



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ICBIM
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RAYSSA COELHO CUNHA GUETLER

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ALFA-ACTINA
E PCNA EM CORAÇÕES DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS OU NÃO
COM ALISQUIRENO.**

UBERLÂNDIA

2018

RAYSSA COELHO CUNHA GUETLER

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ALFA-ACTINA
E PCNA EM CORAÇÕES DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS OU NÃO
COM ALISQUIRENO.**

Trabalho de conclusão de curso graduação apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal do Uberlândia como requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

UBERLÂNDIA

2018

RAYSSA COELHO CUNHA GUETLER

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ALFA-ACTINA
E PCNA EM CORAÇÕES DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS OU NÃO
COM ALISQUIRENO.**

Trabalho de conclusão de curso graduação apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade
Federal do Uberlândia como requisito obrigatório para a
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva
(Orientador - UFU)

Profa. Dr. Karen Renata Nakamura Hiraki
(Examinadora - UFU)

Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves
(Examinadora - UFU)

Uberlândia, 15 de Fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por guiar os meus passos e permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Fátima e Pedro, que mesmo com a distância, sempre me apoiaram nas minhas decisões e nunca mediram esforços para me ajudar durante toda essa jornada. Mesmo com a saudade falando mais alto, foi graças a vocês, este sonho pode se tornar realidade.

À minha irmã, Rayane, que mesmo de longe, sempre me aconselhava nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva, por repassar todo o conhecimento, tanto na prática no laboratório, quanto aos ensinamentos da vida.

À professora Dr. Ana Paula Coelho Balbi, por ajudar na realização dos experimentos e ceder o laboratório de Fisiologia para realização dos mesmos, e à professora Dr. Karen Renata Nakamura Hiraki, por emprestar o laboratório de Histologia para realização dos cortes histológicos, juntamente com o auxílio de sua orientanda Stephany Yasmine Andrade.

Aos meus amigos, em especial Ingrid Moraes, Juliana Milan, Hannah Bizinoto, Vinicius Fernandes, Amanda Freitas, Katryn Lima, Yann Keller e Fernanda Busnardo, por serem como uma família para mim e me apoiarem durante estes quatro anos.

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é ocasionado por alterações metabólicas na insulina, através de defeitos na secreção e/ou na ação da mesma, sendo capaz de provocar danos em diversos órgãos. Um destes órgãos é o coração, que pode apresentar alterações cardiovasculares decorrentes dessa doença. Tendo em vista essa característica, temos como objetivo analisar a expressão de alfa-actina do músculo liso (α -SMA) e de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), além da hipertrofia cardíaca nos corações de ratos controle (tratados com salina), ratos diabéticos (induzidos por aloxano) e ratos diabéticos tratados com alisquireno (um inibidor de renina). Foi observada um aumento na glicemia de ratos tratados com aloxano (diabéticos), quando comparados aos tratados com salina (controle). Não foram observadas alterações de escore de células expressando α -SMA entre os grupos analisados. As células que expressam PCNA apresentaram diferença significativa quando comparado o grupo controle aos grupos diabético e diabético alisquireno. Além disso, a relação peso/coração apresentou alterações significativas ao comparar o grupo controle aos demais grupos, que é característica de uma hipertrofia cardíaca. Podemos concluir que após noventa dias de indução do DM1 pelo aloxano, o coração apresenta em estágios iniciais de miocardiopatia diabética, sugerido pela hipertrofia cardíaca, diminuição da expressão de células PCNA e ausência de alterações de células que expressam α -SMA.

Palavras chave: α -SMA, cardiomiopatia diabética, diabetes, hipertrofia compensatória e PCNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVO	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 ANIMAIS	13
4.2 AVALIAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA	14
4.3 PROCESSAMENTO	14
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	14
4.4.1 α -SMA	14
4.4.2 PCNA	15
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
5. RESULTADOS	17
5.1 GLICEMIA	17
5.2 AVALIAÇÃO DA HIPETROFIA CARDÍACA	17
5.3 CELULAS α -SMA ⁺	18
5.4 CÉLULAS PCNA ⁺	19
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é resultado de alterações metabólicas ocasionadas por defeito na secreção ou na ação da insulina, ou em ambos, que irão resultar em um quadro de hiperglicemia. Esta doença crônica pode provocar danos em diversos órgãos como os olhos, os rins e o coração. Além disso, os danos podem aparecer no sistema nervoso e em vasos sanguíneos. A maioria dos casos de diabetes se divide em duas categorias, o DM tipo 1 (DM1), o qual é causado por uma deficiência total na secreção de insulina, e o DM tipo 2 (DM2), que ocorre por resistência à ação da insulina e pela produção compensatória inadequada (DIABETES CARE, 2010). O DM atualmente atinge a população mundial em cerca 387 milhões de pessoas, estima-se que até 2035 a população com DM chegará em 471 milhões de indivíduos. No Brasil, no ano de 2014 estimou-se que havia 11,9 milhões de pessoas portadoras de DM; acredita-se que até 2035 esta doença alcançará 19,2 milhões de indivíduos (SBD, 2015-2016).

Segundo a American Heart Association (2015) o DM é um dos sete fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Os adultos que possuem DM têm de duas a quatro vezes mais chances de morrer por doenças cardíacas quando comparados a indivíduos não portadores da doença. O DM é responsável por um grande espectro de doenças cardiovasculares, e suas principais complicações surgem devido a disfunções endoteliais, oxidação, inflamação e remodelação vascular que irão contribuir para a aterogênese (MARWICK, et al. 2005). O dano endotelial ocorre porque as células endoteliais não conseguem controlar negativamente o transporte de glicose, quando essas são expostas a hiperglicemia extracelular. As alterações nos microvasos acarretam déficits funcionais, como variações no fluxo sanguíneo e maior permeabilidade vascular, fazendo com que ocorra uma modificação estrutural nos microvasos, perda dos pericitos capilares e com que a membrana basal capilar fique espessa, além de provocar a formação de microaneurismas (AGUIAR, et al. 2007). O estresse oxidativo irá provocar o aumento dos níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo também inibir a proliferação celular, fazendo com que a senescência celular se inicie, o que posteriormente levará à morte celular. Além disso, o estresse oxidativo irá comprometer a proliferação e a mobilização de células-tronco. (KHAN, et al. 2011).

