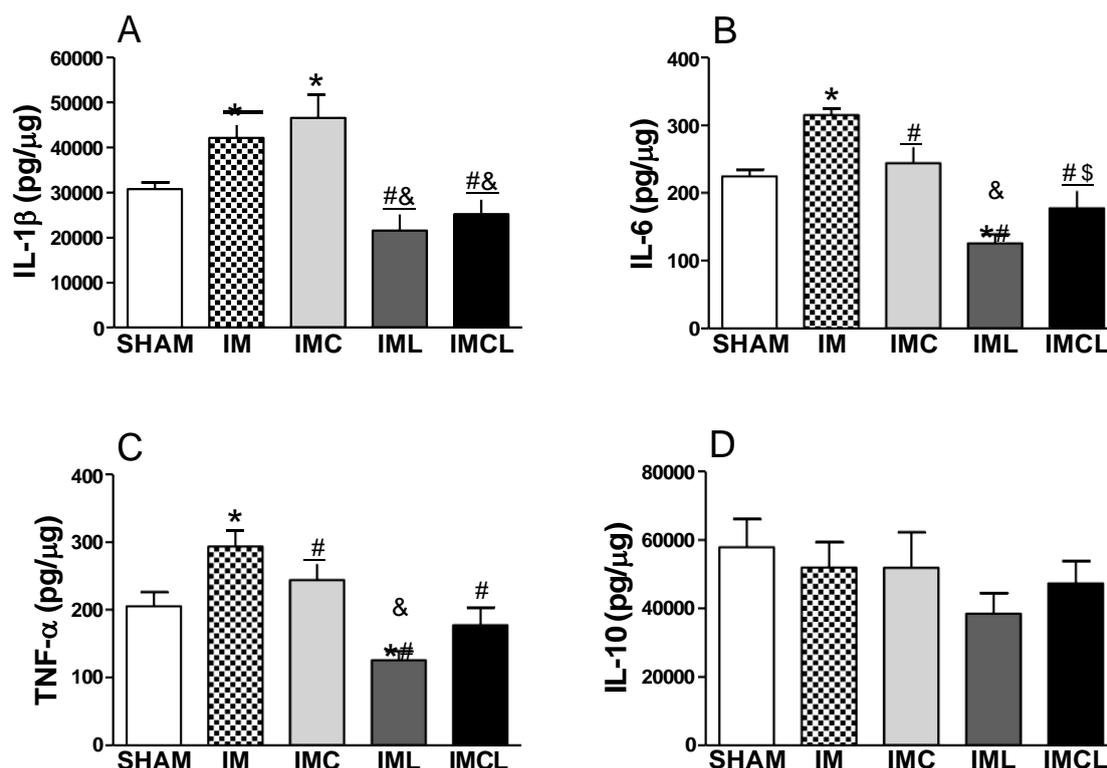
Dados referentes aos parâmetros hemodinâmicos estão disponíveis na Figura 7. Como ilustrado na imagem, todos os grupos infartados apresentaram valores significativamente reduzidos em relação ao grupo SHAM para frequência cardíaca,  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$ , e TS. Esses dados são sugestivos para existência de contratilidade deprimida do VE. De forma muito interessante, todas as terapias foram eficientes em evitar o desenvolvimento de disfunção diastólica, como indicado pelos dados de pressão diastólica final ( $PD_2$ ) ilustrados na Figura 7B. De fato, os valores médios de  $PD_2$  dos grupos IMC, IML e IMCL foram similares aos documentados para o grupo SHAM.



**Figura 7.** Dados hemodinâmicos do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por cateterismo intraventricular e registros de fluxo aórtico dos grupos experimentais com 31 dias de seguimento do estudo. A: pressão sistólica (PSVE). B: pressão diastólica final ( $PD_2$ ). C: derivada de pressão positiva ( $+dP/dt$ ). D: derivada de pressão negativa ( $-dP/dt$ ). E: frequência cardíaca. F: volume sistólico (VS). G: débito cardíaco (DC). H: trabalho sistólico (TS). ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados nas análises estatísticas. \* $p < 0,001$  vs. grupo SHAM; # $p < 0,0001$  vs. grupo IM.

#### 4.6. Marcadores inflamatórios

A expressão proteica de citocinas inflamatórias foi analisada no miocárdio remoto ao infarto com 31 dias de seguimento experimental. Como representado na Figura 8, a terapia isolada com carvedilol resultou em valores de IL-6 e TNF $\alpha$  significativamente menores em comparação ao grupo IM. Todavia, resultados mais positivos foram notados com a aplicação do LBI, em que todas as citocinas pró-inflamatórias foram reduzidas nos grupos IML e IMCL em comparação aos grupos IM e IMC. Acresça-se que os níveis proteicos dessas citocinas foram semelhantes para os animais SHAM, o que indica normalização do estado pró-inflamatório no miocárdio infartado submetido a fotobiomodulação com LBI. Não houve alterações significantes entre os grupos experimentais para a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10.



**Figura 8.** Expressão proteica de citocinas inflamatórias no miocárdio remoto ao infarto e, em área correspondente para o grupo SHAM, com 31 dias de seguimento do estudo. Dados foram obtidos por ensaio de imunoabsorção enzimática. A: interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). B: interleucina 6 (IL-6). C: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). D: interleucina 10 (IL-10). ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados nas análises estatísticas. \* $p < 0,05$  vs. grupo SHAM; # $p < 0,05$  vs. grupo IM; & $p < 0,05$  vs. grupo IMC.

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos experimentais de fisiologia e fisiopatologia cardiovascular têm se valido quase exclusivamente da utilização do rato. O modelo experimental de IM utilizado neste estudo é consolidado na literatura como modelo de IC desde seus primeiros princípios técnicos descritos por Heimburger<sup>44</sup> e Johns&Olson<sup>45</sup> até recentes trabalhos de nosso grupo de pesquisa<sup>31, 46</sup> que caracterizaram repercussões cardíacas sistêmicas bastante semelhantes às dos humanos.

Dessa forma, a opção por empregar o modelo de oclusão coronariana para determinar o efeito da terapia farmacológica com Carvedilol e da fotobiomodulação com LBI no remodelamento cardíaco pós-infarto constituiu decisão acertada. Vale mencionar que, a indicação do Carvedilol no curso da evolução para IC pós-IM é unânime na prática clínica. Essa informação derivada de diversos trabalhos demonstrando atenuação do remodelamento cardíaco em animais<sup>42</sup> de laboratório e humanos<sup>23-25</sup>, com consequente melhoria da sobrevida<sup>23-25</sup>.

A repercussão do LBI no remodelamento cardíaco pós-IM carece de investigação. A leitura não minudenciada de diversos estudos da literatura pode conduzir a acreditar que a fotobiomodulação pode melhorar a aptidão física, reduzir o tamanho do IM, atenuar a dilatação cavitária e a disfunção cardíaca de ratos infartados<sup>29, 47, 48</sup>. Entretanto, muitos estudos possuem limitações metodológicas que impetram desconfiança acerca dos resultados positivos. Assim, como meta inicial dessa tese de doutoramento, estabelecemos realizar uma revisão sistemática como ilustrado em Anexo 1. Deste primeiro procedimento, o que resultou em uma publicação Carlos et al.<sup>26</sup>, evidenciamos diversos aspectos a se considerar sobre a fotobiomodulação: (a) heterogeneidade no gênero dos animais, dispositivo de LBI e parâmetros de irradiação empregados; (b) ausência de controle de variáveis importantes, como exemplo, a composição de grupos experimentais sem o controle do tamanho dos infartos; (c) ausência de procedimentos de randomização ou cegamento; (d) estudos, em sua maioria, de características transversais, em

que a casualidade dos resultados não pode ser negada. De fato, essas informações foram importantes para tomada de decisão sobre o protocolo de LBI.

