Christiane Malfitano

**Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos em cultura frente à
hipóxia: papel de diferentes concentrações de glicose**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia
Irigoyen

São Paulo

2009

Christiane Malfitano

**Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos em cultura frente à
hipóxia: papel de diferentes concentrações de glicose**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia
Irigoyen

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Malfitano, Christiane

Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos em cultura frente à hipóxia: papel de diferentes concentrações de glicose / Christiane Malfitano. -- São Paulo, 2009.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria Cláudia Irigoyen.

Descritores: 1.Fibroblastos 2.Infarto do miocárdio 3.Hiperglicemia 4.Hipóxia celular 5.Apoptose 6.Fibrose 7.Citocinas inflamatórias

USP/FM/SBD-441/09

Este trabalho foi desenvolvido e realizado no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração – InCor da FMUSP, em colaboração com o Laboratório de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBI) da USP.

“Dedico esta tese aos meus familiares, tesouro, a razão da minha vida, minha alegria, por todo amor e fortaleza que puderam compreender minha decisão de seguir um sonho em fazer ciência. A todos que amo incondicionalmente, por orgulho de ter completado mais esta jornada com muita dedicação, minha gratidão eterna.”

AGRADECIMENTOS

Deus, por poder vivenciar tantas experiências e ter força para vencer as dificuldades.

A meu querido sobrinho e afilhado **João Victor**, e a **Maria** por ter vindo contemplar as nossas vidas com alegria.

Aos meus **queridos e verdadeiros amigos** pelo apoio nos momentos difíceis me incentivando a continuar na ciência, orgulhando em dizer que teriam uma amiga doutora.

À **Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen**, pela grande compreensão e dedicação constante, dando confiança e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo ensinamento e amor à fisiologia.

À **Profa. Dra. Kátia De Angelis**, hoje professora e pesquisadora da Universidade São Judas Tadeu, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Hipertensão Experimental, e aprender através de seu exemplo.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor pela amizade, incentivo e troca de idéias: **Aline, Celso, Cristiano, Edson, Geórgia, Ivana, Janaína, Leandro, Luciana, Pamella, Raquel Nitrosi**.

As minhas grandes amigas, **Mariana Pazzine e Karin Flues**, pela amizade, força e atenção nos momentos de desabafo, sempre com palavras de carinho. Amizade que levarei para vida toda.

Ao **Dr. Bruno Rodrigues**, as **doutorandas Raquel Sirvente e Silvia Beatriz de Souza**, pela amizade, apoio técnico e discussões científicas.

A **Profa. Dra. Silvia Lacchini** pela amizade e colaboração nas análises histológicas, doando seu tempo com ensinamentos nas discussões científicas.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em especial ao **Prof. Dr. Rui Curi** quem abriu as portas do seu Laboratório de Fisiologia Celular acreditando em minha hipótese e dando total suporte técnico e científico: sua ajuda foi de extremo valor ao meu crescimento científico.

A **Dra. Tatiana C Alba Loureiro**, por ser minha tutora no laboratório do Prof. Rui Curi, pessoa quem me ensinou a metodologia realizada em bancada com destreza, atenciosa e prestativa, incentivando-me nos momentos difíceis, com críticas construtivas e palavras de sabedoria. Seu profissionalismo me servirá de exemplo à vida toda.

A **Dra. Cláudia Lagranha**, que apesar da distância, me auxiliou na montagem do projeto, incentivando-me e esclarecendo dúvidas no nível profissional junto a Dra. Tatiana, hoje está trilhando seu caminho brilhantemente.

Apoio financeiro: Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina – USP e
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio.....	3
1.2. Papel cardioprotetor da hiperglicemia.....	6
1.3. Fatores de morte e sobrevida celular.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Avaliações <i>in vitro</i>	20
3.1.1. Cultura de fibroblastos cardíacos.....	20
3.1.2. Tratamento de glicose.....	21
3.1.3. Padronização da hipóxia celular.....	22
3.1.4. Avaliação do processo de apoptose.....	23
3.1.4.1. Viabilidade celular	24
3.1.4.2. Fragmentação de DNA.....	24
3.1.4.3. Externalização de fosfatidilserina.....	24
3.1.5. Expressão do VEGF.....	25
3.2. Avaliações <i>in vivo</i>	26
3.2.1. Animais	26
3.2.2. Indução do diabetes.....	27
3.2.3. Infarto do miocárdio.....	28
3.2.4. Função cardíaca: sistólica e diastólica.....	29
3.2.5. Expressão das citosinas.....	31
3.2.6. Expressão gênica	32

3.2.6.1. Síntese do DNA complementar (RT-PCR).....	32
3.2.6.2. PCR em tempo real (real time).....	33
3.2.7. Atividade da caspase 3.....	36
3.2.8. Expressão dos transportadores de glicose (GLUTs tipo 1 e 4).....	36
3.2.9. Histologia tecidual e morfometria.....	37
3.3. Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Resultados dos experimentos <i>in vitro</i>	41
4.1.1. Análise de viabilidade celular.....	41
4.1.2. Análise de fragmentação DNA.....	43
4.1.3. Análise de externalização de fosfatidilserina.....	46
4.1.4. Expressão do fator de crescimento vascular (VEGF).....	48
4.2. Resultados dos experimentos <i>in vivo</i>	50
4.2.1. Avaliações metabólicas.....	50
4.2.2. Avaliações ecocardiográficas.....	50
4.2.2.1. Tamanho do infarto do miocárdio.....	50
4.2.2.2. Avaliação da função cardíaca	51
4.2.3. Expressão de citocinas.....	53
4.2.4. Expressão de genes de apoptose.....	55
4.2.5. Expressão de fatores de sobrevivência: HIF1- α , IL-8r e VEGFa.....	57
4.2.6. Atividade da caspase- 3.....	59
4.2.7. Expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4 e GLUT-1).....	60
4.2.8. Análises histológicas.....	62
4.2.8.1. Densidade capilar.....	62
4.2.8.2. Escore de fibrose.....	64
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos.....	67
5.2. Avaliações metabólicas.....	69
5.3. Avaliações ecocardiográficas.....	70

5.4.	Avaliação das citocinas inflamatórias.....	72
5.5.	Fatores de sobrevivência celular: participação da apoptose e angiogênese.....	73
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	77
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

Bax – proteína indutora de morte por apoptose (pró-apoptótica)

Bcl-2 – “*B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-2*”

Bcl-2 e Bcl-xl - proteínas repressoras de morte por apoptose (antiapoptóticas)

BSA - albumina de soro bovino

C – grupo controle

CO₂ – gás carbônico

CT – ciclo/temperatura

D - grupo diabético

I – grupo infartado

DI- grupo diabético infartado

DMEM – “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”

DNA (c) – ácido desoxirribonucléico (fita complementar)

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

EPM – erro padrão da média

Fas - proteína indutora de apoptose (via extrínseca)

FBS - soro fetal bovino

FE - fração de ejeção

FS - fração de encurtamento

GAPDH – “*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*”

GLUT 1 - transportador de glicose tipo 1

GLUT 4 - transportador de glicose tipo 4

HIF1- α – fator-1 induzível por hipóxia, subunidade alfa

Hipo - Hipóxia

I – grupo infartado

IL- interleucina

IL-1 β - interleucina 1 beta

IM - infarto do miocárdio

ms - milissegundos

N₂ - nitrogênio

O₂ - oxigênio

pb - pares de base

PBS - tampão fosfato/salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PI - iodeto de propídio

r (s) – receptor (s)

RNA – ácido ribonucleico

RT – transcriptase reversa

STZ - estreptozotocina

TDE - tempo de desaceleração do pico E

TNFRs - superfamília de receptores: fator de necrose tumoral

TNF α - fator de necrose tumoral - alfa

TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico

UA – unidades arbitrárias

VE – ventrículo esquerdo

VEGF (a) – fator de crescimento endotelial vascular (tipo a)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Avaliação do percentual de sobrevivência dos animais dos grupos: C: grupo controle; D: grupo diabético; MI: grupo infartado; DMI: grupo diabético infartado (Rodrigues, 2008).....15
- Figura 2.** Câmara incubadora modular.....22
- Figura 3.** Modelo de ligadura da artéria coronária.....29
- Figura 4.** Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da viabilidade celular de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região M1 dos histogramas corresponde ao número de células viáveis e a região M2, às células não viáveis. Na abscissa está representado a fluorescência emitida pelo iodeto de propídio e na ordenada uma unidade de contagem arbitrária. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. À direita dos gráficos de dispersão (C) estão apresentadas as porcentagens de M1 e M2.....41
- Figura 5.** Percentagem de células viáveis por análise de citometria de fluxo avaliadas em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média $\pm$ EPM.....42
- Figura 6.** Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da fragmentação de DNA de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2, às células com DNA fragmentado. Na abscissa está representado a fluorescência do iodeto de propídio e na ordenada uma unidade de contagem arbitrária. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. À direita dos gráficos, (C) estão apresentadas as porcentagens de M1 e M2.....43
- Figura 7.** Percentagem de células fragmentadas por análise de citometria de fluxo avaliadas em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média $\pm$ EPM.....45
- Figura 8.** Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da externalização de fosfatidilserina de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região LR dos quadrantes corresponde ao número de células que possui a fosfatidilserina externalizada. Na abscissa está representada a fluorescência emitida pela anexina V-FITC e na ordenada a fluorescência emitida pelo iodeto de propídio. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. Em (C) estão apresentadas as porcentagens dos quadrantes.....46

Figura 9. Expressão do VEGF no sobrenadante dos meios de cultura avaliada por ELISA, em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média $\pm$ EPM..... 49

Figura 10. Percentagem de perímetro do VE acinético ou discinético, nos animais dos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), em 24 h e aos 15 dias de IM de oclusão coronariana. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. \$ $p \leq 0,05$ quando comparado ao DI 24h; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I (24h e 15 dias) (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....51

Figura 11. Expressão de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) no VE por ELISA. Dados apresentados normalizados pela proteína total do VE, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....55

Figura 12. Expressão de p53 (A), Bax (B), Fas (C) e Bcl-2 (D) no VE por RT-PCR. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....57

Figura 13. Expressão do HIF1- α (A), IL-8br (B) e VEGFa (C) por RT-PCR. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....59

Figure 14. Atividade da caspase-3 por espectrofluorimetria, mensurada por unidades relativas de luz (URLs) a cada 02min30seg totalizando 32min30seg até platô. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....60

Figura 15. Expressão protéica do GLUT-4 (A) e GLUT-1 (B) por *Western-blotting*. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....62

Figura 16. Densidade de capilar por análise histológica. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....63

Figura 17. Escore de Fibrose por análise histológica. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de <i>primers</i> (S: <i>sense</i> ; AS: <i>anti-sense</i>), temperaturas (temp) de anelamento e comprimentos dos fragmentos (frag) dos genes estudados.....	35
Tabela 2 - Percentagem de células viáveis por análise de citometria de fluxo.....	42
Tabela 3 - Percentagem de células com DNA fragmentado por análise de citometria de fluxo.....	45
Tabela 4 - Percentagem de células com anexina V-FITC e PI positivas por análise de citometria de fluxo.....	47
Tabela 5 – Expressão do VEGF avaliada por ELISA (pg/ml).....	49
Tabela 6 – Função sistólica avaliada por ecocardiograma.....	52
Tabela 7 – Função diastólica avaliada por ecocardiograma.....	53
Tabela 8 – Expressão de citosinas avaliadas por ELISA.....	54
Tabela 9 – Expressão dos genes do processo apoptótico avaliadas por PCR em tempo real.....	56
Tabela 10 – Expressão dos genes de sobrevida celular avaliada por PCR em tempo real.....	58
Tabela 11 – Expressão protéica dos transportadores de glicose avaliada por <i>Western-blotting</i> em unidades arbitrárias (UA).....	60

RESUMO

Malfitano C. *Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos em cultura frente à hipóxia: papel de diferentes concentrações de glicose [Tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Estudos mostram que a exposição ao meio hiperglicêmico ou diabetes protege o coração contra insultos patológicos, incluindo isquemia. A ativação de fatores anti-apoptóticos e proliferativos parece estar envolvida com esta cardioproteção. Este estudo foi desenhado para investigar a modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia tratados previamente com meio hiperglicêmico, e os efeitos de 15 dias de infarto do miocárdio (IM) na função ventricular em ratos diabéticos sobre os fatores de morte e sobrevivência celular. Foram utilizados ratos Wistar machos e as análises foram realizadas no ventrículo esquerdo. Para as análises “in vitro”, os fibroblastos cardíacos foram obtidos por digestão enzimática (tripsina/colagenase), e cultivados em dois meios: baixa Glicose (5mM) e alta Glicose (25mM análogo ao plasma diabético). As células confluentes (80%) foram submetidas à hipóxia por incubadora modular com gás (5,6% de CO₂ e 94,4% de N₂); após as células foram mantidas em estufa a 37°C por 6; 12; 24; 48 e 72hs. Experimentos de citometria de fluxo foram realizados para análise da viabilidade celular e fragmentação de DNA, ambas para verificação de apoptose e confirmadas pelas medidas de AnexinaV/FITC/IP. A expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi medida no sobrenadante dos meios por ELISA. Para as análises “in vivo”, os ratos foram divididos (N=8/grupo) em grupos: controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético infartado (DI). Quinze dias após a indução do diabetes ou não, com injeção de estroptozotocina (50mg/Kg) ou tampão citrato, os

grupos I e DI foram submetidos à ligadura da artéria coronária. Após 15 dias de IM e/ou 30 de diabetes, a função cardíaca (sistólica e diastólica) foi analisada por ecocardiograma, além da avaliação do tamanho do IM em 24 horas e 15 dias. As citocinas inflamatórias foram medidas por ELISA, a expressão gênica dos fatores de morte e sobrevivência celular foram avaliados por PCR em tempo real, a atividade da caspase 3 foi medida por espectrofluorimetria, e a expressão protéica dos transportadores de glicose (GLUT) por Western – blotting. A densidade capilar e a fibrose do coração foram quantificadas por análise histológica. A viabilidade celular mostrou homogeneidade em todos os tempos de hipóxia e em ambos os tratamentos de glicose. Em 6 horas verificamos fragmentação do DNA com marcação dos fosfolípidos de membrana (apoptose) e % elevada de morte em ambos os tratamentos até 12hs. Após 24hs, ocorreu adaptação, havendo aumento de VEGF e diminuição da fragmentação do DNA com 48hs; após 72hs, observou-se apenas que o VEGF continuava aumentado. No meio hiperglicêmico, os valores de VEGF estavam maiores e a fragmentação menor quando comparados ao meio hipoglicêmico. O grupo DI apresentou melhora na função sistólica (fração de ejeção e de encurtamento), acompanhada de manutenção da função diastólica (tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de desaceleração do pico E), redução de 36% do tamanho do IM, redução das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), com ativação da apoptose (expressão aumentada de Fas, p53, Bax e atividade de caspase 3) e aumento dos fatores de sobrevivência celular (Bcl-2, HIF-1 α , VEGFa e IL8r). Além disso, o grupo DI apresentou aumento do GLUT-1 com diminuição do escore de fibrose e aumento da densidade capilar; resultados comparados ao grupo I. Este cenário é, provavelmente, um mecanismo de compensação, associado ao saldo positivo entre genes regulatórios relacionados com a sobrevivência celular programada,

redução de citocinas inflamatórias, aumento da utilização de glicose como substrato energético, redução da fibrose e angiogênese. Em conjunto, estes achados sugerem uma maior plasticidade e resistência celular de fibroblastos cardíacos frente à hipóxia sendo esta favorecida pela hiperglicemia crônica em ratos diabéticos.