Dados de estudos que empregaram modelos animais de DM1 sugerem que a cardiomiopatia diabética caracteriza-se por: morte celular, hipertrofia compensatória, deposição de fibras de colágeno na matriz extracelular e disfunção ventricular

(FIORDALISO et al, 2000; HUYNH et al, 2010; RUSSO e FRANGOIANNIS, 2016). Assim, em um estudo apresentado por Fiordaliso e colaboradores (2000), apontou uma perda significativa de miócitos em modelos de DM insulino-dependente, o que promove uma vulnerabilidade nestes corações para desenvolvimento de doenças cardíacas. Foi observada uma redução na medida do ventrículo esquerdo, 4 semanas após a administração de estreptozotocina (droga que provoca citotoxicidade em células β -pancreáticas), que foi associado ao aumento no volume de células sobreviventes, apresentando assim uma hipertrofia reativa, para compensar a perda de células. O mecanismo de morte celular associada ao DM1 é a apoptose dos cardiomiócitos (FIORDALISO et al, 2000; ARES-CARRASCO et al, 2009). A hiperglicemia estimula a proliferação de fibroblastos, promovendo desta forma a diferenciação de miofibroblastos e ativando a transcrição de proteínas na matriz extracelular. Na cardiomiopatia diabética ocorrem alterações estruturais e funcionais dos cardiomiócitos, podendo levar a doenças diastólicas no ventrículo esquerdo e/ou disfunções sistólicas (FIORDALISO et al, 2000; RUSSO e FRANGOIANNIS, 2016).

Actinas são proteínas presentes em células eucarióticas, que possuem funções de adesão, motilidade, contração muscular, divisão celular e manutenção da morfologia celular. As isoformas dos tipos teciduais dessa proteína são: α -actina de músculo estriado esquelético, α -actina cardíaca (expressa em músculo estriado cardíaco), α -actina de músculo liso e γ -actina de músculo liso (ambas expressas em musculatura lisa vascular e não vascular) (MARTINEZ, 2008).

A alfa-actina do músculo liso (α -SMA) é um marcador de diferenciação de miofibroblastos, por exemplo (HINZ, et al. 2001). Estudos realizados em ratos com DM induzido por estreptozotocina, mostraram que o aumento na deposição de colágeno nos corações destes animais, ocorreu concomitantemente ao aumento na expressão de α -SMA. Os mecanismos envolvidos na fibrose associada à cardiomiopatia diabética estão sendo pouco a pouco, elucidados. Quando animais portadores de DM1 são tratados com ácido alfa-lipóico (ácido graxo de cadeia curta), tanto a expressão de α -SMA como a fibrose miocárdica são atenuadas. Essas observações indicam que o estresse oxidativo em corações de ratos diabéticos pode contribuir para diferenciação de miofibroblastos com o aumento de colágeno do tipo I e III, o que irá resultar em uma remodelação cardíaca (LI, et al. 2012).

Os mastócitos podem produzir fatores de crescimento e proteases que estão envolvidos com a fibrose cardíaca em modelos de infarto do miocárdio (RUSSO et al. 2017). Dados

ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram um aumento na população mastocitária cardíaca em animais portadores de DM 1, fenômeno que antecede a fibrose miocárdica. Ainda, o tratamento dos animais DM1 com alisquireno, um inibidor de renina, impediu o aumento da densidade mastocitária cardíaca. Apesar do papel dos mastócitos na fisiopatologia da cardiomiopatia ser desconhecido, os dados citados anteriormente apontam para uma possível participação desse tipo celular (VASCONCELOS, 2017).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um polipeptídio ácido com peso molecular de cerca de 36 kD encontrado em todas as espécies eucarióticas. Foram descobertas diversas funções para esse antígeno, como atuar na replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), remodelação da cromatina, reparo do DNA e controle do ciclo celular. Mas somente depois de um tempo, as pesquisas mostraram que os níveis de expressão de PCNA estão associados à proliferação celular ou à transformação neoplásica (STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011). A ciclina é uma proteína que ocasiona o aumento da proliferação celular e que é idêntico ao PCNA. A ação de PCNA durante o ciclo celular foi investigada em diversos estudos, que apontaram o aumento da expressão deste antígeno durante o final da fase G1 ou em estágios iniciais da fase S do ciclo celular. O PCNA, dessa forma, foi estabelecido como marcador para células em proliferação (KURKI, et al., 1986). Diversas proteínas estão envolvidas no processo de regulação do ciclo celular, incluindo ciclinas e quinases ciclinas dependentes, as quais são responsáveis por regular a transição das fases do ciclo celular: G1, fase em que as células crescem de tamanho e preparam-se para divisão; S, fase em que ocorre a duplicação do genoma; G2, fase onde as células analisam a conclusão da replicação do DNA e preparam-se para dividir; e fase M onde acontecem a mitose. Ainda, a expressão de PCNA se altera em diferentes doenças cardíacas, sendo, portanto, um marcador de alterações patológicas nesse órgão (ARBUSTINI et al., 1993).

O sistema renina-angiotensina (SRA) contribui na homeostase do sistema cardiovascular. A renina é formada no rim, mais especificamente nas células juxtaglomerulares, através de um precursor inativo denominado pró-renina. Para formação da renina ativa ocorre a remoção do pró-peptídeo. A renina é responsável por clivar o angiotensinogênio, formando a angiotensina I (ANG I). A ANG I através da enzima conversora de angiotensina (ECA) é transformada em angiotensina II (ANG II) que se liga ao receptor AT1, tendo como consequência o aumento da pressão arterial (PA) (RIBEIRO 2006; GOESSLER, 2012). O alisquireno é um inibidor de renina, este se liga

ao sítio ativo da pró-renina e da renina bloqueando a enzima, reduzindo assim a formação de ANG II (GOESSLER 2012; MARTINS 2008). Segundo Russo e colaboradores (2016), os níveis de ANG II e densidade de receptores AT1 apresentavam-se elevados em modelos experimentais de DM tipos 1 e 2. A inibição da ECA também diminui ANG II e provoca diminuição na fibrose cardíaca. Por fim, sugere-se que os efeitos profibróticos da ANG II no DM são mediados pela estimulação de receptores AT1 (MASUDA et al. 2012). Desta forma, o uso do alisquireno pode contribuir para diminuir os efeitos profibróticos da ANG II.

