

Pioglitazona Induz Apoptose e Inibe Hipertrofia de Cardiomiócitos pela Via de Sinalização do VEGFR-2

Pioglitazone Induces Cardiomyocyte Apoptosis and Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy Via VEGFR-2 Signaling Pathway

Wenliang Zhong,^{1,2} Wen Jin,³ Shanghua Xu,¹ Yanqing Wu,¹ Shunxiang Luo,¹ Minlie Liang,¹ Lianglong Chen²

Department of Cardiology, The First Hospital of Nanping City, affiliated to Fujian Medical University,¹ Nanping, Fujian - China

Department of Cardiology, Union Hospital, Fujian Medical University,² Fuzhou, Fujian – China

Cardiovascular Department, Guangdong N°.2 Provincial People's Hospital,³ Guangzhou, Guangdong – China

Resumo

Fundamento: A pioglitazona tem sido amplamente utilizada como droga sensibilizadora da insulina para melhorar o controle glicêmico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. No entanto, o risco cardiovascular bem como os efeitos protetores da pioglitazona ainda são controversos.

Objetivos: Neste estudo, investigamos se os efeitos da pioglitazona sobre a apoptose e a hipertrofia de cardiomiócitos ocorrem via regulação da via de sinalização do VEGFR-2.

Métodos: os cardiomiócitos foram isolados enzimaticamente dos ventrículos de ratos Sprague-Dawley de 1-3 anos de vida. Os efeitos da pioglitazona e do inibidor seletivo de VEGFR-2 apatinib sobre a taxa de apoptose dos cardiomiócitos foram avaliados por citometria de fluxo, e a hipertrofia avaliada por incorporação de leucina-[³H]. As expressões de VEGFR-2, Akt, P53, e mTOR fosforiladas e não fosforiladas foram determinadas por Western Blotting. Análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar diferenças entre os grupos.

Resultados: a pioglitazona e o apatinib reduziram a viabilidade e a hipertrofia de cardiomiócitos induzida por angiotensina II *in vitro*. Além disso, no mesmo modelo *in vitro*, a pioglitazona e o apatinib aumentaram significativamente a expressão de Bax e P53 fosforilada, e diminuiu a expressão de VEGFR-2, Akt, e mTOR, que promove hipertrofia de cardiomiócitos.

Conclusões: Esses resultados indicam que a pioglitazona induz a apoptose e inibe a hipertrofia de cardiomiócitos pela modulação da via de sinalização de VEGFR-2. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):162-169)

Palavras-chave: Apoptose; Miócitos Cardíaco; Cardiomegalia; Insuficiência Cardíaca/fisiopatologia; Anti-Hipertensivos; Tiazolidinedionas; Resistência à Insulina.

Abstract

Background: Pioglitazone has been widely used as an insulin-sensitizing agent for improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. However, cardiovascular risk and protective effects of pioglitazone remain controversial.

Objectives: In this study, we investigated whether pioglitazone affects cardiomyocyte apoptosis and hypertrophy by regulating the VEGFR-2 signaling pathway.

Methods: Cardiomyocytes were enzymatically isolated from 1- to 3-day-old Sprague-Dawley rat ventricles. Effects of pioglitazone and the VEGFR-2-selective inhibitor apatinib on cardiomyocyte apoptotic rate was determined using flow cytometry, and hypertrophy was evaluated using [³H]-leucine incorporation. The protein expressions of unphosphorylated and phosphorylated VEGFR-2, Akt, P53, and mTOR were determined by Western-Blotting. Analysis of variance (ANOVA) was used to assess the differences between groups.

Results: Pioglitazone and VEGFR-2-selective inhibitor apatinib reduced rat cardiomyocyte viability and cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II *in vitro*. Furthermore, in the same *in vitro* model, pioglitazone and apatinib significantly increased the expression of Bax and phosphorylated P53 and decreased the expression of phosphorylated VEGFR-2, Akt, and mTOR, which promote cardiomyocyte hypertrophy.

Conclusions: These findings indicate that pioglitazone induces cardiomyocyte apoptosis and inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating the VEGFR-2 signaling pathway. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):162-169)

Keywords: Apoptosis; Myocytes, Cardiac; Cardiomegaly; Heart Failure/physiopathology; Antihypertensive Agents; Thiazolidinediones; Insulin Resistance

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

Correspondência: Wenliang Zhong •

Department of Cardiology, The First Hospital of Nanping City, N°. 317 Zhongshan Road, Nanping, Fujian - China

E-mai: WL.Zhong@tom.com

Artigo recebido em 20/10/2017, revisado em 23/01/2018, aceito em 14/03/2018

DOI: 10.5935/abc.20180108

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é a consequência mais comum das doenças cardiovasculares e a principal causa de mortalidade em todo o mundo.¹ A base da fisiopatologia da IC é o remodelamento cardíaco, que envolve um número de mudanças celulares incluindo hipertrofia de cardiomiócitos, perda de cardiomiócitos por apoptose, necrose, proliferação de fibroblasto e fibrose.² Estudos clínicos recentes demonstraram que o diabetes mellitus (DM) provoca remodelamento cardíaco, incluindo hipertrofia do miocárdio e perda de cardiomiócitos via glicotoxicidade e lipotoxicidade, resultando em IC.³ Foi demonstrado que um controle rigoroso da glicemia reduz a ocorrência de eventos cardiovasculares importantes incluindo a IC, mas não melhora a taxa de sobrevivência global de pacientes com DM tipo 2 em comparação a pacientes que recebem tratamento padrão.³ As tiazolidinedionas, incluindo a pioglitazona, são amplamente utilizadas no controle glicêmico de pacientes com DM tipo 2 como agonistas de receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR)- γ e como agentes que melhoram a sensibilidade à insulina. No entanto, os riscos cardiovasculares da pioglitazona ainda são controversos.