Descritores: Fibroblastos, Infarto do miocárdio, Hiperglicemia, Hipóxia celular, Apoptose, Fibrose, Citocinas inflamatórias

ABSTRACT

Malfitano C. *Modulation of the viability of cardiac fibroblasts in culture against hypoxia: role of different concentrations of glucose [Thesis].* Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2009.

Studies showed that exposure to hyperglycemia or diabetes protects the heart against pathological insults, including ischemia. The activation of anti-apoptotic factors and proliferation seem to be involved in this cardioprotection. This study was designed to investigate the feasibility of modulation of hyperglycemic-environment pretreated-cardiac fibroblasts subjected to hypoxia, and the effects of 15 days of myocardial infarction on ventricular function in diabetic rats and on the causes of death and cell survival. Male Wistar rats were used and the analyses were performed in the left ventricle. For “in vitro” experiments, cardiac fibroblasts were obtained by enzymatic digestion (trypsin/collagenase) and they were cultivated in two different mediums: Low Glucose (5mM) and High Glucose (25mM similar to diabetic plasma). Confluent cells (80%) were subjected to hypoxia by modular incubator with gas (5.6% CO₂ and 94.4% N₂).at 37 ° C for 6, 12, 24, 48 and 72h. Flow cytometry was employed to the analysis of cell viability and DNA fragmentation, both for verification of apoptosis process and confirmed by AnnexinV / FITC / IP. The expression of vascular growth factor (VEGF) was measured in the supernatant medium by ELISA. For “in vivo” experiments, the rats were divided (N = 8/group) in control (C), diabetic (D), infarcted (I) and diabetic infarcted (DI).groups After 15 days of induction of diabetes by streptozotocin (50mg/kg) or citrate buffer, the I and DI groups underwent coronary artery ligation.

After 15 days of myocardium infarction (MI) and/or 30 of diabetes, cardiac function (systolic and diastolic) was analyzed by echocardiogram, as well as the size of infarction at both, 24 hours and 15 days. The inflammatory cytokines were measured by ELISA, the gene expression of factors for death and cell survival by real-time PCR, the activity of caspase 3 by spectrofluorimetry, the protein expression of glucose transporters (GLUT) by Western- blotting and, lastly, capillary density and fibrosis by histological analysis. Cell viability showed homogeneous at all times of hypoxia and in both glucose treatments. In 6 hours we found DNA fragmentation in the main phospholipid membrane (apoptosis) and high % of death in both treatments until 12 hours. After 24 hours, the cells entered into adaptation and after 48 hours it was verified an increase in VEGF expression and a decrease in DNA fragmentation. At 72 hours, no significant differences in the fragmentation were observed; however, there was an increase in VEGF expression. In the hyperglycemic medium we observed higher values of VEGF expression and less DNA fragmentation when compared to the hypoglycemic medium. In the DI group systolic function (% ejection fraction and fractional shortening) was better than in the I group and it was accompanied by the maintenance of diastolic function (IVRT and deceleration time of peak E). There was also a 36% reduction in infarction size in the DI group and reduced pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) with activation of apoptosis (increased expression of Fas, p53, Bax and caspase 3 activity) and increased cell survival factors (Bcl-2, HIF-1 α , VEGF and IL8r). Moreover, DI rats also showed an increase in GLUT-1 with decreased scores of fibrosis and increased capillary density when compared to the I group. This scenario is probably a compensatory mechanism associated with the positive balance of regulatory genes related to programmed cell survival, reduction of inflammatory cytokines,

increased use of glucose as energy substrate, reduction of fibrosis and angiogenesis. Altogether, these findings suggest a greater plasticity and cellular resistance of cardiac fibroblasts to hypoxia and this is favored by chronic hyperglycemia in diabetic rats.

Descriptors: Fibroblasts, Myocardial infarction, Hyperglycemia, Cell hypoxia, Apoptosis, Fibrosis, Cytokines

1. INTRODUÇÃO

O advento e a popularização de novas metodologias ao longo das duas últimas décadas vêm possibilitando um enorme avanço no conhecimento das bases moleculares de processos biológicos complexos. Uma das conseqüências imediatas deste processo é a unificação progressiva dos vários ramos da biologia experimental, permitindo que, atualmente, biologia celular, bioquímica, genética e fisiologia se desenvolvam de maneira indistinta através de abordagens experimentais fundamentais. Esta revolução nas ciências básicas está nos permitindo identificar e caracterizar, do ponto de vista estrutural, sistemas biológicos que até o momento permaneciam não elucidados.

A prevalência de diabetes mellitus tipo-2 está aumentando no ocidente e os estudos epidemiológicos mostram que existe uma maior incidência de infarto do miocárdio (IM) e conseqüentemente desenvolvimento de insuficiência cardíaca em 20-35% dos pacientes diabéticos (Jagasia e McNulty, 2003). De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO, 2005), a prevalência da população diabética nos países do continente americano poderá chegar a 64 milhões até o ano de 2025. No Brasil estes números devem alcançar as cifras de 11,6 milhões até a mesma data.

1.1. Remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio

Tradicionalmente, o coração tem sido visto como um órgão estático incapaz de reparação de qualquer tipo de dano, sendo considerado um órgão pós-mitótico, sem capacidade de regeneração frente a um episódio de lesão. Isso explicaria ao menos parcialmente do ponto de vista fisiopatológico, a grande prevalência de insuficiência cardíaca, já que o coração não seria capaz de reparar ou regenerar os cardiomiócitos em processo de morte celular (Rubart e Field, 2006). Entretanto, o coração humano tem uma capacidade de auto-reparo ou regeneração após IM, quando a perda irreversível do músculo leva a uma fibrose do miocárdio resultando em uma cicatriz. Assim sendo, a descoberta da existência de um “pool” de populações de células progenitoras com potencial de diferenciação muda a visão tradicional de que o coração é estático (Martin-Puig, et al., 2008).

A lesão tecidual do IM provoca a perda de cardiomiócitos funcionais, seguida de uma fibrose que se estabelece de forma irreversível e progressiva. A soma destes dois fatores leva cronicamente, além do prejuízo sintomático, às alterações na geometria ventricular ou remodelamento. Essas alterações são definidas como uma série de variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função cardíaca, com perda progressiva da função ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Na fase inflamatória e na fase de formação do granuloma, há um marcante aumento na produção de citocinas e de fatores de crescimento (Vandervelde, et al., 2005).

Os cardiomiócitos que sobrevivem à isquemia podem ativar a expressão de genes fetais promovendo uma hipertrofia celular, como tentativa de preservar a função tecidual, sendo esta uma circunstância fisiológica que limita a capacidade mitótica de reparo do miocárdio isquêmico, que pode ser substituído por tecido fibrótico, tendo como resultado depressão da função cardíaca. Nesse processo, ocorre um crescimento dos fibroblastos, que são células determinantes da estrutura e função do miocárdio, contribuindo para as características bioquímicas, mecânicas e elétricas da função cardíaca, e para a reorganização da matriz extracelular (Mackenna, et al., 2000; Long e Brown, 2002; Sun, et al., 2002).

Os mecanismos endógenos de preservação do tecido cardíaco após IM tem sido alvo de vários estudos nos quais diversos fatores cardioprotetores são recrutados no processo de remodelamento, porém a manutenção desta cardioproteção depende de um balanço positivo entre os fatores de sobrevivência e morte celular. Experimentalmente, observa-se que este balanço pode ser positivo após isquemia/reperfusão (IR) em animais experimentais (Zhao, et al., 2009). Breves episódios de IR antes da isquemia prolongada resultam em um pré-condicionamento isquêmico, que protege o coração de uma prolongada isquemia (Balakumar, et al., 2009). No entanto, a manutenção desta proteção é controversa, uma vez que a reperfusão pode levar a ativação de fatores inflamatórios e aumento de estresse oxidativo (Luo, et al., 2009).

O remodelamento cardíaco após IM ativa fatores transcricionais que em fase inicial induzem a expressão de genes protetores (Weidemann e Johnson, 2008). Concomitantemente, fatores inflamatórios são também recrutados à área infartada logo nas primeiras horas de isquemia, ativando vias de morte celular, que quando

ativadas, resultam em uma área de necrose, com perda de cardiomiócitos funcionais (Frangogiannis, 2008). Portanto, este processo inicia-se por uma intensa ativação inflamatória, para a qual contribuem as células do infiltrado inflamatório que são ricas em citocinas e fatores de crescimento, desempenhando um papel importante no processo de remodelamento. Este processo é complexo, iniciado por um infiltrado celular, remodelamento extracelular, ativação de citocinas com liberação do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α), interleucina (IL) - 1 beta (IL-1 β) e IL-6 resultando em morte celular. Estas três citocinas pró-inflamatórias não apenas estão envolvidas no processo inflamatório, mas também estão envolvidas no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, e nas cardiomiopatias (Frangogiannis, 2008).

A liberação da IL-8 regula o recrutamento dos neutrófilos, sendo importante ressaltar que a resposta inflamatória aguda apresenta um “programa de parada” endógeno e espontâneo devido às substâncias produzidas na própria inflamação que limitam a destruição tecidual. Este “programa” inclui a eliminação das partículas ou microorganismos invasores pela fagocitose, a diminuição progressiva do recrutamento de leucócitos promovida pela regulação da produção de TNF- α e IL-1 β , por neutrófilos pelas interleucinas-10, 4 e 13 sintetizadas pelos macrófagos e células T (Cassatella, et al., 1993; Wang, et al., 1994).

Estudos “*in vitro*” mostraram a produção espontânea das IL do tipo 6 e 11 e do fator inibitório de leucemia (LIF) em células cardíacas humanas em ambos, cardiomiócitos e fibroblastos, indicando a capacidade do tecido cardíaco em produzir altos níveis destas citocinas, que podem estar envolvidas em vias autócrinas e/ou parácrinas, regulando a citoproteção, ou a hipertrofia e a fibrose (Ancey, et al., 2002). Todavia, não se sabe se a redução da oferta de oxigênio modula essa produção

e se isso está associado à maior oferta de glicose. Portanto, informações sobre o papel do meio rico em glicose associado à hipóxia na capacidade espontânea de produção dessas citocinas por fibroblastos cardíacos, poderiam ter implicações na modulação da lesão e na resposta de ajuste ao IM em indivíduos diabéticos.

Estudos mostram que a apoptose tem sido importante no processo de remodelamento pós IM (Sam, et al., 2000; Palojoki, et al., 2001; Baldi, et al., 2002). A inibição da apoptose reduz a área de infarto e preserva a função ventricular (Zhao, et al., 2003). Zhao, et al. (2004) mostraram que a apoptose contribui para perda dos miócitos no estágio precoce pós-infarto, além de participar da eliminação das células durante a fase inflamatória do pós IM, e na redução dos fibroblastos na fase fibrogênica de reparo, na qual a presença da morte por apoptose foi evidenciada pelo aumento da expressão da proteína pró-apoptótica (Bax), pertencente à família Bcl-2 (*B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-2*).

1.2. Papel cardioprotetor da hiperglicemia

Ao nível celular, existem vários achados sobre os efeitos deletérios do ambiente com alta concentração de glicose que resultam em mudanças funcionais em muitos tipos celulares. A geração de espécies reativas de oxigênio tais como os superóxidos, óxido nítrico e peroxinitrato, bem com ativação da apoptose pelas caspases e redução da produção da proteína anti-apoptótica (Bcl-2), parecem ser relevantes para a evolução das complicações do diabetes, como neuropatia, nefropatia e doença cardiovascular. Embora os mecanismos pareçam complexos, um

número de novas informações vem sendo estabelecido (Asahina, et al., 1995; Ceriello, et al., 1996; Catherwood, et al., 2002; Allen, et al., 2005).

Em contraste, existem evidências que indicam que a alta concentração de glicose (22 mM) tem um papel citoprotetor. Observações em células musculares lisas mostraram que altas concentrações de glicose (analogamente a hiperglicemia diabética) podem provocar um aumento da expressão de proteínas repressoras de morte por apoptose (Bcl-2 e Bcl-xl); esses dados sugerem que a hiperglicemia pode suprimir a apoptose através do aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (Li, et al., 2005). Schaffer, et al. (2000) observaram em cultura de cardiomiócitos tratados com glicose (25mM) e submetidos à hipóxia, que os mesmos resistem à apoptose pela prevenção do acúmulo de cálcio que ocorre durante a hipóxia, promovendo um aumento da expressão do Bcl-2 e inativação da Bax. A partir dessas demonstrações, fica claro que tanto em células musculares lisas como em cardiomiócitos, a citoproteção pela alta concentração de glicose (níveis semelhantes aos observados na hiperglicemia diabética) está associada à expressão de proteínas antiapoptóticas.

A preservação da integridade miocárdica depende fundamentalmente da relação entre oferta e demanda dos substratos metabólicos essenciais, tendo como fator decisivo o fluxo coronário. Em presença de um desequilíbrio tanto pela redução da oferta como pelo aumento da demanda, pode ser estabelecida a injúria, cuja extensão vai depender dos diferentes mecanismos de ajuste a essa nova situação. Portanto, as alterações do fluxo sanguíneo e do metabolismo cardíaco influenciam a progressão da lesão isquêmica.

Um estudo com cães diabéticos demonstrou que o fluxo coronariano estava reduzido, tanto no estado basal como durante o exercício físico quando comparados com animais normais (Tune, et al., 2002). Da mesma forma, dados de nosso laboratório mostraram que o fluxo coronário basal em ratos diabéticos estava reduzido quando comparados a indivíduos controles, e que isto poderia estar associado à redução do débito cardíaco (Harthmann, 2003).

Um trabalho realizado em coração isolado de ratos diabéticos e não diabéticos mostrou que no estado basal (antes do pré-condicionamento por período de isquemia) o coração diabético apresentava uma resistência maior a arritmias induzidas pela isquemia quando comparado ao não diabético (Ravingerova, et al., 2000). Entretanto, após o pré-condicionamento houve redução das arritmias apenas nos corações não diabéticos, não se identificando proteção adicional nos diabéticos. Dessa forma, a menor susceptibilidade à isquemia do coração diabético no estado basal parece ter sido importante em não determinar uma melhora adicional após o pré-condicionamento (Ravingerova, et al., 2003), sugerindo que no estado basal, já estaria pré-condicionado.