2. JUSTIFICATIVA

As alterações cardíacas ocasionadas pelo DM são de grande importância para a saúde pública, visto que a mortalidade por doenças cardíacas encontra-se aumentada em portadores dessa doença. Assim, entender a fisiopatologia da cardiomiopatia diabética é crucial para a definição de tratamentos específicos e adequados para a mesma.

3. OBJETIVO

Avaliar a expressão imunoistoquímica de α -SMA e de PCNA, bem como o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, em corações de ratos não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com alisquireno, 90 dias após a indução do DM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, com peso de 200 a 300 gramas. Os animais foram adquiridos do CBEA (Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU) e mantidos no Biotério de Animais da Área de Ciências Fisiológicas (BIODARF), em caixas com maravalha, em estantes climatizadas com temperatura de 22°C, com ração e água *ad libitum* em um ciclo claro-escuro de 12 horas. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob protocolo de nº 122/11 (em anexo).

O DM foi induzido pela administração de aloxano (Sigma-Aldrich), um análogo tóxico da glicose, que é captado pelo transportador de glicose do tipo GLUT-2, o qual está presente em células beta pancreáticas, ocasionando a necrose destas células, fazendo então com que a secreção endógena de insulina seja abolida, característica de DM do tipo 1. Após um período de jejum absoluto de 24 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália) solução a 2,5% na dosagem de 25 mg/Kg, administrado por via intraperitoneal. Posteriormente, foi administrado intravenosamente utilizando-se a veia peniana, 50 mg/kg de aloxano (em solução à 0,9 % de NaCl). A glicemia capilar foi aferida 24 horas após a indução, através de um glicosímetro (Accu Check Active, Roche), sendo considerados diabéticos os animais que apresentavam glicemia maior que 200 mg/dL. Os animais portadores de DM do tipo 1 foram submetidos à insulinoaterapia (1 unidade em dias alternados por via subcutânea) com insulina NPH (Humulin N[®], Lilly). Esse procedimento tinha como objetivo manter os animais em um quadro hiperglicêmico, porém, minimizando a alta mortalidade causada pela exacerbação deste quadro, comum com o modelo DM empregado neste presente estudo.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória nos seguintes grupos:

Grupo 1: Controles (ND) – não diabéticos (N=05);

Grupo 2: Diabéticos (DB) – com DM sem tratamento (N=06);

Grupo 3: Alisquireno (DB+ALQ) – com DM tratados com inibidor de renina (50 mg/Kg/dia, por 90 dias, administrado por gavagem) (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2012) (N = 08).

Os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália) e seus corações foram coletados, pesados e fixados em methacarn e incluídos em parafina para análise

morfológica. Após a coleta dos corações foi realizado a eutanásia nos animais por aprofundamento da anestesia.

4.2 AVALIAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA.

A hipertrofia cardíaca foi inferida pelos valores de peso relativo do coração (peso do órgão em mg/peso do animal em g).

4.3 PROCESSAMENTO

Os cortes histológicos foram realizados em um micrótomo (Leica), obtidos em uma espessura de 4 μ m, a partir dos corações emblocados em parafina, para colagem das lâminas. Posteriormente foram realizados ensaios imuno-histoquímicos para α -SMA e PCNA com as lâminas e análise em microscópio óptico, com aumento de 400x para as lâminas de α -SMA e 100x para lâminas de PCNA.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.4.1 α -SMA

As lâminas foram colocadas em três banhos de Xilol, durante cinco minutos em cada banho, para que pudesse ser realizada a eliminação da parafina do corte histológico. Os cortes foram então hidratados durante 5 minutos com álcool 100%, 4 minutos em álcool 95% e 1 minuto em álcool 75%. Após a hidratação dos cortes realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando uma solução que continha 169 mL de água destilada, 2 mL de azida sódica 10% e 2 mL de água oxigenada 30%, as lâminas permaneceram nesta solução por 10 minutos para que o bloqueio pudesse ser realizado. Posteriormente estas foram lavadas com PBS (Tampão fosfato salino) por 5 minutos.

O anticorpo primário utilizado nesta imuno-histoquímica, foi o monoclonal anti-alfa-actina. Foram então utilizados 1 μ L deste anticorpo primário e 999 μ L de solução PBS + BSA (albumina sérica bovina) 1% (1:1000). A solução de anticorpo primário foi adicionada em cima dos cortes que permaneceram por incubação em uma cuba úmida na geladeira, incubação overnight.

No segundo dia os cortes foram lavados em PBS I e II por 5 minutos em cada. Posteriormente foi preparada a solução de anticorpo secundário biotinizado, utilizando 5 µL de anticorpo secundário biotinizado (anti IgG de camundongo) e 995 µL de PBS + BSA 1% (1:200). A solução foi adicionada aos cortes e estes foram incubados mais uma vez, por 30 minutos em uma cuba úmida na temperatura ambiente. Mais uma vez os cortes foram lavados em PBS I durante 5 minutos e PBS II por 5 minutos.

O complexo Avidina-Biotina foi realizado com 500 µL de PBS + BSA 1%, adicionando 7,5 µL de Avidina e 7,5 µL de Biotina, a solução foi, então, adicionada aos cortes que novamente foram incubados por 30 minutos em cuba úmida na temperatura ambiente e depois lavadas com PBS I e PBS II por 5 minutos em cada solução.

Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em uma solução de DAB (diaminobenzidina) de 13,4 mL, que foi incubada em 146 mL de Tris-HCl, e 600 µL de água oxigenada 3% a 37°C. Foram então lavadas com água destilada por 2 minutos e realizada uma contra-coloração, em que as lâminas foram mergulhadas em corante metilgreen por 1 minuto, passadas duas vezes em etanol 95%, uma vez em etanol 100%, depois foram mergulhadas em Xilol IV por 1 minuto, Xilol V por 2 minutos e Xilol VI por 2 minutos. As lâminas foram então montadas com permount e laminulas. Após a montagem foram analisadas em microscópio óptico, com aumento de 400x. A contagem foi realizada através de escore, sendo o escore 0: de 0 a 5% do campo analisado apresentava alfa-actina, escore 1: de 5 a 25% do campo, escore 2: 25 a 50%, escore 3: 50 a 75% e escore 4: 75 a 100%, dividido pela quantidade de campo presente.

