

Imatinib Atenua a Fibrose Miocárdica em Associação com a Inibição da Atividade do PDGFR α

Imatinib Attenuates Myocardial Fibrosis in Association with Inhibition of the PDGFR α Activity

Li-kun Ma, Qian Li, Li-feng He, Jin-sheng Hua, Jun-ling Zhou, Hua Yu, Ke-fu Feng, Hong-wu Chen, Hao Hu, Lin Wang
Department of Cardiology, Anhui Provincial Hospital, Hefei – China

Resumo

Fundamento: O Imatinib é um inibidor do receptor tirosina-quinase que foi confirmada como exercendo um efeito inibidor sobre a atividade do receptor do PDGF, fator de crescimento plaquetário (PDGFR α e PDGFR β).

Objetivo: Investigar o efeito protetor do Imatinib na fibrose miocárdica em acetato de deoxicorticosterona (DOCA)/ratos com hipertensão induzida por sal.

Métodos: Sessenta ratos Sprague-Dawley machos, uninefrectomizados foram distribuídos em três grupos: ratos controles (grupo CON): grupo deoxicorticosterona (grupo DOCA); grupo deoxicorticosterona e Imatinib (grupo DOCA IMA). A Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi medida quinzenalmente. Foi estudada a porção apical do ventrículo esquerdo. Foram empregados: coloração vermelho sirius, coloração de hematoxilina-eosina, imuno-histoquímica e ensaio de western blot.

Resultados: A PAS nos grupos DOCA e IMA+DOCA foi maior que no grupo CON nos dias 14 e 28. Os animais do grupo DOCA apresentaram fibrose intersticial e perivascular grave no dia 28, e as expressões de PI, PIII, tenascina-C e fibronectina foram significativamente maiores que nos grupos DOCA+IMA e CON. Quando comparados com o grupo CON, os grupos DOCA e DOCA+IMA apresentaram resposta inflamatória de tecido miocárdico e infiltração de monócitos/macrófagos de diferentes graus. As expressões proteicas do PDGF-A, PDGF-C e PDGFR α foram significativamente maiores nos grupos DOCA e DOCA+IMA que no grupo CON, mas a expressão proteica do p-PDGFR α no grupo DOCA+IMA foi menor que no DOCA.

Conclusão: O Imatinib pode exercer efeitos inibitórios sobre a fibrose miocárdica em ratos com hipertensão induzida por DOCA/sal, os quais podem ser atribuídos à inibição da atividade do PDGFR- α . (Arq Bras Cardiol 2012;99(6):1082-1091)

Palavras-chave: Receptores da Família Eph; Receptor Alfa de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; Receptor Beta de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; Fibrose Endomiocárdica; Desoxicorticosterona.

Abstract

Background: Imatinib is a tyrosine kinase receptor inhibitor that has been confirmed to exert inhibitory effect on the platelet derived growth factor PDGF receptor (PDGFR α and PDGFR β) activity.

Objective: To investigate the protective effect of imatinib on the myocardial fibrosis in deoxycorticosterone-acetate (DOCA)/salt induced hypertensive rats.

Methods: Sixty male uninephrectomized Sprague-Dawley rats were assigned to three groups: control rats (CON group); deoxycorticosterone group (DOCA group); deoxycorticosterone and imatinib group (DOCA+IMA group). Systolic blood pressure (SBP) was measured biweekly. The apical portion of the left ventricle was studied. Sirius-Red staining, Hematoxylin-Eosin staining, immunohistochemistry and Western blot assay were employed.

Results: SBP in the DOCA group and DOCA+IMA group was higher than that in the CON group on day 14 and 28. Animals in the DOCA group showed severe interstitial and perivascular fibrosis on day 28, and the expressions of PI, PIII, tenascin-C and fibronectin were significantly higher than those in the DOCA+IMA group and CON group. When compared with the CON group, myocardial tissue inflammatory response and monocyte/macrophage infiltration of different degrees were observed in the DOCA group and DOCA+IMA group. Protein expressions of PDGF-A, PDGF-C and PDGFR α were significantly higher in the DOCA and DOCA+IMA groups than those in the CON group, but the p-PDGFR α protein expression in the DOCA+IMA group was lower than that in the DOCA group.

Conclusion: Imatinib can exert inhibitory effects on myocardial fibrosis in DOCA/salt induced hypertensive rats, which may be attributed to the inhibition of PDGFR- α activity. (Arq Bras Cardiol 2012;99(6):1082-1091)

Keywords: Receptors, Eph Family; Receptor, Platelet-Derived Growth Factor Alpha; Endomyocardial Fibrosis; Desoxycorticosterone.

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

Correspondência: Li-kun Ma •

Department of Cardiology, Anhui Provincial Hospital, Lujiang Lu, 17. CEP 230001, Hefei – China
E-mail: docma96@sina.com, kevin6811@yeah.net

Artigo recebido em 29/11/11; revisado em 01/12/11; aceito em 22/03/12.

Introdução

A fibrose miocárdica é um problema clínico comum, pode ser encontrado em várias doenças cardíacas e está frequentemente associada com o processo inflamatório. No coração, o acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular (MEC), especialmente os tipos I, III, e colágeno tipo V, é responsável pela fibrose miocárdica. Mudanças na estrutura tecidual e disfunção cardíaca após a fibrose miocárdica contribuem para a insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita cardíaca e outros eventos cardiovasculares graves. Os mecanismos moleculares da fibrose miocárdica são complexos, sobre os quais ainda há controvérsias. Estudos anteriores sugeriram que a fibrose miocárdica está estreitamente relacionada com o aumento do mineralocorticoide endógeno. No entanto, os papéis de algumas vias de sinalização molecular na fibrose miocárdica, induzida por mineralocorticoide, permanecem obscuros. Várias citocinas e fatores de crescimento têm demonstrado desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento da fibrose miocárdica. Esses fatores incluem o fator β de crescimento transformante (TGF β)¹, interleucina-1 (IL-1)², fator de necrose tumoral α (TNF α)³, e fator de crescimento plaquetário (PDGF)⁴. O PDGF é um membro da família de fatores de crescimento, e se encontrou que promove a divisão e proliferação de fibroblastos e células musculares lisas. Há evidências mostrando que altas expressões proteicas dos PDGF podem levar a fibrose miocárdica, o que sugere que vias de sinalização PDGF-PDGFR podem servir como importantes mecanismos moleculares da fibrose miocárdica⁵.