No coração com oxigenação normal, os ácidos graxos livres (AGL) são a principal fonte de energia dos cardiomiócitos. Sua captação e oxidação são proporcionais às suas concentrações séricas. Na isquemia miocárdica, a energia celular dependerá quase que exclusivamente do metabolismo anaeróbico da glicose, pois a redução na oferta de oxigênio torna o miocárdio incapaz de oxidar os AGL (Opie, 1972). O aumento da glicólise anaeróbia e da oxidação da glicose dependem da ocorrência de um incremento do transporte deste substrato para a célula miocárdica e ativação da glicogenólise, de forma que a maior captação de glicose e

seu metabolismo durante isquemia miocárdica aguda associam-se à preservação da área atingida (Zorzano, et al., 1997).

Em animais diabéticos, foi observado que a resposta inflamatória está alterada. De fato, em linfócitos, a capacidade de proliferação estava reduzida pelo estímulo dos ácidos graxos, mas a insulina foi capaz de reverter o efeito do ácido graxo nestas células. Também a hiperglicemia sem a participação de insulina, reduz a capacidade proliferativa dos linfócitos de ratos diabéticos (Otton, et al., 2002). Em neutrófilos obtidos de ratos diabéticos pela administração de estreptozotocina (STZ), o metabolismo (diminuição da descarboxilação de glicose e glutamina, alteração nas enzimas G6PDH, PFK e glutaminase) e a função (redução de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio) estavam alterados, e o tratamento com a insulina foi capaz de reverter esses efeitos do diabetes (Alba-Loureiro, et al., 2006).

A complexidade do entendimento desses processos, passa pelo reconhecimento de que, embora a inibição da apoptose possa ter impacto terapêutico, reduzindo a área de lesão, também pode impedir a eliminação de células indesejáveis na resposta adaptativa. Intervenções seletivas nas rotas de sinalização da apoptose permitirão manipulação controlada desse processo e estudos no entendimento da mesma devem ser encorajados.

1.3. Fatores de morte e sobrevida celular

A apoptose é o tipo de morte celular programada que remove as células não-desejadas e mantém a homeostase do organismo, sem provocar processo inflamatório local, tendo papel importante durante o processo de diferenciação, crescimento e desenvolvimento dos tecidos adultos normais e/ou patológicos. A perda deste equilíbrio promove o aparecimento de lesões proliferativas e degenerativas como, por exemplo, no IM. A apoptose é claramente diferente de outra forma de morte celular conhecida como necrose, que pode ser desencadeada pela injúria celular em condições como hipertermia, trauma, e acúmulo de reagentes tóxicos (Wyllie, et al., 1980; Schwartzman e Cidlowski, 1993; Thompson, 1995).

Existem duas principais vias que regulam a apoptose: a primeira é a via dos receptores de morte ou extrínseca, iniciada pela superfamília de receptores: fator de necrose tumoral (TNFRs), entre eles a proteína indutora de apoptose (Fas); a segunda, é a via intrínseca, que envolve as mitocôndrias e os membros da família Bcl-2 (Ashkenazi e Dixit, 1998; Tsujimoto e Shimizu, 2000). Na via mitocondrial, a redução de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, ou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio promove despolarização da membrana mitocondrial e formação de poro que altera a permeabilidade da mitocôndria e, conseqüentemente promove liberação desses fatores pró-apoptóticos do espaço intramembranoso mitocondrial para o citosol, como o citocromo C e o AIF (fator de indução de apoptose) (Kroemer, 1998; Ferri e Kroemer, 2001; Mayer e Oberbauer, 2003).

A apoptose está associada com mudanças bioquímicas e biofísicas envolvendo o citoplasma, núcleo e membrana plasmática. Uma das primeiras

alterações marcantes no processo apoptótico é a agregação e condensação da cromatina em grandes massas granulares compactas que se ligam à carioteca formando um núcleo picnótico. Em um estágio posterior, ocorre clivagem do DNA internucleossomal com o aparecimento de fragmentos nucleares discretos (Kerr, et al., 1972).

Além da diminuição de volume celular, outro processo que marca o início da apoptose é a externalização de fosfatidilserina. Na apoptose, ocorre a perda da assimetria dos fosfolípides com exposição de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática. Assim, ocorre a translocação de cargas negativas da molécula de fosfolípidos da face interna da membrana citoplasmática para a superfície celular (Vermes, et al., 1995). A fase irreversível da apoptose é a fragmentação de DNA. Promovida pelas endonucleases, nucleases mitocondriais liberadas no citossol e translocadas para o núcleo, consiste em clivar o DNA nos espaços internucleossomais em fragmentos de 180 a 200 pares de bases (Eastman, 1995).

A apoptose é regulada pelo balanço de genes supressores e indutores, incluindo aqueles primariamente supressores da apoptose, tais como o Bcl-2 (que codifica proteínas reguladoras, que integram sinais de morte ou de sobrevivência celular para ativar ou não a maquinaria da apoptose), e aqueles indutores da apoptose, tais como Bax (relacionado a família de proteínas pró-apoptóticas que possuem o domínio BH3, as chamadas *BH3-only proteins*) (Reed, 1994; Elsasser, et al., 2000).

O balanço Bax/Bcl-2 determina a resposta de sinalização que desencadeia a morte. Alterações na expressão, localização subcelular, estado de fosforilação e processamento proteolítico das proteínas Bcl-2 determinam o aumento da expressão

de Bax sendo encontrada na isquemia após IM (Zhu, et al., 2001). A proteína Bcl-2 é expressa em cardiomiócitos no estágio agudo do IM, mas a proteína Bax está expressa no estágio tardio (Misao, et al., 1996). A expressão da Bcl-2 e a super-expressão da Bax podem ter um papel fisiológico importante na proteção ou aceleração da apoptose dos cardiomiócitos humanos após isquemia e/ou reperfusão (Misao, et al., 1996).

Diferentemente dos cardiomiócitos, os fibroblastos cardíacos parecem ter maior resistência à redução da disponibilidade de oxigênio. De fato, Mayorga, et al. (2004) mostraram em cultura de fibroblastos cardíacos, submetidos à hipóxia, que os mesmos resistem até 72 horas, quando a ativação da caspase-3 também é detectada. Nesse trabalho, os fibroblastos cardíacos foram comparados aos fibroblastos de outras origens, da derme e pulmonar. Os resultados mostraram que os fibroblastos da derme expressaram Bcl-2, apresentando um nível de resistência similar aos fibroblastos cardíacos. Isso demonstra que o Bcl-2 é um importante fator de resistência dos fibroblastos cardíacos à apoptose e um mecanismo provável na promoção da sobrevivência dos fibroblastos cardíacos à hipóxia.

A apoptose parece ser um processo importante não só na determinação da resistência de determinadas células à isquemia, como também no desaparecimento de vários tipos celulares após o IM (Takemura, et al., 1998). De fato, existem evidências de que a redução de células durante a transição entre a resposta inflamatória e a formação do tecido de granulação e deste para a formação da cicatriz, depende da apoptose.

Um processo natural do miocárdio, como forma de reparo após IM é a resposta angiogênica, podendo ocorrer neo-angiogênese pela diferenciação de células

migradas à área de reparo, que são células circulantes derivadas da medula óssea, conhecidas como progenitoras endoteliais (sub-população de células-tronco mesenquimais), exercendo papel de neovascularização (Ziegelhoeffer, et al., 2004).

A angiogênese é essencial para o desenvolvimento, cicatrização e regeneração de tecidos ou órgãos, mas também é parte de processos patológicos, como câncer e retinopatia. É um processo com múltiplos passos envolvendo uma série de genes modificadores. Muitos destes genes são expressos pelo fator-1 induzível por hipóxia, subunidade alfa (HIF1- α), tais como óxido nítrico sintase, fatores de crescimento angiogênicos e vasculares, além de genes que regulam o metabolismo da matriz celular (Ramirez-Bergeron e Simon, 2001; Weidemann e Johnson, 2008).

O papel do HIF1- α , é essencial no desenvolvimento cardíaco normal durante a embriogênese, a deficiência completa deste gene em camundongos resulta em malformações cardíacas e vasculares letais (Compernelle, et al., 2003; Tang, et al., 2004). Resumindo, o HIF1- α é um fator de transcrição sensível à hipóxia capaz de ativar diversos fatores, por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outras vias, após dano isquêmico; a super expressão do HIF1- α pode resultar em aumento da transcrição gênica aumentando o fornecimento de oxigênio e respostas adaptativas de sobrevivência, sendo importante para as células-tronco repararem o dano cardíaco.

As etapas da angiogênese requerem mudanças celulares, principalmente em células endoteliais que são modificadas para um fenótipo proliferativo. Os passos do processo incluem mobilização, migração, recrutamento, adesão, invasão e diferenciação, como também funções autócrinas. No processo de remodelamento a

matriz extracelular é digerida, permitindo a migração das células endoteliais à área de reparo. O VEGF também está envolvido na mobilização de células tronco - mesenquimais (Asahara, et al., 1999).

Como a apoptose representa uma forma de morte celular potencialmente induzível ou evitável e, portanto, passível de manejo terapêutico, existem já muitos trabalhos na literatura estudando este mecanismo e possíveis intervenções com relação aos cardiomiócitos. Entretanto, a sobrevivência após o IM depende também do remodelamento ventricular após a isquemia. Nesse sentido, o marcante aumento de fibroblastos e subsequentemente sua redução no curso temporal das adaptações ao IM, bem como seu significado fisiopatológico permanecem não bem estudados.

Não se conhecem bem, entretanto, os mecanismos envolvidos nessas respostas, bem como sua modulação pela hiperglicemia e hipóxia associadas.

Recentemente em nosso laboratório, (Rodrigues, 2008) testamos a hipótese de que o coração diabético seria mais resistente à injúria. Para isto, as alterações morfofuncionais cardíacas foram avaliadas pelo ecocardiograma aos 90 dias de protocolo. A área de IM e a dilatação ventricular foram maiores no grupo infartado em relação ao grupo diabético infartado, sugerindo menor disfunção cardíaca no animal diabético infartado em comparação ao animal somente infartado. No estudo, avaliamos adicionalmente a mortalidade dos animais. Os resultados mostraram que dentre os grupos infartados, os diabéticos apresentaram menor mortalidade, no período de 15 a 30 dias de protocolo, indicando que o estado diabético pode estar associado a uma cardioproteção, como pode ser visto na Figura 1. Vale destacar, que aos 90 dias, no entanto, a mortalidade foi semelhante entre os grupos infartados, independente da presença de diabetes.

Figura 1. Avaliação do percentual de sobrevivência dos animais dos grupos: C: grupo controle; D: grupo diabético; MI: grupo infartado; DMI: grupo diabético infartado (Rodrigues, 2008)

Embora o potencial papel da apoptose e/ou fatores inflamatórios na lesão isquêmica tenha sido investigado, o papel da hiperglicemia como um mecanismo protetor ao coração após a lesão isquêmica e na preservação da função cardíaca permanece incerto.

Assim, testamos a hipótese de que concentrações aumentadas de glicose (equivalentes a hiperglicemia diabética) favorecem a resistência de fibroblastos cardíacos à hipóxia possibilitando um remodelamento positivo ao tecido cardíaco, mantendo a função cardíaca e ativando fatores que favorecem a sobrevivência celular após infarto do miocárdio em animais hiperglicêmicos por diabetes mellitus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo foi desenhado para avaliar os efeitos da hiperglicemia diabética sobre fatores de sobrevivência celular no coração, após hipóxia.

Considerando:

1. As informações da literatura e de nosso laboratório de que existe uma janela temporal de maior resistência do miocárdio diabético à isquemia;
2. A importância dos fibroblastos cardíacos no remodelamento cardíaco após isquemia e a relação aos efeitos do meio hiperglicêmico;
3. O papel dos fatores inflamatórios e de sobrevivência celular após IM e a não existência de informações conclusivas do papel protetor da hiperglicemia diabética.

2.2 Objetivos específicos

Resolveu-se:

Avaliar, *in vitro*, em culturas de fibroblastos cardíacos submetidos a diferentes concentrações de glicose e a diferentes tempos de hipóxia:

1. A sobrevivência celular por citometria de fluxo;
2. A expressão do fator VEGF por *ELISA* no sobrenadante das culturas.

Avaliar *in vivo* nos corações de ratos submetidos a 15 dias de IM e a 30 dias de hiperglicemia diabética:

3. Tamanho do IM e a função cardíaca por análise ecocardiográfica;
4. Expressão de citocinas inflamatórias por ELISA;
5. Expressão gênica de fatores de sobrevivência celular por Real Time PCR;
6. Expressão protéica dos transportadores de glicose por Western - blotting;
7. Densidade capilar e fibrose por análise histológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente tese teve a aprovação do seu projeto pela Comissão de ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº protocolo: 496/06).

3.1. Avaliações *in vitro*

3.1.1. Cultura de fibroblastos cardíacos

Foram utilizados ratos Wistar com dois meses de vida provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo quatro animais por caixa, com temperatura ambiente entre 22-24°C e luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro). A ração e água foram oferecidas *ad libitum*.

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg) e desinfetados com álcool 70% para abertura da caixa torácica e exposição do coração, sendo este rapidamente retirado. O coração foi lavado com uma solução de PBS (tampão fosfato/salina) + Penicilina/estreptomicina. Os ventrículos foram limpos e cortados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo de 50mL contendo tampão de digestão à base de collagenase/tripsina/BSA (albumina de soro bovino) e incubados por 30 min a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi

desprezado e realizada nova incubação por 20 minutos. O sobrenadante contendo as células foi aspirado e centrifugado para obtenção de um concentrado celular (*pellet*). Este foi ressuspendido em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e FBS (Soro fetal bovino), e guardado em garrafa de cultura (T-25cm) mantida em estufa de CO₂. Este processo de digestão enzimática do tecido foi repetido até que todo tecido cardíaco fosse processado. Após duas horas da extração, o meio de cultura das garrafas foi trocado por um meio de cultura novo com DMEM e 15% de FBS. As garrafas foram mantidas em estufa de CO₂, sob condições estéreis, até a realização dos experimentos.

Seqüência experimental

3.1.2. Tratamento de glicose

Durante a extração as células foram divididas em dois tratamentos diferentes de glicose usando o meio de cultura D-MEM *Gibco*®: baixa glicose (concentração: 5mM de glicose) definidas como controle normoglicêmico e/ou alta glicose (concentração: 25mM de glicose) definidas como hiperglicêmicas, ambas adicionadas 15% de FBS nas garrafas de cultura T-25, e cultivadas nestas condições até atingirem confluência de 80% quando foram amplificadas até o protocolo de hipóxia (máximo de duas passagens – P2).

3.1.3. Padronização da hipóxia celular

A hipóxia foi induzida em câmara especialmente adquirida para este fim, na qual era possível manter estável a concentração desejada dos gases em estufa na temperatura de 37°C por tempos variados, permitindo experimentos crônicos.