4.4.2 PCNA

Para realização da imuno-histoquímica de PCNA, também foram realizadas lavagens em Xilol I, Xilol II e Xilol III, durante 5 minutos em cada banho para a eliminação da parafina do corte histológico. Posteriormente os cortes foram hidratados por 5 minutos com álcool 100%, 4 minutos em álcool 95% e 1 minuto em álcool 75%. Foi realizada, então, o bloqueio da peroxidase endógena, composta pela mesma solução de bloqueio de peroxidase utilizada para imuno-histoquímica de α -SMA, as lâminas foram mantidas nesta solução por 10 minutos e, então, lavadas com PBS por 5 minutos.

A reação com o anticorpo primário (PCNA) foi realizada com uma solução de 999 µL de PBS + BSA 1% e 1 µL de anticorpo primário anti-PCNA (1:1000). Esta solução foi colocada em cima dos cortes e o anticorpo primário ficou em incubação por um período

de 30 minutos em cuba úmida na temperatura ambiente. Depois do período de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS I por 5 minutos e posteriormente com PBS II por 5 minutos.

Para realização da reação com anticorpo secundário biotinado foi preparada uma solução de 398 μ L de PBS + BSA 1% e 2 μ L de anticorpo secundário biotinado (anti IgG de camundongo), a solução foi adicionada aos cortes e estes permaneceram em incubação por 30 minutos em cuba úmida na temperatura ambiente, posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS I e PBS II por 5 minutos em cada solução.

O complexo avidina-biotina foi preparado, da mesma forma que na imunohistoquímica de α -SMA, e este foi adicionado aos cortes que foram incubados novamente por 30 minutos em uma cuba úmida em temperatura ambiente. Foram então lavados em PBS I durante 5 minutos e PBS II por 5 minutos.

Assim como os cortes de α -SMA, os cortes de PCNA foram mergulhadas por 10 minutos em uma solução de DAB. Foram lavados em água destilada por 2 minutos e as lâminas foram mergulhadas em corante metilgreen por 1 minuto, passadas duas vezes em etanol 95%, uma vez em etanol 100%, depois foram mergulhadas em Xilol IV por 1 minuto, Xilol V por 2 minutos e Xilol VI por 2 minutos. As lâminas foram montadas da mesma forma que as lâminas de α -SMA, com permount e lamínulas. Os cortes foram então analisados em microscópio óptico, com aumento de 100x. A contagem foi realizada através do número de células presentes, dividida pela quantidade de campo presente.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-8 animais. Os parâmetros foram analisados empregando-se a ANOVA com pós-teste de Tukey com o auxílio do software GraphPad Prism® Version 6.00. As diferenças foram consideradas significativas quando p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 GLICEMIA

Os animais nos quais foram administrados aloxano, tanto de 24 hora, quanto 90 dias após o tratamento, apresentaram glicemia significativamente maior do que aquela dos animais não diabéticos: ND (tratados com salina). (Figura 1).

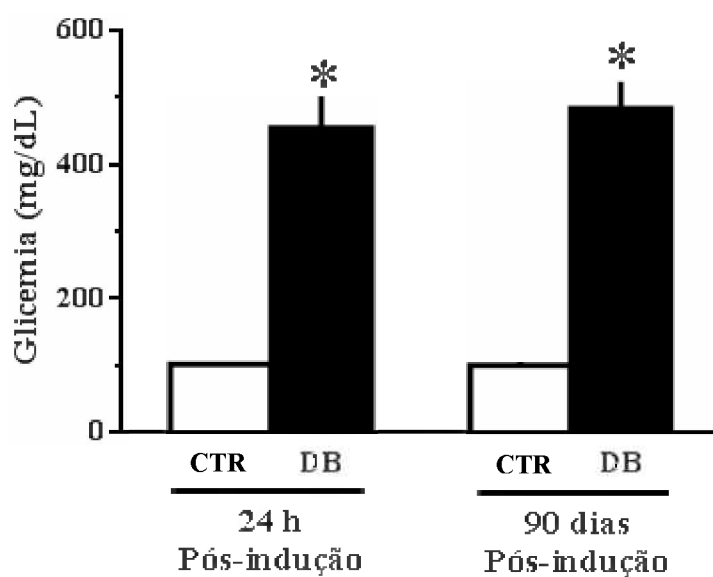


Figura 1: Glicemia dos animais tratados com salina (não diabéticos: ND n= 5) ou aloxano (diabéticos: DB n= 8), 24 horas ou 90 dias após o tratamento. *p<0,05 vs. ND (Teste t-Student).

5.2 AVALIAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Quando comparado o peso relativo do coração em mg/g o grupo diabético (DB) e o grupo diabético tratado com alisquireno (DB + ALQ), apresentaram um aumento significativo, quando comparados com o grupo controle.

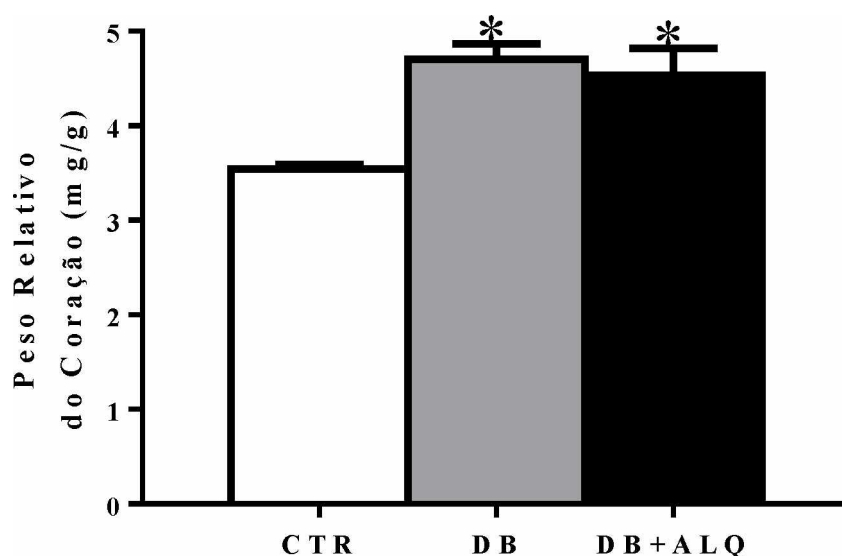
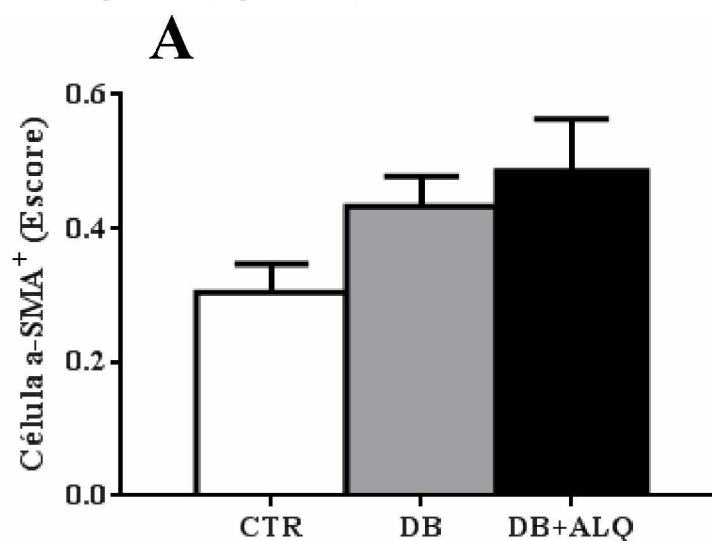