Uma linha afirma que o uso de pioglitazona ou rosiglitazona para controle glicêmico aumenta o risco de IC (OR $\leq 2,1$; IC95% 1,08–4,08) com base em metanálises de ensaios clínicos randomizados.⁴⁻⁶ A rosiglitazona apresentou maior chance de induzir à IC em comparação à pioglitazona.⁷ Além disso, estudos experimentais confirmaram o risco aumentado de IC com tratamento com pioglitazona, uma vez que seu uso aumentou os danos cardíacos em um modelo de IC com ratos induzida por isoproterenol e levou à hipertrofia ventricular nos animais em experimentos sobre toxicidade aguda.^{8,9} Uma outra linha defende que o uso de pioglitazona não aumenta significativamente o risco de infarto do miocárdio ou mortalidade por doença cardíaca, baseando-se em dados do estudo *PROspective pioglitAZone Clinical Trial In macroVascular Events* (PROactive),¹⁰ e que a pioglitazona é capaz de suprimir a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga por meio da inibição da AKT/GSK3 β e de vias de sinalização da MAPK.¹¹

Receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são considerados críticos para hipertrofia cardíaca e IC. Três diferentes subtipos foram descritos – VEGFR-1, VEGFR-2, e VEGFR-3. Estudos recentes mostraram que o VEGFR-1 e o VEGFR-2 são essenciais na regressão e na indução de hipertrofia dos cardiomiócitos, respectivamente,¹² ao passo que o VEGFR-3 mostrou-se benéfico no miocárdio infartado por promover hipertrofia dos cardiomiócitos e melhor sobrevivência.¹³ Ainda, o VEGFR-2 está envolvido na fase tardia da ruptura da barreira endotelial (células endoteliais da artéria pulmonar e células endoteliais da aorta) causada por altos níveis de produtos de oxidação do 1-palmitoil-2-araquidônol-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, além de contribuir para a formação de fibras de estresse e aumentar a fosforilação de cadeias leves de miosina.¹⁴ A pioglitazona reduziu a expressão de VEGFR-2 em órgãos esplâncnicos e inibiu a neoangiogênese em um modelo de hipertensão portal com ratos,¹⁵ sugerindo um efeito direto sobre a expressão de VEGFR-2. Abordagens com rastreamento reverso – mapeamento farmacofórico reverso e docagem (*docking*) reversa são métodos importantes para identificar novas proteínas alvo para pioglitazona, relacionadas

as doenças cardiovasculares. Em nosso estudo, utilizamos o PharmMapper para mapeamento farmacofórico reverso. A estrutura da pioglitazona em formato mol2 foi submetida ao PharmMapper, obtendo-se dez alvos e poses, classificados em ordem decrescente do escore de ajuste (*fit score*). Entre os dez compostos com maiores escores, o VEGFR-2 foi o alvo potencial mais bem ranqueado, dado que será essencial para se compreender a interação entre a droga e o VEGFR-2.

Dada a potencial ligação entre a pioglitazona e o VEGFR-2 e seus papéis na hipertrofia e apoptose de cardiomiócitos e na fisiopatologia da IC, nós investigamos, pela primeira vez, se a pioglitazona afeta a hipertrofia e apoptose de cardiomiócitos por regulação da via de sinalização do VEGFR-2. Além disso, espera-se que essa seja uma abordagem promissora para esclarecer o mecanismo potencial do efeito da pioglitazona sobre desfechos cardiovasculares.

Métodos

Todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê para uso e cuidado de animais (*Institutional Animal Care and Use Committee*, IACU) do Primeiro Hospital da cidade de Nanping.

Preparação das moléculas

Para caracterizar os sítios de ligação na identificação de proteínas-alvo, utilizamos o programa *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD) versão 5.3. A estrutura cristalográfica do inibidor do VEGFR-2 (Banco de Dados de Proteínas, PDB, ID:3CP9) foi selecionada como a estrutura inicial 2. O GOLD utiliza um algoritmo genético para ancorar os ligantes no sítio de ligação de proteínas alvo, com flexibilidade conformacional total do ligante e flexibilidade parcial do receptor. A energia de ligação do ligante foi predita pela função ChemScore e energia livre de ligação (ΔG) do GOLD.¹⁶ As moléculas solventes foram removidas da estrutura cristalina e átomos de hidrogênio da proteína foram adicionados. Para a definição dos sítios de ligação, estabeleceu-se que a inclusão de aminoácidos localizados dentro de 10 Å das coordenadas do inibidor na estrutura cristalina. As dez principais poses ancoradas foram obtidas finalizando a simulação uma vez que a raiz do erro médio quadrático (do inglês *Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre qualquer pose de ligante fosse atingido. Os resultados foram visualizados utilizando-se o PyMol versão 1.3 e o LigPlot+ versão 1.4.

Isolamento e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos

Os cardiomiócitos foram isolados enzimaticamente de ventrículos de ratos Sprague-Dawley com 1 a 3 dias de idade conforme descrito previamente.¹⁷ Doze ratos foram utilizados para a realização de 12 experimentos independentes. Os cardiomiócitos isolados foram semeados em placas de culturas celulares cobertas com 10 g/mL de fibronectina e cultivadas em um meio contendo DMEMF-12 com HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 5% de soro de cavalo inativado pelo calor, 100 U/mL de penicilina, 10 μ g/mL de estreptomicina, 3 mM de ácido pirúvico, 2 mg/mL de albumina sérica bovina, 100 g/mL de ampicilina, meio insulina-transferrina-selênio (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 g/mL

ácido linoleico, e 100 M de ácido ascórbico a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5 % CO₂. Para todos os experimentos, as células foram cultivadas a 5 × 10⁴ células/cm² (ou outro valor especificado, se o caso).