As células anteriormente tratadas com glicose foram inseridas em uma “incubadora modular” (© 2001 Billups-Rothenberg Inc.) feita com material de acrílico (Figura 2). Esta possui uma válvula de entrada e uma de saída, onde foi possível infundir o gás (5,6% de CO₂ / 94,4% de N₂) por um tempo de 20 minutos; antes de cessar a infusão, as válvulas foram fechadas, evitando a saída do gás e a entrada de O₂. Com o uso desta incubadora foi possível manter a concentração constante do gás nas garrafas de cultura, e mantê-las acondicionadas em estufa (a 37°C) até o experimento. Todos os resultados apresentados foram realizados por este método de indução à hipóxia.

Figura 2. Câmara incubadora modular

As células tratadas com glicose a 5mM (condição normoglicêmica) e 25mM (condição hiperglicêmica) foram mantidas em diferentes tempos de exposição à hipóxia: 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Após, foram realizados experimentos nos fibroblastos cardíacos para análise de apoptose e expressão do VEGF nos sobrenadantes das culturas.

3.1.4. Avaliação do processo de apoptose

Para esta metodologia foram usados fibroblastos cardíacos obtidos por seis extrações diferentes, em média com o “n” (tamanho da amostra) de três tratamentos/extração. As células foram retiradas da incubadora modular no momento do experimento para evitar a reoxigenação, sendo guardado o sobrenadante (meio) das células em cultura em freezer -70°C até análise do VEGF. As células aderidas nas garrafas foram soltas com o uso da solução de Tripsina/EDTA (0,1 ml/cm²), centrifugadas e o *pellet* re-suspenso para contagem em “câmara de Neubauer”.

O processo de apoptose foi avaliado pela metodologia de citometria de fluxo no aparelho FACScalibur da *Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA*. Os resultados foram processados utilizando o programa CellQuest (*Becton & Dickinson*), avaliando 10.000 eventos por amostra.

O programa de apoptose apresenta características morfológicas determinadas, incluindo a perda da assimetria da membrana plasmática, condensação do citoplasma

e núcleo, e clivagem internucleossômica do DNA. A perda da membrana é uma das primeiras características.

3.1.4.1. Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade dos fibroblastos cardíacos foi realizada em alíquota contendo 1×10^6 células, sendo esta centrifugada e o precipitado foi re-suspenso em 500 µl de PBS. Foram adicionados 50 µl de solução de iodeto de propídio (PI) (50 µg por ml em PBS), um fluoróforo hidrofílico que se intercala ao DNA, seguindo-se de detecção fluorimétrica pelo citômetro de fluxo.

3.1.4.2. Fragmentação de DNA

O precipitado de células (1×10^6) foi re-suspenso em 200 µl de uma solução hipotônica contendo PI 50 µg/ml, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados por 24hs a 4°C. O tampão hipotônico rompe a membrana celular, permitindo que o PI se ligue ao DNA intercalando-se entre as bases, diferenciando as células com o DNA íntegro daquela com DNA fragmentado, sugerindo um processo apoptótico em estágio final.

3.1.4.3. Externalização de fosfatidilserina

A dupla marcação com anexina V-FITC e PI foi realizada em uma alíquota de 1×10^6 células. As células foram re-suspensas em 100 μ l do tampão pH 7,4 (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,5) e 5 μ l de anexina V-FITC. As células foram incubadas no escuro à temperatura ambiente, por 15 minutos. No final desta incubação foram acrescentados 400 μ l do mesmo tampão e 50 μ l de solução de PI (50 μ g por mL PBS).

3.1.5. Expressão do VEGF

A expressão do VEGF foi realizada no sobrenadante coletado nas culturas celulares, usando leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com o kit Duo-set (BD Bioscience Inc., MA, USA). Incubou-se a placa, *overnight* a 4°C com o anticorpo primário (captura 100 μ l/poço). Após esse período a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20 - *Sigma Chemical Co, EUA*) e incubada com o tampão de experimento que contém PBS e BSA por 1 hora. Após nova lavagem adicionou-se as amostras/ou padrão (curva) e incubou-se por mais 2 horas. Ao final desse período foram adicionados os anticorpos biotinilados - secundários (100 μ l/poço) e incubados por mais 2 horas. A placa foi novamente lavada, e adicionada 100 μ l/poço de estreptovidina conjugada com HRP (*Horseradish Peroxidase*). A placa foi coberta e protegida da luz e incubada por mais 20 minutos. Em sequência, a placa foi novamente lavada e incubada por mais

30 minutos com 100µl/poço de TMB (*tetramethylbenzidine* - Calbiochem, USA) e novamente protegida da luz. A reação colorimétrica foi parada com H₂SO₄ (2N) e a densidade óptica foi determinada a 450nm. A sensibilidade do ensaio foi de 15 pg/ml.

3.2. Avaliações *in vivo*

3.2.1. Animais

Ratos Wistar machos (230-260g) foram obtidos a partir do biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Os ratos receberam ração padrão laboratorial e água *ad libitum*, e foram alojados em gaiolas contendo de 4 a 5 animais/cada a 22-24°C com ciclo dia/noite de 12h. Os procedimentos e protocolos seguiram as orientações de Ética em Cuidados de Animais Experimentais aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee*.

Seqüência experimental

Todos os grupos foram seguidos durante os 30 dias do protocolo:

Grupo C: controle

Grupo D: diabético

Grupo I: controle 15 dias, sendo no 15º dia induzido o IM

Grupo DI: diabético 15 dias, sendo no 15º dia induzido o IM

3.2.2. Indução do diabetes

Após jejum de oito horas o diabetes foi induzido por uma única injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ, 50mg/kg; *Sigma Chemical Co, EUA*) na veia caudal, dissolvida em tampão citrato, (0,01M, pH 4,5) (Rerup, 1970). Os animais controles foram injetados somente tampão citrato. O peso corporal foi avaliado semanalmente. A glicemia de jejum foi mensurada por hemoglicoteste, através de tiras (*Advantage Roche®*) para confirmar a taxa de glicose no início do protocolo e 30 dias após injeção de STZ (*Accu-Check Instant teste, Boehringer Mannheim*). Foram selecionados para os grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250mg/dl, sendo os demais desconsiderados.

3.2.3. Infarto do miocárdio

Após 15 dias de indução do diabetes ou injeção de tampão citrato, os ratos foram anestesiados (80mg/kg Ketamina e Xilazina 12mg/kg, intraperitoneal), colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais afastados, assim mantidos sob respiração artificial (*Havard Aparattus, Boston EUA*). Um pequeno corte foi realizado na pele, os músculos peitorais foram afastados e o terceiro espaço intercostal esquerdo foi aberto para exposição do coração. Assim, após a exposição do coração e visualização da aurícula esquerda, foi feita a oclusão cirúrgica da artéria coronária esquerda por ligadura direta. A artéria coronária esquerda foi ocluída uma única vez com uma linha nylon (6,0) de sutura em cerca de um milímetro distal à aurícula esquerda, provocando isquemia miocárdica (Figura 3).

Após a ligadura, a incisão torácica foi fechada linha nylon (5,0) e o pneumotórax retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10 ml. Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e a respiração natural foi estimulada. Os músculos afastados para a cirurgia foram reposicionados e a pele foi suturada com fio de seda (4,0). Os animais receberam 30000 UI de Benzilpenicilina Benzatina (*Penretard, Cibran, Tanqua, RJ, Brasil, i.m.*) e foram colocados em ambiente aquecido para recuperação (Pfeffer, et al., 1979).

Figura 3. Modelo de ligadura da artéria coronária

3.2.4. Função cardíaca: sistólica e diastólica

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas após o protocolo experimental (30 dias) em todos os grupos estudados. As análises foram realizadas por um único observador e às cegas quanto à identidade dos grupos experimentais. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, e o erro padrão da média dessas medidas, de acordo com as orientações da “*American Society of Echocardiography*” (Sahn, et al., 1978). Os ratos foram anestesiados (90mg/kg ketamina e 12mg/kg de xilazina intraperitoneal), a região torácica foi devidamente tricotomizada e mantidos em decúbito dorsal para realização do exame no aparelho Sequóia 512 (*ACUSON Corporation, Mountain View, CA*). As imagens foram obtidas com um transdutor linear e multifrequencial (10-14 mHz), que permite imagens bidimensionais e monodimensionais simultâneas, além de fluxo por efeito Doppler espectral. Foram realizados os registros eletrocardiográficos mediante a colocação de três eletrodos

para a derivação DII. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade médio-alta (*General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA*).

Foi utilizada a janela longitudinal paraesternal para obtenção dos cortes longitudinal e transversal e a janela do ápice cardíaco para a obtenção dos cortes apicais (quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme descrito por (Schiller, et al., 1979).

Os índices de função sistólica como a fração de encurtamento foram calculados pelo modo M, de acordo com as orientações da “*American Society of Echocardiography*” (Sahn, et al., 1978) e do “*Chamber Quantification Writing Group*”, desenvolvido em conjunto com a Associação Européia de Ecocardiografia, da Sociedade Européia de Cardiologia.

A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do VE, obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade diastólica foi obtida a partir da imagem apical das quatro câmaras posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas: a) onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) tempo de desaceleração da onda E (TDE) em milissegundos (ms), entre o pico da onda E, e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral, A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do VE. Foi determinado o TRIV em milissegundos (ms), entre o final do fluxo sistólico na via de saída do VE e o início do fluxo diastólico mitral.

As variáveis ecocardiográficas analisadas nos grupos experimentais foram:

- 1) **Variáveis de função sistólica:** fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (FS);
- 2) **Variáveis de função diastólica:** tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração do pico E (TDE) e Razão aorta/átrio esquerdo (razão alterada sugere disfunção diastólica).

O tamanho do IM foi estimado com base na identificação subjetiva de acinesia ou discinesia após 24hs e 15 dias de oclusão da artéria coronária. Regiões com encurtamento classificados como normais ou ausentes, bem como partes com movimento paradoxal, foram considerados como acinesia ou discinesia. Foi medido o perímetro do segmento infartado IM (região acinética ou discinética) e o perímetro total da borda endocárdica do VE (PE), o tamanho do IM foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $IM (\%) = IM/PE \times 100$. Descrito por (Dos Santos, et al., 2008) como a relação entre estas regiões, o perímetro total da borda endocárdica do VE.

Para análises moleculares os animais foram sacrificados por decapitação e os ventrículos esquerdos foram coletados e congelados (-70°C). Para análises histológicas os animais foram anestesiados e perfundidos com formol 4% tamponado e os corações processados como descrito posteriormente.

3.2.5. Expressão das citocinas

As proteínas do VE (100mg) foram extraídas em tampão (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 100 mM;

ortovanadato de sódio 10 mM; aprotinina 10µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 2 mM), incubadas com Triton X-100 - 10% por 30 minutos em gelo. Imediatamente, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos, e os sobrenadantes submetidos à quantificação protéica pelo método Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se uma curva padrão de 50 a 1000 µg/ml de albumina bovina sérica e reagente de Bradford (*coomassie brilliant blue* 0,01%, etanol 47%, ácido fosfórico 8,5% e água destilada q.s.p); a absorbância foi determinada a 595nm.

A expressão das citocinas foi realizada por ELISA, como descrito previamente no item 3.1.4. Brevemente, foram usadas amostras do extrato de proteínas extraído do VE, incubadas com Kits Duo-set disponíveis para IL-1b e IL-10 (*BD Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA*) e TNF- α (*Pharmingen, San Jose, CA, EUA*). Os resultados foram normalizados pela proteína total do VE quantificada previamente.

3.2.6. Expressão gênica

3.2.6.1. Síntese do DNA complementar (RT-PCR)

O RNA total foi obtido a partir do VE (50mg) pelo método de extração com isotiocianato de guanidina usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.), que mantém a integridade do RNA, dissolvendo os componentes celulares. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos em temperatura

ambiente para permitir a total dissociação dos complexos das proteínas nucleares, acrescentado clorofórmio (0,2ml) e centrifugados a 12, 000 xg durante 15 minutos, a 2°C a 8°C com 0,5ml de álcool isopropílico gelado (Chomczynski e Sacchi, 1987). O sedimento de RNA foi lavado com 75% de etanol, misturado e centrifugado a 7, 500xg, por 5 minutos, a 2°C a 8°C. Ao final, o sedimento de RNA foi seco ao ar, dissolvido em água livre de RNase e armazenados a -70°C. O RNA foi quantificado por absorbância a 260 nm. A pureza do RNA foi avaliada pela razão 260/280nm. O RNA total (2µg) foi tratado com 1U DNase I, durante 15 minutos, a 25°C e inativados com 25mM de EDTA, durante 10 minutos, a 65°C. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado em 20ml de meio contendo 10 mM dNTP Mix (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,1 TDT e 200 U RevertAid™ H Minus M-MuLV Transcriptase Reversa (*Fermentas Life Science, Glen Burnie, MD, E.U.A*), a 42°C, durante 50 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento, a 70°C, durante 15 minutos.

3.2.6.2. PCR em tempo real (real time)

A família de proteínas Bax e Bcl-2 (*B-cell-leucemia linfocítica proto-oncogene 2*), p53 (proteína supressora de tumor), Fas (via apoptótica dependente do receptor Fas), HIF1- α (fator-1 induzível por hipóxia- alfa), IL-8rb (receptor de interleucina 8- beta), VEGFa (fator de crescimento endotelial vascular a), e GAPDH (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*) a expressão desses genes foi avaliada por PCR em tempo real (Higuchi, et al., 1992), com o equipamento Rotor Gene 3000 (*Corbett Research, Mortlake, Austrália*), utilizando *Platinum® SYBR® Green qPCR*

SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que contém *SYBR[®] Green I* como corante fluorescente. A avaliação foi realizada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), utilizando o gene GAPDH como controle interno (normalizador) testado como gene de referência entre mais cinco pelo programa de normalização de expressão gênica por PCR em tempo real (*GeNorm*). As seqüências *sense* e *anti-sense*, temperaturas de anelamento e os comprimentos dos fragmentos do PCR são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Sequências de *primers* (S: *sense*; AS: *anti-sense*), temperaturas (temp) de anelamento e comprimentos dos fragmentos (frag) dos genes estudados.

genes	<i>primers</i>	temp (°C)	frag (bp)
Bax	S: AGATGAACTGGACAATAATATGG		
NM017059	AS: GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC	53	152
Fas	S: GGTGGCTCTGGTTGGAATG		
NM012908	AS: GATACTCTAAGGCTGTGGTTGG	55	102
Bcl-2	S: GCAGAGATGTCCAGTCAGC		
NM016993	AS: CCCACCGAACTCAAAGAAGG	55	129
p53	S: GCGTTGCTCTGATGGTGAC		
NM030989	AS: GCGTGATGATGGTAAGGATGG	55	230
HIF-1 α	S: TGGCTTTGGAGTTTCAGAGGC		
NM024359	AS: GACTTCGGCAGCGATGACAC	52.6	147
VEGF α	S: ACTGTGAGCCTTGTTTCAGAGCG		
NM0011103	AS: CGGATCTTGGACAAACAAATGC		
36		48.1	50
IL-8br	S: CAAGTGGAGGGTGGTACTGC		
NM017183	AS: GGAGGAAGCCATAGGTCTGAG	50.4	50
GAPDH	S: ATGGTGAAGGTCGGTGTG		
NM017008	AS:GAACTTGCCGTGGGTAGAG	56	82

3.2.7. Atividade da caspase - 3

As proteínas do VE (50mg) foram extraídas em solução tampão com um coquetel de inibidores de proteases (10% de sacarose; 0,1% CHAPS; HEPES 100 mM pH 7,4; Leupeptina de 10mg/ml; aprotinina de 10mg/ml; 200mM de PMSF, e 10mM de ditioneitol, quantificadas por método de Braddford como descrito anteriormente. A atividade da Caspase 3 foi determinada incubando o lisado (20µg de proteína) com 50µM de substrato fluorogênico *Ca-DEVD-AMC* em placa, e a fluorescência medida pelo Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina liberado em 30 minutos. As leituras realizadas a cada 2,3 minutos usando um espectrofluorímetro (*Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS, CA, USA*) (Andersson, et al., 2000). Foi realizada a média de cada leitura e preparada uma curva linear crescente da atividade.