Figura 2: Peso relativo do coração (mg/g) de ratos controles (CTR), diabéticos (DB) e diabéticos tratados com alisqureno (DB+ALQ). n = 5-8. * p<0,05 vs. controle (ANOVA/Tukey).

5.3 CELULAS α -SMA⁺

Através da análise das lâminas que foram realizadas imuno-histoquímica para α -SMA, a quantidade de escore α -SMA⁺ no ventrículo direito não foi significativa no grupo diabético (DB), tanto quanto o grupo diabético tratado com alisqureno (DB + ALQ), quando comparado com o grupo controle (CTR), tratados com salina (Figura 2: A). Assim como no ventrículo esquerdo. (Figura 2: B).



B

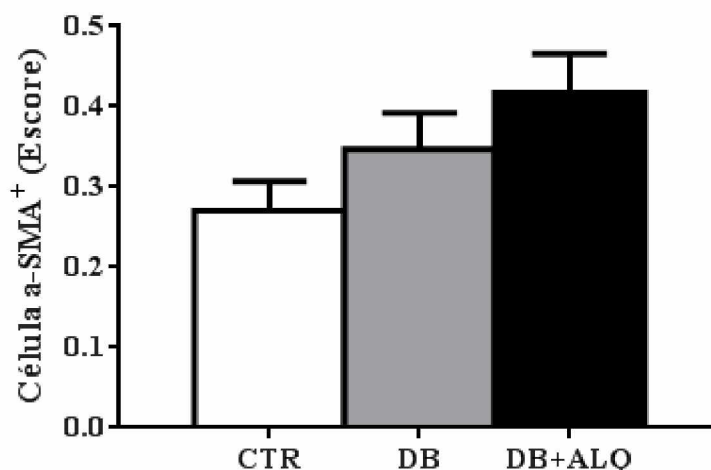


Figura 3: Escore de células α -SMA⁺ de acordo com o ventrículo considerado (A) direito e (B) esquerdo. Nenhuma diferença significativa foi observada; n= 5-8. CTR = animais controle não diabéticos; DB = animais diabéticos; DB+ALQ = animais diabéticos tratados com alisquireno; n = 5-8. Nenhuma alteração significativa foi observada ($P > 0,05$; ANOVA).

5.4 CÉLULAS PCNA⁺

Através da análise das lâminas que foram realizadas imuno-histoquímica para PCNA, a quantidade de células PCNA⁺ no ventrículo direito foi significativamente menor no grupo diabético tratado com alisquireno (DB + ALQ) quando comparado com o grupo controle (CTR), tratados com salina. (Figura 3: A). Já no ventrículo esquerdo, tanto o grupo diabético (DB), quanto o grupo diabético tratado com alisquireno (DB + ALQ) apresentaram quantidade menor de células PCNA⁺, quando comparado com o grupo controle (CTR) (Figura 3: B). Figura 4 apresenta a fotomicrografia das células PCNA⁺ no ventrículo direito. Figura 4 A, pertence ao grupo controle e a figura 4 B ao grupo diabético tratado com alisquireno. Figura 5 apresenta células PCNA⁺ no ventrículo esquerdo, sendo a 5 A grupo controle, 5 B grupo diabético e 5 C grupo diabético tratado com alisquireno.