O Imatinib é um inibidor do receptor tirosina-quinase, especialmente utilizado no atual tratamento clínico de tumores, e foi confirmado como exercendo um efeito inibidor sobre a atividade do receptor de PDGF (PDGFR α e PDGFR β). As vias sinalização PDGF-PDGFR são reguladas pelo PDGFR⁵, e assim, o Imatinib pode modular a resposta biológica celular induzida pelas vias de sinalização PDGF-PDGFR. Neste estudo, os efeitos de Imatinib na inflamação do miocárdio e resposta fibrogênica, infiltração de monócitos/macrófagos, e as expressões proteicas de PDGF-A, PDGF-C, PDGFR α , p-PDGFR α , e o procolágeno (PI), procolágeno III (PIII), tenascina-C e fibronectina foram investigados em ratos com hipertensão induzida por sal/acetato de deoxicorticosterona (DOCA), com o objetivo de estudar se o Imatinib pode efetivamente atenuar a fibrose miocárdica, e explorar a relação entre a via de sinalização PDGFR α e a fibrose miocárdica.

Materiais e métodos

Modelo animal

Sessenta ratos Sprague Dawley machos (SD), pesando entre 200 ~ 250 g, foram adquiridos do Centro Experimental Animal, filiado à Universidade Médica de Anhui, e alojados em ambiente livre de patógenos específicos. Antes de experiência, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 10% de hidrato de cloral (400 mg kg⁻¹) e foi realizada nefrectomia direita. Uma semana após a cirurgia, os ratos foram alimentados com água contendo

1% de NaCl e 0,2% de KCl, e divididos aleatoriamente em três grupos (n = 20 por grupo): 1) grupo controle (grupo CON): água destilada foi administrada diariamente por via intragástrica, e injeções subcutâneas de óleo de gergelim foram administradas uma vez a cada quatro dias; 2) grupo deoxicorticosterona (grupo DOCA): deoxicorticosterona (60 mg.kg⁻¹.4d⁻¹) foi administrada por via subcutânea, e água destilada foi administrada diariamente por via intragástrica; 3) grupo deoxicorticosterona mais Imatinib (grupo DOCA+IMA): deoxicorticosterona (60 mg.kg⁻¹.4d⁻¹) foi administrada subcutaneamente uma vez a cada quatro dias, e simultaneamente o Imatinib (60 mg.kg⁻¹.d⁻¹) foi administrado intragastricamente, diariamente. O volume de água destilada usada no grupo de controle foi idêntico ao volume de água destilada contendo as drogas nos restantes dois grupos. Além disso, o volume de óleo de gergelim utilizado no grupo de controle foi equivalente ao volume de óleo de gergelim contendo os agentes nos outros dois grupos. O tratamento com agentes durou quatro semanas.

Reagentes principais

Foram utilizados no presente estudo: deoxicorticosterona, óleo de gergelim (Sigma, EUA), Imatinib (Novartis, Suíça), corante vermelho sirius (Beijing Hede Biocompany), hematoxilina, kits de coloração imuno-SP (Beijing Goldenbridge Biotechnology CO., Ltd), anticorpo ED-1 (Beijing Biosynthesis Biotechnology CO., Ltd), PDGF-A, PDGF-C, PDGFR α , p-PDGFR α , PI, PIII, fibronectina, tenascina-C e anticorpos primários e secundários para β -actina (Santa Cruz Inc) e kits ECL (Pierce Inc).

Medida da pressão arterial sistólica e coleta de amostra

A Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi medida em 1d, 14d e 28d, usando o método do manguito cauda. No dia 14 e dia 28 após a intervenção farmacológica, os animais (n = 10) foram anestesiados intraperitonealmente com 10% de hidrato de cloral (400 mg kg⁻¹) e depois mortos. Foram obtidos os corações e removidos os átrios bilaterais, ventrículos direitos, grandes vasos e tecidos conectivos, a parte apical do ventrículo esquerdo foi coletada para exames complementares. As amostras coletadas no dia 14 foram fixadas em paraformaldeído 4%, embebidas em parafina, seguidas de corte e imunocoloração. As amostras obtidas no dia 28 foram divididas em duas: uma foi fixada em paraformaldeído 4% para coloração HE e coloração com colágeno vermelho sirius, e a outra foi armazenado a -80v para ensaio de western blot.

Alterações patológicas inflamatórias e imuno-histoquímica

Dois patologistas que foram cegos para o estudo avaliaram as seções. Após os dias 14 e 28, a porção apical do ventrículo esquerdo foi submetida a coloração H&E para exame de inflamação cardíaca. A infiltração de macrófagos do miocárdio foi observada por imuno-histoquímica, 14 dias após a intervenção com agentes. O ED-1 é um tipo de antígeno específico sobre a superfície de monócitos/macrófagos. A imuno-histoquímica foi realizada para detectar a expressão do ED-1 no coração, de acordo com as instruções do fabricante. Macrófagos com membrana marrom foram considerados positivos para ED-1. Dez campos na região positiva foram

selecionados aleatoriamente com uma ampliação de 400 ×. O software Image-Proplus 6.0 foi utilizado para contar o número de células positivas, seguido pelo cálculo do número de macrófagos por mm² de campo visual. Em seguida, a média foi obtida para cada seção.

Deteção de fibrose miocárdica e remodelação vascular

A fração de volume do colágeno miocárdico (FVC) e área de colágeno de vasos periféricos miocárdicos (PVCA) foram medidas por pírco coloração vermelho sirius-ácido pírco no dia 28. O método de cálculo foi o indicado a seguir. Foi usado o sistema fotográfico Nikon, e o software Image-Proplus 6.0 foi utilizado para a análise. A FVC foi expressa como a relação entre a área de colágeno do miocárdio e a área total de campo visual. Oito campos (400×) foram selecionados aleatoriamente e as correspondentes FVC foram medidas em cada seção, e a média foi considerada como a FVC final de cada seção. A PVCA foi expressa como a relação entre a área de colágeno periférica em torno da artéria pequena e a área do lúmen arterial. Quatro pequenas artérias (400×) foram escolhidas aleatoriamente para a deteção em cada seção, e a média foi considerada como a PVCA final para a seção correspondente.

Ensaio de western blot

As expressões proteicas de PDGF-A, PDGF-C, PDGFR α , p-PDGFR α , PI, PIII, fibronectina e tenascina-C no coração foram detectadas pelo ensaio de western blot no dia 28 após a intervenção com agentes. A proteína total foi extraída usando uma solução tampão de lise celular (Principais componentes: Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato 1%, SDS 0,1%, PMSF 1 mM, leupeptina 2 mg/mL, EDTA 1 mM, pirofosfato de sódio, β -glicerofosfato e Na₃VO₄), o sobrenadante contendo as proteínas foi recolhido por centrifugação, e a concentração de proteína foi detectada com o método BCA. Todas as amostras (uma amostra representa uma) foram diluídas na mesma concentração. Três amostras foram escolhidas aleatoriamente de cada grupo e comparadas com os dos restantes dois grupos. Em seguida, 50 μ g de proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de PVDF, e bloqueada em leite desnatado durante a noite. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário por 8 ~ 12 h, e com o anticorpo secundário durante 2 h. A visualização foi feita com kit ECL. As bandas foram digitalizadas com o sistema de imagem Bio-Rad, e o software Quantity-one foi utilizado para a deteção da densidade óptica. A β -actina serviu

como referência interna. A densidade óptica da proteína alvo foi normalizada pelo que a β -actina representou como quantidade relativa da proteína alvo.