3.2.8. Expressão dos transportadores de glicose (GLUT)

As proteínas do VE (100mg) foram extraídas em solução em tampão de Tris com um coquetel de inibidores de proteases (base de Tris 100 mM, pH 7,5 adicionada 10mM de EDTA; fluoreto de sódio 100mM; pirofosfato de sódio 100mM; ortovanidato de sódio 10 mM; aprotinina 10mg/ml; Leupeptina 1mg/ml, e PMSF 2mM) e foram quantificadas por método de Bradford como descrito anteriormente.

A expressão protéica dos transportadores de glicose tipo – 4 (GLUT-4) e tipo- 1 (GLUT-1) foram quantificadas pelo método de *Western blotting*. A eletroforese foi executada em 7,5% de gel de placa (acrilamida) na presença de sulfato de dodecil de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de (Laemmli, 1970), usando 100µg de proteína desnaturada e reduzida. As proteínas foram eletroforeticamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, *Saúde de GE, Suécia*) por 42 minutos em voltagem constante (40 V). A membrana foi incubada com 5% de leite desnatado (solução de bloqueio) por 4 horas antes da incubação noturna (4°C) com anticorpos policlonais (GLUT-1, diluição 1:1000 e GLUT-4, diluição 1:4000 por *Chemicon Internacional, Millipore Corp, EUA*). Os passos subsequentes foram executados com sistema estreptoavidina conjugada com fosfatase alcalina (*GE Healthcare, Sweden*) e as bandas foram reveladas usando NBT/BCIP como substratos como recomendado pelo fabricante (*Bio Rad, EUA*) (Laybutt, et al., 1997).

3.2.9. Histologia cardíaca e morfometria

Após os tratamentos, os ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (80mg/Kg), sendo realizada uma incisão transversal sob o diafragma e incisões paraesternais para toracotomia e exposição completa do VE. O átrio direito foi seccionado e o VE perfundido por inserção de agulha em seu ápice. Os corações foram parados em diástole pela perfusão de solução de NaCl 0,9% acrescida de 14mM de KCl. Posteriormente, foi feita a fixação dos tecidos pela perfusão com

formol 4% tamponado em PBS. Os corações foram então deixados imersos em formol 4% tamponado por 24 horas e posteriormente preparados para a preparação histológica. Para o processamento, segmentos de ventrículo transversais ao coração foram obtidos 5mm abaixo da ligadura da coronária ou região equivalente nos animais não infartados. Os tecidos foram dispostos em cassetes plásticos processadores-inclusores, foram processados em aparelho auto-técnico e incluídos em *paraplast*. Secções de 5µm foram obtidas em micrótomo e coradas com *Picrosirius Red* (corante vermelho), para avaliação da fibrose, e com ácido periódico de *Schiff* (PAS) para a quantificação da densidade capilar. As análises histomorfométricas foram realizadas às cegas quanto à identidade dos grupos experimentais.

A fibrose do VE foi avaliada dividindo-se a circunferência do VE (parede livre e septo) em 4 quadrantes, sendo feita avaliação semi-quantitativa em microscópio em campo claro em aumento de 200X. A análise foi baseada na atribuição de números relativos ao grau de fibrose, determinando um escore de fibrose (0, sem fibrose, a 4, grande área de fibrose) para cada quadrante, como descrito previamente (De Macedo Braga, et al., 2008).

A densidade capilar foi quantificada por exame em microscópio de campo claro das seções coradas para PAS, utilizando uma gráticula ocular de 10 linhas x 10 pontos, opticamente sobreposta, em aumento de 400X. Foram avaliados de 10 a 15 campos não coincidentes, distribuídos aleatoriamente no ventrículo esquerdo, garantindo-se seu afastamento da cicatriz no caso dos animais infartados. A densidade capilar foi avaliada como o número total de capilares em todos os campos,

considerando sua área, obtendo-se então a densidade capilar expressa em número de capilares por mm² (Becker, et al., 2006).

3.3. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. O teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p \leq 0,05$ para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados dos experimentos *in vitro*

4.1.1. Análise de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade dos fibroblastos cardíacos foi realizada após o tratamento com iodeto de propídio, um fluoróforo hidrofílico que se intercala ao DNA, seguindo-se de detecção fluorimétrica pelo citômetro de fluxo. A integridade da membrana das células viáveis não permite a passagem do fluoróforo e, conseqüentemente, a fluorescência dos fibroblastos viáveis é baixa. A representação em histograma e o gráfico de dispersão podem ser verificados na Figura 4.

Figura 4. Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da viabilidade celular de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região M1 dos histogramas corresponde ao número de células viáveis e a região M2, às células não viáveis. Na abscissa está representado a fluorescência emitida pelo iodeto de propídio e na ordenada uma unidade de contagem arbitrária. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. À direita dos gráficos de dispersão (C) estão apresentadas as porcentagens de M1 e M2

Após os períodos de hipóxia, os fibroblastos mostraram uma tendência à diminuição da viabilidade, porém, não foram observadas diferenças significativas na percentagem (%) de células viáveis em todos os tempos estudados (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 2 - Percentagem de células viáveis por análise de citometria de fluxo.

Grupos	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
Cont 5mM	79 ± 6,7	74 ± 9	79 ± 4,8	83 ± 3,6	88 ± 1,8
Hipo 5mM	73 ± 6	70 ± 2,7	64 ± 5	69 ± 7,2	75 ± 5
Cont 25mM	80 ± 5,5	82 ± 5,5	74 ± 4	79 ± 5	87 ± 1,7
Hipo 25mM	77 ± 1,5	72 ± 4,4	68 ± 4,2	74 ± 4,3	78 ± 6,9

Dados apresentados como média ± EPM. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose)

Figura 5. Percentagem de células viáveis por análise de citometria de fluxo avaliadas em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média ± EPM

4.1.2. Análise de fragmentação DNA

Ao apresentarmos esses resultados, faz-se necessário alguns comentários que devem facilitar a compreensão dos mesmos.

A fase irreversível do processo apoptótico é a fragmentação nuclear que é causada por endonucleases endógenas (Eastman, 1995) que clivam o DNA entre os nucleossomos em fragmentos de 180-200 pares de base (pb) ou maiores (Thompson, 1998). O conteúdo de DNA total por células diminui progressivamente, à medida que o processo apoptótico evolui. O método utilizado para determinação da porcentagem de fibroblastos cardíacos fragmentados refere-se primeiramente ao tratamento destas células com triton, um detergente que rompe a membrana celular externa. Em seguida, o iodeto de propídio se liga aos fragmentos de 180 a 200 pb das células em apoptose; eventos observados com emissão de baixa fluorescência, como pode ser verificado no gráfico de dispersão e o histograma apresentado na Figura 6, mostram eventos com emissão baixa de fluorescência.

Figura 6. Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da fragmentação de DNA de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2, às células com DNA fragmentado. Na abscissa está representado a fluorescência do iodeto de propídio e na ordenada uma unidade de contagem arbitrária. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a

ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. À direita dos gráficos, (C) estão apresentadas as porcentagens de M1 e M2

Nas primeiras horas de hipóxia (6 e 12 hs), houve um aumento na renovação celular, em ambas as concentrações de glicose, demonstrada por aumento da porcentagem (%) de células com o DNA fragmentado. Interessantemente, este aumento foi mais pronunciado no meio com baixa glicose (5mM) quando comparado ao meio hiperglicêmico (25mM). Nas 24hs seguintes observamos uma tendência, a diminuição da porcentagem das células com DNA fragmentado, quando comparada aos períodos iniciais, porém não foi observada diferença significativa entre os tratamentos neste período (Tabela 3 e Figura 7).

Em tempos mais crônicos (48hs) esta diferença aparece: há um aumento da porcentagem de DNA fragmentado somente nas células tratadas com baixa glicose, porém apresentando um percentual menor que nos tempos iniciais (6 e 12hs). Em 72hs observamos um padrão constante de fragmentação de DNA em todos os tratamentos, não havendo diferença das células submetidas à hipóxia, em ambos os tratamentos com glicose. Os resultados sugerem um *turnover* celular somente nos períodos iniciais, após permanecerem as células que sobreviveram sugerindo uma “resistência dos fibroblastos cardíacos” em tempos crônicos de hipóxia (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3 - Percentagem de células com DNA fragmentado por análise de citometria de fluxo

Grupos	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
Cont 5mM	16,9 ± 4,4	37,2 ± 2,0#	28,0 ± 0,5	13,5 ± 6,3	27,2 ± 0,6#
Hipo 5mM	78,2 ± 3,9*#	64,0 ± 7,4*#	47,3 ± 3,5	48,4 ± 8,8*#	35,3 ± 3,0#
Cont 25mM	10,4 ± 2,1	10,5 ± 2,0	25,5 ± 9,7	21,7 ± 4,3	13,5 ± 3,6
Hipo 25mM	51,8 ± 9,4*#‡	41,5 ± 8,0#‡	31,0 ± 6,4	27,7 ± 5,8‡	29,0 ± 7,0#

Dados apresentados como média ± EPM. *p ≤ 0,05 vs. Cont 5mM; #p ≤ 0,05 vs. Cont 25mM; ‡p ≤ 0,05 vs. Hipo 5mM (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

Figura 7. Percentagem de células fragmentadas por análise de citometria de fluxo avaliadas em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média ± EPM

4.1.3. Análise de externalização de fosfatidilserina

O início do processo apoptótico também pode ser caracterizado pela externalização de fosfatidilserina. Neste processo, ocorre a translocação de cargas negativas da molécula de fosfolípídios da face interna da membrana citoplasmática para a superfície celular facilitando o reconhecimento das células apoptóticas por células fagocíticas que apresentam receptores para fosfatidilserina. A anexina V-FITC se liga preferencialmente a fosfolípides carregados negativamente como a fosfatidilserina (Vermes et al., 1995). Esta marcação é feita em combinação com o iodeto de propídio. As células vivas apresentam fluorescência baixa para iodeto e anexina, enquanto as em estágio inicial de apoptose apresentam alta fluorescência de anexina e baixa de iodeto e, as necróticas e apoptóticas em estágio tardio, fluorescência alta dos dois fluoróforos. O histograma e gráfico de dispersão da externalização da fosfatidilserina estão representados na Figura 8.

Figura 8. Representação em histograma (A) e gráfico de dispersão (B) da externalização de fosfatidilserina de fibroblastos cardíacos de ratos analisados em citômetro de fluxo. A região LR dos quadrantes corresponde ao número de células que possui a fosfatidilserina externalizada. Na abscissa está representada a fluorescência emitida pela anexina V-FITC e na ordenada à fluorescência emitida

pelo iodeto de propídio. No gráfico de dispersão, a abscissa representa o volume celular e a ordenada, a granulosidade dos fibroblastos. Em (C) estão apresentadas as porcentagens dos quadrantes

Estes experimentos foram realizados somente em 6 e 12hs de hipóxia, porque foram os tempos nos quais foi observado aumento na porcentagem de fragmentação de DNA. Confirmamos por esta metodologia o aumento das células apoptóticas nas primeiras horas de hipóxia (6 e 12hs) no meio com baixa glicose (5mM) quando comparado ao hiperglicêmico (25mM), sugerindo que o processo apoptótico, é mais resistente no meio hiperglicêmico (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de células com anexina V-FITC e PI positivas por análise de citometria de fluxo

Grupos	6hs	12hs
Cont 5mM	0,27 ± 0,1	0,09 ± 0,02
Hipo 5mM	3,93 ± 0,34*#	0,51 ± 0,32
Cont 25mM	0,31 ± 0,08	0,03 ± 0,01
Hipo 25mM	1,80 ± 0,89‡	1,97 ± 0,58*#‡

Dados apresentados como média ± EPM. *p ≤ 0,05 vs. Cont 5mM; #p ≤ 0,05 vs. Cont 25mM; ‡p ≤ 0,05 vs. Hipo 5mM (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.1.4. Expressão do fator de crescimento vascular (VEGF)

A expressão do VEGF foi medida no sobrenadante das células tratadas com glicose e submetidas à hipóxia. Nas primeiras horas de hipóxia (6, 12 e 24hs), foi encontrada diferença significativa somente em 12hs no meio hiperglicêmico (25mM) quando comparado aos outros grupos. Em 24hs ambos os tratamentos apresentaram valores de VEGF maiores que seus controles, porém não foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,07$) (Tabela 5 e Figura 9).

No entanto, nos tempos crônicos (48 e 72hs) as células submetidas à hipóxia apresentaram aumento da expressão do VEGF no meio hiperglicêmico quando comparado aos outros grupos. Interessantemente, no meio com baixa glicose (5mM), observou-se valores aumentados de VEGF, que não foram estatisticamente diferentes do seu controle (Tabela 5 e Figura 9).

Em 48hs as células apresentaram maior fragmentação de DNA observada na figura 7, e isto foi acompanhado de aumento da expressão do VEGF (Figura 9), sugerindo uma manutenção da viabilidade das células remanescentes. Este fato pode ser observado em 72hs de hipóxia, tempo em que não foi observada diferença na fragmentação do DNA (Figura 7); observou-se, entretanto, aumento da expressão do VEGF no meio hiperglicêmico, sugerindo uma resposta fisiológica de ativação de vias de sobrevivência celular frente à hipóxia, pelo ambiente hiperglicêmico (Figura 9).

Tabela 5 – Expressão do VEGF avaliada por ELISA (pg/ml)

Grupos	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
Cont 5mM	62 ± 6	32 ± 8	62 ± 6	112 ± 19	32 ± 8
Hipo 5mM	65 ± 13	37 ± 2	198 ± 45	186 ± 49	1046 ± 157#
Cont 25mM	78 ± 14	18 ± 1	78 ± 14	91 ± 30	18 ± 1
Hipo 25mM	71 ± 9	122 ± 11*#‡	154 ± 22	698 ± 80*#‡	1685 ± 168*#‡

Dados apresentados como média ± EPM. *p ≤ 0,05 vs. Cont 5mM; #p ≤ 0,05 vs. Cont 25mM; ‡p ≤ 0,05 vs. Hipo 5mM (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

Figura 9. Expressão do VEGF no sobrenadante dos meios de cultura avaliada por ELISA, em 6, 12, 24, 48 e 72 horas (hs) de hipóxia. Grupos Controle (Cont) e Hipóxia (Hipo) tratados em meio de cultura com 5mM (baixa glicose) ou 25mM (alta glicose). Dados apresentados como média ± EPM

4.2. Resultados dos experimentos “*in vivo*”

4.2.1. Avaliações metabólicas

Os níveis de glicose plasmática estavam maiores nos diabéticos/STZ (D: 400 ± 6 e DI: 427 ± 22 mg/dL), quando comparados a ratos normoglicêmicos (C: 90 ± 3 e I: 96 ± 3 mg/dL) demonstrando a eficácia da indução do diabetes por STZ.

Como esperado, o peso corpóreo estava significativamente reduzido nos grupos diabéticos D (278 ± 4 g) e DI (245 ± 10 g) comparado com os ratos controles (357 ± 15 g) e I (321 ± 10 g).

4.2.2. Avaliações ecocardiográficas

4.2.2.1. Tamanho do infarto do miocárdio

O tamanho do IM (avaliado pelo perímetro) foi semelhante, entre os grupos infartados nas 24hs após o procedimento cirúrgico (I: 41 ± 2 e DI: $44 \pm 4\%$ de perímetro do VE). No entanto, após 15 dias, a área acinética do grupo diabético estava **36% menor** ($28 \pm 3\%$ do perímetro do VE), em comparação com o período inicial (24hs) e $39 \pm 2\%$ em comparação ao grupo I (Figura 10).

Figura 10. Percentagem de perímetro do VE acinético ou discinético, nos animais dos grupos infartados (I) e diabético/infartado (DI), em 24 h e aos 15 dias de IM de oclusão coronariana. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. \$ $p \leq 0,05$ quando comparado ao DI 24h; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I (24h e 15 dias) (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.2.2. Avaliação da função cardíaca

Após 15 dias de IM, a função sistólica expressada por FS (%) e FE (%) estava menor no grupo I, em comparação com C, sugerindo disfunção contrátil neste grupo. Não houve diferenças entre os ratos controles e diabéticos; interessante, nos ratos diabéticos após IM a função sistólica estava preservada, apresentando valores aumentados quando comparada ao grupo somente infartado, o que pode indicar uma proteção pela hiperglicemia (Tabela 6).

Tabela 6 – Função sistólica avaliada por ecocardiograma

Grupos	FS (%)	FE (%)
C	39 ± 1	71 ± 1.5
D	39 ± 2	78 ± 2
I	25 ± 2*‡	55 ± 3*‡
DI	48 ± 2†	82 ± 3†

Dados apresentados como média ± EPM. *p ≤ 0,05 quando comparado ao C; †p ≤ 0,05 quando comparado ao I; ‡p ≤ 0,05 quando comparado ao D (ANOVA - duas vias seguida de pós-teste Tukey)

A função diastólica expressa pelo TDE (ms) e TRIV (ms) estava diminuída nos grupos diabético e infartado quando comparada com o grupo controle sugerindo uma disfunção diastólica pelo lento tempo de relaxamento. Por outro lado, no grupo infartado os valores das medidas (TDE e TRIV) estavam diminuídos confirmando a disfunção ventricular nesse grupo evidenciada pela diminuição da função contrátil. No entanto, o grupo diabético após o IM não alterou os valores de TDE e TRIV, preservando a função cardíaca após infarto (Tabela 7).

Ainda, a razão Aorta/Átrio esquerdo se apresentou diminuída nos grupos diabéticos e I, se comparados aos grupos controle e diabéticos infartados, sugerindo uma disfunção diastólica (Tabela 7).

Tabela 7 – Função diastólica avaliada por ecocardiograma

Grupos	EDT (ms)	TRIV (ms)	Razão Aorta/Átrio esquerdo (cm)
C	40 ± 1	24 ± 1	0,94 ± 0,02
D	47 ± 1*	35 ± 1*	0,76 ± 0,04*
I	32 ± 1*‡	22 ± 1‡	0,79 ± 0,02*
DI	43 ± 1†‡	30 ± 2*†‡	0,91 ± 0,02†‡

Dados apresentados como média ± EPM. *p ≤ 0,05 quando comparado ao C; †p ≤ 0,05 quando comparado ao I; ‡p ≤ 0,05 quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.3. Expressão de citocinas

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos celulares envolvidos na preservação da função cardíaca, observadas dos animais diabéticos infartados, avaliamos a expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10), como apresentado na Tabela 8.

Na tabela 8 estão apresentados os valores das expressões das citocinas envolvidas no processo inflamatório em homogeneizados do VE dos grupos estudados.

Tabela 8 – Expressão de citocinas avaliadas por ELISA

Grupos	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
C	125 $\pm$ 18	1146 $\pm$ 58	715 $\pm$ 89	1590 $\pm$ 146
D	47 $\pm$ 8*	976 $\pm$ 90	1054 $\pm$ 85	1359 $\pm$ 92
I	82 $\pm$ 24	1548 $\pm$ 230*‡	1794 $\pm$ 304*‡	1398 $\pm$ 275
DI	20 $\pm$ 5*†	811 $\pm$ 68†	1496 $\pm$ 133*	1057 $\pm$ 49

Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

A expressão de TNF- α estava diminuída no grupo diabético em comparação com o grupo controle. Além disso, o grupo diabético infartado apresentou redução adicional do TNF- α quando comparado com os grupos C e I (Tabela 8 e Figura 11A). Por outro lado, a expressão de IL-1 β estava maior no grupo I, em comparação com os demais grupos. Entretanto, a expressão de IL-1 β não se alterou nos corações dos ratos diabéticos após infarto, (Tabela 8 e Figura 11B). Esses resultados indicam uma diminuição da ativação das citocinas pró-inflamatórias após o IM nos ratos diabéticos hiperglicêmicos.

A expressão de IL-6 estava maior nos grupos I e DI, em comparação aos ratos não infartados (Tabela 8 e Figura 11C). Por outro lado, a expressão de IL-10, citocina anti-inflamatória, não mostrou diferenças entre os grupos estudados (Tabela 8 e Figura 11D).

Figura 11. Expressão de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) no VE por ELISA. Dados apresentados normalizados pela proteína total do VE, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.4. Expressão de genes de apoptose

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na preservação da função cardíaca, bem como na diminuição das citocinas pró-inflamatórias nos animais diabéticos infartados, avaliamos a expressão

gênica dos genes fatores da família Bcl2 (Bax e Bcl-2), e ativadores de apoptose (p53 e Fas). Na tabela 9 estão apresentados os valores das expressões dos genes envolvidos no processo apoptótico em homogeneizados do VE dos grupos estudados.

Tabela 9 – Expressão dos genes do processo apoptótico avaliadas por PCR em tempo real

Grupos	p53	Bax	Fas	Bcl-2
C	1 ± 0,2	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,2
D	12 ± 0,43*†	6,6 ± 0,24*	3,3 ± 0,45*	7,4 ± 0,5*
I	5 ± 0,90*	2,3 ± 0,58	2,8 ± 0,65	4,0 ± 0,83*‡
DI	33 ± 0,4*‡†	8,0 ± 0,6*‡†	6,2 ± 0,4*‡†	12,4 ± 0,4*‡†

Dados apresentados normalizados pelo controle, como média ± EPM. *p ≤ 0,05 quando comparado ao C; †p ≤ 0,05 quando comparado ao I; ‡p ≤ 0,05 quando comparado ao D (ANOVA – duas vias seguida de pós-teste Tukey)

As expressões dos genes pró-apoptóticos: p53, Bax e Fas estavam aumentadas nos grupos diabéticos (D e DI) quando comparadas aos C e I. Além disso, mostrou-se um aumento adicional no grupo DI, quando comparado a todos os grupos (Tabela 9 e Figura 12A, B e C, respectivamente).

Do mesmo modo, a expressão do gene anti-apoptótico (Bcl-2) estava aumentada nos grupos diabéticos (D e DI) quando comparada aos não diabéticos (grupos C e I). Além disso, a expressão do gene Bcl-2 no grupo DI mostrou aumento adicional quando comparado a todos os grupos (Tabela 9 e Figura 12D). Esses resultados, em conjunto, sugerem ativação do processo apoptótico; o aumento da expressão de Bcl-2 demonstra uma resposta fisiológica do tecido hiperglicêmico à hipóxia.

Figura 12. Expressão de p53 (A), Bax (B), Fas (C) e Bcl-2 (D) no VE por RT-PCR. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.5. Expressão de fatores de sobrevivência: HIF1- α , IL-8r e VEGFa

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na preservação da função cardíaca, bem como na diminuição das citocinas pró-inflamatórias e ativação da apoptose nos animais diabéticos infartados, avaliamos a expressão gênica dos fatores de sobrevivência: HIF1- α , IL-8r e VEGFa. Na tabela 10 estão apresentados os valores das expressões dos genes envolvidos no processo de sobrevivência celular em homogeneizados do VE dos grupos estudados.

Tabela 10 – Expressão dos genes de sobrevivência celular avaliada por PCR em tempo real

Grupos	HIF1- α	IL-8r	VEGF α
C	1 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3
D	6 $\pm$ 0,4*	6,4 $\pm$ 0,7*	2,8 $\pm$ 0,1*
I	5 $\pm$ 0,6*	5,9 $\pm$ 0,4*	2,0 $\pm$ 0,3*‡
DI	14 $\pm$ 0,5*‡†	23 $\pm$ 0,8*‡†	1,7 $\pm$ 0,2‡

Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. *p $\leq$ 0,05 quando comparado ao C; †p $\leq$ 0,05 quando comparado ao I; ‡p $\leq$ 0,05 quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

A expressão de HIF1- α e IL-8r estava aumentada nos grupos D e MI, quando comparados com ratos C. Além disso, o grupo diabético infartado mostrou aumento adicional da expressão do HIF1- α e IL-8r quando comparada a todos os grupos, sugerindo ativação do coração hiperglicêmico em resposta à hipóxia (Tabela 10 e Figura 13A e B, respectivamente).

Interessantemente, a expressão do VEGF α estava maior no grupo D quando comparado com o grupo C, o que pode indicar um pré-condicionamento ativado pela condição hiperglicêmica nestes animais. Após o IM, a expressão do VEGF α manteve-se aumentada no DI e também no grupo I, se comparados aos ratos somente diabéticos (Tabela 10 e Figura 13C).

Figura 13. Expressão do HIF1- α (A), IL-8r (B) e VEGFa (C) por RT-PCR. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.6. Atividade da caspase- 3

Após IM a atividade da caspase- 3 aumentou quando comparada aos grupos C e D. No entanto, no grupo DI a atividade estava maior em comparação com o grupo I corroborando com o aumento dos genes pró-apoptóticos, demonstrando a ativação da

apoptose (estágio final) nos corações dos animais diabéticos frente à hipóxia (Figura 14).

Figure 14. Atividade da caspase-3 por espectrofluorimetria, mensurada por unidades relativas de luz (URLs) a cada 02min30seg totalizando 32min30seg até platô. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.7. Expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4 e GLUT-1)

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na preservação da função cardíaca, bem como na diminuição das citocinas pró-inflamatórias, ativação das vias de apoptose e dos fatores de sobrevivência

nos animais diabéticos infartados, avaliamos a expressão protéica dos transportadores de glicose: GLUT-4 e GLUT-1. Na tabela 11 estão apresentados os valores das expressões dos transportadores de glicose em homogeneizados do VE dos grupos estudados.

Tabela 11 – Expressão protéica dos transportadores de glicose avaliada por *Western-blotting* em unidades arbitrárias (UA)

Grupos	GLUT-4 (UA)	GLUT-1 (UA)
C	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1
D	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1*
I	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,08‡
DI	0,3 ± 0,06*	0,7 ± 0,08*‡†

Dados apresentados normalizados pelo controle, como média ± EPM. *p ≤ 0,05 quando comparado ao C; †p ≤ 0,05 quando comparado ao I; ‡p ≤ 0,05 quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

A expressão protéica do GLUT-4 reduziu após IM nos animais diabéticos quando comparada com os controles (Tabela 11 e Figura 15 A). Por outro lado, a expressão do GLUT-1 se mostrou aumentada no grupo DI, em comparação com o grupo diabético, mostrando uma alteração no uso do substrato de glicose após IM (Tabela 11 e Figura 15 B).

Figura 15. Expressão protéica do GLUT-4 (A) e GLUT-1 (B) por *Western-blotting*. Dados apresentados normalizados pelo controle, como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey)

4.2.8. Análises histológicas

4.2.8.1. Densidade capilar

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos morfológicos envolvidos na preservação da função cardíaca, bem como na diminuição das citocinas pró-inflamatórias, ativação de vias da apoptose, dos fatores de sobrevivência e no melhor aproveitamento da glicose nos animais diabéticos infartados, avaliamos a

densidade capilar nos cortes histológicos dos corações dos grupos estudados, como demonstrado a seguir.

Na Figura 16 estão apresentados os resultados da densidade capilar que se encontrou aumentada no grupo de diabético ($1258 \pm 94 \text{ mm}^2$), em comparação com o grupo controle ($910 \pm 27 \text{ mm}^2$). Após o IM a densidade capilar aumentou em ambos os grupos infartados: DI ($1276 \pm 48 \text{ mm}^2$), e I ($1156 \pm 62 \text{ mm}^2$), comparados com ratos controle. Esses dados demonstram uma adaptação fisiológica à isquemia nos corações dos animais diabéticos frente à hipóxia, dando suporte aos resultados da expressão do HIF1- α e VEGF (Figura 13), nesse grupo.

Figura 16. Densidade capilar por análise histológica. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).

4.2.8.2. Escore de fibrose

Com o objetivo de determinar as possíveis repercussões morfológicas envolvidas na preservação da função cardíaca, e nos processos estudados anteriormente, avaliamos o escore de fibrose (colágeno) nos cortes histológicos dos corações dos grupos estudados, como apresentado a seguir.

Na figura 17 estão apresentados os escores de fibrose, que se encontrou aumentado após o IM em ambos os grupos (I: $1,95 \pm 0,09$ e DI: $1,2 \pm 0,13$ unidades arbitrárias) quando comparados com os grupos não infartados (C: $0,2 \pm 0,09$ e D: $0,35 \pm 0,06$ unidades arbitrárias). Além disso, o grupo DI apresentou uma redução no escore de fibrose, quando comparado ao I, mostrando um melhor remodelamento cardíaco após isquemia provavelmente guiado pela hiperglicemia (Figura 17).

Figura 17. Escore de Fibrose por análise histológica. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao C; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao I; ‡ $p \leq 0,05$ quando comparado ao D (ANOVA – duas vias, seguida de pós-teste Tukey).

5. DISCUSSÃO

Apesar de uma grande quantidade de evidências acumuladas em estudos clínicos da cardiomiopatia diabética, sugerindo um aumento do risco de IM e da taxa de mortalidade em pacientes diabéticos, os dados experimentais são bastante controversos quanto à resistência aumentada dos animais diabéticos à lesão isquêmica (Ravingerova, et al., 2003). O presente estudo foi desenvolvido: 1) para investigar a modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia tratados previamente com meio hiperglicêmico, 2) para investigar os efeitos de 15 dias de IM na função ventricular em ratos diabéticos induzidos com STZ e 3) para testar a hipótese de que a maior resistência dos corações diabéticos à lesão isquêmica está associada a um saldo positivo entre as vias intracelulares inflamatórias e de sobrevivência celular.

A principal conclusão deste estudo foi de que a disfunção do VE está atenuada em ratos diabéticos após 15 dias de IM quando comparados com ratos não diabéticos. Curiosamente, esta atenuação está associada com melhor saldo entre as citocinas inflamatórias e os genes reguladores que participam da sobrevivência celular cardíaca. Além disso, a ativação de vias de hipóxia levou ao aumento da densidade capilar e reduzida fibrose nos animais diabéticos após IM o que sugere um pré-condicionamento isquêmico associado à hiperglicemia. Estes dados em conjunto mostram a participação dos fibroblastos cardíacos no processo de remodelamento cardíaco após hipóxia, sendo positivo nos animais diabéticos, demonstrado por ativação da apoptose tanto *in vivo* com reduzida fibrose cardíaca, quanto *in vitro*, além de aumento da expressão do fator de crescimento vascular *in vivo* e *in vitro* (aumento da densidade capilar).

5.1. Modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos

O coração é composto não somente de cardiomiócitos, mas também de não miócitos, particularmente fibroblastos, os quais correspondem aproximadamente a 80% da população celular do tecido cardíaco. Diferente dos cardiomiócitos, os fibroblastos cardíacos podem proliferar mesmo no coração adulto, tendo papel principal na produção das proteínas da matriz extracelular, tais como, fibronectina e colágeno (Dostal, et al., 1996). Entretanto, os fibroblastos têm papel crítico no desenvolvimento da fibrose cardíaca, principalmente no remodelamento pós IM, quando ocorre uma dramática perda de cardiomiócitos funcionais, levando à insuficiência cardíaca. O controle da hiperplasia ou proliferação de fibroblastos é de fundamental importância neste processo; se por um lado essa proliferação quando não bem regulada possa levar à fibrose e comprometimento da função cardíaca, por outro, eles tem uma função fisiológica; nesta condição quando sintetizam fatores de crescimento que vão atuar nas células adjacentes contribuindo para a ação funcional das mesmas. Diante desta importância, este foi o tipo celular escolhido para avaliar a resistência cardíaca após hipóxia.

As células foram tratadas desde o momento da extração com dois diferentes meios de cultura, o fisiológico, considerado normoglicêmico (5mM de glicose) e com o meio hiperglicêmico (25mM de glicose), semelhante às concentrações plasmáticas de um indivíduo diabético) (~250mg/dL). Após foram submetidas a diferentes períodos de hipóxia. A curva de viabilidade celular mostrou homogenia dos valores em todos os tempos de hipóxia e em ambos os tratamentos de glicose,

mostrando que o evento de morte celular pode ser programado. De fato, nas primeiras horas de hipóxia, verificamos que a maior parte das células apresentavam a externalização de fosfatidilserina associada a fragmentação do DNA, indicando apoptose em estágio irreversível. Nos tempos mais crônicos, isso não ocorre. Ao contrário, verificamos uma menor percentagem de células em apoptose, demonstrando assim, uma maior resistência dos fibroblastos frente à hipóxia. De acordo com estes achados, previamente foi demonstrado por Mayorga (2004) maior resistência dos fibroblastos cardíacos frente à hipóxia, com ativação da caspase – 3, efetora do processo apoptótico em fase final após 72 horas de exposição.

Em maiores períodos de hipóxia, as células entraram em adaptação, respondendo de forma fisiológica à privação de oxigênio pelo aumento da expressão do fator de crescimento vascular (VEGF), e decréscimo dos valores de fragmentação do DNA, demonstrando que os fibroblastos que restaram após a renovação celular ocorrida nos tempos iniciais de hipóxia, estão em atividade. No meio hiperglicêmico os valores de expressão estavam maiores e de apoptose menores que no meio normoglicêmico, sugerindo que o meio rico em glicose favorece a modulação da viabilidade de fibroblastos cardíacos frente à hipóxia. Diante desses achados passamos a investigar quais mecanismos poderiam estar envolvidos na resposta in vivo e que poderiam contribuir para essa maior resistência e menor disfunção contrátil em resposta à hipóxia, observadas nos animais diabéticos e infartados.

5.2. Avaliações metabólicas

A estreptozotocina foi descoberta e isolada primariamente pelos seus efeitos antibióticos e antineoplásicos. Posteriormente, veio a ser utilizada por muitos investigadores para induzir o diabetes mellitus em modelos experimentais, por conta de seus efeitos destrutivos nas células β pancreáticas (Bolzan e Bianchi, 2002). A ação diabetogênica da estreptozotocina mostra-se bastante eficiente na indução de um quadro severo de diabetes, apresentando alterações semelhantes às observadas em humanos diabéticos, como: hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria e perda de peso (Junod, et al., 1969).

O presente estudo confirma os resultados obtidos em trabalhos anteriores do nosso grupo que demonstraram os prejuízos metabólicos induzidos pelo diabetes por STZ (Maeda, Fernandes et al., 1995; Dall'ago, et al., 1997; Schaan, et al., 1997; De Angelis, et al., 2000). Os grupos diabéticos apresentaram hiperglicemia e perda de peso corporal significantes demonstrando um estado metabólico similar ao observado em humanos com diabetes descontrolado. A associação do diabetes (30 dias) e IM (15 dias) não induziu redução adicional no peso corporal em relação ao ratos somente diabéticos. Como esperado, os grupos normoglicêmicos, ganharam peso normalmente até os 30 dias de protocolo.

5.3. Avaliações ecocardiográficas

A imagem de ultra-sonografia das estruturas cardíacas e velocidade do fluxo sanguíneo pelo ecocardiograma são largamente reconhecidas por proporcionar uma das mais acuradas medidas não invasivas para caracterização da massa ventricular e análise das funções sistólica e diastólica em humanos (Devereux e Reichek, 1977; Devereux, et al., 1986; Devereux, 1987). Em animais de experimentação, o uso do ecocardiograma como metodologia não invasiva da análise da função e estrutura cardíacas, também vem se tornando rotina graças ao avanço tecnológico e desenvolvimento de transdutores ultra-sonográficos com frequências maiores, que proporcionam uma resolução adequada a pequenas estruturas (Pawlus, et al., 1993). Essa prática vem sendo amplamente utilizada em estudos que requeiram análise anátomo-funcional do sistema cardiovascular no curso temporal de determinada patologia, exatamente por permitir a sobrevivência do animal até o final do experimento, podendo ser estudado os efeitos do diabetes e do IM. Neste estudo, avaliamos o tamanho do IM, a função sistólica e diastólica através do exame de ecocardiograma.

A indução do IM experimental pela ligadura coronariana foi utilizada neste estudo. Sabe-se que esse procedimento provoca isquemia miocárdica, e inicia um processo de disfunção e remodelamento do VE, podendo ainda induzir a formação de vasos colaterais no coração (Pfeffer, et al., 1991; Banai, et al., 1994; Elsner e Riegger, 1995; Unger, 2001). Os tamanhos do IM podem ser classificados como pequenos quando inferiores a 20%; moderados entre 20-39% e grandes quando maiores que 40%. No presente estudo, o tamanho do perímetro do IM representado

por áreas acinéticas e discinéticas da parede do VE foram de aproximadamente 40% nas avaliações iniciais (24hs pós IM) em ambos os grupos infartados, diabéticos ou não e na avaliação final (15 dias pós IM) somente no grupo infartado. Esse achado indicou que nesse grupo não houve alteração da área infartada durante o período do protocolo.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que cardiomiócitos expostos ao meio suplementado com insulina e elevadas concentrações de glicose são resistentes a vários insultos patológicos, incluindo isquemia, hipóxia, e sobrecarga de cálcio (Schaffer, et al., 2000; Ma, et al., 2006). Embora no presente estudo os animais não tenham sido tratados com insulina, se observou que animais diabéticos após 15 dias de IM apresentaram 36% de redução da área acinética. Alguns estudos têm demonstrado que a redução do tamanho do IM está relacionada a uma diminuição do número de cardiomiócitos mortos em animais diabéticos (Ravingerova, et al., 2003; Xu, et al., 2004), e isso pode ser atribuído a uma maior resistência de ratos diabéticos à lesão isquêmica. De fato, observou-se atenuação da disfunção diastólica e preservação da função sistólica, sugerindo que o coração do diabético é, de fato, resistente a essa injúria isquêmica. Alguns investigadores têm demonstrado anormalidades na função sistólica e diastólica em humanos e em ratos diabéticos (Di Bonito, et al., 1996; Akula, et al., 2003; De Angelis, et al., 2000). Em nosso laboratório, demonstramos recentemente que animais diabéticos por STZ apresentavam alterações estruturais, na função sistólica e diastólica em 30 dias após a indução, avaliadas tanto pelo ecocardiograma quanto pela cateterização do VE (Wichi, et al., 2007). Neste estudo, os animais diabéticos não apresentaram disfunção sistólica, mas apresentaram disfunção diastólica. Nestes animais a presença da

hiperglicemia e do IM pode estar associada com a melhora da função sistólica e manutenção da função diastólica, contrariamente ao observado nos animais somente infartados que possuem função cardíaca deprimida. Isso sugere que os animais diabéticos podem ativar mecanismos de preservação tecidual e que a hiperglicemia diabética poderia ter um papel nessa proteção à isquemia cardíaca.

5.4. Avaliação das citocinas inflamatórias

O reparo cardíaco após o IM é dependente da ativação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) que resultam no recrutamento de leucócitos para área de infarto (Frangogiannis, 2008). Em consequência, o desequilíbrio imunológico entre citocinas pró e antiinflamatórias pode ser alterado em favor de mais ou menos fatores inflamatórios, dependendo do curso de tempo da progressão da insuficiência cardíaca. A este respeito, as mudanças na concentração de TNF- α , podem ter diferentes efeitos em todos os tipos celulares envolvidos na lesão cardíaca e reparo, como a supressão da contratilidade cardíaca (Yokoyama, et al., 1993) e pela melhora da apoptose dos cardiomiócitos (Engel, et al., 2004). De fato, nosso estudo mostrou redução de TNF- α nos animais diabéticos após IM. A sinalização da IL-1 β é essencial para a ativação das vias inflamatórias e fibrogênicas na reparação da lesão do infarto e pode desempenhar um papel importante na patogênese do remodelamento pós-infarto (Bujak, et al., 2008). Por outro lado, a indução de membros da família IL-6 leva ao rápido recrutamento de células mononucleares pelos cardiomiócitos da zona viável do miocárdio isquêmico (Gwechenberger, et al.,

1999). De fato, nossos resultados mostraram que a concentração da IL-6 estava aumentada apenas em animais infartados, mas não se alterou nos animais diabéticos, após lesão isquêmica.

Essas três citocinas pró-inflamatórias não estão apenas associadas à resposta inflamatória, mas também envolvidas na insuficiência cardíaca, cardiomiopatia e remodelamento do VE, sugerindo que a redução de fatores inflamatórios pode ser um dos mecanismos responsáveis pela melhor função cardíaca observada neste grupo. Confirmando estes resultados, foi demonstrado previamente que a hiperglicemia em ratos e células em cultura foi capaz de suprimir a expressão de mediadores pró-inflamatórios pela apoptose de neutrófilos e linfócitos (Pithon-Curi, et al., 2004; Alba-Loureiro, et al., 2007). De fato, a alta proporção de linfócitos apoptóticos pelo estado diabético reforça a idéia de que a função imune está prejudicada em pacientes com diabetes mal controlado (Pithon-Curi, *et al.*, 2004).

5.5. Fatores de sobrevivência celular: participação da apoptose e angiogênese

A fim de investigar os mecanismos subjacentes à melhora da função do VE em ratos diabéticos submetidos ao IM, avaliamos a expressão de genes reguladores que participam na sobrevivência celular cardíaca: Bax, Fas, Bcl-2 e p53. Nossos resultados mostraram que a expressão gênica de todos os genes investigados estava aumentada em ratos diabéticos após IM, sugerindo que as vias pró e anti-apoptóticas podem ser ativadas simultaneamente nesta condição. Confirmando a ativação da apoptose, a atividade da caspase-3 também estava aumentada nestes animais,

sugerindo um aumento do *turnover* celular como uma tentativa de preservação da função cardíaca e redução do tecido lesionado.

Os fatores de sobrevivência podem ser ativados pela expressão aumentada de Bcl-2, como encontrado por Baffy, et al., (1993) que mostrou que o aumento da regulação do Bcl-2 em algumas células impede o acúmulo excessivo de Ca^{2+} pelas mitocôndrias, favorecendo a sobrevivência da célula. Nesta questão, embora a sobrecarga de Ca^{2+} possa ser induzida pela isquemia, a associação com a hiperglicemia parece reduzir a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Feuvray e Lopaschuk, 1997). Confirmando esses achados, resultados anteriores de nosso grupo mostraram uma redução da expressão protéica do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nos corações infartados diabéticos, o que provavelmente contribui para o rompimento e contratura mitocondrial, induzindo danos estruturais (Rodrigues, 2008). De fato, a melhora da função cardíaca nos ratos diabéticos infartados pode estar associada ao efeito protetor da Bcl-2, abolindo as ações de injúria pelo acúmulo de cálcio nos corações dos ratos diabéticos.

Em consequência da condição de hiperglicemia diabética, nossos resultados mostraram que os fatores de sobrevivência estavam aumentados nos animais diabéticos antes e após IM, como o HIF-1 α , VEGF, e IL-8r. O HIF-1 α é um fator de transcrição expresso em resposta a uma diminuição da pressão parcial de oxigênio, sendo capaz de ativar os genes envolvidos na angiogênese (Semenza, 1998), como por exemplo, o VEGF. Curiosamente, a expressão do VEGF estava já aumentada antes de IM em animais diabéticos, assim como o gene da IL-8r, quimiocina reguladora do influxo e ativação de neutrófilos com propriedades angiogênicas (Koch, et al., 1992; Mukaida, 2000; Zeilhofer e Schorr, 2000). A IL-8 e

possivelmente outras quimiocinas quimioatrativas de neutrófilos, sintetizadas por células endoteliais microvasculares, desempenham um papel importante no recrutamento de granulócitos no miocárdio infartado, aumentando a adesão celular (integrina) e ativando vias de sinalização de sobrevivência celular, MAPK (mitogen-activated protein kinase) e proteína quinase C (PKC) (Takami, et al., 2002) contribuindo para a angiogênese. Neste cenário, se a hiperglicemia realmente leva ao aumento dos fatores de sobrevivência descritos bem como ao aumento da densidade capilar pode-se especular que essas respostas aos insultos isquêmicos podem determinar alguma forma de pré-condicionamento isquêmico em ratos diabéticos. Esta resposta está fortemente associada com a melhora da função do VE observada após a lesão isquêmica, sugerindo a presença de um mecanismo fisiológico de proteção contra lesões isquêmicas cardíacas.