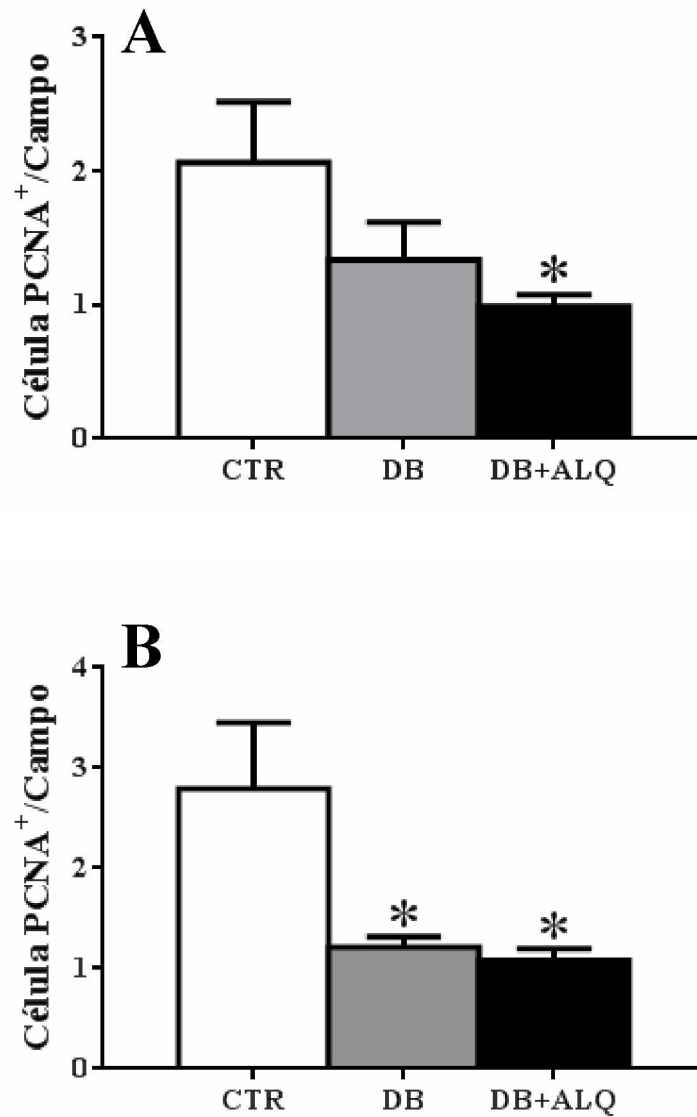


Figura 4: Células PCNA⁺ por campo de acordo com o ventrículo considerado (A) direito, grupo DB+ALQ (animais diabéticos tratados com alisquireno) apresenta diferença significativa quando comparados com o grupo CTR (animais controle não diabéticos); e (B) ventrículo esquerdo, grupos DB (animais diabéticos) e DB+ALQ (animais diabéticos tratados com alisquireno), apresentam diferença significativa quando comparados com o grupo CTR (animais controle não diabéticos); n = 5-8. *p<0,05 vs. controle (ANOVA/Tukey);

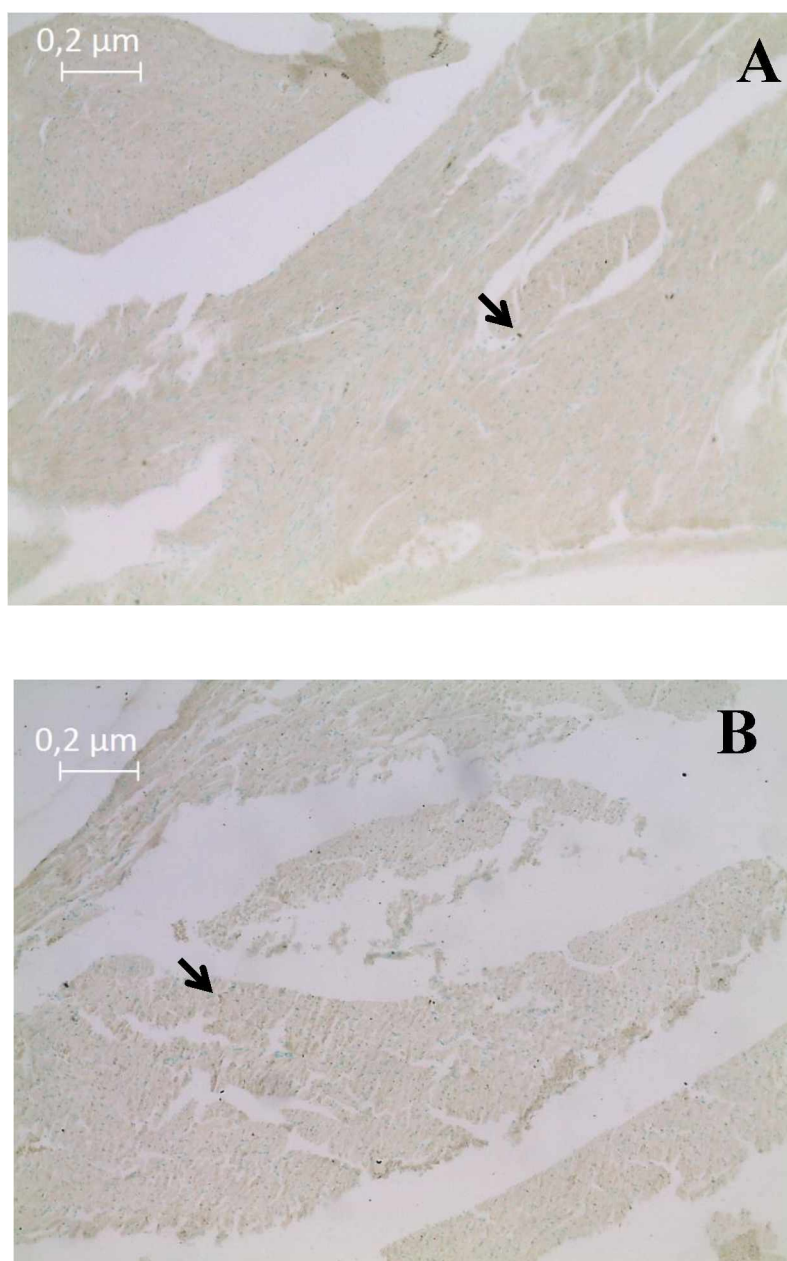


Figura 5: Fotomicrografia de secções representativas do ventrículo direito de corações de ratos controles (A), diabéticos tratados com alisquireno (B). As setas indicam as células de PCNA⁺. Aumento 100x.