Análise estatística

O software SPSS versão 13.0 foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão (EPM). As médias entre vários grupos foram comparadas com a análise de variância de uma via (ANOVA). As relações foram comparadas com o teste de qui quadrado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Mudanças na PAS

Não houve diferença significativa na PAS entre os grupos antes da experiência. No entanto, a PAS nos grupos DOCA e DOCA+IMA foram significativamente mais elevadas que no grupo CON nos dias 14 e 28. Não foi observada significância estatística na PAS entre os grupos DOCA e DOCA+IMA, em relação aos níveis (Tabela 1).

Inflamação do miocárdio

A coloração H&E revelou infiltração evidente de células inflamatórias e fibrose leve no coração no dia 14, no grupo DOCA. Uma grande quantidade de células inflamatórias se infiltrou no coração no grupo DOCA+IMA, enquanto a fibrose estava ausente. Vinte e oito dias após a intervenção com agente, as células do miocárdio estavam regularmente organizadas, e infiltração de células inflamatórias e fibrose grave foram observadas no grupo DOCA. No grupo DOCA+IMA, células miocárdicas estavam regularmente organizadas. Embora não houvesse células inflamatórias infiltrando o coração, não foram encontrados tecidos fibróticos. As células do miocárdio no grupo controle foram normais durante todo o experimento, e não se encontrou infiltração de células inflamatórias nem tecido fibrótico (Figura 1).

Infiltração de monócitos/macrófagos

O número de células positivas ED-1 reflete a extensão da infiltração de monócitos/macrófagos. A imuno-histoquímica para ED-1 mostrou que o número de células positivas ED-1 nos grupos DOCA e DOCA+IMA era significativamente maior que no grupo CON (grupo DOCA: 6,3 \pm 0,4/mm²; grupo DOCA + IMA: 6,0 \pm 0,3/mm²; grupo CON: 1,1 \pm 0,2/mm² [Figura 2]).

Tabela 1 – PAS nos três grupos

		Grupos		
		CON	DOCA	DOCA+IMA
PAS (mm Hg)	Dia 0	130 \pm 2	130 \pm 3	131 \pm 2
	Dia 14	129 \pm 2	156 \pm 6*	157 \pm 5*
	Dia 28	131 \pm 2	198 \pm 5**	195 \pm 7**

Os dados foram expressos como média \pm EPM. Foi utilizado o teste do qui-quadrado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. grupo CON, $n = 20$ nos dias 0 e 14, $n = 10$ no dia 28.

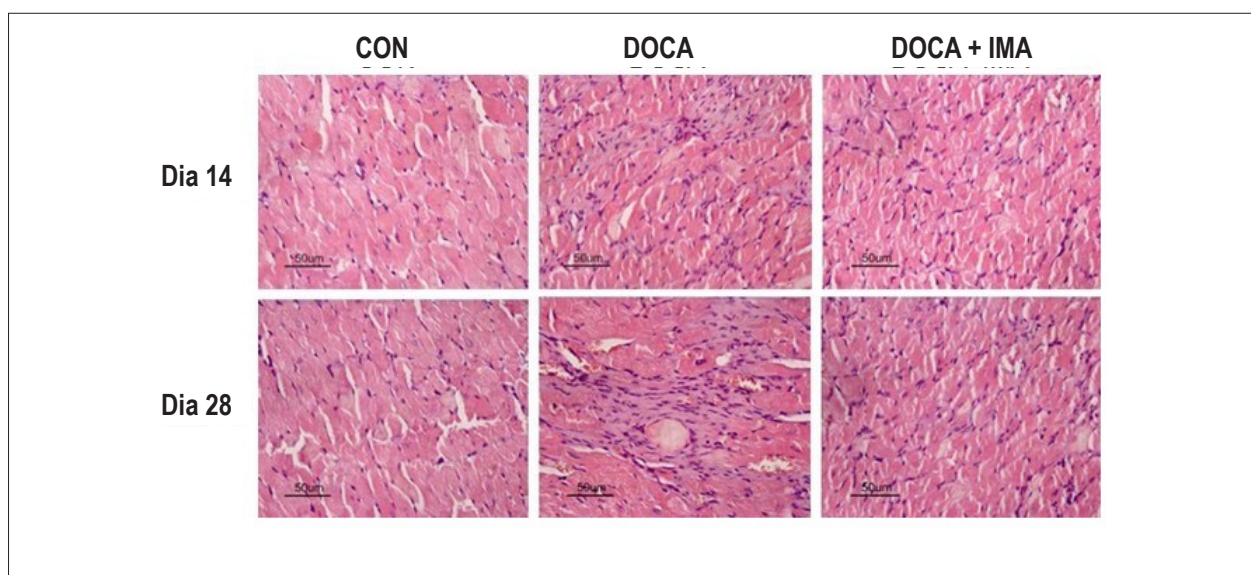


Fig. 1 – Inflamação do miocárdio e cicatriz fibrótica nos dois grupos de tratamento no dia 14 e dia 28, em comparação com o grupo CON (coloração HE, 400×)

Fibrose miocárdica

Aos 28 dias da intervenção, a coloração vermelho sirius mostrou que o colágeno do miocárdio vermelho-claro, e os restantes tecidos cardíacos se apresentavam amarelos. A coloração vermelho sirius revelou que fibrose miocárdica no grupo DOCA foi a mais grave entre todos os grupos, caracterizada pelo maior nível de colágeno intersticial. Além disso, a FVC e PVCA no grupo DOCA foram também significativamente maiores quando comparados com os do grupo CON. A FVC e PVCA no grupo DOCA+IMA foram também mais elevadas que no grupo CON, embora acentuadamente menor que no grupo DOCA (Tabela 2, Figuras 3 e 4).

Expressões proteicas de PDGF-A, PDGF-C, PDGFR α e p-PDGFR α

Quando comparado com o grupo CON, as expressões proteicas de PDGF-A, PDGF-C e PDGFR α no grupo DOCA e DOCA+IMA grupo foram notavelmente aumentadas. A expressão proteica de p-PDGFR α no grupo DOCA foi significativamente elevada, mas no DOCA+IMA foi marcadamente diminuída, em comparação com o grupo CON. O ensaio de western blot (Figura 5) mostrou que o tratamento com acetato de desoxicorticosterona (grupo DOCA e grupo DOCA+IMA) suprarregulou significativamente as expressões proteicas de PDGF-A ($0,61 \pm 0,12$ vezes e $0,59 \pm 0,09$ vezes, respectivamente, $p < 0,01$), e PDGF-C ($0,58 \pm 0,11$ vezes e $0,55 \pm 0,06$ vezes, respectivamente, $p < 0,01$) quando comparado com o grupo CON ($0,17 \pm 0,04$ vezes e $0,15 \pm 0,02$ vezes, respectivamente). A expressão proteica de PDGFR α (Figura 5) foi significativamente aumentada nos grupos DOCA ($0,41 \pm 0,08$ vezes, $p < 0,01$) e DOCA+IMA ($0,43 \pm 0,10$ vezes, $p < 0,01$) quando comparado com o grupo CON ($0,12 \pm 0,03$ vezes). PDGFR α é um tipo de receptor tirosina-quinase, que mostra a atividade quando resíduo de tirosina intracelular é fosforilado, p-PDGFR α é a forma fosforilada de PDGFR α , e o aumento no

nível de p-PDGFR α sugeriu um aumento na ativação da via de sinalização de PDGF. Os resultados mostraram que o grupo DOCA tem a expressão proteica mais elevada de p-PDGFR α ($0,38 \pm 0,06$ vezes, $p < 0,01$) quando comparada com o grupo CON ($0,08 \pm 0,02$ vezes) e o grupo DOCA+IMA grupo ($0,11 \pm 0,02$ vezes), e a expressão proteica de p-PDGFR α no grupo DOCA+IMA foi maior que no grupo CON, mas sem diferença significativa (Figura 5).

Expressões proteicas de PI, PIII, fibronectina e tenascina-C

PI e PIII, os índices precisos e diretos da fibrose miocárdica, são os principais componentes de proteína do colágeno. Expressões proteicas aumentadas de fibronectina e tenascina-C também foram encontradas na fibrose miocárdica grave. No presente estudo, as expressões proteicas de PI, PIII, fibronectina e tenascina-C no grupo DOCA foram maiores que nos grupos CON e DOCA+IMA. O ensaio de western blot (Figura 6) mostrou que o tratamento com acetato de desoxicorticosterona (grupo DOCA) suprarregulou significativamente as expressões proteicas de PI ($2,33 \pm 0,21$ vezes, $p < 0,01$) e PIII ($1,81 \pm 0,16$ vezes, $p < 0,05$) quando comparado com os grupos CON ($0,55 \pm 0,11$ vezes e $0,42 \pm 0,08$ vezes, respectivamente) e DOCA+IMA ($1,13 \pm 0,09$ vezes e $0,89 \pm 0,07$ vezes, respectivamente). Além disso, o grupo DOCA tinha expressões proteicas mais elevadas de fibronectina ($0,80 \pm 0,15$ vezes) e tenascina-C ($0,31 \pm 0,05$ vezes) do que os grupos CON ($0,07 \pm 0,02$ vezes e $0,05 \pm 0,01$ vezes, respectivamente, $p < 0,01$) e DOCA+IMA ($0,10 \pm 0,03$ vezes [$p < 0,01$] e $0,18 \pm 0,04$ vezes, [$p < 0,05$], respectivamente) (Figura 6).

Discussão

Neste estudo, nossos achados mostraram que: 1) Os ratos com hipertensão induzida por sal-DOCA apresentaram inflamação aparente nas células do miocárdio. Houve mais

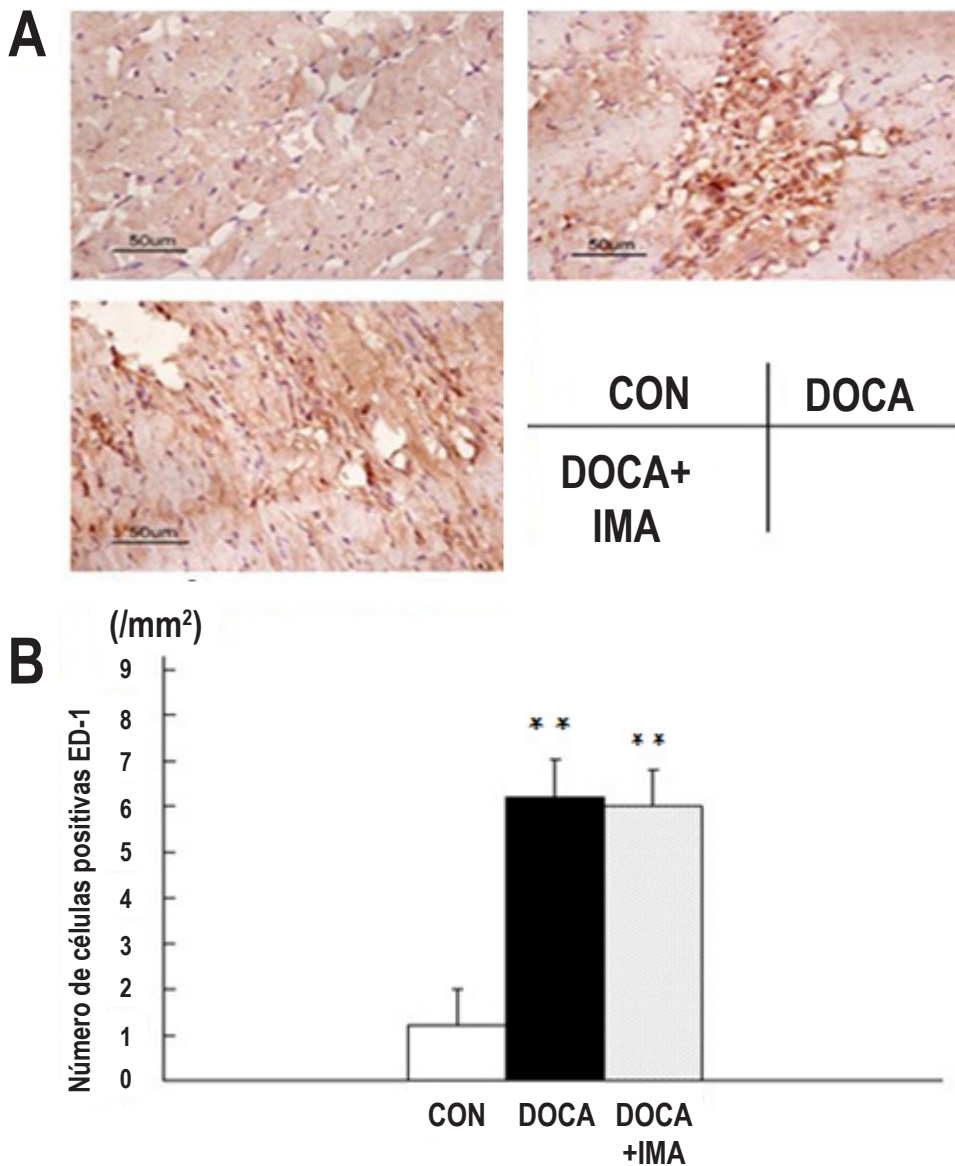


Fig. 2 – Número de células positivas ED-1 em diferentes grupos no dia 14 (imunohistoquímica, 400×). Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 10). Foi utilizado o teste do qui-quadrado. **p < 0,01 vs. grupo CON

Tabela 2 – FVC e PVCA nos diferentes grupos

	FVC (%)	PVCA (%)
CON	5,7 ± 1,2	19,5 ± 2,1
DOCA	28,5 ± 2,3**	39,6 ± 3,8**
DOCA+IMA	11,6 ± 1,5*#	25,4 ± 3,0*#

Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 10). Foi utilizado o teste do qui-quadrado. *p < 0,05, **P < 0,01 vs. grupo CON, #p < 0,05 vs. grupo DOCA.

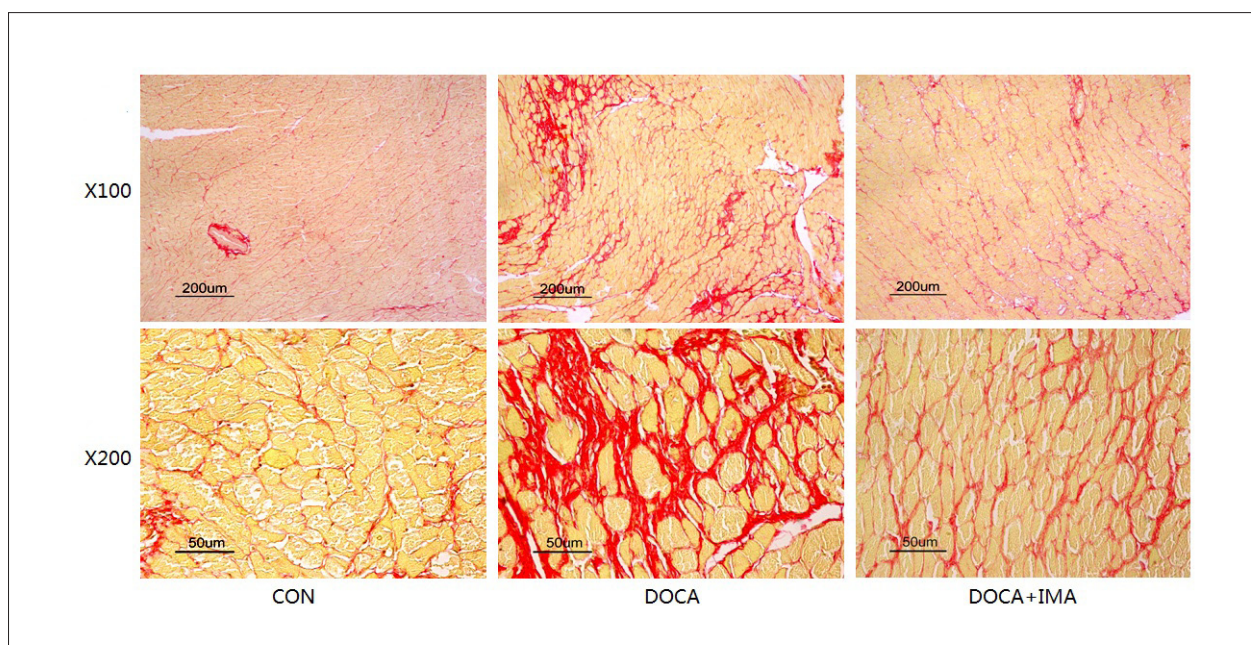


Fig. 3 – Inflamação do miocárdio nos dois grupos de tratamento no dia 28, em comparação com o grupo CON (coloração vermelho sirius, 100× e 400×)

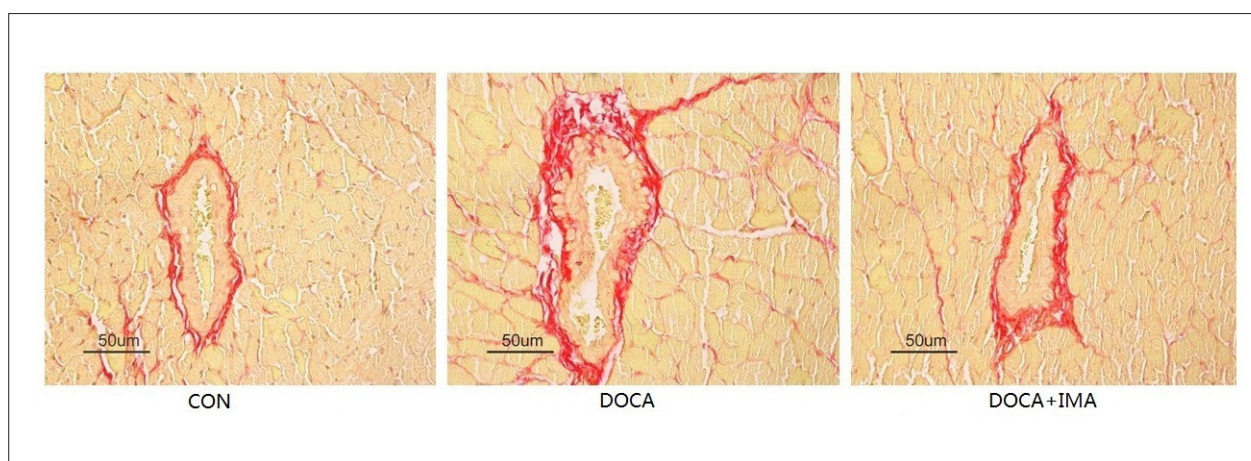


Fig. 4 – Fibrose perivascular nos dois grupos de tratamento no dia 28, em comparação com o grupo CON (coloração vermelho sirius, 400×)

infiltração de macrófagos no miocárdio, acompanhada por sobre-expressões de PDGF-A, PDGF-C e PDGFR α . Esses achados sugerem que a ocorrência de fibrose miocárdica está intimamente associada com a ativação aumentada da via de sinalização de PDGF; 2) Embora não tenha havido diferença na PAS antes da experiência, a FVC e PVCA no grupo DOCA+IMA foram drasticamente reduzidas quando comparadas com o grupo DOCA, indicando que o Imatinib é capaz de aliviar a fibrose miocárdica independentemente da diminuição da PAS; 3) A expressão proteica de p-PDGFR α diminuiu significativamente

no grupo DOCA+IMA quando comparado com o grupo DOCA. Como inibidor do receptor de tirosina-quinase, o Imatinib pode suprimir a atividade de PDGFR α . O efeito inibidor sobre a fibrose miocárdica é possivelmente atribuída à proliferação comprometida de fibroblastos com a inibição da via de sinalização de PDGF; 4) Fibronectina e tenascina-C são considerados índices do grau de fibrose. Os nossos resultados mostraram que as expressões proteicas de fibronectina e tenascina-C foram proporcionalmente relacionadas com o grau de fibrose muscular cardíaca.

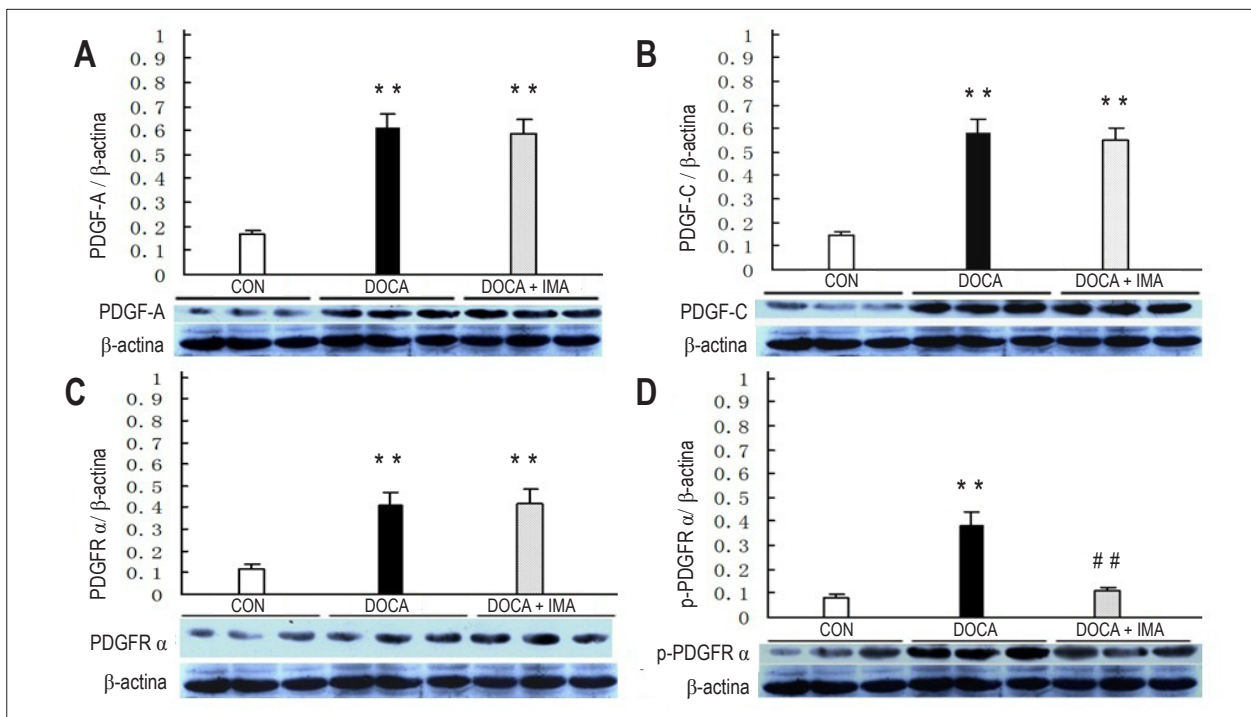


Fig. 5 – Expressões de PDGF-A (A), PDGF-C (B), PDGFRα (C), e p-PDGFRα (D) em grupos diferentes, no dia 28 (ensaio de western blot). Tratamento com Imatinib reduziu significativamente a expressão de p-PDGFRα no grupo DOCA+IMA. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 10). Foi utilizado o teste do qui-quadrado. **p < 0,01 vs. grupo CON, ##p < 0,01 vs. grupo DOCA.

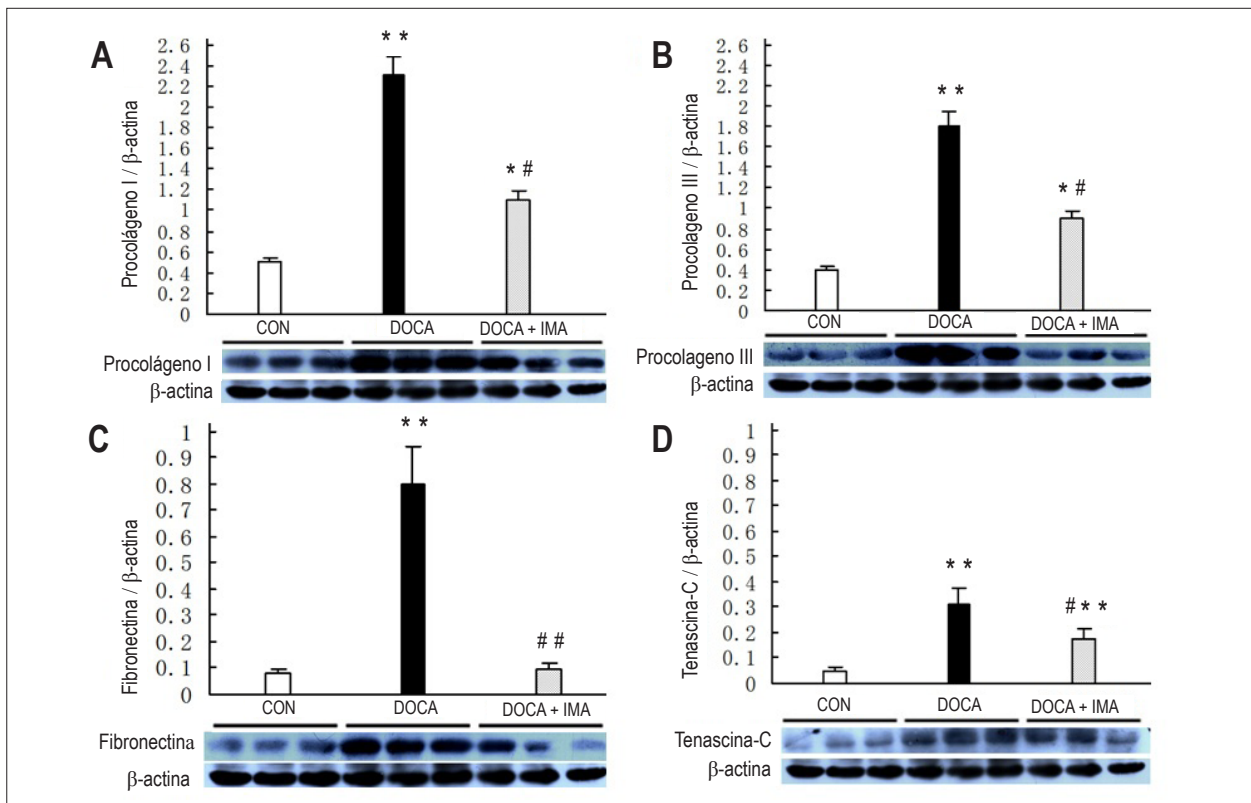


Fig. 6 – Expressão de pró-colágeno I (A), pró-colágeno III (B), fibronectina (C), e tenascina-C (D) em grupos diferentes, no dia 28 (ensaio de western blot). Tratamento com imatinib reduziu significativamente as expressões de procolágeno I, procolágeno III, fibronectina e tenascina-C no grupo DOCA+IMA. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 10). Foi utilizado o teste do qui-quadrado. *p < 0,05 e **p < 0,01 vs. grupo CON, #p < 0,05 e ##p < 0,01 vs. grupo DOCA

Inflamação e fibrose miocárdica

Estudos anteriores sugeriram que a fibrose miocárdica induzida por mineralocorticoide foi acompanhada por uma fase inicial de inflamação aguda no miocárdio, sugerindo que a inflamação é um evento inicial na fibrose miocárdica. Além disso, a inflamação crônica em fases média e tardia agrava o processo fibrótico⁶⁻⁸, o que foi confirmado no presente estudo. Nos dias 14 e 28, após a intervenção, a coloração HE revelou a infiltração de células inflamatórias no coração do grupo DOCA. O aumento da infiltração de macrófagos mononucleares durante a inflamação é um passo característico e fundamental na fibrose tecidual^{9,10}. Além disso, cito-hormônios múltiplos e fatores de crescimento secretados por células mononucleares e macrófagos são críticos para a fibrose miocárdica. A remoção de Receptores de Mineralocorticoide (MR) sobre as células mononucleares e macrófagos por técnica de *knock-out* ou efusão inflamatória e infiltração de macrófagos mononucleares, de maneira dependente de drogas, pode aliviar significativamente a fibrose miocárdica induzida por DOCA^{8,11,12}. Além disso, o mineralocorticoide é capaz de regular a diferenciação e maturação de células mononucleares e macrófagos, ativando o MR sobre as células mononucleares e macrófagos. Assim, inibidores de MR, tais como antiestrona, são capazes de exercer efeitos anti-inflamatórios e efeitos antifibrose miocárdica^{13,14}. Neste estudo, os ratos tratados com DOCA apresentaram inflamação miocárdica evidente e aumento da quantidade de macrófagos infiltrados, quando comparados com o grupo controle. Portanto, é razoável supor uma relação explícita entre a fibrose miocárdica induzida por mineralocorticoide e consequente inflamação no miocárdio. A infiltração agravada de macrófagos intersticiais é importante para a ocorrência e desenvolvimento da fibrose miocárdica.

Vias de sinalização de PDGF e fibrose miocárdica

Os PDGF atuam como fatores de crescimento essenciais, são capazes de promover a divisão e proliferação de fibroblastos e células musculares lisas vasculares, e desempenham um papel quimiotático. Achados recentes indicam que os membros da família PDGF participam na fibrose de múltiplos órgãos e tecidos. A inflamação intersticial evidente e a secreção aumentada de PDGF por células inflamatórias (células mononucleares e macrófagos) têm sido observadas na fibrose do pulmão, coração, fígado e rim¹⁵⁻¹⁷, acompanhadas pela expressão elevada de PDGFR nos fibroblastos¹⁸⁻²¹. Algumas investigações sugeriram que a fibrose miocárdica foi associada com a ativação excessiva de vias de sinalização de PDGF e proliferação de fibroblastos elevada²²⁻²⁴. Os membros da família PDGF incluem PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D. PDGF-A e PDGF-C são considerados intimamente relacionados com a fibrose miocárdica²⁵⁻²⁸. PDGF-AA é a isoforma dimérica de PDGF-A, que tem sido demonstrado ser um mitogênio para os fibroblastos do miocárdio e está implicado na patogênese da fibrose miocárdica^{29,30}. PDGF-C, um ligando recém-descoberto para PDGFR α ^{31,32}, também desempenha um papel importante no desenvolvimento da fibrose miocárdica. Os PDGF funcionam ligando-se aos receptores da proteína tirosina quinase transmembrana (PDGFR α e PDGFR β). As vias de sinalização de PDGF foram divididas em vias de sinalização PDGFR α e PDGFR β , com base no tipo de PDGFR³³. Provou-se que a fibrose miocárdica está relacionada especialmente à via

de sinalização PDGFR α ^{5,34}. Além disso, a via de sinalização PDGF é especialmente regulada por PDGFR. A inibição do PDGFR pode bloquear completamente as respostas celulares e biológicas mediadas por esta via^{5,35}. Os resultados no presente estudo confirmam os achados antes mencionados. O ensaio de western blot mostrou que as expressões proteicas de PDGF-A, PDGF-C e PDGFR- α nos grupos DOCA e DOCA+IMA foram dramaticamente aumentadas, quando comparadas com o grupo CON, e a expressão proteica de p-PDGFR α foi positivamente associada com a fibrose miocárdica.

Mecanismo do efeito cardioprotetor do Imatinib

Como os PDGF e seus receptores são mediadores importantes para a proliferação, sobrevivência e migração de fibroblastos, os inibidores de PDGFR podem tornar-se agentes promissores para o tratamento da fibrose miocárdica. O Imatinib é um inibidor do receptor tirosina-quinase. Estudos anteriores sugeriram que inibindo-se a transformação de PDGFR em PDGFR α ativado era possível bloquear a via de sinalização de PDGF, prevenindo com o tempo a ocorrência de fibrose miocárdica³⁶⁻³⁸. Neste estudo, a fibrose do miocárdio e dos tecidos dos vasos sanguíneos circundantes, no grupo DOCA+IMA, foi acentuadamente mitigada, e as expressões proteicas de PI e PIII também diminuíram significativamente se comparado com o grupo DOCA. A fibronectina e tenascina-C são também componentes principais de tecidos fibróticos^{39,40}. Encontrou-se que a tenascina-C está envolvida na adesão entre as células do miocárdio e os tecidos fibróticos, e na regulação do recrutamento de fibroblastos após a lesão do miocárdio. Assim, a tenascina-C tem sido considerada como um novo índice de fibrose miocárdica e remodelação ventricular. Além disso, a tenascina-C pode também ser usada para avaliar a função do ventrículo esquerdo. As expressões proteicas de fibronectina e tenascina-C no grupo DOCA+IMA foram significativamente diminuídas, quando comparadas com o grupo DOCA. Esses achados confirmam que o Imatinib é capaz de inibir a fibrose miocárdica em ratos com hipertensão induzida por mineralocorticoides.

Papel das vias de sinalização de PDGF na fibrose miocárdica induzida por mineralocorticoide

Nossos achados demonstraram que a via de sinalização de PDGF participa na fibrose miocárdica induzida por mineralocorticoide. Além disso, os PDGF desempenham um papel como fatores substitutos de macrófagos. Assim, especula-se que o mineralocorticoide induz a inflamação do miocárdio, ativa MR sobre os macrófagos, e recruta os macrófagos no miocárdio, conduzindo à produção de uma grande quantidade de PDGF. Então, os PDGF ligam-se e ativam o PDGFR α sobre os fibroblastos do miocárdio, o qual promove a infiltração e proliferação de fibroblastos em locais de inflamação e facilita a síntese e secreção de colágeno excessivo, resultando, no final das contas, em fibrose miocárdica^{22,36}. O Imatinib exerce um efeito antifibrose miocárdica, através do bloqueio da via de sinalização de PDGF. Assim, os animais do grupo DOCA+IMA apresentaram inflamação do miocárdio evidente, e expressões elevadas de PDGF-A, PDGF-C, e PDGF- α . Contudo, a fibrose miocárdica grave estava ausente.

Conclusão

O presente estudo confirma que a via de sinalização de PDGF participa na fibrose miocárdica induzida por mineralocorticoide. O Imatinib é capaz de suprimir eficazmente a fibrose miocárdica, inibindo a atividade do PDGFR α e, finalmente, bloqueando a via de sinalização de PDGF.

Agradecimentos

Agradecemos aos assistentes técnicos do laboratório central da Universidade Médica de Anhui por sua ajuda na imunohistoquímica e ensaio western blot.

Referências

1. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, et al. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H1253-62.
2. Isoda K, Kamezawa Y, Tada N, Sato M, Ohsuzu F. Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin 1 α . *J Card Fail*. 2001;7(4):355-64.
3. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumornecrosis factor-alpha. *Circulation*. 1998;97(14):1375-81.
4. Pontén A, Li X, Thorén P, Aase K, Sjöblom T, Ostman A, et al. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2003;163(2):673-82.
5. Wu E, Palmer N, Tian Z, Moseman AP, Galdzicki M, Wang X, et al. Comprehensive dissection of PDGF-PDGFR signaling pathways in PDGFR genetically defined cells. *PLoS One*. 2008;3(11):e3794.
6. Habibi J, DeMarco VG, Ma L, Pulakat L, Rainey WE, Whaley-Connell AT, et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves diastolic function independent of blood pressure reduction in a transgenic model of RAAS overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1484-1491.
7. Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. The regulation of cell growth and survival by aldosterone. *Front Biosci*. 2011;16:440-57.
8. Ishimaru K, Ueno H, Kagitani S, Takabayashi D, Takata M, Inoue H. Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the Heart of DOCA/Salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(2):187-94.
9. Frangogiannis NG. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem*. 2006;13(16):1877-93.
10. Eddy A. Role of cellular infiltrates in response to proteinuria. *Am J Kidney Dis*. 2001;7(Suppl 2):S25-9.
11. Dorrance AM. Are macrophages the foot soldiers in the war waged by aldosterone against the heart? *Hypertension*. 2009;54(3):451-3.
12. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against DOC/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension*. 2009; 54(3):537-43.
13. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3350-64.

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

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

14. Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*. 2006;47(4):656-64.
15. Ostendorf T, Kunter U, Grone HJ, Bahlmann F, Kawachi H, Shimizu F, et al. Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(5):909-18.
16. Eitner F, Ostendorf T, Kretzler M, Cohen CD, Eriksson U, Grone HJ, et al. ERCC-Consortium. PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1145-53.
17. Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors*. 2002;20(2):81-91.
18. Bonner JC, Lindroos PM, Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL. Induction of PDGF receptor-alpha in rat myofibroblasts during pulmonary fibrogenesis in vivo. *Am J Physiol*. 1998;274 (1 Pt 1):L72-80.
19. Lindroos PM, Wang YZ, Rice AB, Bonner JC. Regulation of PDGFR-alpha in rat pulmonary myofibroblasts by staurosporine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(2):L354-62.
20. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):397-416.
21. Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest*. 1993;92(1):425-30.
22. Leipner C, Grün K, Müller A, Buchdunger E, Borsi L, Kosmehl H, et al. Imatinib mesylate attenuates fibrosis in COXSackievirusB3-induced chronic myocarditis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(1):118-26.
23. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF beta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*. 2010;106(11):1675-80.
24. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):237-54.
25. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, et al. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 2010;120(1):242-53.
26. Yang D, Qiu D. Linkage between elevated PDGF-C expression and myocardial fibrogenesis in coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *Eur Heart J*. 2005;26(7):642-3.
27. Grün K, Markova B, Böhmer FD, Berndt A, Kosmehl H, Leipner C. Elevated expression of PDGF-C in coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *Eur Heart J*. 2005;26(7):728-39.

28. Pontén A, Folestad EB, Pietras K, Eriksson U. Platelet-derived growth factor D induces cardiac fibrosis and proliferation of vascular smooth muscle cells in heart-specific transgenic mice. *Circ Res*. 2005;97(10):1036-45.
29. Simm A, Nestler M, Hoppe V. Mitogenic effect of PDGF-AA on cardiac fibroblasts. *Basic Res Cardiol*. 1998;93(Suppl 3):40-3.
30. Simm A, Nestler M, Hoppe V. PDGF-AA, a potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(1):357-68.
31. Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol*. 2000;2(5):302-9.
32. Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*. 2002;398(2):284-90.
33. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-312.
34. Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, Frangogiannis NG. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2315-23.
35. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):255-73.
36. Chaudhary NI, Roth CJ, Hilberg F, Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J*. 2007;29(5):976-85.
37. Vittal R, Zhang H, Han MK, Moore BB, Horowitz JC, Thannickal VJ. Effects of the Protein Kinase Inhibitor, Imatinib mesylate, on epithelial/mesenchymal phenotypes: Implications for treatment of fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(1):35-44.
38. Savikko J, Taskinen E, Von Willebrand E. Chronic allograft nephropathy is prevented by inhibition of platelet-derived growth factor receptor: tyrosine kinase inhibitors as a potential therapy. *Transplantation*. 2003;75(8):1147-53.
39. Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, et al. Eplerenone Attenuates Myocardial Fibrosis in the Angiotensin II-Induced Hypertensive Mouse: Involvement of Tenascin-C Induced by Aldosterone-Mediated Inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 49(5): 261-8.
40. Eismann U, Sommer M, Kosmehl H, Appenroth D, Fleck C, Stein G. Fibronectin splice variants-prognostic markers for the stage of renal interstitial fibrosis in the rat. *Nephron*. 2002;92(2):379-88.