

Expressão Imunoistoquímica de Diferenciação e Crescimento Celular em Cardiomiócitos de Neonatos

Immunohistochemical Expression of Cell Differentiation and Growth in Neonate Cardiomyocytes

Tarcísio Fulgêncio Alves da Silva¹, Greyce Kelly de Souza¹, Mona Adalgisa Simões¹, Francisco Cesar Pabis¹, Lucia de Noronha^{1,2}

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR¹, Universidade Federal do Paraná - UFPR², PR - Brasil

Resumo

Fundamento: As alterações cardíacas na fase de transição do coração fetal para a vida extrauterina vêm sendo exploradas por inúmeras pesquisas em animais, e os mecanismos celulares responsáveis por essas modificações ainda não estão bem documentado em seres humanos.

Objetivo: Avaliar o mecanismo de diferenciação celular em cardiomiócitos ocorridas nos primeiros dias de vida, por meio da análise imunoistoquímica de proteínas envolvidas com processos de proliferação e contração muscular, em amostras de miocárdio de recém-natos humanos.

Método: Estudo transversal de amostras parafinadas de miocárdio provenientes de banco de necropsias de recém-nascidos humanos, divididos em dois grupos amostrais: recém-nascidos a termo que foram a óbito com no máximo dois dias de vida (NEO1) com 10 casos, e recém-nascidos a termo que foram a óbito entre três e 10 dias de vida (NEO2) com 14 casos, a fim de seguir uma linha de tempo que contemplasse a fase de transição da circulação fetal a vida extrauterina. As amostras foram estudadas em *tissue microarray* e os anticorpos utilizados foram o Ki67, PCNA, PTEN, Bcl2 (proliferação) e HHF35 e actina sarcomérica (proteínas contráteis).

Resultados: Foi encontrada diferença com o Ki67 $p = 0,02$, HHF35 $p < 0,01$ e actina sarcomérica $p = 0,02$, e a expressão do Ki67 foi mais alta no grupo NEO1 e a expressão do HHF35 e da actina sarcomérica foi mais alta no grupo NEO2.

Conclusão: Os resultados sugerem que os cardiomiócitos apresentam uma característica proliferativa (Ki67) nos NEO1 e que essa vai, seguindo uma linha temporal, sendo substituída por um caráter de diferenciação (HHF35 e actina sarcomérica) nos NEO2. (Arq Bras Cardiol 2012;99(3):797-801)

Palavras-chave: Recém-nascido; miócitos cardíacos / classificação; imunoistoquímica; transição de fase; circulação placentária.

Abstract

Background: The cardiac alterations during the fetal heart transition to extrauterine life have been explored by several animal studies and the cell mechanisms responsible for these modifications are not well documented in humans.

Objective: To evaluate the mechanism of cell differentiation into cardiomyocytes that occur in the first days of life, through immunohistochemical analysis of proteins involved in proliferation and muscle contraction processes, in samples of human neonate myocardium.

Methods: Cross-sectional study of paraffin-sample sections of myocardium from an autopsy database of human neonates, divided into two sample groups: full-term neonates who died after a maximum of two days of life (NEO1) with 10 cases, and full-term infants who died between 3 and 10 days of life (NEO2) with 14 cases, in order to follow a temporal line that would contemplate the transition from fetal circulation to extrauterine life. The samples were studied in *tissue microarray* and the antibodies used were Ki67, PCNA, PTEN, Bcl2 (proliferation), HHF35 and sarcomeric actin (contractile proteins).

Results: Difference was observed regarding Ki67, $p = 0.02$; HHF35, $p < 0.01$ and sarcomeric actin, $p = 0.02$, with Ki67 expression being higher in NEO1 group, whereas HHF35 and sarcomeric actin expression was higher in the NEO2 group.

Conclusion: The results suggest that cardiomyocytes have a proliferation characteristic (Ki67) in NEO1 which, following a temporal line, will be replaced by a differentiation characteristic (HHF35 and sarcomeric actin) in NEO2 (Arq Bras Cardiol 2012;99(3):797-801)

Keywords: Infant, newborn; myocytes, cardiac / classification; immunohistochemistry; phase transition; placental circulation.

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

Correspondência: Mona Adalgisa Simões

Itaiópolis, 254, apto 302, America. CEP 89204-100, Joinville, SC – Brasil

E-mail: simoes@saude.sc.gov.br, monasimoes@uol.com.br

Artigo recebido em 21/02/12; revisado em 21/02/12; aceito em 16/04/12.

Introdução

Durante o desenvolvimento cardíaco, nos estudos em animais, os cardiomiócitos sofrem numerosas mudanças fenotípicas, passando, segundo MacLellan e Schneider e Cortius e cols., de um fenótipo proliferativo intraútero (hiperplásico) para um de crescimento e diferenciação celular na vida extrauterina (hipertrófico)^{1,2}.

Anversa e Nadal-Ginard relatam que a transição dos cardiomiócitos de fenótipo hiperplásico para hipertrófico proporcionaria um aumento importante da força de contração cardíaca³.

Na fase hipertrófica do desenvolvimento cardíaco, os cardiomiócitos ventriculares aumentam de tamanho por causa do aumento da síntese de proteínas contráteis e também diminuem a síntese de DNA com consequente diminuição da proliferação celular.

Os mecanismos celulares que são responsáveis pelo desencadeamento e regulação dessa transição não são totalmente conhecidos⁴.

Porrello e cols. realizaram ressecção parcial do coração do rato com um e sete dias de vida. Observaram que apenas no rato com um dia de vida ocorreu regeneração, demonstrando assim que, por um breve período após o nascimento, o coração do mamífero parece ter capacidade de regeneração⁵.

O delineamento desses mecanismos é particularmente importante para a compreensão dos processos de regeneração de cardiomiócitos, por meio de células primitivas indiferenciadas, após lesões miocárdicas em indivíduos adultos. O conhecimento da proliferação intrínseca e do potencial cardiomiogênico de recém-nascidos pode levar a uma melhor compreensão desses mesmos processos em indivíduos adultos, acarretando futuros benefícios clínicos em pacientes com lesões miocárdicas grave⁵.

A hipótese deste estudo se baseia no fato de que os cardiomiócitos podem sofrer uma transição gradativa do seu fenótipo hiperplásico para hipertrófico, seguindo a evolução temporal dos neonatos, envolvendo alterações na expressão imunohistoquímica de algumas proteínas atuantes no crescimento e diferenciação celular. Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar, por meio de análise imunohistoquímica de algumas proteínas envolvidas com os processos de proliferação e contração muscular, o mecanismo de diferenciação celular dos cardiomiócitos em seres humanos que demonstrasse a fase de transição da circulação fetal a vida extrauterina.

Método

Para a elaboração desta pesquisa foram incluídas amostras de miocárdio de ventrículo esquerdo fixadas em formol e emblocadas em parafina, provenientes de necropsias de recém-natos a termo (idade gestacional entre 38 e 42 semanas) que foram a óbito até 10 dias de vida pós-natal (n = 106 casos), da Unidade de Patologia Pediátrica e Perinatal do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), entre os anos de 1985 e 2005.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFPR com o número 1319.167/2006-11.

Os casos foram divididos em dois grupos: NEO1, recém-nascidos a termo que evoluíram para óbito com no máximo dois dias de vida; e NEO2, com óbito entre três e 10 dias de vida.

O estudo contava, inicialmente, com 56 casos de NEO1 e 50 casos de NEO2. Após serem aplicados os critérios de exclusão, foram selecionados 10 casos para o grupo NEO1 e 14 casos para o grupo NEO2.

Foram excluídos todos os fetos malformados, sindrômicos, portadores de eritoblastose fetal, alterações placentárias ou com histórico gestacional de hipertensão arterial crônica ou específica da gestação, diabetes pré-gestacional ou gestacional, infecções maternas, crescimento intrauterino retardado, oligodrâmnio e polidrâmnio.

Todos os casos do estudo foram classificados quanto a sexo, idade gestacional, tempo de vida e causa da morte.

As amostras de miocárdio foram fixadas em formol e estavam conservadas em blocos de parafina, o que levou a adotar-se a técnica de imunohistoquímica como método de análise de expressão proteica.

A imunohistoquímica parece ser a técnica mais apropriada para materiais fixados em formol e emblocados em parafina. Tem sido descrita, ao longo dos anos, como uma importante ferramenta na expansão dos conhecimentos sobre a expressão proteica, além de ser uma técnica barata e de fácil execução.

O seu resultado, no entanto, é influenciado por alguns fatores, tais como o tempo de fixação e o processamento do material, a qualidade do fixador e dos anticorpos escolhidos, as reações propriamente ditas e a subjetividade da interpretação das lâminas. Mesmo assim, a imunohistoquímica tem sido amplamente utilizada em materiais fixados em formol e processados em parafina, pela sua capacidade de expressão mesmo diante de uma qualidade precária dos tecidos estudados⁶.

As amostras de miocárdio de cada um dos grupos foram então montadas em *Tissue Microarray* (TMA) com três fragmentos de miocárdio de ventrículo esquerdo por caso, e cada fragmento media 3 mm de diâmetro.

Para a demonstração dos antígenos específicos em amostras de miocárdio fixados em formol e emblocados em parafina, utilizou-se a técnica da imunohistoquímica, e todos os anticorpos foram diluídos com diluente de anticorpos (Dakocytomation®). Como anticorpo secundário utilizou-se o EnVision® + Dual Link/Peroxidase (Dakocytomation®). Utilizou-se como cromógeno, para revelar as reações, o 3,3'-diaminobenzidina ou DAB; Sistema Substrato-Cromógeno (Dakocytomation®). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários e proporção de diluição: anti-PTEN (1:400; Novocastra®), anti-Ki67 (1:150; Dako®); anti-PCNA (1:400; Dako®) e anti-Bcl2 (1:200; Dako®) para avaliar proliferação celular; e o HHF35 (1:400; Dako®) e o anti-Actina Sarcomérica (1:400; Dako®) para avaliar proteínas contráteis.

As reações foram controladas com reações-controle positivas e negativas.

As reações dos anticorpos Ki67, PCNA, Bcl2 e PTEN para proliferação celular foram analisados pelo método quantitativo simples, mediante a contagem dos núcleos de cardiomiócitos positivos em toda a amostra, objetiva com aumento de 400 vezes.

As reações dos anticorpos HHF35 e actina sarcomérica para proteínas contráteis foram analisados pelo método quantitativo morfométrico, e esse método lê a intensidade da cor da região com reação imunoistoquímica positiva e a converte numa medida de área, tendo como unidade o micrômetro. Para isso foi utilizada a microscopia óptica, objetiva com aumento de 200 vezes, microscópio binocular (Olympus® BX50), acoplado a um computador onde se encontra instalado o software Image Pro Plus® para realização da análise.

Para a comparação dos grupos em relação a variáveis quantitativas foi considerado o modelo de análise de variância ANOVA com o nível de significância considerado de 0,05.

Resultados

Um total de 24 corações de recém-nascidos foram analisados, apresentando, no que se refere a sexo, tempo médio de idade gestacional ou de vida e causa da morte, o seguinte perfil demonstrado na Tabela 1⁷.

Dentre os marcadores imunoistoquímicos que sugerem proliferação celular, o Ki67 com $p = 0,02$ apresentou diferença significativa entre o grupo NEO1 e NEO2.

Na Tabela 2 são apresentadas as estatísticas descritivas e os valores de p para os anticorpos PCNA, Ki67, PTEN e Bcl2 que avaliam proliferação celular.

Os anticorpos HHF35 e actina sarcomérica que avaliam proteínas contráteis apresentaram diferença significativa entre os dois grupos, tendo valores maiores no grupo NEO2, e têm seus resultados apresentados na Tabela 3.

Discussão

O PCNA e o Ki67 vêm sendo utilizados para o estudo do ciclo celular como importantes marcadores proliferativos, sendo empregados em estudos sobre o crescimento celular dos cardiomiócitos^{1,2,8}.

No embrião de mamíferos, a proliferação e a diferenciação dos cardiomiócitos acontecem concomitantemente durante o período embrionário e fetal e continuam a ocorrer até poucos dias após o nascimento².

Estudos em ratos revelam que os cardiomiócitos normalmente param de se dividir com aproximadamente 17 dias de desenvolvimento pós-natal. A expressão do PCNA nessa fase revela que 6% dos cardiomiócitos estariam em atividade de síntese no momento do nascimento, mas apenas 1,5% dessas células estaria em síntese com 11 dias de vida, e apenas 0,5% dos cardiomiócitos adultos seria capaz de entrar em fase de síntese. Essa incapacidade dos cardiomiócitos adultos de se regenerarem mediante o aumento de divisões celulares já foi amplamente estudada e apresentada como um dos maiores problemas para o tratamento clínico das doenças cardíacas^{1,2,8}.

Tabela 1 – Perfil dos grupos amostrais segundo sexo, média de idade e causa do óbito

perfil GRUPO	SEXO		TEMPO DE VIDA		CAUSA DO ÓBITO	%
	MASCULINO	FEMININO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO		
NEO1	30%	70%	16,3 horas	10,7 horas	Hipóxia Perinatal	100%
NEO2	64,3%	35,7%	5,4 dias	2,8 dias	Hemorragia	28,5%
					Hipóxia Perinatal	21,5%
					Broncopneumonia	21,5%
					Outras	28,5%

Tabela 2 – Resultado da análise quantitativa dos anticorpos PCNA, Ki67, PTEN e Bcl2, em número de células positivas por campo

VARIÁVEL	GRUPO	N	MEDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	VALOR DE p
PCNA	NEO1	10	37,6	84,8	9,7	0,41
	NEO2	14	77,2	132,6	8,3	
Ki67	NEO1	10	35,2	32,1	28,0	0,02
	NEO2	13*	14,1	8,5	14,7	
PTEN	NEO1	10	107,5	78,2	105,7	0,28
	NEO2	14	167,7	160,3	164,0	
Bcl2	NEO1	09*	26,8	24,7	19,5	0,79
	NEO2	14	24,8	11,4	28,3	

ANOVA com $p < 0,05$; * Um caso excluído pela baixa qualidade da reação imunoistoquímica

Tabela 3 – Resultado da análise morfométrica das áreas positivas dos anticorpos HHF35 e actina sarcomérica, em micrômetros quadrados por campo

VARIÁVEL	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	VALOR DE p
Área HHF35	NEO1	10	36876,8	13369,0	36353,5	< 0,01
	NEO2	14	56540,0	10605,3	57433,1	
Área Actina Sarcomérica	NEO1	10	22299,6	13698,3	23326,0	0,02
	NEO2	14	12314,4	7221,7	12023,8	

ANOVA com $p < 0,05$.

Estudos recentes da expressão imunoistoquímica do Ki67, em corações humanos infartados, revelaram, entretanto, que 4% dos cardiomiócitos apresentavam positividade para essa proteína proliferativa nas regiões infartadas. Além disso, as mudanças fenotípicas encontradas na transição da circulação fetal para a vida extrauterina poderiam incluir uma diminuição gradativa da expressão do PCNA e Ki67^{1,2,8-12}.

Neste estudo, o Ki67 apresentou um decréscimo na expressão quando comparado os grupos de NEO1 e NEO2 ($p = 0,02$). Esse fato está de acordo com a ideia de diminuição da característica proliferativa dos cardiomiócitos nesse período.

Outro anticorpo que tem importante papel na regulação do ciclo celular é o PTEN, estando envolvido na progressão do ciclo celular, na migração e crescimento celular, bem como a apoptose¹³.

Nas amostras deste estudo observamos uma diferença de expressão do PTEN entre os dois grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa.

O PTEN, quando ativado, pode estar envolvido com o bloqueio da capacidade celular de passar da fase G1 para a fase S mediante a inibição das ciclinas, bloqueando, conseqüentemente, a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos na via extrauterina¹³.

Observou-se um aumento de expressão do Bcl2, a qual seguiu a linha temporal dos grupos da amostra, todavia sem diferença significativa estatisticamente. Esse fato poderia estar evidenciando maior resistência à apoptose no grupo de recém-natos que foi a óbito com mais de dois dias e, conseqüentemente, uma maior tendência ao crescimento e diferenciação celular^{2,9}.

Os anticorpos HHF35 e a actina sarcomérica, os quais são usados para o estudo de proteínas contráteis, apresentaram diferença estatisticamente relevante entre os dois grupos amostrais, e o grupo NEO2 apresentou maior expressão de

ambas às proteínas ($p < 0,01$ e $p = 0,02$, respectivamente). Esse fato demonstra, possivelmente, que a diferenciação dos cardiomiócitos se dá pelo aumento do volume das células cardíacas, por meio de mudanças na expressão das proteínas sarcoméricas, o que propiciaria alterações nas propriedades funcionais dos cardiomiócitos com acréscimo na capacidade de geração de força pelos músculos cardíacos durante o desenvolvimento pós-natal¹⁴.

Conclusões

Percebeu-se a diminuição da expressão do Ki67, em relação à evolução temporal das amostras, evidenciando redução do fenótipo proliferativo dos cardiomiócitos. Os anticorpos que marcaram as proteínas contráteis (HHF35 e antiactina sarcomérica) apresentaram um aumento de sua expressão seguindo a evolução temporal dos grupos amostrais. Esses dados estão de acordo com a substituição da característica proliferativa hiperplásica desse tecido na vida intrauterina por uma característica de diferenciação celular, na vida extrauterina.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Tarcísio Fulgêncio Alves da Silva pela Pontífca Universidade Católica do Paraná.

Referências

- MacLellan RW, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:289-319.
- Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*. 2005;57(6):796-800.
- Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature*. 2002;415(6868):240-3.
- Evans HJ, Sweet JK, Price RL, Yost M, Goodwin RL. Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H570-8.

5. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331(6020):1078-80.
6. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol*. 2004;164(1):35-42.
7. Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res*. 2004;94(4):505-13.
8. Field LJ. Modulation of the cardiomyocyte cell cycle in genetically altered animals. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1015:160-70.
9. Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*. 2002;90(10):1044-54.
10. McGill CJ, Brooks G. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc Res*. 1995;30(4):557-69.
11. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(8):1737-46.
12. Tang MK, Kindler PM, Cai DQ, Chow PH, Li M, Lee KK. Heart-type fatty acid binding proteins are upregulated during terminal differentiation of mouse cardiomyocytes, as revealed by proteomic analysis. *Cell Tissue Res*. 2004;316(3):339-47.
13. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001;264(1):29-41.
14. Siedner S, Kruger M, Schoeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, et al. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol*. 2003;548(Pt 2):493-505.