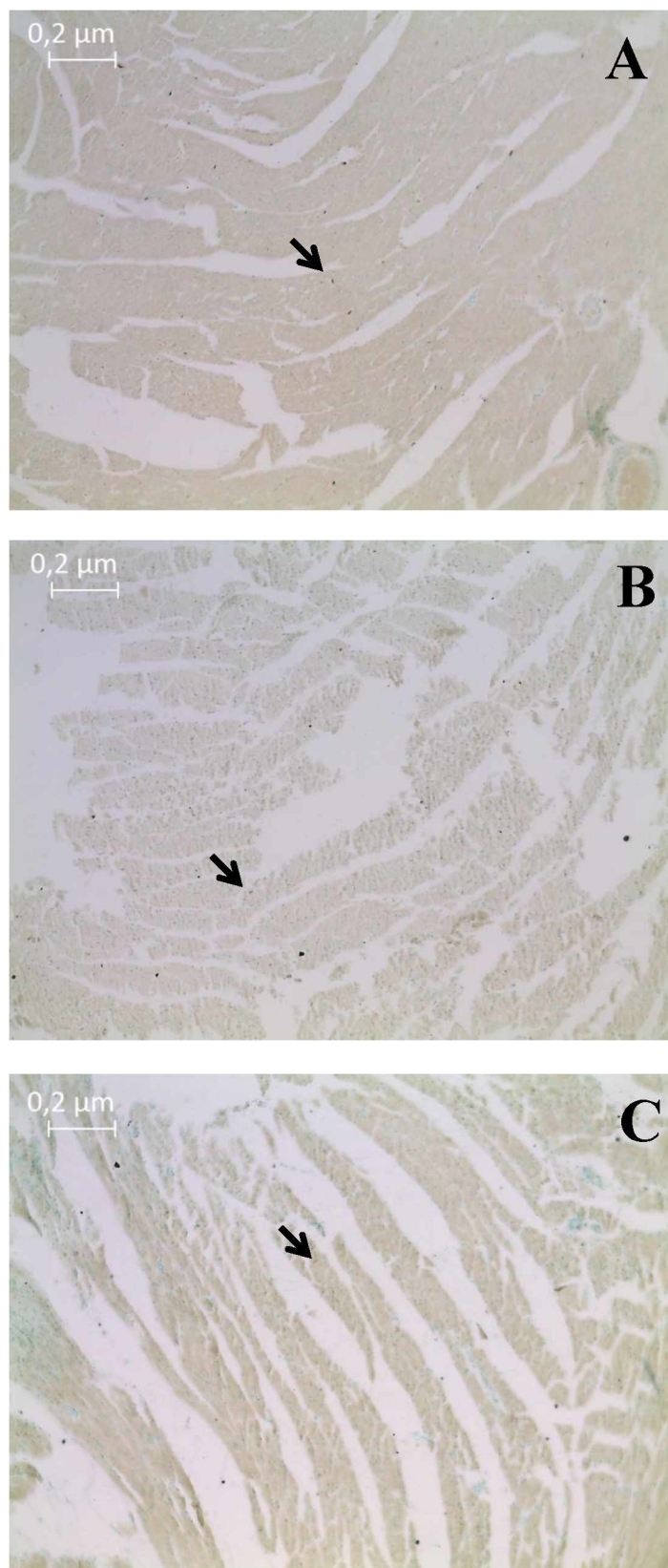


Figura 6: Fotomicrografia de secções representativas do ventrículo esquerdo de corações de ratos controles (A), diabéticos (B) e diabéticos tratados com alisquireno (C). As setas indicam as células de PCNA⁺.

6. DISCUSSÃO

Li e colaboradores (2010) observaram um aumento significativo na deposição de fibras de colágeno e na expressão de RNAm (RNA mensageiro) para α -SMA nos corações dos animais portadores de DM1. Esses dados sugerem que há uma relação entre a fibrose miocárdica e o aumento na expressão de α -SMA. Nesse sentido, Russo e colaboradores (2016) relataram que durante o remodelamento cardíaco, os fibroblastos passam a expressar proteínas contrateis como a α -SMA, sendo denominados, portanto, de miofibroblastos. Masuda e colaboradores (2012) observaram que ratos espontaneamente diabético (DM2), portadores da doença há 8 semanas, não apresentaram aumento significativo na deposição de fibras de colágeno no coração, diferentemente dos acometidos há 16 semanas, os quais apresentaram fibrose miocárdica quando comparados aos controles não diabéticos. O fato de não termos detectado um aumento significativo na população de células α -SMA⁺ em nosso estudo pode estar relacionado, portanto, ao tempo após a indução do DM no qual os corações foram analisados, ou seja, 90 dias (aproximadamente 13 semanas). Esses dados corroboram com observações prévias do nosso laboratório que evidenciaram ausência de fibrose significativa nos corações de ratos diabético 90 dias após a indução da doença com aloxano (VASCONCELOS, 2017).

Apesar da expressão de PCNA ser muito baixa em coração saudável, diferentes doenças estão associadas a aumentos na expressão cardíaca dessa proteína (ARBUSTINI et al., 1993). Como os cardiomiócitos adultos não se dividem, o aumento na expressão de cardiomiócito PCNA⁺ indica renovação do DNA miocárdico, a qual é influenciada por estímulos inflamatórios ou hipertróficos (ARBUSTINI et al., 1993). Contudo, o tecido cardíaco conta com células passíveis de sofrerem mitose, como fibroblastos e músculo liso vascular, de forma que alterações gerais na expressão de células PCNA⁺ podem denotar proliferação nesses tipos celulares.

Como o DM1 determina alterações patológicas no coração, esperar-se-ia um aumento na expressão de células PCNA⁺, contrariamente ao que observamos no presente estudo. Contudo, uma característica importante do miocárdio de animais portadores de DM é o aumento de células em apoptose, observado tanto em estágios iniciais da doença, como em longo prazo (FIORDALISO et al., 2002; ARES-CARRASCO et al., 2009). Nesse sentido, a literatura relata que há uma relação inversa entre a expressão de células PCNA⁺ e aquelas que estão em apoptose em diferentes tecidos (KAIXIONG et al., 2000; MERESMAN et al., 2010). Em corações de ratos com DM2 observa-se um aumento no

número de capilares PCNA⁺ na 8^a semana após a instalação da doença, que se normaliza na 16^a semana; os capilares de corações obtidos na oitava semana apresentam um número normal de células em apoptose, por outro lado, capilares de corações de animais portadores há 16 semanas apresentam um aumento na ocorrência de apoptose. Assim, nos capilares de corações de animais com DM1, quando a apoptose aumenta, a expressão de PCNA se normaliza e vice-versa. Dessa forma, uma possível explicação para a nossa observação é a de que, no período avaliado, haja prevalência de processos apoptóticos, inclusive de cardiomiócitos; como essas células não se dividem, mas podem expressar PCNA, um aumento na morte celular em uma condição não associada a incrementos na proliferação de outros elementos, pode causar uma diminuição geral na quantidade de células PCNA⁺. Corrobora com essa interpretação o fato de não termos detectado, ainda, aumentos no número de células α -SMA⁺ (as quais representariam um dos possíveis elementos celulares em proliferação no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética). Ainda, a hipótese de morte celular está de acordo com nossa observação de aumento no peso relativo do coração, o qual sugere hipertrofia miocárdica. A hipertrofia pode ter se instalado como mecanismo compensatório ao aumento da morte e perda celulares. Cabe ressaltar que essa hipótese deve ser investigada através de técnicas específicas para marcação de célula em apoptose, como o TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Do ponto de vista molecular, a estimulação de receptores AT1 parece ser a responsável pelo aumento no número de células em apoptose nos corações de animais com DM2 (FIORDALISO et al., 2000; MASUDA et al., 2012). No sistema renina-angiotensina clássico, a primeira etapa é representada pela geração de angiotensina I a partir do angiotensinogênio pela ação da renina; a angiotensina I é então convertida à angiotensina II pela ação ECA, atuando, por sua vez, nos receptores para angiotensina, como o receptor AT1. Assim, considerando a hipótese apresentada acima, esperar-se-ia que o tratamento com alisquireno pudesse impedir o aumento na indução de apoptose associada ao DM1 e, portanto, reverter as alterações na expressão cardíaca de PCNA. Contudo, o referido inibidor de renina não alterou o número de células PCNA⁺ nos corações de ratos portadores de diabetes no período avaliado. Uma via alternativa para a geração dos principais peptídeos do sistema renina-angiotensina no coração (i.e., Ang I e Ang II) é representada pela formação de angiotensina 1-12 (Ang₁₋₁₂; Ang I-Leu-Tyr, em ratos – a sequência depende da espécie) pela ação de enzimas diferentes da renina sobre o