Ensaio de proliferação celular

Efeitos de pioglitazona e do inibidor seletivo de VEGFR-2 apatinib (Apexbio Technology LLC, Houston, TX, EUA) sobre a proliferação celular foram medidos por contagem de células coradas por cristal violeta 24 horas após o tratamento, por um contador automático (BioRad). Resumidamente, os cardiomiócitos (5×10⁴ células/poço) foram semeados em placas de 96 poços e cultivados em um meio padrão por 24 horas. Após 24 horas sem soro, os cardiomiócitos foram tratados com angiotensina 0,1 μM (Ang II) por 24 h. Pioglitazona (0, 10 ou 20 μM) e inibidor seletivo de VEGFR-2 apatinib (2 μM) foi adicionado ao meio de cultura 2 horas antes da administração de Ang II. Para a marcação com cristal violeta, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina, fixados com metanol 20% por 30 minutos, e corados com solução de cristal violeta 0,2% por 30 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação. As células coradas foram lavadas até clara visualização do fundo. O corante cristal violeta foi extraído utilizando-se SDS 1% e as células foram contadas utilizando-se um contador automático.

Deteção de apoptose por citometria de fluxo

A taxa de apoptose foi determinada por citometria de fluxo com corante anexina V-FITC (AV) combinada com iodeto de propídio (IP). Em resumo, após o tratamento, as células (1-5 × 10⁵/ml) foram coletadas, lavadas duas vezes com tampão salina fosfato, ressuspensas em 500 μL de tampão de ligação. Em seguida, as células foram incubadas com 10 μL de AV e 5 μL de PI em sala escura e temperatura ambiente por 15 minutos. As células apoptóticas foram identificadas por CMF dentro de 30 minutos.

Hipertrofia dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos foram semeados a 5 × 10⁴ células por poço em placas de 96 poços e a hipertrofia foi avaliada por incorporação de [³H]-leucina, conforme descrito anteriormente.¹⁸ Em resumo, 2 horas após o tratamento com pioglitazona (0-20 μmol/L) e apatinib (2 μM), Ang II 0,1 μM foi usada para estimular a hipertrofia dos cardiomiócitos, e 1 μCi [³H]-leucina foi simultaneamente adicionada a cada poço. Após estimulação com AngII por 60 horas, as células foram colhidas por precipitação com ácido tricloroacético a 10% em gelo por 30 minutos, antes de ser solubilizado com NaOH 1 mol/L de um dia para outro a 4°C. As amostras foram neutralizadas com HCl 1 mol/L e os níveis de [³H] foram determinados em solução de cintilação usando um contador (beta) para avaliar a incorporação de [³H]-leucina.

Análise por Western Blotting

Células tripsinizadas foram lisadas em tampão de radioimunoprecipitação, homogeneizadas em gelo, e

centrifugadas. O sobrenadante foi diluído com SDS-PAGE 10% e transferido para membranas PVDF (Millipore). As membranas foram bloqueadas com salina tamponada (TBS) contendo 5% de leite desnatado e incubadas com os seguintes anticorpos primários a 4°C de um dia para o outro: VEGFR-2 (ab39256; 1:1000; Abcam), fosfo-VEGFR-2 (Tyr1175) (#2478; 1:1000; Cell Signaling Technology), Akt (#9272; 1:1000; Cell Signaling Technology), fosfo-Akt (Thr308) (#9275; 1:1000; Cell Signaling Technology), P53 (#9282; 1:1000; Cell Signaling Technology), fosfo-P53 (Ser15) (#9284; 1:1000; Cell Signaling Technology), Bax (#14796; 1:1000; Cell Signaling Technology), anti-mTOR de coelho (#2972; 1:1000; Cell Signaling Technology), anti-mTOR fosforilado de coelho (Ser2448) (#5536; 1:1000; Cell Signaling Technology), e GAPDH (#2118; 1:1000; Cell Signaling Technology). No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes com TBS com tween (TBST) por 5 minutos em temperatura ambiente e depois incubadas com anticorpos secundários anti-IgHG de coelhos por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBST e expostas a um filme de raio X. As intensidades da banda no filme foram analisadas por densitometria, e os resultados normalizados para β actina. A proteína GAPDH foi usada como controle de carga.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 13.0. O teste Kolmogorov Smirnov foi usado para se testar a normalidade da distribuição dos dados e o teste de Levene para avaliar a homogeneidade da variância. Todos os dados apresentaram distribuição normal e a homogeneidade da variância foi apresentada como média ± DP. O teste ANOVA de um fator (one-way ANOVA) foi usado para comparações entre vários grupos, e o teste de Bonferroni usado para comparações pareadas. Um valor de p < 0,05 indicou significância estatística.

Resultados

VEGFR-2 como melhor alvo potencial para pioglitazona

Entre os dez compostos que apresentaram melhor pontuação do PharmMapper, o VEGFR-2 foi o que apresentou maior pontuação. Para entender a interação entre o pioglitazona e o VEGFR-2 e avaliar a energia de ligação, realizamos um estudo de docagem (*docking*) utilizando o GOLD. A conformação ótima de ligação do complexo pioglitazona-VEGFR-2 está apresentada nas Figuras 1A e 1B. O escore ChemScore e a energia de ligação do complexo pioglitazona-VEGFR-2 foram comparáveis à complexa estrutura cristalográfica do inibidor de VEGFR-2. Foram previstas interações de van der Waals da pioglitazona com Val363, Leu428, Cys454, Leu444, Leu310, Phe456, Gly387, Phe383, Val364, e Ile453, e sua ligação com Cys384 e Asp455 por ligações de hidrogênio (Figura 1B). A técnica de Western Blotting foi realizada para avaliar o efeito da pioglitazona sobre a expressão do VEGFR-2 e do fosfo-VEGFR-2 em cardiomiócitos de ratos neonatos de modo dose-dependente (Figura 1 C).