Como ferramenta para determinar o impacto das intervenções na aptidão física, nós aplicamos um teste de corrida com carga progressiva, em que a velocidade máxima obtida em esteira rolante foi registrada. Como imaginávamos, ratos infartados com IC apresentaram redução da resistência aeróbia, um achado que corrobora trabalhos prévios da literatura<sup>49, 50</sup>. Considerando a repercussão do Carvedilol, nós não observamos benefícios para manutenção ou melhora da aptidão física. A ação benéfica do Carvedilol no desempenho físico não é consensual. Enquanto alguns investigadores reportaram melhora da resistência aeróbia em pacientes com IC<sup>51</sup>, há indicações que os beta-bloqueadores podem não influenciar positivamente o desempenho físico<sup>52</sup>. Considerando a fotobiomodulação, há pouca evidência acerca da repercussão no desempenho físico. Capalunga et al.<sup>47</sup> aplicaram LED no músculo gastrocnêmio de ratos infartados ao longo de oito semanas e reportaram melhora na distância percorrida e velocidade máxima em esteira rolante. É difícil estabelecer porque também não encontramos melhora na aptidão física com a fotobiomodulação, mas alguns pontos podem ser considerados. No trabalho de Capalunga et al. (2016) foram incluídos animais com tamanhos de IM inferiores (~24% do VE) aos dos nossos animais. Além disso, o tipo de luz e a região irradiada (gastrocnêmio) foram diferentes das padronizadas em nosso trabalho. Assim, a influência da fotobiomodulação no desempenho aeróbio de ratos infartados com IC ainda carece de investigação.

Análises biométricas evidenciaram benefícios singulares das terapias em atenuar a congestão pulmonar nos animais infartados (Figura 4). O edema pulmonar é uma manifestação potencialmente fatal da IC. O aumento na pressão de enchimento do VE resulta em efluência do fluido plasmático através dos capilares pulmonares para os espaços intersticiais e alvéolos<sup>25</sup>. Assim, a normalização do teor de água pulmonar nos ratos infartados submetidos ao tratamento com Carvedilol e LBI para valores similares ao grupo SHAM pode derivar da normalização da PD<sub>2</sub>, como ilustrado na Figura 7B.

O remodelamento cardíaco pós-infarto cursa com hipertrofia do miocárdio remanescente à lesão<sup>53</sup>, situação que também vigora em nosso

estudo. Assim, as massas cardíacas e VE indexadas pelo peso corporal foi maior no grupo IM em comparação ao grupo SHAM, corroborando estudos prévios da literatura<sup>54-56</sup>. Embora existam dados na literatura demonstrando redução da hipertrofia miocárdica com o uso do Carvedilol em ratos<sup>57</sup> e humanos<sup>58</sup> infartados, nós não constatamos esses achados no grupo IMC. É importante ressaltar que a ação do Carvedilol na hipertrofia miocárdica pode variar em acordo com dose empregada e há estudos com resultados contraditórios. Por exemplo, Yang et al<sup>57</sup> avaliaram os efeitos de baixa (0,01mg/100g/dia), moderada (0,1mg/100g/dia) e alta (1mg/100g/dia) dose de Carvedilol em ratos infartados tratados por quatro semanas. Os autores observaram que as doses moderadas e altas foram mais efetivas em atenuar o aumento da massa do VE. Todavia, Sun et al<sup>59</sup> trataram animais infartados por seis semanas com doses baixas e altas de Carvedilol, em que a dose baixa surtiu efeitos mais significativos na atenuação da hipertrofia miocárdica do VE. Em outro trabalho, os autores analisaram a repercussão da administração de 2mg/100g/dia de Carvedilol durante 30 dias em ratos com grandes infartos<sup>60</sup>. De maneira interessante, os animais tratados exibiram valores de massa do VE indexada peso corporal superiores aos ratos infartados sem tratamento. Em nosso caso, a administração isolada de 1mg/100g/dia de Carvedilol não resultou em atenuação da hipertrofia miocárdica induzida pelo IM. Entretanto, a associação do tratamento farmacológico com o LBI foi auspiciosa para inibir a hipertrofia miocárdica. Assim, a análise dos dados constantes na Figura 4C ilustra valores de massa do VE indexadas pelo peso corporal inferiores ao grupo IM e, similares ao grupo SHAM.

Os dados disponíveis na Figura 5A indicam que nos grupos com terapia isolada de Carvedilol e LBI houve prevenção do aumento do tamanho do IM, porém, no grupo com terapia associada, o aumento da área necrótica foi evidente. A ausência de aumento não significativo no tamanho do IM nos grupos IMC e IML pode ser atribuída ao tamanho amostral, assim, o impacto dessa caracterização estatística pode não refletir a fisiopatologia da evolução do IM para IC. Além disso, a inclusão de animais com tamanhos de infarto somente  $\geq 37\%$  do VE também pode contribuir para ausência de aumento significativo na área necrótica dos ratos IMC e IML. Relata-se que não houve diferenças entre os grupos para o tamanho do IM ao final do estudo, o que

constitui achado comum para ratos infartados submetidos ao tratamento com Carvedilol<sup>57, 61</sup>.

A respeito da fotobiomodulação, a redução do tamanho do infarto tem sido considerado achado principal ligado ao LBI<sup>29, 62</sup>. Nosso grupo de pesquisa<sup>30</sup> e outros investigadores têm demonstrado que a aplicação do LBI pode resultar em infartos de menores dimensões<sup>62, 63</sup>. Nesse estudo, não identificamos repercussão positiva do LBI no tamanho do IM, mas é possível compor explicação para esses achados. Nós incluímos somente animais com IM de tamanhos similares para evitar que variabilidade na extensão da lesão pudesse influenciar negativamente os resultados obtidos, conseqüentemente, o desenho do estudo não permite analisar apropriadamente o impacto do LBI no tamanho do IM. Outro ponto importante é a análise prospectiva dos dados, em que o LBI foi aplicado durante todo seguimento do estudo. Resultados significativos do LBI no tamanho do IM provêm de investigações em que as irradiações foram aplicadas imediatamente ou alguns minutos após indução do IM<sup>29, 30, 48</sup>; nesse caso, o tamanho do IM foi analisado somente em amostras coletadas na fase aguda da doença. Esses dados, em conjunto com a informação disponível na Figura 5A, são sugestivos de que os benefícios da fotobiomodulação em reduzir o tamanho do IM são evidentes na fase aguda do remodelamento cardíaco.

Nossos achados de menor dilatação do VE, expressos como área diastólica, nos animais tratados com Carvedilol e LBI, possuem implicações importantes para desempenho cardíaco. É bem conhecido que ventrículos maiores oneram o desenvolvimento de pressão intracavitário e, assim, a dilatação do VE pós-infarto implica em maior esforço miocárdico e menor eficiência da bomba cardíaca<sup>64</sup>. Singular a esse conceito residem dados que associam maiores diâmetros das cavidades esquerdas com piora funcional em ratos com IC isquêmica<sup>65</sup>. Reporta-se, ainda, que outros estudos utilizando diferentes doses de Carvedilol também apresentaram resultados similares aos nossos<sup>59, 66</sup>. Quanto a fotobiomodulação, as poucas evidências disponíveis acerca do efeito do LBI são inconclusivas – há trabalhos que apresentam dados positivos ou nulos<sup>26</sup>.

A análise conjunta dos dados funcionais obtidos por estudo ecocardiográfico e hemodinâmico não revela melhora significativa da função sistólica do VE com o tratamento isolado de Carvedilol e LBI. Decorre que os

valores médios dos indicadores FEAT,  $+dP/dt$ , VS, DC e TS dos grupos IMC e IML não diferiram significativamente do grupo IM. Havia premissa que o tratamento com Carvedilol resultaria em melhora do desempenho sistólico do VE, como evidenciado por estudos prévios que se valeram de doses diferentes de ministração do beta-bloqueador em ratos infartados<sup>59, 61, 67</sup>. É difícil explicar porque não encontramos melhora da função sistólica com o uso de Carvedilol, todavia, cabe mencionar que esses achados não são exclusivos de nosso estudo. Yang et al<sup>61</sup> e Zhuang et al<sup>22</sup> trataram ratos infartados com Carvedilol na dose de 1mg/100g/dia por quatro semanas e não observaram melhora significativa da função sistólica utilizando a  $+dP/dt$  como marcador. Resultados similares foram divulgados por outros investigadores que utilizaram Carvedilol na dose de 2mg/100g/dia<sup>60</sup>. Ao analisar nossos dados em comparação com a literatura, aparentemente há um efeito dose-resposta do Carvedilol. Assim, nós notamos que benefícios para a função sistólica do VE foram mais evidentes em estudos que empregaram regimes de tratamento de doses baixas (exemplo: 1mg/100g/dia) de Carvedilol em comparação a doses altas como a adotada por nós.

Ao considerar o efeito isolado do LBI na função sistólica do VE, os resultados foram similares ao observado para a terapia com Carvedilol. Há poucos estudos que analisaram o desempenho cardíaco de animais infartados, em que benefícios advindos da aplicação do LBI foram noticiados para dados obtidos na fase aguda do remodelamento cardíaco<sup>30</sup>. Quando a análise funcional cardíaca foi conduzida em animais em estágio de IC, em que o LBI foi aplicado na fase precoce<sup>31, 62</sup> ou tardia<sup>68</sup> do IM, respectivamente, não há relatos de benefícios da fotobiomodulação.

Resta mencionar que benefícios funcionais do Carvedilol e do LBI foram evidentes ao considerar o desempenho diastólico do VE, em que houve normalização dos valores de PD<sub>2</sub> e atenuação do aumento na onda E nos grupos infartados, resultando em razão E/A com valores próximos ao observado no grupo SHAM. Além disso, quando observamos a Figura 6A, nota-se que há melhora discreta, mas significativa, nos valores médios da FEAT nos animais submetidos a terapia combinada (grupo IMCL). Em nosso estudo, não há dados que permitam inferir acerca dos mecanismos inerentes a esses achados, todavia, há indicações que o Carvedilol pode reduzir o acúmulo de

colágeno no miocárdio remoto e positivamente alterar a expressão de proteínas que modulam a cinética do cálcio em corações infartados<sup>59, 69</sup>.

Vários mecanismos contribuem para o desenvolvimento de IC pós-infarto, em que há evidências mostrando que várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6, estão envolvidas no remodelamento cardíaco adverso<sup>19, 70</sup>. Dados de nosso estudo corroboram informações prévias, em que o tratamento de ratos infartados com Carvedilol resultou em melhora dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, Zhuang et al.<sup>22</sup> documentaram que a ministração de 30 mg/kg/dia de Carvedilol por quatro semanas resultou menor teor de IL-6 em coração de ratos infartados. Resultados similares foram apresentados por Li et al.<sup>20</sup> que, ao ministrarem a dose de 1mg/100g/dia durante 10 semanas de tratamento, identificaram menores níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no miocárdio. A redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias tem implicações importantes no remodelamento cardíaco pós-infarto. A expressão elevada desses mediadores inflamatórios tem impacto adverso na IC<sup>71</sup>, em que vários estudos sugerem que as citocinas induzem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, apoptose, hipertrofia celular e remodelamento da matriz extracelular. Acresça-se acentuação da ruptura da cicatriz do infarto e dilatação cavitária<sup>60, 67, 70, 72, 73</sup>.

De nota são nossos achados ligados à terapia com LBI, em que todas as citocinas pró-inflamatórias foram reduzidas para níveis similares aos encontrados no grupo SHAM. Essa informação corrobora estudo prévio de nosso grupo para análises conduzidas na fase aguda do IM<sup>30</sup> e de outros grupos investigadores, em que o potencial anti-inflamatório da fotobiomodulação foi evidenciado em diversos modelos de injúria celular<sup>74-82</sup>.

## **6. CONCLUSÃO**

Em conclusão, esse estudo ilustra que o Carvedilol e o LBI possuem efeitos análogos na IC pós-infarto, considerando as alterações de desempenho físico, de biometria cardiopulmonar e morfofuncionalidade do VE. Todavia, um efeito anti-inflamatório local foi mais evidente nos animais submetidos ao tratamento com LBI. Além disso, a combinação das terapias resultou em atenuação da hipertrofia miocárdica e melhora da FEAT do VE.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Mansur AdP, Favarato D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2012;99(2):755-61.
2. Schmidt MM, de Quadros AS, Martinelli ES, Gottschall CAM. Prevalência, etiologia e características dos pacientes com infarto agudo do miocárdio tipo 2. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2015;23(2):119-23.
3. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2005;66(1):22-32.
4. Granger BB, Swedberg K, Ekman I, Granger CB, Olofsson B, McMurray JJ, et al. Adherence to candesartan and placebo and outcomes in chronic heart failure in the CHARM programme: double-blind, randomised, controlled clinical trial. *The Lancet*. 2005;366(9502).
5. MW M, RA A, RM R, Réa-Neto A. II Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca aguda. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2009;93(3):2-65.
6. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017;136(6):e137-e61.
7. Kannel MWB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart failure reviews*. 2000;5(2):167-73.
8. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European journal of heart failure*. 2012;14(8):803-69.
9. Santiago JM. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca: aproximación al paciente real en Galicia. *Galicia Clin*. 2012;73(Supl 2):S5-S11.
10. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;92(2):157-64.

11. Francis J, Weiss R, Wei S, Johnson A, Felder R. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2001;281(5):R1734-R45.
12. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S-M, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(23):1750-7.
13. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(5):1201-6.
14. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *The American journal of cardiology*. 2005;95(11):3-8.
15. Anker SD, Sharma R. The syndrome of cardiac cachexia. *International journal of cardiology*. 2002;85(1):51-66.
16. Nah D-Y, Rhee M-Y. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean circulation journal*. 2009;39(10):393-8.
17. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research*. 2004;94(12):1543-53.
18. Abbate A, Morales C, De Falco M, Fedele V, Zoccai GGB, Santini D, et al. Ischemia and apoptosis in an animal model of permanent infarct-related artery occlusion. *International journal of cardiology*. 2007;121(1):109-11.
19. Remme WJ. Which beta-blocker is most effective in heart failure? *Cardiovascular drugs and therapy*. 2010;24(4):351-8.
20. Li B, Liao Y-H, Cheng X, Ge H, Guo H, Wang M. Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2006;111(2):247-55.
21. Liu C, Huang Y, Zhang J, Xu Y, Wu C. Effect of carvedilol on cardiac dysfunction 4 days after myocardial infarction in rats: role of toll-like receptor 4 and  $\beta$ -arrestin 2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(15):2103-10.
22. Zhuang X, Yin C, Wang H, Sun N. Distinctive effects of carvedilol in the non-infarct zone: remodelling of the ligated rat heart linked to oxidative stress. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(5):1354-64.
23. Investigators C-I. The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): a randomised trial. *The Lancet*. 1999;353(9146):9-13.

24. Carson PE. Beta blocker treatment in heart failure. *Progress in cardiovascular diseases*. 1999;41(4):301-21.
25. Group M-HS. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL randomised intervention trial in-congestive heart failure (MERIT-HF). *The Lancet*. 1999;353(9169):2001-7.
26. Carlos FP, Gradinetti V, Manchini M, de Carvalho PdTC, Silva JA, Girardi ACC, et al. Role of low-level laser therapy on the cardiac remodeling after myocardial infarction: A systematic review of experimental studies. *Life sciences*. 2016;151:109-14.
27. Whittaker P, Patterson MJ. Ventricular remodeling after acute myocardial infarction: Effect of low-intensity laser irradiation. *Lasers in surgery and medicine*. 2000;27(1):29-38.
28. Blatt A, Elbaz-Greener GA, Tuby H, Maltz L, Siman-Tov Y, Ben-Aharon G, et al. Low-level laser therapy to the bone marrow reduces scarring and improves heart function post-acute myocardial infarction in the pig. *Photomedicine and laser surgery*. 2016;34(11):516-24.
29. Oron U, Yaakobi T, Oron A, Hayam G, Gepstein L, Rubin O, et al. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation. *Lasers in surgery and medicine*. 2001;28(3):204-11.
30. Manchini MT, Serra AJ, dos Santos Feliciano R, Santana ET, Antônio EL, de Carvalho PdTC, et al. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PloS one*. 2014;9(7):e101270.
31. Manchini MT, Antônio EL, Junior JAS, de Carvalho PdTC, Albertini R, Pereira FC, et al. Low-level laser application in the early myocardial infarction stage has no beneficial role in heart failure. *Frontiers in physiology*. 2017;8.
32. Antonio EL, Dos Santos AA, Araujo SR, Bocalini DS, Dos Santos L, Fenelon G, et al. Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality. *Journal of cardiac failure*. 2009;15(6):540-8.
33. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation research*. 1979;44(4):503-12.

34. Helber I, Dos Santos AA, Antonio EL, Flumignan RL, Bocalini DS, Piccolo C, et al. Digoxin prolongs survival of female rats with heart failure due to large myocardial infarction. *Journal of cardiac failure*. 2009;15(9):798-804.
35. Loss FR. Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). 2013.
36. de Melo BL, Vieira SS, Antônio EL, dos Santos LF, Portes LA, Feliciano RS, et al. Exercise training attenuates right ventricular remodeling in rats with pulmonary arterial stenosis. *Frontiers in physiology*. 2016;7.
37. Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, Campos O, Carvalho ACC, De Paola ÂAV, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2005;18(5):454-60.
38. Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos F, Andrade JLD, et al. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2000;75(2):131-6.
39. Nozawa E, Kanashiro R, Murad N, Carvalho A, Cravo S, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2006;39(5):687-95.
40. Kitabatake A, Inoue M, Asao M, Masuyama T, Tanouchi J, Morita T, et al. Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique. *Circulation*. 1983;68(2):302-9.
41. Xu C, Hu Y, Hou L, Ju J, Li X, Du N, et al.  $\beta$ -Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;75:111-21.
42. Yang Y, Tang Y, Ruan Y, Wang Y, Gao R, Chen J, et al. Comparison of metoprolol with low, middle and high doses of carvedilol in prevention of postinfarction left ventricular remodeling in rats. *Japanese heart journal*. 2003;44(6):979-88.
43. Zhang J-l, Lu J-k, Chen D, Cai Q, Li T-x, Wu L-s, et al. Myocardial autophagy variation during acute myocardial infarction in rats: the effects of carvedilol. *Chinese medical journal*. 2009;122(19):2372-9.

44. HEIMBURGER RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Archives of Surgery*. 1946;52(6):677-89.
45. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: I. A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of surgery*. 1954;140(5):675.
46. Santana ET, dos Santos Feliciano R, Serra AJ, Brigidio E, Antonio EL, Tucci PJ, et al. Comparative mRNA and MicroRNA Profiling during Acute Myocardial Infarction Induced by Coronary Occlusion and Ablation Radio-Frequency Currents. *Frontiers in physiology*. 2016;7.
47. Capalonga L, Karsten M, Hentschke VS, Rossato DD, Dornelles MP, Sonza A, et al. Light-emitting diode therapy (LEDT) improves functional capacity in rats with heart failure. *Lasers in medical science*. 2016;31(5):937-44.
48. Ad N, Oron U. Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2001;80(2):109-16.
49. BECH OM, KAHR O, DIAMANT B, STEINESS E. Time course of functional deterioration after coronary artery ligation in rats. *Cardiovascular research*. 1989;23(8):649-54.
50. Trueblood NA, Inscore PR, Brenner D, Lugassy D, Apstein CS, Sawyer DB, et al. Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;288(1):H244-H9.
51. Castro P, Pérez O, Greig D, Díaz-Araya G, Moraga F, Chiong M, et al. Effects of Carvedilol on Functional Capacity, Left Ventricular Function, Catecholamines, and Oxidative Stress in Patients With Chronic Heart Failure. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2004;57(11):1053-8.
52. Fowler MB. Effects of beta blockers on symptoms and functional capacity in heart failure. *The American journal of cardiology*. 1997;80(11):55L-8L.
53. Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2010;95(5):635-9.
54. Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahsh AJ, Gupta S, John R, et al. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation*. 1997;96(11):3974-84.

55. Liu J-F, Wang B-W, Hung H-F, Chang H, Shyu K-G. Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2008;107(2):165-74.
56. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1991;260(5):H1406-H1414.
57. Yang Y, Tang Y, Ruan Y, Li Y, Zhou Y, Gao R, et al. Comparative effects of cilazapril, carvedilol and their combination in preventing left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2002;3(1):31-5.
58. Senior R, Basu S, Kinsey C, Schaeffer S, Lahiri A. Carvedilol prevents remodeling in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *American heart journal*. 1999;137(4):646-52.
59. Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. COMPARISON OF LOW and HIGH DOSES OF CARVEDILOL ON RESTORATION OF CARDIAC FUNCTION and CALCIUM-HANDLING PROTEINS IN RAT FAILING HEART. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2005;32(7):553-60.
60. Sia YT, Parker TG, Tsoporis JN, Liu P, Adam A, Rouleau JL. Long-term effects of carvedilol on left ventricular function, remodeling, and expression of cardiac cytokines after large myocardial infarction in the rat. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2002;39(1):73-87.
61. Yang Y-J, Tang Y-D, Ruan Y-M, Zhang P, Zhou Y-W, Wang P-H, et al. Comparative effects of carvedilol and losartan alone and in combination for preventing left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. *Circulation journal*. 2003;67(2):159-62.
62. Yang Z, Wu Y, Zhang H, Jin P, Wang W, Hou J, et al. Low-level laser irradiation alters cardiac cytokine expression following acute myocardial infarction: a potential mechanism for laser therapy. *Photomedicine and laser surgery*. 2011;29(6):391-8.
63. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers in surgery and medicine*. 2006;38(7):682-8.

64. Adhyapak SM, Parachuri VR. Tailoring therapy for ischemic cardiomyopathy: is Laplace's law enough? : SAGE Publications Sage UK: London, England; 2017.
65. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Gonçalves AF, Lima AF, Martinez PF, et al. Association between Functional Variables and Heart Failure after Myocardial Infarction in Rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016;106(2):105-12.
66. Chen B, Li Y, Jiang S, Xie Y-P, Guo A, Kutschke W, et al.  $\beta$ -Adrenergic receptor antagonists ameliorate myocyte T-tubule remodeling following myocardial infarction. *The FASEB Journal*. 2012;26(6):2531-7.
67. Hassan F, Meduru S, Taguchi K, Kuppusamy ML, Mostafa M, Kuppusamy P, et al. Carvedilol enhances mesenchymal stem cell therapy for myocardial infarction via inhibition of caspase-3 expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;343(1):62-71.
68. Hentschke VS, Jaenisch RB, Schmeing LA, Cavinato PR, Xavier LL, Dal Lago P. Low-level laser therapy improves the inflammatory profile of rats with heart failure. *Lasers in medical science*. 2013;28(3):1007-16.
69. Wei S, Chow LT, Sanderson JE. Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36(1):276-81.
70. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart. *Circulation research*. 2002;91(11):988-98.
71. Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans M-J, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circulation research*. 2008;102(2):257-64.
72. Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD, et al. Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *The American journal of cardiology*. 2006;97(5):671-5.
73. Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation*. 2006;114(14):1531-44.
74. Aimbire F, De Oliveira AL, Albertini R, Correa J, De Campos CL, Lyon J, et al. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage,

neutrophil influx and IL-1 $\beta$  levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008;31(3):189.

75. Albertini R, Aimbire F, Villaverde A, Silva Jr J, Costa M. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflammation Research*. 2007;56(6):228.

76. Bortone F, Santos H, Albertini R, Pesquero J, Costa M, Silva J. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *International immunopharmacology*. 2008;8(2):206-10.

77. Lopes-Martins RÁB, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC, Muscará MN, Aimbire F, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *Journal of Applied Physiology*. 2006;101(1):283-8.

78. Mafra de Lima F, Costa M, Albertini R, Silva J, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): Attenuation of cholinergic hyperreactivity,  $\beta$ 2-adrenergic hyporesponsiveness and TNF- $\alpha$  mRNA expression in rat bronchi segments in *E. coli* lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF- $\kappa$ B dependent mechanism. *Lasers in surgery and medicine*. 2009;41(1):68-74.

79. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers in Medical Science*. 2011;26(3):335-40.

80. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti-and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers in medical science*. 2011;26(1):85-94.

81. Silva MP, Bortone F, Silva MP, Araújo TR, Costa MS, Silva Júnior JA. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by low level laser therapy in a rat paw edema model. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2011;15(1):1-7.

82. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers in surgery and medicine*. 2010;42(6):553-8.

## 8. ANEXO 1

## ARTICLE IN PRESS



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)

Review article

## Role of low-level laser therapy on the cardiac remodeling after myocardial infarction: A systematic review of experimental studies

Fernando Pereira Carlos <sup>a,1</sup>, Vanessa Gradinetti <sup>a,1</sup>, Martha Manchini <sup>a</sup>, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho <sup>ai</sup>, José Antonio Silva Jr. <sup>b</sup>, Adriana Castello Costa Girardi <sup>c</sup>, Ernesto Cesar Pinto Leal Jr. <sup>a</sup>, Danilo Sales Bocalini <sup>d,e</sup>, Stella Vieira <sup>f</sup>, Ednei Luiz Antonio <sup>f</sup>, Paulo Tucci <sup>f</sup>, Andrey Jorge Serra <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biophotonics Program, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Medicine Program, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Heart Institute (InCor), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Translational Physiology Laboratory, São Judas Tadeu University (USJT), São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Postgraduate Program in Physical Education and Aging Science, São Judas Tadeu University (USJT), São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

### article info

#### Article history:

Received 16 January 2016

Accepted 15 February 2016

Available online xxxxx

#### Keywords:

Cardiac remodeling

Laser therapy

Myocardial infarction

### abstract

**Aims:** We systematically reviewed the role of low-level laser therapy (LLLT) in cardiac remodeling after myocardial infarction.

**Main methods:** Literatures were systematically searched in several electronic databases. We included only studies with a well-standardized coronary occlusion model *in vivo* LLLT application.

**Key findings:** After screening, 14 studies were eligible for review. The study heterogeneity was described in terms of rationality, gender, irradiation parameters, treatment numbers and moment of LLLT application. Three studies showed a null role of LLLT on infarct size, and only one study found positive LLLT effects on the cardiac performance. The cardioprotective role of LLLT was mediated by anti-inflammatory, pro-angiogenic and anti-oxidant actions.

**Significance:** The reduction in infarct size is a major finding. The LLLT cardioprotection may be mediated by several molecular and cellular mechanisms. Although these results are exciting, there are many limitations that must be resolved before LLLT clinical trials.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

### Contents

1. Introduction.....	0
2. Materials and methods.....	0
2.1. Search strategy.....	0
2.2. Inclusion and exclusion criteria.....	0
2.3. Outcome measures.....	0
3. Results.....	0
4. Discussion.....	0
4.1. Structural and function role of LLLT in myocardial infarction remodeling.....	0
4.2. LLLT cardioprotective mechanisms.....	0
4.3. Quality of the evidence and potential biases.....	0
5. Conclusion.....	0
Conflict of interest statement.....	0
Acknowledgements.....	0
References.....	0

Corresponding author at: Rua Araraúri 159, 03659-040 São Paulo, Brazil.

E-mail address: [andreyjserra@gmail.com](mailto:andreyjserra@gmail.com) (A.J. Serra).

<sup>1</sup> The authors contributed equally in the preparation of the manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.058>

0024-3205/© 2015 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

A persistent myocardial blood reduction may result in myocardial infarction (MI). The ischemic myocardium has irreversible injury, which generates cardiac remodeling to maintain blood supply. Unfortunately, this adaptive process is limited and cardiac function, heart failure and sudden death [1,2]. Several mechanisms have been implicated in cardiac remodeling including: ventricular dilatation, tissue inflammation, fibrosis, oxidative stress, apoptosis, calcium handling and metabolic abnormalities [1,3–10]. The cardiac remodeling after MI is a complex condition, and different therapies can prevent or prolong the development of heart failure. In this regard, invasive (*e.g.* coronary angioplasty or surgery), pharmacological (*e.g.* beta-blockers and angiotensin converting blockers), non-pharmacological (*e.g.* exercise training) and cell therapies have all been considered [11–13]. Current therapies are marked by modest results in survival and potential adverse effects [14]. Therefore, novel approaches to attenuate cardiac remodeling and to increase post-infarction survival are key issues. In recent years, experimental data have shown that phototherapy including low-level laser therapy (LLLT) is a promising approach. The first studies that analyzed LLLT date to 1990. These studies have reported that phototherapy attenuates oxidative stress and increases vasodilators in infarcted patients [15,16]. A direct cardiac LLLT effect has been reported for over ten years. Infarcted rats showed less myocardial necrosis with phototherapy [17]. Moreover, the necrotic areas showed favorable characteristics to prevent disruptions with LLLT [18]. There are no clinical trials that evaluate the cardiac impact of LLLT post-infarction. Currently, data are derived from experimental studies. Thereafter, this systematic

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Search strategy

A literature search was identified studies with small or large experimental animals on MEDLINE, Pubmed, Embase, Cochrane Database, LILACS, and Google Scholar. The research was conducted independently by two authors for studies published up until October 10, 2015. Disagreements were resolved by discussion with a third researcher. The keywords and MeSH terms include myocardial infarction, heart failure, cardiac remodeling, low-level laser therapy, laser therapy, phototherapy, low-level laser irradiation, and photobiomodulation. The MeSH terms were used individually or combined to increase the findings.

### Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were as follows: (i) live animal; (ii) myocardial infarction on a well-standardized coronary occlusion model; (iii) any treatment groups; (iv) a quantitative or semi-quantitative measure; and (v) English language. Exclusion criteria were: (i) other MI experimental models (*e.g.* cryoablation); (ii) no details for LLLT parameters; (iii) studies in cell cultures; (iv) review articles; (v) LLLT application in other diseases; and (vi) articles in languages other than English.

#### 1.1. Outcome measures

Studies were included in which structural (*e.g.* MI size, diastolic and systolic left ventricular (LV) dimension) and cardiac functional parameters (*e.g.* ejection fraction) were determined on both an acute and/or chronic LLLT intervention. Moreover, cellular and molecular effects of LLLT were also outcomes of interest.

## Results

A detailed flow diagram of the selected articles is presented in Fig. 1. LLLT irradiation was provided as an intervention to at least 1 of the We found 341,000 initial references by the different search system. An

update to selected eligible manuscripts denoted 188 records. Some manuscripts were disqualified because of the use of high-power lasers or the paper was not published in English. Of the 15 remaining articles, only one study was excluded because it has analyzed the *in vitro* role of LLLT. Table 1 shows overall characteristics of the studies included in the qualitative analysis. There is a methodological heterogeneity regarding rationale, gender, randomization, irradiation parameters, treatment numbers and time of LLLT application. All studies were performed in rats, and only two have analyzed the LLLT effects in dogs [17,19]. More than half of the studies considered male gender but reported no inclusion/exclusion criteria. This is a key issue in experimental infarction models, in which extension of the injured area may differ intragroup [20,21]. In this regard, only two studies considered the infarct size and arrangement *versus* experimental groups. Thus, Whittaker et al. [18] excluded animals with injuries  $\geq 20\%$  and Manchini et al. [22] included rats within injuries  $\geq 37\%$  of LV. We did not find any study with a clear procedure for blinding the experimental group or outcomes analysis. The wavelength devices varied from 635 to 810 nm, and there was a variety

of spot size/diameter values. Considering that the total energy delivered to tissues has a key role in the phototherapy [23–25], there were only four studies that clearly described this parameter [22,26–28]. Most studies applied LLLT directly to the heart [22,26,29–32], and another two studies irradiated the peripheral musculature (*e.g.* gastrocnemius muscle) to evaluate cardiac reperfusion [27,28]. Ten studies cross-sectional and were relatively consistent — the LLLT may decrease infarct size. A null role of phototherapy on infarct size was found in only three studies [18,27,28]. In one study, we found a positive effect of LLLT in the cardiac performance. To date, Manchini et al. [22] applied LLLT irradiation after a 90-minute of coronary occlusion, and an echocardiographic evaluation was carried out three days later. The authors found a higher LV fractional area in their irradiated LLLT rats. Four studies have analyzed the LV performance. They did not observe positive LLLT reperfusion [26–29]. Moreover, a non-beneficial role of LLLT was also observed in myocardial mass, collagen content, and pulmonary congestion [18,22,27]. The papers described in this systematic review show several cellular and molecular mechanisms in which LLLT can improve the post-infarction cardiac remodeling (Table 3). Most studies showed anti-inflammatory [18,22,26,27], pro-angiogenic [26,32–34] and anti-oxidant actions [19,28,30,32,33] of LLLT. Three studies have found a beneficial LLLT effect on the skeletal [27,28] and biosynthesis of ATP in the myocardium [19], respectively.

## 4. Discussion

### 4.1. Structural and function role of LLLT in myocardial infarction remodeling

The reduction of infarct size is a favorable route to alleviate cardiac dilatation, improve ventricular function and delay development in heart failure [36]. In this regard, phototherapy is encouraging, and most studies have analyzed the LLLT repercussions after ischemic insult. For example, Oron et al. [17] subjected dogs and rats to coronary occlusion and applied infrared laser directly in the heart. This reduced mortality by 6.5% and smaller infarcts were reported after five weeks in animals submitted to phototherapy. Moreover, we reported that application of LLLT directly to the heart reduced the incidence of large infarcts [22]. A course of the MI is cardiac dilatation — a process well-

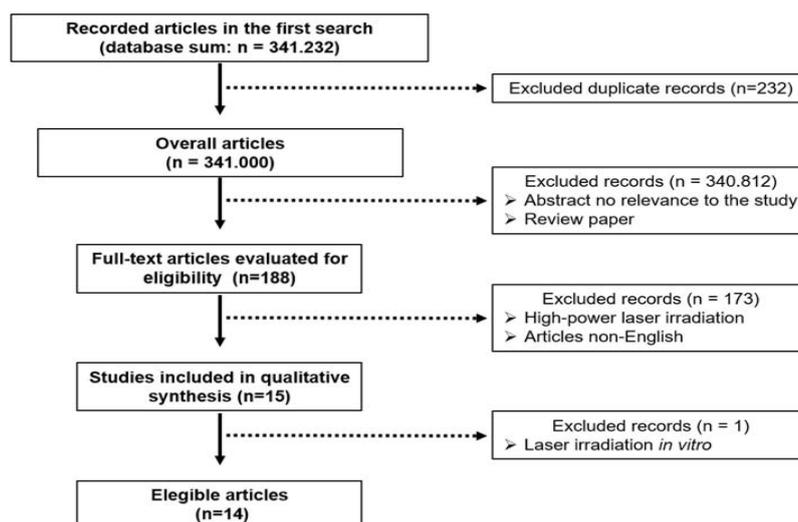


Fig. 1. Flow chart to eligible studies in the review process.

known as eccentric hypertrophy [37]. Initially, this adaptive process is useful for maintenance of cardiac performance via the Frank–Starling mechanism [38]. However, the Frank–Starling mechanism is limited to long-term, and cardiac dysfunction as well as heart failure are commonly recognized [39]. We found little evidence for LLLT-related long-term benefits in this review. In none of the selected studies, Yaakobi et al. [33] treated rats with LLLT after ~10 min and three days of MI. The authors found a ~50% reduction in ventricular dilation after a two-week follow-up. In another study, the same group showed a 75% reduction in ventricular dilation with LLLT [31]. There is limited information on the LLLT effects in cardiac dysfunction after MI, in which available findings lend support to the action at an early stage of cardiac remodeling [22]. On the other hand, a positive LLLT role has not been shown at later infarction stages. To date, Yang et al. [26] noticed that the application of LLLT 5 min after coronary occlusion in rats did not improve the systolic function (e.g. ejection fraction and fractional shortening). As shown in Table 2, this circumstance is also true for cellular markers of hypertrophy, fibrosis and pulmonary congestion. These findings illustrate the necessity of further investigation on the role of LLLT in the evolution to heart failure.

#### 4. LLLT cardioprotective mechanisms

One common finding is that LLLT can increase *in vitro/in vivo* ATP synthesis [40]. An association between this metabolic adaptation and improved post-infarction cardiac remodeling was previously reported. Indeed, Oron et al. [17,35] applied LLLT in canine hearts and reported a significant reduction in mitochondrial injury and increased ATP in the infarcted area. Thus, these findings are suggestive that LLLT can reduce myocardial injury by increasing energy supply. Angiogenesis is another putative target of LLLT to induce cardioprotection. Mirsky et al. [34] observed that the application of LLLT in the infarcted area was associated with neogenesis. This vessel growth has been linked to the cardiac delivery of angiogenic growth factors including vascular endothelial growth factor (VEGF) [32]. Moreover, VEGF may act in the endothelium to induce nitric oxide (NO) synthesis. Both NO and induced members of NOS (iNOS) have a cytoprotective role in cardiac remodeling [41,42]. The hypothesis for the participation of VEGF/iNOS-NO signaling in LLLT cardioprotection may be found in Tuby et al. [32] and Manchini et al. [22] who showed that iNOS and NO were increased in infarcted rats. Inflammation and oxidative stress modulation are raised as additional mechanisms to cardioprotective effects of

4.1 LLLT. An anti-inflammatory LLLT reperfusion in infarcted rats has been well documented by our group [22] and other groups [26]. The benefits are represented by the reduction of pro-inflammatory cytokines (e.g. tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, and interleukin-6) and increased anti-inflammatory cytokine interleukin-10. A beneficial modulation of the oxidative stress by LLLT may be via heat shock protein HSP70. This issue was reported by Yaakobi et al. [33] in an ischemia and reperfusion rat model in which LLLT increased HSP70 2-fold in the myocardium.

#### 4.2. Quality of the evidence and potential biases

Our review raises critical issues. First, many studies were heterogeneous regarding gender, laser device, irradiation parameters and intervention numbers. Second, control settings have not been described in most studies. Only two studies have fixed experimental groups according to the infarction size. To date, only Whittaker et al. [18] have excluded rats with infarctions > 20% of LV and Manchini et al. [22] has included only animals with large infarctions (> 37% of LV). The control of this variable is crucial because the cardiac remodeling is intensified by infarct size [38,43,44]. It is hard to consider a positive LLLT effect on cardiac morphology and function because of the intragroup variability in the infarct size [26,29,31,33]. Third, there is no study with a clear blinding procedure. A more suitable methodological process would be to blind the infarct size and/or LLLT. Fourth, all studies reported a cross-sectional data analysis. Thus, as for other cross-sectional studies, the causality results cannot be determined. Therefore, studies with repeated analyses are often performed in the testing of LLLT. It is difficult to interpret the experimental data from a clinical perspective. For example, although it seems that LLLT may have a favorable effect on infarct size, the amount of data about the cardiac function is limited and favorable reperfusion is not always reported. Moreover, there is only one study showing positive effects of LLLT on cardiac function in animals with large infarctions. Unfortunately, the data are illustrative of LLLT effects on early cardiac remodeling stage. Here, the analyses were carried out



Table 1  
Low level laser therapy parameters in the left ventricular of infarcted rats.

References	Specie	Gender	Inclusion/ randomization criteria	Model	Spotsize/beam diameter	Power density (mW orW/cm <sup>2</sup> )	Energy densityper point(J/cm <sup>2</sup> )	Number of irradiations per day	Time per irradiation (sec/min)	Total energy pertreatment (J)	Numberof treatment (days)	Application route	Laser application moment
[18]	Rat	Female	Excluded:MI b20%	GaAlAs (780 nm)			4 mW/10mW	0.64/1.27	2	180		4	Transthoracic
[17]	Rat/ dog			Ga-As (810 nm)	1.5 × 3.5 mm (rats) 3 cm (dogs)	5 mW/cm <sup>2</sup> (rat) 6 and 12 mW/cm <sup>2</sup> (dog)	0.3 and 0.9 (rats) 1.08 and 2.16 (dog)	1 (rat) 4–6 (dog)	60 and 180 (rat) 180 (dog)		2 (rat and dog)	Transthoracic (rats) Heart (dog)	10–15 min post-MI; 3 days post-MI (rats) Immediate post-MI (dog)
[33]	Rat	Male		Ga-As (804 nm)	1.5 × 3.5 mm	4.5 mW/cm <sup>2</sup>	0.27 (post-MI); 0.81 (3 days post-MI)	1	60 (post-MI); 180 (3 days post-MI)		2	Transthoracic	10–15 min post-MI; 3 days post-MI
[35]	Rat	Male		Ga-As (804 nm)	1.5 × 3.5 mm	4.5 mW/cm <sup>2</sup>	0.27 (post-MI); 0.8 (3 days post-MI)	1	60 (post-MI); 180 (3 days post-MI)		2	Transthoracic	10–15 min post-MI; 3 days post-MI
[19]	Rat/ dog			Ga-As (803 nm)		6mW/cm <sup>2</sup> (dog) 6 mW/cm <sup>2</sup> (rat)	1.08 (dog) 1.08 (rat)	4–6 (dog) 1 (rat)	180 (dog) 180 (rat)		2 (dog) 1 (rat)	Heart (dogs) Transthoracic (rat)	≈15 min post-MI; 3 days post-MI (dog) 10–15 min post-MI (rat)
[34]	Rat	Male		Ga-As (804 nm)	1.5 × 3.5 mm	4.5 mW/cm <sup>2</sup>	0.27 (post-MI); 0.81 (3 days post-MI)	1	60 (post-MI); 180 (3 days post-MI)		2	Transthoracic	10–15 min post-MI; 3 days post-MI
[32]	Rat	Male		Ga-As (804 nm)	Groups 1, 2 and 3: 1.5 cm Group 4: 2 cm	Group 1: 5 mW/cm <sup>2</sup> Group 2: 12 mW/cm <sup>2</sup> Group 3: 17 mW/cm <sup>2</sup> Group 4: 8 mW/cm <sup>2</sup>	Group 1: 0.6 Group 2: 1.44 Group 3: 2.04 Group 4: 0.96	All groups: 1	All groups: 120		All groups: 1	Transthoracic (groups 1, 2 and 3) Heart (Group 4)	Groups 1–3: 7 days before infarction Group 4: immediate post-MI
[29]	Rat	Female		InGaAsP (635 nm)	10 mm	6.37 mW/cm <sup>2</sup>	0.96	1	150		1	Heart	3 weeks post-MI
[26]	Rat	Female		Diodo (635 nm)	0.8 cm <sup>2</sup>	5 mW	1.0	1	150	0.8	2	Heart and Transthoracic	5 min post-MI and 72 h post-MI
[31]	Rat	Male		GaAlAs (804 nm)	Group 1 (organ laser): 1.8 cm Group 2 (remote laser): 1.8 cm	All groups: 10 mW/cm <sup>2</sup>	All groups: 1.0	All groups: 1	All groups: 100		1	Group 1: Heart Group 2: Tibia bone	Group 1: 20 min post-MI Group 2: 4 h post-MI
[27]	Rat	Male		InGaAlP (660 nm)	0.035 cm <sup>2</sup>	0.571 W/cm <sup>2</sup>	3/21	2	5.25/36.75	0.21/1.47	10	Gastrocnemius	4 weeks post-MI
[30]	Rat	Female		Ga-As (635 nm)	10 mm	7.64 mW/cm <sup>2</sup>	0.96	1	125		1	Heart	3 weeks post-MI
[22]	Rat	Female	Excluded: MI b 37%	AlGalnP (660 nm)	0.785 cm <sup>2</sup>	15 mW	22.5	1	60	1.1	1	Heart	1 min post-MI
[28]	Rat	Male		InGaAlP (660 nm)	0.035 cm <sup>2</sup>	0.571 W/cm <sup>2</sup>	3/21	2	5.25/36.75	0.21/1.47	10	Gastrocnemius	4 weeks post-MI

Table 2  
Morphological and function characteristics of the left ventricle of infarcted animals submitted to low-level laser therapy.

References	MI size	LVDA/LVDV	LVSA/LVSV	EF	FAC	LVSP	LVEDP	E wave	A wave	E/A ratio	+dP/dt	-dP/dt	MM	CC	PC
[18]	↔	↓ 10 mW ↔ 5 mW											↔	↔	
[17]	↓ Dog and rats														
[33]	↓	↓													
[35]	↓														
[19]	↓ Dog														
[34]															
[32]	↓ 5 mW/cm <sup>2</sup> ↓ 12 mW/cm <sup>2</sup>														
[29]		↔	↔	↔	↔										
[26]	↓	↔	↔	↔	↔										
[31]	↓	↓													
[27]	↔					↔	↔				↔	↔	↔		↔
[30]	↓													↔	
[22]	↓	↔	↔		↑			↔	↔	↔			↔		↔
[28]	↔					↔	↔								

LVDA, left ventricular diastolic area; LVDV, ventricular diastolic volume; LVSA, left ventricular systolic area; LVSV, left ventricular systolic; EF, fractional shortening; FAC, fractional area change; LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; E wave; A wave; E/A ratio, relation between velocity of E and A waves; +dP/dt, left ventricular maximum change in pressure; -dP/dt, left ventricular minimum change in pressure; MM, myocardial mass; CC, collagen content; PC, pulmonary congestion  
↑ increase; ↓ decrease; ↔ no significant difference

three days after coronary occlusion. Thus, LLLT reperfusion during heart failure post-infarction remains to be determined.

reduction of oxidative stress. Although these results are exciting, there are study limitations that must be clarified before a clinical trial of LLLT.

## 5. Conclusion

Data showing a beneficial role of LLLT in the cardiac remodeling after infarction are almost always from rodent studies. A reduction in infarct size is a major finding. On the other hand, there are few studies that analyze LLLT effects in the cardiac remodeling during heart failure progress. The conceivable LLLT cardioprotection may be mediated by an improvement in cellular bioenergetics, increased angiogenesis, and

## Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors are grateful to American Manuscript Editors by writing English assistance and proof reading the article.

Table 3  
Cellular and molecular mechanisms linked to cardioprotective role of the low-level laser therapy.

References	Inflammatory markers	Angiogenesis	Oxidative stress	Bioenergetic
[18]	↓ Inflammatory cells			
[17]				
[33]		↑ Blood vessels	↑ HSP70	
[35]				
[19]			↑ CAT (dog)	↓ Troponin-T (dog) ↓ Mitochondrial injury (rat) ↑ ATP (rat)
[34]		↑ Blood vessels ↑ Endothelial cells		
[32]		↑ VEGF ↑ Blood vessels	↑ iNOS	
[29]		↑ VEGF ↑ Capillary density	↑ SOD ↓ MDA	
[26]	↑ FKN ↑ GM-CSF			
[31]				
[27]	↓ IL-6 plasma ↑ IL-10 plasma and muscle ↓ TNF-alpha and IL-6 muscle			
[30]			↓ SOD ↑ MDA	
[22]	↓ Receptors B1 mRNA ↑ Receptor B2 mRNA ↓ IL1β and IL-6 mRNA	↔ VEGF ↔ Capillaries	↓ iNOS ↑ eNOS ↑ Nox Plasma	
[28]			↓ SOD gastrocnemius muscle ↔ GPX soleus muscle and plasma	

↔ DCFH plasma and muscles

Inflammatory cells; Blood vessels; HSP70, heat shock protein; CAT, catalase; Mitochondrial injury; ATP, adenosine triphosphate; blood vessels; endothelial cells; VEGF, vascular endothelial growth factors; FKN, fractalkine; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; iNOS, inducible nitric oxide; eNOS, endothelial nitric oxide; NOx, nitrite/nitrate concentration; SOD, superoxide dismutase; MDA, malondialdehyde; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; TNF-alpha, transforming growth factor alpha; IL1β, interleukin 1 beta; t3:21 GPx, glutathione peroxidase; DCFH<sub>2</sub>, 2',7'-Dihydrodichlorofluoresceinoxidation; receptors B1, kinin B1 receptor; receptor B2, kinin B2 receptor. ↑ increase; ↓ decrease; ↔ no significant difference.



## References

- [1] B. Swynghedauw, Molecular mechanisms of myocardial remodeling, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 215–262.
- [2] C. Mittmann, T. Eschenhagen, H. Scholz, Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure, *Cardiovasc. Res.* 39 (1998) 267–275.
- [3] C.W. Yancy, M. Jessup, B. Bouillon, J. Butler, D.E. Casey, M.H. Drazner, G.C. Fonarow, S.A. Geraci, T. Horwich, J.L. Januzzi, 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines, *JACC* 62 (2013) e147–e239.
- [4] K. Weber, Y. Sun, R. Guntaka, Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair, *Dialog. Cardiovasc. Med.* 4 (1999) 3–19.
- [5] D.B. Sawyer, D.A. Sivik, L. Xiao, D.R. Pimentel, K. Singh, W.S. Colucci, Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (2002) 379–388.
- [6] S. Kunapuli, S. Rosanio, E.R. Schwarz, “how do cardiomyocytes die?” Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes, *J. Card. Fail.* 12 (2006) 381–391.
- [7] G. Hasenfuss, Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy, *Cardiovasc. Res.* 39 (1998) 60–76.
- [8] F.J. Giordano, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 500–508.
- [9] A. Deten, H.C. Vols, W. Brist, H.-G. Zimmer, Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats, *Cardiovasc. Res.* 55 (2002) 329–340.
- [10] R.D.A. Barros, M.P. Okoshi, A.C. Cicogna, Beta-adrenergic pathway in healthy and hypertrophied hearts, *Arq. Bras. Cardiol.* 72 (1999) 649–656.
- [11] D. Spiegelstein, C. Kim, Y. Zhang, G. Li, R.D. Weisel, R.-K. Li, T.M. Yau, Combined transmyocardial revascularization and cell-based angiogenic gene therapy increases transplanted cell survival, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H3311–H3316.
- [12] M.F. Piepoli, U. Corra, W. Benzer, B. Bjarnason-Wehrens, P. Dendale, D. Gaita, H. McGee, M. Mendes, J. Niebauer, A.-D.O. Zwieler, Secondary prevention through cardiac rehabilitation: from knowledge to implementation. A position paper from the Cardiac Rehabilitation Section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 17 (2010) 1–17.
- [13] F. Arslan, R.C. Lai, M.B. Smeets, L. Akeroyd, A. Choo, E.N. Aguor, L. Timmers, H.V. van Rijen, P.A. Doevendans, G. Pasterkamp, Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury, *Stem Cell Res.* 10 (2013) 301–312.
- [14] H.P.S.C. Group, MRC/BHF heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial, *Lancet* 360 (2002) 23–33.
- [15] I. Sirenko, S. Savitskiĭ, S. Krasitskiĭ, A. Shabliyanov, L. Popova, The use of low-intensity laser irradiation of the blood in myocardial infarction, *Sov. Med.* 3 (1989) 18–21.
- [16] I. Korochkin, A. Kartel'shev, G. Babushkina, G. Kapustina, Combined helium-neon laser therapy in patients with ischemic heart disease, *Kardiologiia* 30 (1990) 24–28.
- [17] U. Oron, T. Yaakobi, A. Oron, G. Hayam, L. Gepstein, O. Rubin, T. Wolf, S.B. Haim, Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation, *Lasers Surg. Med.* 28 (2001) 204–211.
- [18] P. Whittaker, M.J. Patterson, Ventricular remodeling after acute myocardial infarction: effect of low-intensity laser irradiation, *Lasers Surg. Med.* 27 (2000) 29–38.
- [19] U. Oron, T. Yaakobi, A. Oron, D. Mordehovits, R. Shofti, G. Hayam, U. Dror, L. Gepstein, T. Wolf, C. Haudenschild, Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs, *Circulation* 103 (2001) 296–301.
- [20] M.A. Pfeiffer, J.M. Pfeiffer, M.C. Fishbein, P.J. Fletcher, J. Spadaro, R.A. Kloner, E. Braunwald, Myocardial infarct size and ventricular function in rats, *Circ. Res.* 44 (1979) 503–512.
- [21] P. Anversa, C. Beghi, V. Levicky, S.L. McDonald, Y. Kikkawa, Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by strenuous exercise in rat, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 243 (1982) H856–H861.
- [22] M.T. Marchini, A.J. Serra, R. dos Santos Feliciano, E.T. Santana, E.L. Antonio, P.T.C. de Carvalho, J. Montemor, R.O. Crajonas, A.C.C. Girardi, P.J.F. Tucci, J.A. Silva Jr., Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy, *PLoS ONE* 9 (2014), e101270.
- [23] M.P. Silva, F. Bortone, M.P. Silva, T.R. Araújo, M.S. Costa, J.A. Silva Júnior, Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikrein mRNA by low level laser therapy in a rat paw edema model, *Rev. Bras. Fis.* 15 (2011) 1–7.
- [24] P.V. Peplow, T.-Y. Chung, G.D. Baxter, Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies, *Photomed. Laser Surg.* 30 (2012) 118–148.
- [25] F. Mafrá de Lima, M. Costa, R. Albertini, J. Silva, F. Aimbire, Low level laser therapy (LLLT): Attenuation of cholinergic hyperactivity,  $\beta_2$ -adrenergic hyporesponsiveness and TNF- $\alpha$  mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF- $\kappa$ B dependent mechanism, *Lasers Surg. Med.* 41 (2009) 68–74.
- [26] Z. Yang, Y. Wu, H. Zhang, P. Jin, W. Wang, J. Hou, Y. Wei, S. Hu, Low-level laser irradiation alters cardiac cytokine expression following acute myocardial infarction: a potential mechanism for laser therapy, *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 391–398.
- [27] V.S. Hentschke, R.B. Jaenisch, L.A. Schmeing, P.R. Cavinato, L.L. Xavier, P. Dal Lago, Low-level laser therapy improves the inflammatory profile of rats with heart failure, *Lasers Med. Sci.* 28 (2013) 1007–1016.
- [28] M. Biasibetti, D.B. Rojas, V.S. Hentschke, D.J. Moura, M. Karsten, C.M. Warumacher, J. Saffi, P. Dal Lago, The influence of low-level laser therapy on parameters of oxidative stress and DNA damage on muscle and plasma in rats with heart failure, *Lasers Med. Sci.* 29 (2014) 1895–1906.
- [30] H. Zhang, J.F. Hou, Y. Shen, W. Wang, Y.J. Wei, S. Hu, Low level laser irradiation precondition to create friendly milieu of infarcted myocardium and enhance early survival of transplanted bone marrow cells, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 1975–1987.
- [31] J. Yang, Z. Huang, Y. Zhou, S. Gai, F. Zhu, R. Lv, X.E. Fa, Effect of low-level laser irradiation on oxygen free radicals and ventricular remodeling in the infarcted rat heart, *Photomed. Laser Surg.* 31 (2013) 447–452.
- [32] H. Tuby, L. Maltz, U. Oron, Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart, *Lasers Surg. Med.* 43 (2011) 401–409.
- [33] H. Tuby, L. Maltz, U. Oron, Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 682–688.
- [34] T. Yaakobi, Y. Shoshany, S. Levkovits, O. Rubin, S.A.B. Haim, U. Oron, Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion injury in the rat heart, *Appl. Phys.* 90 (2001) 2411–2419.
- [35] N. Mirsky, Y. Krispel, Y. Shoshany, L. Maltz, U. Oron, Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation, *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002) 785–790.
- [36] N. Ad, U. Oron, Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 80 (2001) 109–116.
- [37] B. Ibanez, C. Macaya, V. Sánchez-Brunete, G. Pizarro, L. Fernández-Friera, A. Mateos, A. Fernández-Ortiz, J.M. García-Ruiz, A. García-Álvarez, A. Iñiguez, J. Jiménez-Borreguero, P. López-Romero, R. Fernández-Jiménez, J. Goicolea, B. Ruiz-Mateos, T. Bastante, M. Arias, J.A. Iglesias-Vázquez, M.D. Rodríguez, N. Escalera, C. Acebal, J.A. Cabrera, J. Valenciano, A. Pérez de Prado, M.J. Fernández-Campos, I. Casado, J.C. García-Rubira, J. García-Prieto, D. Sano-Rosa, C. Cudrás, R. Hernández-Antolin, A. Albarrán, F. Fernández-Vázquez, J.M. de la Torre-Herrández, S. Pocock, G. Saruz, V. 380 Fuster, Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the ef-382 effect of metoprolol in cardioprotection during an acute myocardial infarction (METOCARD-CNIC) trial, *Circulation* 128 (2013) 1495–1503.
- [38] G.S. Francis, Pathophysiology of chronic heart failure, *Am. J. Med.* 110 (2001) 37–46.
- [39] J.W. Holmes, T.K. Borg, J.W. Covell, Structure and mechanics of healing myocardial infarcts, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7 (2005) 223–253.
- [40] L.A. Zornoff, S.A. Paiva, D.R. Duarte, J. Spadaro, Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications, *Arq. Bras. Cardiol.* 92 (2009) 157–164.
- [41] S. Farivar, T. Malekzadeh, R. Shari, Biological effects of low level laser therapy, *391 J. Lasers Med. Sci.* 5 (2014) 58.
- [42] N.D. Roe, J. Ren, Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases, *Vasc. Pharmacol.* 57 (2012) 168–172.
- [43] T. Kempf, K.C. Wollert, Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy, *395 BioEssays* 26 (2004) 608–615.
- [44] A.A. Santos, I. Helber, R.L. Flumignan, E.L. Antonio, A.C. Carvalho, A.A. Paiva, P.J. Tucci, V.A. Moises, Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction, *J. Card. Fail.* 15 (2009) 163–168.
- [45] R.M. Kanashiro, R.M. Saraiva, A. Alberta, E.L. Antonio, V.A. Moisés, P.J. Tucci, Immediate functional effects of left ventricular reduction: a Doppler echocardiographic study in the rat, *J. Card. Fail.* 12 (2006) 163–169.