Outro resultado que reforça os achados de melhora funcional encontrados neste estudo, é a expressão aumentada de GLUT-1 em ratos diabéticos após IM. De fato, estudos anteriores demonstraram que o suprimento de glicose, intermediado pela ação do GLUT-1, desempenha um papel crítico cardioprotetor em resposta a isquemia miocárdica, com o aumento do aporte de glicose durante o infarto agudo (King e Opie, 1998; Cave, et al., 2000), e na progressão para insuficiência cardíaca (Rosenblatt-Velin, et al., 2001). A importância clínica da disponibilidade e captação de glicose na evolução da lesão isquêmica pós IM tem sido demonstrada pela melhora funcional observada nos pacientes tratados com glicose e insulina (Malmberg, 2004). Esta situação pode ser a chave para a melhora da função cardíaca, quando a expressão aumentada GLUT1 tem papel importante em aumentar a captação de glicose em condições isquêmicas, independente da ação da insulina.

Finalmente, o aumento das vias de sobrevivência e da densidade capilar pode estar contribuindo efetivamente para a redução da fibrose cardíaca (modulação dos fibroblastos cardíacos), como foi observado após o IM em animais diabéticos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

No presente estudo testamos a hipótese de que a hiperglicemia diabética leva à maior resistência à injúria isquêmica no tecido cardíaco e que os fibroblastos cardíacos têm papel importante nesta resistência. Para testar esta hipótese avaliamos em fibroblastos cardíacos isolados *in vitro*, submetidos ao tratamento com meio hiperglicêmico, a viabilidade celular frente à hipóxia. Além disso, avaliamos em animais diabéticos (30 dias) as alterações metabólicas, morfológicas, funcionais e moleculares do VE observadas após 15 dias de IM.

Primeiramente, nossos achados evidenciaram que os fibroblastos cardíacos submetidos ao meio com altas concentrações de glicose (hiperglicêmico) são mais resistentes à morte celular após hipóxia, respondendo ao insulto cardíaco pela síntese de VEGF. Este resultado corrobora com os dados *in vivo* sugerindo que a hiperglicemia pode contribuir para a atenuação das disfunções ventriculares (sistólica e diastólica) induzidas pela injúria isquêmica. Além disso, essa atenuação foi acompanhada de respostas positivas compensatórias do miocárdio infartado: nos genes envolvidos com a sobrevivência celular, na suplementação de glicose, bem como na morfologia cardíaca, com aumento da angiogênese e diminuição da fibrose, mostrando o papel da modulação dos fibroblastos cardíacos frente à hipóxia.

Sumarizando, o controle do crescimento da população de fibroblastos cardíacos após isquemia pela ativação da apoptose pode explicar a melhora da função cardíaca observada neste estudo. Além disso, o mecanismo anti-apoptótico expresso pelo aumento do gene Bcl-2 nos corações diabéticos infartados pode estar relacionado com a resistência dos fibroblastos cardíacos à morte celular durante a

doença cardíaca. Isso evidencia o papel dos fibroblastos cardíacos no remodelamento cardíaco sobre a função ventricular do coração diabético exposto à lesão isquêmica.

Em conclusão, mostramos que a hiperglicemia diabética pode ser uma condição favorável para manter a sobrevivência celular levando ao aumento da angiogênese. Assim, após IM os animais diabéticos apresentaram redução da fibrose cardíaca e esta foi acompanhada de melhora da função sistólica, com redução do tamanho do infarto após 15 dias. Este cenário é, provavelmente, um mecanismo de compensação associado ao saldo positivo de genes regulatórios relacionados com a sobrevivência celular programada, redução de citocinas inflamatórias, e aumento da utilização de glicose como substrato energético. Todos estes resultados estão conferindo maior plasticidade e resistência celular à lesão isquêmica, sugerindo um pré-condicionamento isquêmico e metabólico em ratos diabéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akula, A., M. K. Kota, *et al.* Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2003; 48(5):429-35.

Alba-Loureiro, T. C., S. M. Hirabara, *et al.* Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol.* 2006; 188(2):295-303.

Alba-Loureiro, T. C., C. D. Munhoz, *et al.* Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(8):1037-44.

Allen, D. A., M. M. Yaqoob, *et al.* Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(12):705-13.

Ancey, C., P. Corbi, *et al.* Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine.* 2002; 18(4):199-205.

Andersson, M., J. Sjostrand, *et al.* Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(9):2623-32.

Asahara, T., T. Takahashi, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18(14):3964-72.

Asahina, T., A. Kashiwagi, *et al.* Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H₂O₂ in high-glucose medium. *Diabetes*. 1995; 44(5):520-6.

Ashkenazi, A. e V. M. Dixit. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-8.

Baffy, G., T. Miyashita, *et al.* Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*. 1993; 268(9):6511-9.

Balakumar, P., H. Singh, *et al.* The impairment of preconditioning-mediated cardioprotection in pathological conditions. *Pharmacol Res*. 2009; 60(1):18-23.

Baldi, A., A. Abbate, *et al.* Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34(2):165-74.

Banai, S., D. Shweiki, *et al.* Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1994; 28(8):1176-9.

Becker, C., S. Lacchini, *et al.* Skeletal muscle cells expressing VEGF induce capillary formation and reduce cardiac injury in rats. *Int J Cardiol*. 2006; 113(3):348-54.

Bolzan, A. D. e M. S. Bianchi. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002; 512(2-3):121-34.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Bujak, M., M. Dobaczewski, *et al.* Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* 2008; 173(1):57-67.

Cassatella, M. A., L. Meda, *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1993; 178(6):2207-11.

Catherwood, M. A., L. A. Powell, *et al.* Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* 2002; 61(2):599-608.

Cave, A. C., J. S. Ingwall, *et al.* ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased glycolytic substrate. *Circulation.* 2000; 101(17): 2090-6.

Ceriello, A., P. Dello Russo, *et al.* High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes.* 1996; 45(4):471-7.

Chomczynski, P. e N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):156-9.

Cioffi, C. L., X. Q. Liu, *et al.* Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303(3):947-53.

Compernelle, V., K. Brusselmans, *et al.* Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2003; 60(3):569-79.

Dall'ago, P., T. G. Fernandes, *et al.* Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*, 1997; 30(1):119-24.

De Angelis, K. L., A. R. Oliveira, *et al.* Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(6):635-41.

De Macedo Braga, L. M., S. Lacchini, *et al.* In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *J Biomed Sci.* 2008; 15(3):365-74.

Devereux, R. B. Detection of left ventricular hypertrophy by M-mode echocardiography. Anatomic validation, standardization, and comparison to other methods. *Hypertension*. 1987; 9(2) Pt 2:II19-26.

Devereux, R. B., D. R. Alonso, *et al.* Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*. 1986; 57(6):450-8.

Devereux, R. B. e N. Reichek. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation*. 1977; 55(4): 613-8.

Di Bonito, P., S. Cuomo, *et al.* Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. *Diabet Med*. 1996; 13(4):321-4.

Dos Santos, L., A. F. Mello, *et al.* Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41(3):199-201.

Dostal, D. E., G. W. Booz, *et al.* Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Mol Cell Biochem*. 1996; 157(1-2):15-21.

Eastman, A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca²⁺ associated with apoptosis. *Methods Cell Biol*. 1995; 46:41-55.

Elsasser, A., K. Suzuki, *et al.* Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(5):711-24.

Elsner, D. e G. A. Riegger. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 1995; 10(3):253-9.

Engel, D., R. Peshock, *et al.* Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(3):H1303-11.

Ferri, K. F. e G. Kroemer. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays.* 2001; 23(2):111-5.

Feuvray, D. e G. D. Lopaschuk. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. *Cardiovasc Res.* 1997; 34(1):113-20.

Frangogiannis, N. G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58(2):88-111.

Gwechenberger, M., L. H. Mendoza, *et al.* Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 1999; 99(4):546-51.

Harthmann, AD. Efeitos do treinamento físico nas alterações hemodinâmicas do diabetes experimental: papel do débito cardíaco, fluxo sanguíneo e reflexos cardiovasculares [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2003.

Higuchi, R., G. Dollinger, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992; 10(4):413-7.

Jagasia, D. e P. H. McNulty. Diabetes mellitus and heart failure. *Congest Heart Fail*. 2003; 9(3):133-9; quiz 140-1.

Junod, A., A. E. Lambert, *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969; 48(11):2129-39.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4):239-57.

King, L. M. e L. H. Opie. Glucose and glycogen utilisation in myocardial ischemia--changes in metabolism and consequences for the myocyte. *Mol Cell Biochem*. 1998; 180(1-2):3-26.

Koch, A. E., P. J. Polverini, *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992; 258(5089):1798-801.

Kroemer, G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 1998; 5(6):547.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Laybutt, D. R., A. L. Thompson, *et al.* Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo. *Am J Physiol.* 1997; 273(3) Pt 2:H1309-16.

Li, H., S. Telemaque, *et al.* High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl. *Diabetes.* 2005; 54(2): 540-5..

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.

Long, C. S. e R. D. Brown. The cardiac fibroblast, another therapeutic target for mending the broken heart? *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34(10):1273-8.

Luo, X., H. Cai, *et al.* c-Jun DNazymes Inhibit Myocardial Inflammation, ROS Generation, Infarct Size, and Improve Cardiac Function After Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; Jul 17.

Ma, G., M. Al-Shabrawey, *et al.* Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by short-term diabetes: enhancement of VEGF formation, capillary density, and activation of cell survival signaling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006; 373(6):415-27.

Mackenna, D., S. R. Summerour, *et al.* Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res.* 2000; 46(2):257-63.

Maeda, C. Y., T. G. Fernandes, *et al.* Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension.* 1995; 26(6) Pt 2:1100-4.

Malmberg K. Role of insulin-glucose infusion in outcomes after acute myocardial infarction: the diabetes and insulin-glucose infusion in acute myocardial infarction (DIGAMI) study. *Endocr Pract.* 2004;10 (2):13-6.

Martin-Puig, S., Z. Wang, *et al.* Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4):320-31.

Mayer, B. e R. Oberbauer. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci.* 2003; 18:89-94.

Mayorga, M., N. Bahi, *et al.* Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem.* 2004; 279(33):34882-9.

Misao, J., Y. Hayakawa, *et al.* Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996; 94(7):1506-12.

Mukaida, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol*. 2000; 72(4):391-8.

Opie, L. H. Metabolic response during impending myocardial infarction. I. Relevance of studies of glucose and fatty acid metabolism in animals. *Circulation*. 1972; 45(2):483-90.

Otonari, R., C. R. Carvalho, *et al.* Low proliferation capacity of lymphocytes from alloxan-diabetic rats: involvement of high glucose and tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1. *Life Sci*. 2002; 71(23):2759-71.

Palojoki, E., A. Saraste, *et al.* Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280(6): H2726-31.

Pawlsh, D. G., R. L. Moore, *et al.* Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. *J Appl Physiol*. 1993; 74(5):2598-605.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.

Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer, *et al.* Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991; 260(5)Pt 2:H1406-14.

Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 44(4):503-12.

Pithon-Curi, T. C., M. P. De Melo, *et al.* Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22(5):321-6.

Ramirez-Bergeron, D. L. e M. C. Simon. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells.* 2001; 19(4):79-86.

Ravingerova, T., J. Neckar, *et al.* Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2003; 249(1-2):167-74.

Ravingerova, T., R. Stetka, *et al.* Acute diabetes modulates response to ischemia in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2000; 210(1-2):143-51.

Reed, J. C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994; 124(1-2):1-6.

Rerup, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev.* 1970; 22(4):485-518.

Rodrigues B. Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

Rosenblatt-Velin, N., C. Montessuit, *et al.* Post infarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. *Cardiovasc Res.* 2001; 52(3):407-16.

Rubart, M. e L. J. Field. Cell-based approaches for cardiac repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1080:34-48.

Sahn, D. J., A. Demaria, *et al.* Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58(6):1072-83.

Sam, F., D. B. Sawyer, *et al.* Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(1):H422-8.

Schaan, B. D., C. Y. Maeda, *et al.* Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(9):1081-6.

Schaffer, S. W., C. B. Croft, *et al.* Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278(6):H1948-54.

Schiller, N. B., H. Acquatella, *et al.* Left ventricular volume from paired biplane two-dimensional echocardiography. *Circulation.* 1979; 60(3):547-55.

Schwartzman, R. A. e J. A. Cidlowski. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* 1993; 14(2):133-51.

Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med.* 1998; 131(3):207-14.

Sun, Y., M. F. Kiani, *et al.* Infarct scar as living tissue. *Basic Res Cardiol.* 2002; 97(5):343-7.

Takami, M., V. Terry, *et al.* Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1. *J Immunol.* 2002; 168(9):4559-66.

Takemura, G., M. Ohno, *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998; 82(11):1130-8.

Tang, N., L. Wang, *et al.* Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2004; 6(5):485-95.

Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-62.

Tsujimoto, Y. e S. Shimizu. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000; 466(1):6-10.

Tune, J. D., C. Yeh, *et al*. Coronary blood flow control is impaired at rest and during exercise in conscious diabetic dogs. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97(3):248-57.

Unger, E. F. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*. 2001; 49(3):497-506.

Vandervelde, S., M. J. Van Luyn, *et al*. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(2):363-76.

Vassilopoulos, A. e P. Papazafiri. Attenuation of oxidative stress in HL-1 cardiomyocytes improves mitochondrial function and stabilizes Hif-1alpha. *Free Radic Res*. 2005; 39(12):1273-84.

Vermes, I., C. Haanen, *et al*. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1):39-51.

Wang, P., P. Wu, *et al.* Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood*. 1994; 83(9):2678-83.

Weidemann, A. e R. S. Johnson. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ.* 2008; 15(4):621-7.

Who, W. H. O. Prevalence of Diabetes Among Older Adults in America. 2005.

Wichi, R., C. Malfitano, *et al.* Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol.* 2007; 6, p.14.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr, *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.

Xi, L., M. Taher, *et al.* Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1alpha and AP-1 and iNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(6):H2369-75.

Xu, G., E. Takashi, *et al.* Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Exp Mol Pathol.* 2004; 76(1):57-65.

Yokoyama, T., L. Vaca, *et al.* Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest.* 1993; 92(5):2303-12.

Zeilhofer, H. U. e W. Schorr. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7(3):178-82.

Zhao, H. X., X. L. Wang, *et al.* Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha. *Basic Res Cardiol*, Jul 14. 2009.

Zhao, W., L. Lu, *et al.* Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325(2):605-11. .

Zhao, Z. Q., C. D. Morris, *et al.* Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2003; 59(1):132-42.

Zhu, Y. Z., Y. C. Zhu, *et al.* Time-dependent apoptotic development and pro-apoptotic genes expression in rat heart after myocardial infarction. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 86(3):355-8.

Ziegelhoeffer, T., B. Fernandez, *et al.* Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004; 94(2):230-8.

Zorzano, A., L. Sevilla, *et al.* Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol.* 1997; 80(3A):65A-76A.