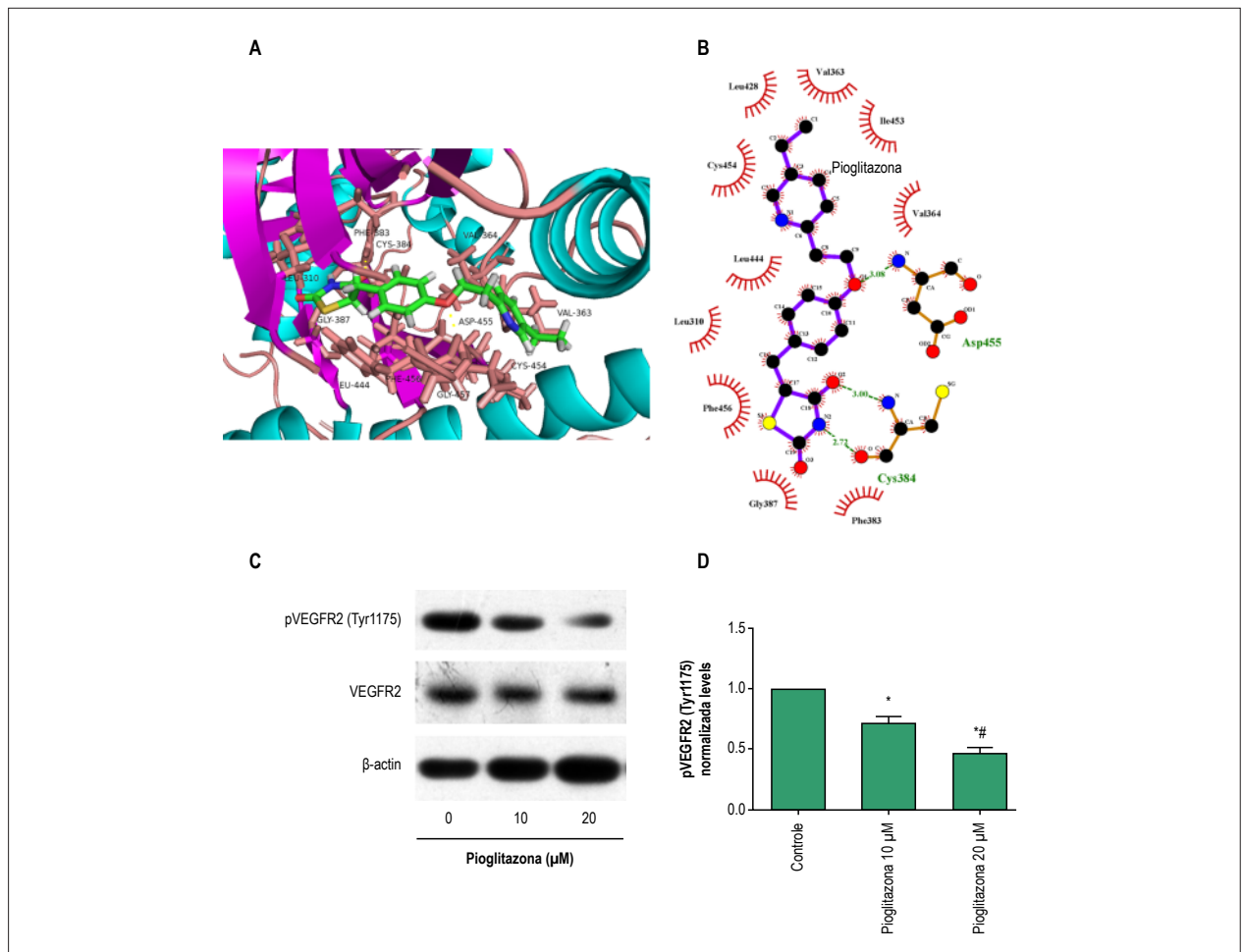


Figura 1 – O VEGFR-2 é o alvo potencial para a pioglitazona. (A) modelo de docagem (docking) molecular 3D da pioglitazona com VEGFR-2; estrutura verde: conformador da pioglitazona. (B) modelo de docking molecular 2D da pioglitazona com VEGFR-2. Ligações de hidrogênio entre a pioglitazona e o VEGFR-2 estão indicadas com linha verde. (C e D) Western Blot dos níveis de VEGFR-2 e fosfo-VEGFR-2 (Tyr1175) de cardiomiócitos de ratos neonatais sob estímulo hipertrófico, tratados com 0, 10, 20 (μM) de pioglitazona por 24 horas, e (C) intensidade das bandas normalizada para β-actina (n = 12 em cada grupo). Todos os dados são apresentados em média ± DP. Comparações com o grupo controle: *p < 0,01 com grupo pioglitazona 10 μM; # p < 0,01, calculado por one-way ANOVA e teste post hoc de Bonferroni para comparações pareadas.

A pioglitazona promoveu apoptose e inibiu a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pela Ang II

Para validar os efeitos da pioglitazona, foram avaliadas a viabilidade do cardiomiócitos e da hipertrofia induzida pela Ang II. O corante cristal violeta, um teste rápido e versátil para se detectar a viabilidade celular sob diversas condições de estímulo,¹⁹ foi usado para avaliar a viabilidade celular. A pioglitazona inibiu a viabilidade dos cardiomiócitos de modo dose dependente (Figuras 2A e 2B, p < 0,01), com concentrações efetivas variando de 0 a 20 μmol/L. O inibidor seletivo para VEGFR-2 apatinib também inibiu a viabilidade dos cardiomiócitos - (Figuras 2A e 2B, p < 0,01). A taxa de apoptose dos cardiomiócitos foi determinada pela técnica de marcação com corante AV/PI. As taxas apoptóticas nos grupos pioglitazona 20 μM, pioglitazona 10 μM, e apatinib 2 μM foram significativas maiores que no grupo controle (Figuras 2C e 2D, p < 0,01). A incorporação de [3H]-leucina induzida por

Ang II foi significativamente menor após o tratamento com pioglitazona ou com apatinib, indicando que ambos inibiram a hipertrofia de cardiomiócitos.

A pioglitazona inibiu a hipertrofia e promoveu a apoptose de cardiomiócitos pela supressão da sinalização do VEGFR-2

Os mecanismos potenciais da inibição induzida da hipertrofia dos cardiomiócitos pela pioglitazona e a promoção de apoptose dessas células foram avaliados *in vitro*. Em comparação aos cardiomiócitos sob condições controle, a pioglitazona aumentou significativamente a expressão do Bax e fosfo-P53 e diminuiu a expressão do fosfo-VEGFR-2 em cardiomiócitos de ratos neonatos sob estímulo hipertrófico (Figuras 1C e 3).

Para avaliar se o VEGFR-2 é alvo da pioglitazona, os efeitos da droga sobre a expressão de VEGFR-2 e sinalização intracelular regulada pelo VEGFR-2 foram determinados

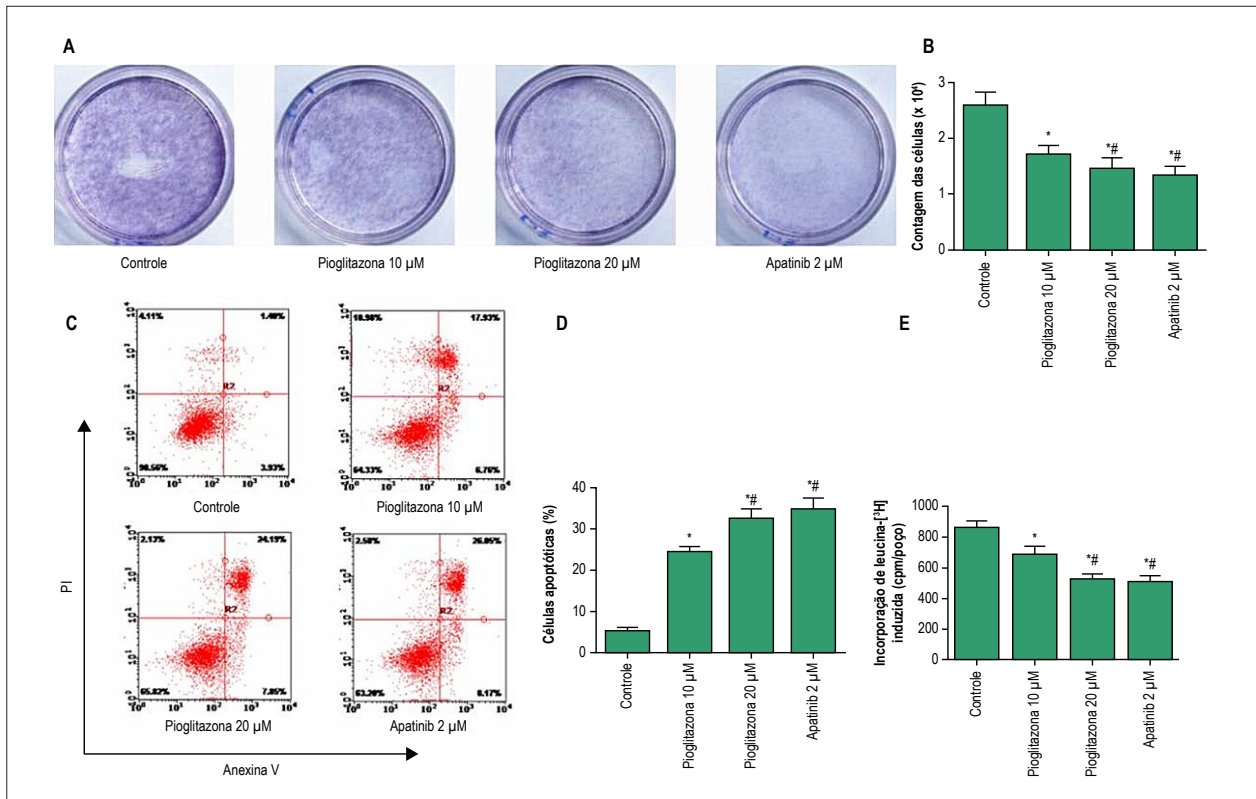


Figura 2 – A pioglitazona e o apatinib induziram hipertrofia de cardiomiócitos de ratos neonatais ($n = 12$ em cada grupo). (A) Coloração com cristal violeta em resposta a várias concentrações de pioglitazona e apatinib. Ambos inibiram a viabilidade de cardiomiócitos de ratos neonatais. (B) A proliferação celular apatinib foi determinada usando contador celular automático. (C e D) A pioglitazona e o apatinib induziram apoptose de cardiomiócitos de ratos neonatais, detectado por citometria de fluxo com coloração com anexina V (AV) combinada com iodeto de propídio. A pioglitazona (10, 20 µM) e o apatinib (2 µM) aumentaram a apoptose de cardiomiócitos em comparação ao grupo controle. (E) Incorporação de leucina-[³H] induzida por angiotensina II em resposta a diferentes concentrações de pioglitazona ou apatinib. Todos os dados são apresentados em média ± DP. * $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle; # $p < 0,01$, em comparação à pioglitazona 10 µM, calculados por one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações pareadas.

em cardiomiócitos de ratos neonatos sob indução de hipertrofia pela Ang II. Em comparação aos cardiomiócitos hipertróficos não tratados, a pioglitazona diminuiu significativamente a expressão de fosfo-VEGFR-2, fosfo-Akt, e fosfo-mTOR, o que pode contribuir para a hipertrofia dos cardiomiócitos. Além disso, o apatinib reduziu significativamente a expressão de VEGFR-2, fosfo-VEGFR-2, fosfo-Akt, e fosfo-mTOR (Figura 1C, Figura 3).

Discussão

No presente estudo, mostramos que a pioglitazona reduziu a viabilidade dos cardiomiócitos e a hipertrofia induzida por Ang II, aumentou a expressão de Bax e P53 fosforilada, e diminuiu a expressão de VEGFR-2, Akt, e mTOR fosforilados *in vitro*. Esses achados sugerem que a pioglitazona induz a apoptose e inibe a hipertrofia de cardiomiócitos por seus efeitos na via de sinalização de VEGFR-2.

A pioglitazona tem sido amplamente utilizada no controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2. O estudo PROactive mostrou que a pioglitazona reduziu o principal desfecho secundário composto, o qual englobou morte por doença cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em comparação a placebo em 43% da população do

estudo.¹⁰ Esses achados indicam que a pioglitazona melhora a função vascular em pacientes diabéticos e em pacientes não diabéticos com resistência à insulina, e sugerem um possível efeito benéfico do tratamento com pioglitazona no prognóstico desses pacientes. Além disso, uma metanálise mostrou que a suplementação da terapia insulínica com pioglitazona em pacientes com DM tipo 2 e controle deficiente dos níveis glicêmicos contribuiria para a redução desses níveis bem como da dosagem de insulina, sem aumentar os riscos de infarto do miocárdio, IC, morte por doença cardíaca e morte por todas as causas, porém, com aumento nos níveis de colesterol total e nos riscos de ocorrência de hipoglicemia e edema.²⁰

Com base nas evidências disponíveis, o tratamento com pioglitazona parece ser vantajoso em pacientes com IC. Contudo, também foi relatado que a pioglitazona aumenta o risco de hospitalização por IC por um período maior que 30 dias, apesar de a probabilidade de se prescrever pioglitazona a pacientes com alto risco de IC ser menor.²¹ Além disso, estudos clínicos indicaram que o tratamento com baixas doses de pioglitazona não reduz a taxa de reestenose intra-stent, volume neointimal ou volume do ateroma em pacientes com DM que foram submetidos à intervenção coronária com stents liberadores de droga.²² Além das diferentes metodologias aplicadas nesses estudos, as razões para os resultados

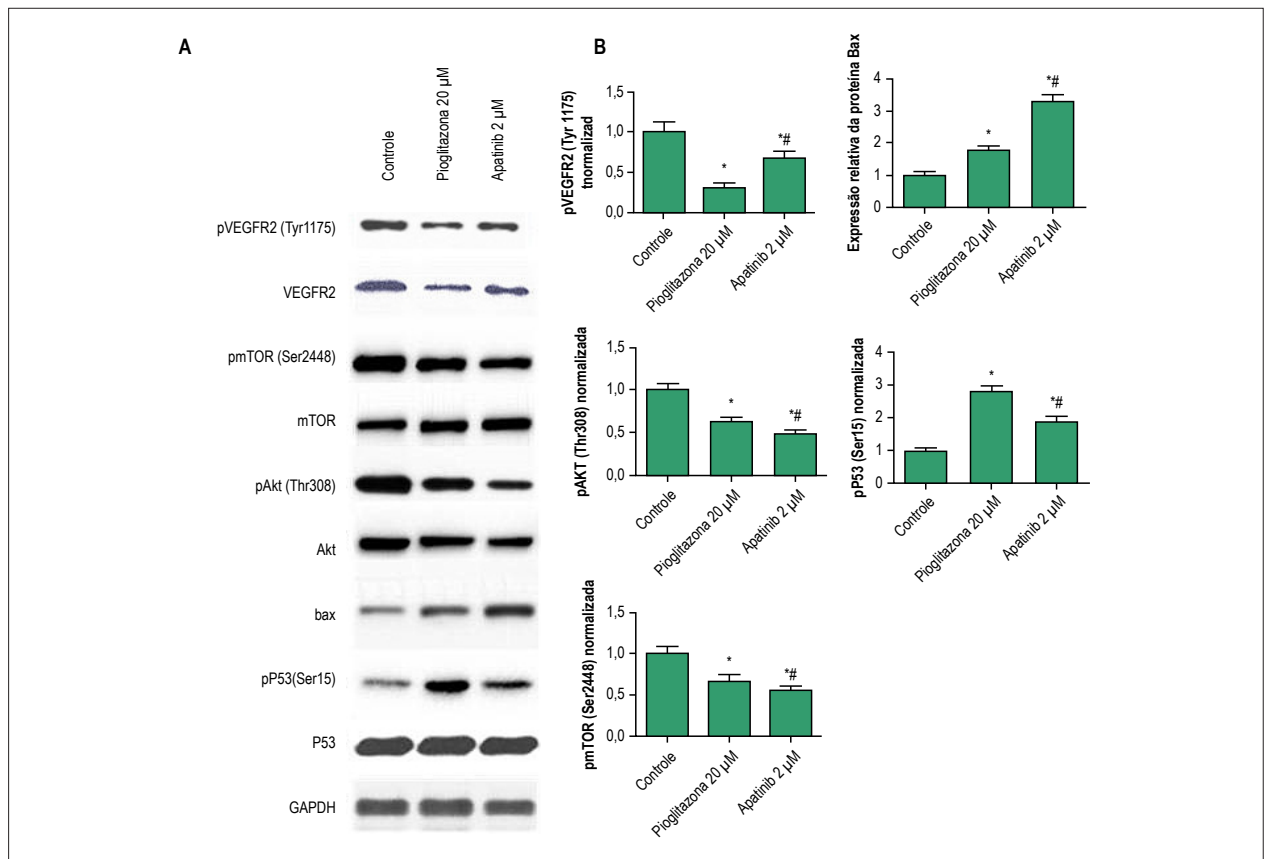


Figura 3 – A pioglitazona e o apatinib regulam a sinalização de VEGFR-2 em cardiomiócitos de ratos neonatais após hipertrofia induzida por Angiotensina II (n = 12 em cada grupo). (A e B) Western blot dos níveis de fosfo-VEGFR-2, VEGFR-2, fosfo-mTOR, mTOR, fosfo-Akt, Akt, Bax, fosfo-P53 e P53 em cardiomiócitos de ratos neonatais sob estímulo hipertrofico e tratados com pioglitazona (20 µM) ou apatinib (2 µM) por 24 horas, e (A) intensidade das bandas normalizadas para GAPDH. Todos os dados são apresentados em médias ± DP. *p < 0,01 em comparação ao grupo controle; # p < 0,01, em comparação à pioglitazona 20 µM, calculados por one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações pareadas.

controversos sobre o efeito da pioglitazona na IC ainda não claras. Por isso, a investigação de alvos cardiovasculares da pioglitazona é uma abordagem promissora para esclarecer o efeito da droga sobre desfechos cardiovasculares.

Os efeitos da pioglitazona sobre o sistema cardiovascular foram previamente publicados. Em ratos, a pioglitazona atenuou a hipertrofia ventricular direita induzida por monocrotalina e fibrose, e diminuiu o tamanho dos cardiomiócitos.²³ A pioglitazona (2,5 mg/Kg) melhorou a disfunção cardíaca sistólica e diastólica em um modelo de hipertensão induzida por Ang II em ratos.²⁴ Além disso, a pioglitazona preveniu a hipertrofia de cardiomiócitos induzida por Ang II inibindo-se as vias de sinalização de AKT/GSK3β e MAPK. No entanto, a pioglitazona (40 mg/Kg) induziu a hipertrofia cardíaca com aumento do volume plasmático, sem afetar seus efeitos cardíacos metabólicos e sobre a sensibilidade insulínica em todo o corpo.²⁵ Esses achados contrastantes podem ser causados por diferenças nas doses de pioglitazona utilizadas, uma vez que o tratamento com essa droga em doses supraterapêuticas induz cardiotoxicidade.^{26,27} Análise proteômica dos perfis de ligação *off-target* para a pioglitazona sugeriu fontes potenciais de eficácia e de cardiotoxicidade – distúrbios na função mitocondrial e nos canais de íons cardíacos, e ruptura na sinalização simpática cardíaca.²⁸ No presente estudo, a pioglitazona induziu a apoptose e inibiu a hipertrofia dos cardiomiócitos, o que indica,

a nosso ver, que o tratamento com pioglitazona não é vantajoso em pacientes com IC. Foi relatado um número aumentado de células apoptóticas no coração de ratos espontaneamente hipertensos, sugerindo que a apoptose pode ser um mecanismo envolvido na redução da massa cardíaca, que acompanha a transição de um estado de compensação estável para IC nesse modelo.²⁹ Ainda, a apoptose de cardiomiócitos é um fator determinante ainda mais crítico na transição de uma hipertrofia cardíaca compensatória à IC.³⁰ Contudo, estudos sobre os possíveis mecanismos da pioglitazona sobre fatores de risco cardiovasculares foram conduzidos, até o momento, em condições *in vitro* e, por isso, estudos coortes prospectivos são necessários para confirmar tais efeitos.

Neste estudo, abordagens de rastreamento reverso (*docking* e mapeamento farmacofórico) foram utilizadas para identificar potenciais proteínas alvo da pioglitazona, relacionadas com doença cardiovascular. A pioglitazona pode estar relacionada com a regulação da angiogênese, formação de neointima, e aterosclerose associadas com vias que envolvem o VEGFR-2.³¹⁻³³ O VEGFR-2 é um receptor de tirosina quinase que se dimeriza ao se ligar ao composto ligante e é ativado por trans-fosforilação.³³ A ativação do VEGFR-2 estimula sinalização *downstream*, incluindo a ativação de vias de c-Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt, levando ao aumento de proliferação, migração e sobrevivência das células.^{34,35} Em nosso estudo, identificamos

que a pioglitazona atuou diretamente no VEGFR-2 e inibiu a expressão de fosfo-VEGFR-2, indicando que a pioglitazona induz a apoptose e inibe a hipertrofia de cardiomiócitos^{35,36} de ratos neonatais por meio da inibição da sinalização do VEGFR-2. A via de sinalização *downstream* do PI3/Akt também tem participação na sobrevivência e hipertrofia dessas células, por inibição de vias dependentes de P53 e ativação de vias dependentes de m-TOR, respectivamente.³⁷ Neste estudo, a pioglitazona e o inibidor de VEGFR-2 apatinib aumentaram a expressão de fosfo-P53 e Bax nos cardiomiócitos e diminuíram a expressão de cardiomiócitos hipertróficos, indicando a ligação entre a pioglitazona e a via de sinalização do VEGFR-2.

Conclusão

Os achados aqui apresentados indicam que a pioglitazona induz a apoptose e inibe a hipertrofia de cardiomiócitos, em parte por ativação da via de sinalização do VEGFR-2. Esses achados contribuem para o entendimento dos riscos cardiovasculares da pioglitazona.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Zhong W, Chen L; Obtenção de dados: Zhong W, Jin W, Wu Y, Luo S, Liang M;

Análise e interpretação dos dados e análise estatística: Zhong W, Jin W, Xu S, Wu Y, Luo S, Liang M; Obtenção de financiamento: Zhong W; Redação do manuscrito: Zhong W, Jin W, Liang M; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Zhong W, Xu S, Liang M.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Natural Science Foundation of Fujian Province Project (No. 2010J01371).

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Pós-Doutorado de Wenliang Zhong pela Union Hospital of Fujian Medical University.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do First Hospital of Nanping City sob o número de protocolo NP01371.

Referências

1. Dassanayaka S, Jones SP. Recent developments in heart failure. *Circ Res.* 2015;117(7):e58-63.
2. Braunwald E. Research advances in heart failure: a compendium. *Circ Res.* 2013;113(6):633-45.
3. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical update: cardiovascular disease in diabetes mellitus: atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus—mechanisms, management, and clinical considerations. *Circulation.* 2016;133(24):2459-502.
4. Eurich DT, McAlister FA, Blackburn DF, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Varney J, et al. Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review. *BMJ.* 2007;335(7618):497.
5. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet.* 2007;370(9593):1129-36.
6. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Thiazolidinediones and heart failure: a teleo-analysis. *Diabetes Care.* 2007;30(8):2148-53.
7. Varas-Lorenzo C, Margulis AV, Pladevall M, Riera-Guardia N, Calingaert B, Hazell L, et al. The risk of heart failure associated with the use of noninsulin blood glucose-lowering drugs: systematic review and meta-analysis of published observational studies. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014 Sep 26;14:129.
8. Biswas A, Rabbani SI, Devi K. Influence of pioglitazone on experimental heart failure and hyperlipidemia in rats. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(3):333-9.
9. Chinnam P, Mohsin M, Shafee LM. Evaluation of acute toxicity of pioglitazone in mice. *Toxicol Int.* 2012;19(3):250-4.
10. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al; PROactive Investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9493):1279-89.
11. Wei WY, Ma ZG, Xu SC, Zhang N, Tang QZ. Pioglitazone protected against cardiac hypertrophy via inhibiting AKT/GSK3 β and MAPK signaling pathways. *PPAR Res.* 2016;2016:9174190.
12. Zhou Y, Bourcy K, Kang YJ. Copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy is associated with enhanced vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 2009;84(1):54-63.
13. Zhao T, Zhao W, Meng W, Liu C, Chen Y, Gerling IC, et al. VEGF-C/VEGFR-3 pathway promotes myocyte hypertrophy and survival in the infarcted myocardium. *Am J Transl Res.* 2015;7(4):697-709.
14. Birukova AA, Lee S, Starosta V, Wu T, Ho T, Kim J, et al. A role for VEGFR2 activation in endothelial responses caused by barrier disruptive OxPAPC concentrations. *PLoS One.* 2012;7(1):e30957.
15. Schwabl P, Payer BA, Grahovac J, Klein S, Horvatis T, Mitterhauser M, et al. Pioglitazone decreases portosystemic shunting by modulating inflammation and angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 2014;60(6):1135-42.
16. Wang WJ, Huang Q, Zou J, Li LL, Yang SY. TS-Chemscore, a target-specific scoring function, significantly improves the performance of scoring in virtual screening. *Chem Biol Drug Des.* 2015;86(1):1-8.
17. Fang X, Mei W, Barbazuk WB, Rivkees SA, Wendler CC. Caffeine exposure alters cardiac gene expression in embryonic cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307(12):R1471-87.
18. Yu L, She T, Li M, Shi C, Han L, Cheng M. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and tumor necrosis factor- α secretion through an NF- κ B-dependent mechanism. *Int J Mol Med.* 2013;32(3):717-22.

19. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(4):pdb.prot087379.
20. Tan A, Cao Y, Xia N, Mo Z, Gao F. The addition of pioglitazone in type 2 diabetics poorly controlled on insulin therapy: a meta-analysis. *Eur J Intern Med.* 2010;21(5):398-403.
21. Suh S, Seo GH, Jung CH, Kim MK, Jin SM, Hwang YC, et al. Increased risk of hospitalization for heart failure with newly prescribed dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and pioglitazone using the korean health insurance claims database. *Diabetes Metab J.* 2015;39(3):247-52.
22. Lee HW, Lee HC, Kim BW, Yang MJ, Park JS, Oh JH, et al. Effects of low dose pioglitazone on restenosis and coronary atherosclerosis in diabetic patients undergoing drug eluting stent implantation. *Yonsei Med J.* 2013;54(6):1313-20.
23. Behringer A, Trappiel M, Berghausen EM, Ten Freyhaus H, Wellnhofer E, Odenthal M, et al. Pioglitazone alleviates cardiac and vascular remodelling and improves survival in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016;389(4):369-79.
24. Sakamoto A, Hongo M, Furuta K, Saito K, Nagai R, Ishizaka N. Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin II-induced hypertension. *Int J Cardiol.* 2013;167(2):409-15.
25. Chang CS, Tsai PJ, Sung JM, Chen JY, Ho LC, Pandya K, et al. Diuretics prevent thiazolidinedione-induced cardiac hypertrophy without compromising insulin-sensitizing effects in mice. *Am J Pathol.* 2014;184(2):442-53.
26. Elshama SS, El-Kenawy Ael-M, Osman HE. Toxicological evaluation of subchronic use of pioglitazone in mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(7):712-9.
27. Chinnam P, Mohsin M, Shafee LM. Evaluation of acute toxicity of pioglitazone in mice. *Toxicol Int.* 2012;19(3):250-4.
28. Hoffmann BR, El-Mansy MF, Sem DS, Greene AS. Chemical proteomics-based analysis of off-target binding profiles for rosiglitazone and pioglitazone: clues for assessing potential for cardiotoxicity. *J Med Chem.* 2012;55(19):8260-71.
29. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):H2313-9.
30. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell.* 1999;97(2):189-98.
31. Petrovan RJ, Kaplan CD, Reisfeld RA, Curtiss LK. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1095-100.
32. Bhardwaj S, Roy H, Babu M, Shibuya M, Yla-Herttuala S. Adventitial gene transfer of VEGFR-2 specific VEGF-E chimera induces MCP-1 expression in vascular smooth muscle cells and enhances neointimal formation. *Atherosclerosis.* 2011;219(1):84-91.
33. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(2):154-65.
34. Sarabipour S, Ballmer-Hofer K, Hristova K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *Elife.* 2016 Apr 7;5:e13876.
35. Masuda T, Muto S, Fujisawa G, Iwazu Y, Kimura M, Kobayashi T, et al. Heart angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy suppresses coronary angiogenesis and progresses diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(9):H1871-83.
36. Zheng L, Han P, Liu J, Li R, Yin W, Wang T, et al. Role of copper in regression of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr 18;148:66-84.
37. Song HK, Kim J, Lee JS, Nho KJ, Jeong HC, Kim J, et al. Pik3ip1 modulates cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K pathway. *PLoS One.* 2015;10(3):e0122251.