angiotensinogênio (FERRARIO et al., 2009). A Ang1-12 sofre a ação de enzimas como a quimase e a ECA, gerando Ang I e Ang II (NAGATA et al., 2006; PROSSER et al., 2009). Assim, a inibição da renina pode não ser suficiente para diminuir os níveis intramiocárdicos de Ang II, em decorrência da via alternativa supracitada, o que explicaria a ausência de efeito desse inibidor sobre a expressão de PCNA. Ainda, o tratamento de animais portadores de DM2 com um antagonista AT1 sugere que a estimulação desse receptor também medeia a hipertrofia cardíaca associada ao DM (MASUDA et al., 2012), contudo, o tratamento com alisquireno não impediu o desenvolvimento de hipertrofia, como sugerem os dados de peso relativo do coração. Essa observação reforça nossa sugestão de que a inibição da renina não é suficiente para alterar os níveis cardíacos de Ang II.

7. CONCLUSÃO

Noventa dias após a indução do DM1 pela administração de aloxano, o coração apresenta-se em estágio inicial da miocardiopatia diabética, como sugerido pela presença de hipertrofia cardíaca e diminuição na expressão de célula PCNA⁺ na ausência de alterações de células α -SMA⁺. Esses dados corroboram observações prévias do nosso grupo com relação à ausência de fibrose miocárdica em animais portadores de DM1 no período considerado. O tratamento com inibidor de renina não modifica significativamente as alterações observadas no início da instalação da cardiomiopatia diabética.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.; VILELA, N.; BOUSKELA. A microcirculação no diabetes: implicações nas complicações crônicas e tratamento da doença. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, 2007.

AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2015.

ARBUSTINI, E. et al. Expression of Proliferating Cell Markers in Normal and Diseased Human Hearts. **The American Journal Of Cardiology**, v. 72, 1993.

ARES-CARRASCO, S.; PICATOSTE, B.; et al. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2009.

FERRARIO, C. et al., Differential regulation of angiotensin $-(1-12)$ in plasma and cardiac tissue in response to unilateral nephrectomy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 269, 2009.

FIORDALISO, F.; LI, B.; LATINI, R. et al, Myocyte Death In Streptozotocin-Induced Diabetes In Rats Is Angiotensin II- Dependent. **Laboratory Investigation**, v. 80, 2000.

GOESSLER, et al. Inibidor Direto da Renina e Hipertensão Arterial: uma revisão. **Revista Brasileira de Cardiologia**. V. 25, 2012.

HINZ, B.; CELLETA, G.; TOMASEK, J. et al. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, 2001.

HUYNH, K.; MCMULLEN, J.; JULIUS, T. et al. Cardiac-Specific IGF-1 Receptor Transgenic Expression Protects Against Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction in a Mouse Model of Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 59, 2010.

KAIXIONG, T. et al., The Relationship between Apoptosis and the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen and the Clinical Stages in Gastric Carcinoma. **Journal of Tongji Medical University**, v.20, 2000.

KHAN M.; AKHTAR, S.; MOHSIN, S. et al. Growth Factor Preconditioning Increases the Function of Diabetes-Impaired Mesenchymal Stem Cells. **Stem cells and development**, v. 20, 2011.

KURKI, P. et al. Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)/Cyclin during the Cell Cycle. **Experimental Cell Research**, v. 166, 1986.

LI, C. et al. Cardiac Fibrosis And Dysfunction In Experimental Diabetic Cardiomyopathy Are Ameliorated By Alpha-Lipoic Acid. **Cardiovascular Diabetology**, v.11, 2012.

LI, J. et al. Deficiency of Rac1 Blocks NADPH Oxidase Activation, Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress, and Reduces Myocardial Remodeling in a Mouse Model of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 59, 2010.

- MARTINS-OLIVEIRA, A. et al. Contrasting Effects of Aliskiren Versus Losartan on Hypertensive Vascular Remodeling. **International Journal of Cardiology**, v.167, 2012.
- MARTINEZ, E. Estudo da Expressão Da α - Actina De Músculo Liso em Cultura de Células de Poupas Dentárias e Gengivais Humanas Tratadas Com Fator de Transformação De Crescimento- β 1 (TGF- β 1). **São Paulo**, 2008.
- MARTINS, et al. Tratamento medicamentoso do paciente com hipertensão de difícil controle. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 15, 2008.
- MARWICK, T. Diabetic heart disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 84, 2005.
- RUY, L; OLIVEIRA, M; LINS, D. et al. Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes. **A.C. Farmacêutica**, 2016.
- MASUDA, T. et al. Heart angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy suppresses coronary angiogenesis and progresses diabetic cardiomyopathy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, 2012.
- MERESMAN, G. et al., Apoptosis is increased and cell proliferation is decreased in out-of-phase endometria from infertile and recurrent abortion patients. **Biology and Endocrinology**, v. 8, 2010.
- NAGATA, S. et al. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible componente of renin-angiotensin system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.350, 2006.
- PROSSER, H. et al. Cardiac chymase converts rat proAngiotensin-12 (PA12) to angiotensin II: effects of PA12 upon cardiac haemodynamics. **Cardiovascular Research**, v. 82, 2009.
- RIBEIRO, et al. Inibidores da renina – uma nova classe de hipertensivos. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v.13, 2006;
- RUSSO, I.; FRANGOGIANNIS, N. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 90, 2016.
- STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, 107, 2011.
- VASCONCELOS, R. Caracterização da fibrose e da população mastocitária cardíacas em ratos diabéticos: efeito do alisquireno. **Uberlândia**, 2017.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 228/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 122/11

Projeto Pesquisa: "Efeitos do Bloqueio Triplo Experimental do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona no Desenvolvimento da Nefropatia Diabética".

Pesquisador Responsável: Ana Paula Coelho Balbi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE À CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 14 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU