

Células envolvidas no remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio

Cells involved in extracellular matrix remodeling after acute myocardial infarction

Larissa Ferraz Garcia¹, Fábio D'Aguiar Mataveli², Ana Maria Amaral Antônio Mader¹,
Thérèse Rachell Theodoro¹, Giselle Zenker Justo², Maria Aparecida da Silva Pinhal²

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da transferência gênica do VEGF₁₆₅ no processo de remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio. **Métodos:** Ratos Wistar foram submetidos ao infarto do miocárdio por ligação da artéria coronária descendente esquerda, e a fração de ejeção de ventrículo esquerdo foi utilizada para classificar os infartos em grandes e pequenos. Os animais foram divididos em grupos de dez animais, de acordo com o tamanho do infarto (grande ou pequeno), e receberam ou não tratamento com o VEGF₁₆₅. A avaliação dos diferentes marcadores foi realizada por imuno-histoquímica e quantificação digital. Os anticorpos primários utilizados foram antifibronectina, antivimentina, anti-CD44, anti-E-caderina, anti-CD24, anti-alfa-1-actina e anti-PCNA. Os resultados foram representados como média e erro padrão, e analisados por ANOVA, sendo considerado estatisticamente significativo se $p \leq 0,05$. **Resultados:** Houve aumento significativo da expressão de marcadores de células indiferenciadas, como fibronectina (proteína presente na matriz extracelular) e CD44 (glicoproteína presente nas células endoteliais). Entretanto, houve diminuição da expressão de vimentina e PCNA, indicando possível diminuição do processo de proliferação celular após o tratamento com VEGF₁₆₅. Os marcadores de células diferenciadas, E-caderina (proteína de adesão entre as células do miocárdio), CD24 (proteína presente nos vasos sanguíneos) e alfa-1-actina (marcador específico de miócitos) também apresentaram maior expressão nos grupos submetidos à terapia gênica, comparativamente com o grupo não tratado. O valor obtido pela relação entre alfa-1-actina e vimentina foi aproximadamente três vezes maior nos grupos tratados com VEGF₁₆₅, indicando maior diferenciação tecidual. **Conclusão:** O papel dos miócitos se mostrou importante no processo de remodelamento tecidual, confirmando que o VEGF₁₆₅ parece conferir um efeito protetor no tratamento do infarto agudo do miocárdio.

Descritores: Infarto do miocárdio; Terapia genética; Indutores da angiogênese; Neovascularização fisiológica; Fatores de crescimento do endotélio vascular

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effects of VEGF₁₆₅ gene transfer in the process of remodeling of the extracellular matrix after an acute myocardial infarct. **Methods:** Wistar rats were submitted to myocardial infarction, after the ligation of the left descending artery, and the left ventricle ejection fraction was used to classify the infarcts into large and small. The animals were divided into groups of ten, according to the size of infarcted area (large or small), and received or not VEGF₁₆₅ treatment. Evaluation of different markers was performed using immunohistochemistry and digital quantification. The primary antibodies used in the analysis were anti-fibronectin, anti-vimentin, anti-CD44, anti-E-cadherin, anti-CD24, anti-alpha-1-actin, and anti-PCNA. The results were expressed as mean and standard error, and analyzed by ANOVA, considering statistically significant if $p \leq 0.05$. **Results:** There was a significant increase in the expression of undifferentiated cell markers, such as fibronectin (protein present in the extracellular matrix) and CD44 (glycoprotein present in the endothelial cells). However, there was decreased expression of vimentin and PCNA, indicating a possible decrease in the process of cell proliferation after treatment with VEGF₁₆₅. Markers of differentiated cells, E-cadherin (adhesion protein between myocardial cells), CD24 (protein present in the blood vessels), and alpha-1-actin (specific myocyte marker), showed higher expression in the groups submitted to gene therapy, compared to non-treated group. The value obtained by the relation between alpha-1-actin and vimentin was approximately three times higher in the groups treated with VEGF₁₆₅, suggesting greater tissue differentiation. **Conclusion:** The results demonstrated the important role of myocytes in the process of tissue remodeling, confirming that VEGF₁₆₅ seems to provide a protective effect in the treatment of acute myocardial infarct.

Keywords: Myocardial infarction; Genetic therapy; Angiogenesis inducing agents; Neovascularization physiologic; Vascular endothelial growth factors

¹ Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

² Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Larissa Ferraz Garcia – Avenida Príncipe de Gales, 821 – Príncipe de Gales – Santo André, SP, Brasil – CEP: 09060-650 – Tel.: (11) 4993-5400 – E-mail: comunicacao@fmabc.br

Data de submissão: 16/9/2013 – Data de aceite: 10/1/2015

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082015AO2970

INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular representa uma das principais causas de mortalidade no mundo.⁽¹⁾ Infelizmente, o tratamento farmacológico atual para o infarto agudo do miocárdio é limitado com relação ao processo de remodelação dos ventrículos cardíacos, além de não prevenir progressão para insuficiência cardíaca.⁽²⁻⁴⁾

A terapia gênica representa uma modalidade alternativa de tratamento para doenças cardíacas, pois intensifica a ação de fatores angiogênicos exógenos e, com isso, induz à formação de novos capilares arteriais e promove o remodelamento de vasos já existentes.⁽⁵⁾ Os possíveis benefícios da terapia gênica no contexto do infarto agudo do miocárdio incluem, além da intensificação da ação de fatores angiogênicos, a promoção da proteção dos miócitos (por inibir processos celulares como apoptose e garantir sobrevivência celular) e a alteração da expressão de componentes responsáveis pela integridade da matriz extracelular ventricular.⁽⁶⁻⁹⁾ A proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta heterogeneidade molecular e apresenta cinco isoformas diferentes com 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos. Sua forma mais comum é um polipeptídeo homodímero com 165 ou 121 aminoácidos (VEGF₁₆₅ e VEGF₁₂₁), sendo ambos capazes de aumentar o fluxo sanguíneo colateral em modelos experimentais. O VEGF₁₂₁ regula a permeabilidade vascular, enquanto o VEGF₁₆₅ regula a angiogênese.⁽¹⁰⁾

O VEGF₁₆₅ é um potente mitógeno de células endoteliais de artérias, veias e vasos linfáticos, pois além de estimular a proliferação e a migração de células endoteliais, promove a formação de novos vasos e aumenta a permeabilidade vascular.⁽¹⁰⁻¹²⁾ A expansão de vasos colaterais no tecido cardíaco infartado, desencadeia invasão e proliferação de células endoteliais e células musculares lisas, induzindo a respostas como mitose, migração, diferenciação celular, degradação e remodelamento da matriz extracelular. No coração de um indivíduo adulto, os genes que codificam fatores indutores de formação de novos vasos, bem como seus receptores, são expressos em níveis aparentemente insuficientes em resposta a uma isquemia crônica.^(13,14)

O VEGF₁₆₅ apresenta expressão induzida por hipóxia e promove a diferenciação de células-tronco mesenquimais em vários tipos de células especializadas, inclusive miócitos, proporcionando, dessa forma, maior cardioproteção, seguida de formação de novos vasos no miocárdio isquêmico.⁽¹⁵⁾

A superexpressão de VEGF₁₆₅ durante a sobrevivência dos miócitos em condições de hipóxia, além de estimular a formação de novos vasos sanguíneos, aumenta a densidade vascular e o fluxo sanguíneo na

zona do infarto. A neovascularização determinada pelo VEGF₁₆₅ é responsável pela diminuição de apoptose dos miócitos e pelo aumento de contratilidade dos ventrículos cardíacos.^(15,16) Desse modo, a terapia gênica com VEGF₁₆₅ pode afetar o remodelamento fibroso na área isquêmica e impedir a expansão da cicatriz.⁽¹⁷⁾

Estudos recentes sugerem um papel muito mais amplo do VEGF₁₆₅ para a manutenção da função ventricular, pois a diminuição do número de miócitos associados com infarto do miocárdio leva a um estado de deficiência de VEGF₁₆₅ relativa e tal fato contribui para uma alteração da função cardíaca normal e da estrutura ventricular. Conseqüentemente, tais descobertas evidenciam um papel autócrino e parácrino do VEGF₁₆₅, que parece conferir um efeito protetor sobre o miocárdio e a matriz extracelular cardíaca, o qual se estende ao seu papel na formação de novos vasos.^(18,19)

As alterações de moléculas da matriz extracelular e da superfície de miócitos, após infarto agudo do miocárdio, foram avaliadas pelos anticorpos que identificam diferenciação celular e proliferação tecidual como glicoproteína adesiva presente na forma solúvel no plasma e insolúvel na matriz extracelular da maioria dos tecidos responsável pela interação entre superfície celular e componente da matriz extracelular (antifibronectina), receptor de superfície celular presente em monócitos e células do endotélio vascular (anti-CD44), filamento intermediário de fibroblastos e células mesenquimais (antivimentina), proteína de adesão presente em células cardíacas que garantem a adesão durante a sístole e diástole (anti-E-caderina), marcador de vasos sanguíneos (anti-CD24), marcador específico de miócitos (anti-alfa-1-actina) e marcador que identifica o processo de proliferação celular, definido como antígeno nuclear de proliferação celular (antiantígeno nuclear de proliferação celular – anti-PCNA).⁽¹⁹⁾

OBJETIVO

Avaliar os efeitos da transferência gênica do VEGF₁₆₅ no processo de remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio.

MÉTODOS

Modelo animal

Ratos Wistar (fêmeas adultas) foram anestesiados e submetidos à ligação da artéria coronária descendente esquerda para a obtenção do infarto, com subsequente transferência gênica ao grupo de animais tratados, como previamente descritos por Mataveli et al.⁽¹³⁾ Foram injetados 250µg de plasmídeo de DNA (cDNA)

recombinante do VEGF₁₆₅ (pVEGF₁₆₅) em 150 μ l de tampão fosfato 0,1M, imediatamente após a indução do infarto. A injeção intramiocárdica foi realizada em três pontos equidistantes, ao redor da área irrigada pela porção esquerda da artéria coronária descendente.

Após 6 semanas da indução do infarto agudo do miocárdio, todos os animais foram submetidos ao exame de ecocardiograma antes de serem sacrificados. O exame teve como objetivo calcular o tamanho do infarto na parede anterior do ventrículo esquerdo (VE) e mensurar a fração de ejeção (FE) como medida de função cardíaca, como descrito detalhadamente por Mataveli et al.⁽¹³⁾

Os grupos de animais foram divididos de acordo com o tamanho do infarto, ou seja, infartos que atingiam menos que 30% da parede anterior do VE, foram considerados pequenos (IAMP), e infartos que atingiram mais que 30% da parede anterior do VE foram considerados grandes (IAMG). O grupo de animais que sofreram infarto (IAMG ou IAMP), porém não receberam tratamento com pVEGF₁₆₅, foi o controle. Cada grupo foi constituído por dez animais.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), processo número 0933/07. A obtenção dos animais com infarto foi realizada no biotério do Instituto Nacional de Farmacologia da UNIFESP, no período entre 2008 e 2010. Entretanto, as análises de imuno-histoquímica dos diferentes marcadores foram realizadas no laboratório da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC no período entre 2009 e 2012.

Reações de imuno-histoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram: antifibronectina (sc-6953, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos), anti-CD-44 (AM310-5M, BioGenex®, Andhra Pradesh, Índia), antivimentina (sc-7558, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos), anti-E-caderina (número 4.065, Cell Signaling Technology Inc®, Beverly Hills, Estados Unidos), anti-CD-24 (sc-7036, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos), anti-alfa-1-actina (M0851, Dako®, Glostrup, Dinamarca) e anti-PCNA (sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos). O anticorpo secundário utilizado foi o LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Avidin-Biotin-; System Peroxidase*; k-0690; Dako®, Glostrup, Dinamarca). A revelação das lâminas foi feita com cromógeno (3-3'-diaminobenzamida (DAB), obtido da (Sigma Diagnostics®, St. Louis, Estados Unidos) e a contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics®, St. Louis, Estados Unidos).

Quantificação digital das reações de imuno-histoquímica

Para a análise quantitativa das reações de imuno-histoquímica foi utilizado um *software* de processamento de imagem digital (ImageLab®, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo instruções descritas por Matos et al.⁽²⁰⁾ A quantificação digital de cada reação de imuno-histoquímica foi determinada como índice de expressão (IE), indicado em unidades ópticas/mm² (ou/mm²).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão ou mediana e variação interquartil, analisados por Análise de Variância (ANOVA), sendo considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 13.0 (SPSS Inc., Illinois, Estados Unidos).

RESULTADOS

Os resultados foram apresentados de acordo com o grupo de marcadores que determinou indiferenciação, diferenciação e proliferação celular.

Avaliação dos marcadores de indiferenciação celular

A transferência gênica do VEGF₁₆₅ aumentou a expressão de marcadores específicos, os quais identificam células indiferenciadas, tais como fibronectina, CD44 e vimentina, como mostra a figura 1.

Foi observado aumento na expressão de fibronectina e de CD44 nos tecidos infartados tratados com VEGF₁₆₅, comparativamente aos respectivos tecidos de grupos infartados e não tratados com VEGF₁₆₅. Porém, a vimentina, apresentou diminuição da expressão nos grupos infartados, após tratamento com terapia gênica, como pode ser observado na figura 1.

A figura 1 evidencia ainda que houve aumento significativo na expressão de fibronectina para o grupo de animais com IAMP, tratado com VEGF₁₆₅, comparativamente com o grupo não tratado – respectivamente $21,74 \pm 6,00$ ou μm^2 e $4,62 \pm 1,43$ ou μm^2 , com $p=0,0125$. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de fibronectina comparando-se o grupo de animais que sofreram IAMG tratado e não tratado: $18,2 \pm 4,72$ ou μm^2 e $11,45 \pm 2,61$ ou μm^2 , respectivamente, com $p=0,2108$.

O aumento significativo na expressão de CD44 para os grupos de animais tratados com transferência gênica, contendo o fator VEGF₁₆₅, também está demonstrado na figura 1. Valores obtidos para o grupo

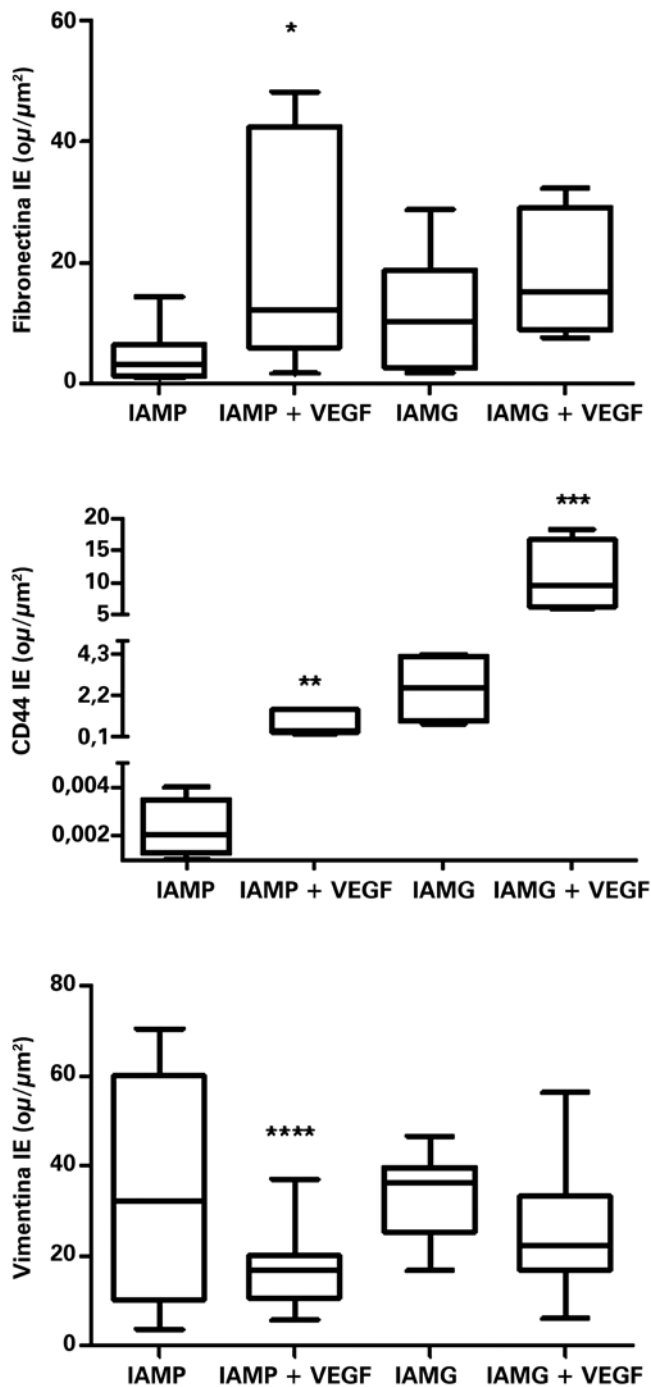


Figura 1. Expressão de fibronectina, CD44 e vimentina em animais infartados, submetidos ou não ao tratamento com VEGF₁₆₅. Os valores indicam a mediana e a variação interquartil, obtidos por análise estatística, após obter a intensidade de expressão (IE), por quantificação digital das reações de imuno-histoquímica, como descrito detalhadamente no item Métodos. O número de animais em cada grupo foi dez (n=10). Asteriscos indicam os valores de p obtidos para cada marcador, comparando-se os resultados obtidos de animais tratados com VEGF contra grupo não tratado. *p=0,0125; **p=0,0358; ***p=0,0299; ****p=0,0120. IAMP: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) sem tratamento; IAMP + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅; IAMG: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) sem tratamento; IAMG + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅.

IAMP não tratado e tratado foram, respectivamente, de $0,0023 \pm 0,01$ ou μm^2 e $0,82 \pm 0,27$ ou μm^2 , com $p=0,0358$. No grupo IAMG, os valores obtidos de expressão do CD44 foram $2,57 \pm 0,91$ ou μm^2 para o grupo sem tratamento e $10,83 \pm 2,76$ ou μm^2 para o grupo tratado com VEGF₁₆₅ ($p=0,0299$), como mostra a figura 1.

Houve maior expressão de vimentina nos grupos de animais não tratados com VEGF₁₆₅, como pode ser observado na figura 1, tanto para IAMP como IAMP. Nota-se claramente a diminuição significativa na expressão de vimentina, quando comparamos, respectivamente, o grupo IAMP não tratado ao tratado com VEGF₁₆₅: $34,18 \pm 6,81$ ou μm^2 e $17,11 \pm 2,02$ ou μm^2 , com $p=0,0120$. Entretanto, não existiu diferença estatística para o grupo IAMG não tratado ($34,00 \pm 3,45$ ou μm^2) e tratados com VEGF₁₆₅ ($25,58 \pm 3,025$ ou μm^2), com $p=0,1122$.

Avaliação dos marcadores de diferenciação celular

Os marcadores de diferenciação celular encontraram-se aumentados nos tecidos infartados que receberam o plasmídeo recombinante, contendo VEGF₁₆₅, comparativamente aos tecidos do grupo não tratado.

A molécula de E-caderina apresentou aumento significativo da expressão no grupo IAMG, que recebeu terapia gênica, em comparação ao grupo não tratado (respectivamente, $34,08 \pm 5,03$ ou μm^2 e $12,40 \pm 6,37$ ou μm^2 ; $p=0,0331$), como mostra a figura 2. Entretanto, não foi verificada diferença significativa entre o grupo IAMP tratado e não tratado com VEGF₁₆₅ (respectivamente, $26,87 \pm 5,52$ ou μm^2 e $25,35 \pm 4,93$ ou μm^2 ; $p=0,8419$), como pode ser visto na figura 2.

A marcação de células diferenciadas com anticorpos específicos direcionados a proteínas presentes nos vasos sanguíneos (CD24) e em miócitos (alfa-1-actina) também foi analisada.

O número de vasos, identificado pelo anticorpo anti-CD24, apresentou aumento significativo ($p=0,0018$) nos tecidos coletados do grupo IAMP, que recebeu tratamento com VEGF₁₆₅ em relação aos animais não tratados (respectivamente, $10,04 \pm 1,69$ ou μm^2 e $0,46 \pm 0,44$ ou μm^2), como pode ser observado na figura 2.

Não foi observada diferença significativa na expressão de CD24 ($p=0,1626$), quando se compara o grupo IAMG, submetido ou não à transferência com VEGF₁₆₅ (respectivamente, $5,56 \pm 0,91$ ou μm^2 e $7,45 \pm 0,86$ ou μm^2).

O anticorpo anti-alfa-1-actina também demonstrou aumento expressivo ($p=0,0490$) nos tecidos de animais que apresentam IAMP tratados com VEGF₁₆₅ ($16,26 \pm 1,99$ ou μm^2) comparativamente com tecidos de animais não tratados ($10,20 \pm 1,69$ ou μm^2), como pode ser observado na figura 2.

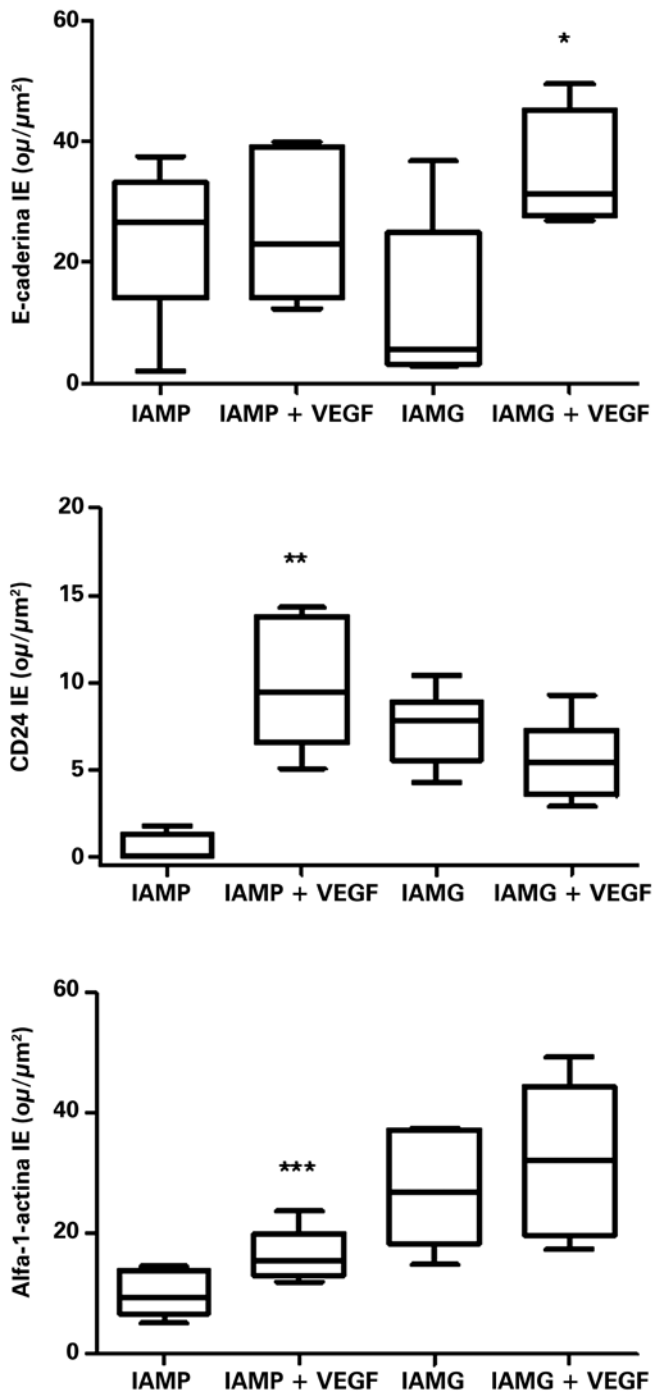


Figura 2. Expressão de E-caderina, CD24 e alfa-1-actina em animais infartados submetidos ou não ao tratamento com VEGF₁₆₅. Os valores indicam a mediana e a variação interquartil, obtidos por análise estatística, após obter a intensidade de expressão (IE), por quantificação digital das reações de imuno-histoquímica, como descrito detalhadamente no item Métodos. O número de animais em cada grupo foi dez (n=10). Asteriscos (*) indicam os valores de p obtidos para cada marcador, comparando-se os resultados adquiridos de animais tratados com VEGF contra grupo não tratado. *p=0,0331; **p=0,0018; ***p=0,0490. IAMP: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) sem tratamento; IAMP + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅; IAMG: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) sem tratamento; IAMG + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅.

Não houve diferença significativa (p=0,5534) na expressão de alfa-1-actina entre os grupos de animais acometidos a IAMG, tratados com VEGF₁₆₅ (27,54±4,38ou/μm²) e não tratados (32,02±5,70ou/μm²), como mostra a figura 2.

Relação entre marcadores de diferenciação e indiferenciação

Os valores médios dos IE, obtidos por quantificação digital das reações de imuno-histoquímica, utilizando os diferentes anticorpos que marcam células indiferenciadas (fibronectina, vimentina e CD44) e células diferenciadas (E-caderina, CD24 e alfa-1-actina), estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Índice de expressão de marcadores de células diferenciadas e indiferenciadas

	Fibronectina	Vimentina	CD44	E-caderina	CD24	Alfa-1-actina
IAMP	4,62	34,18	0	26,87	0,46	10,20
IAMP + VEGF	21,74	17,10	0,82	25,35	10,04	16,26
IAMG	11,45	34,00	2,57	12,40	7,45	27,54
IAMG + VEGF	18,12	25,58	10,83	34,80	5,56	32,02

IAMP: pequeno infarto; IAMG: grande infarto; VEGF: animais tratados com injeção do plasmídeo recombinante contendo VEGF₁₆₅.

Na tabela 2, encontra-se o valor que expressa a relação entre o IE de alfa-1-actina (marcador de diferenciação) e vimentina (marcador de indiferenciação). O maior valor obtido pela relação alfa-1-actina/vimentina indicou que existiu maior grau de diferenciação celular do tecido analisado. A escolha da alfa-1-actina e da vimentina como marcadores de diferenciação e indiferenciação celular se deveu ao fato de que ambos marcadores estão presentes no interior de células diferenciadas (miócitos) e indiferenciadas, como mencionado anteriormente.

Tabela 2. Relação alfa-1-actina e vimentina. Note evidenciado nível de diferenciação do miocárdio

Grupos	Alfa-1-actina/vimentina
IAMP	0,3
IAMP + VEGF	0,95
IAMG	0,81
IAMG + VEGF	1,03

IAMP: pequeno infarto; IAMG: grande infarto; VEGF: animais tratados com injeção do plasmídeo recombinante contendo VEGF₁₆₅.

Tecidos de animais do grupo submetido ao tratamento com VEGF₁₆₅ apresentaram aproximadamente

três vezes maior proporção de marcadores de diferenciação celular, comparativamente aos seus respectivos grupos não tratados. Essa relação evidencia aumento da proporção de miócitos, após o tratamento com VEGF₁₆₅, o que sugere que tais células diferenciadas são importantes no remodelamento tecidual.

Avaliação da proliferação celular

OPCNA encontrou-se significativamente diminuído nos animais submetidos ao tratamento com VEGF₁₆₅. Em relação ao grupo que sofreu infarto pequeno, o resultado foi, respectivamente, para tratados com VEGF₁₆₅ e sem tratamento: $1,92 \pm 0,66$ ou μm^2 e $14,75 \pm 3,36$ ou μm^2 , com $p=0,0078$. O grupo que sofreu IAMG apresentou como resultado $22,82 \pm 3,23$ ou μm^2 para o grupo tratado e $55,70 \pm 6,54$ ou μm^2 para o grupo sem tratamento ($p=0,0006$), como pode ser observado na figura 3.

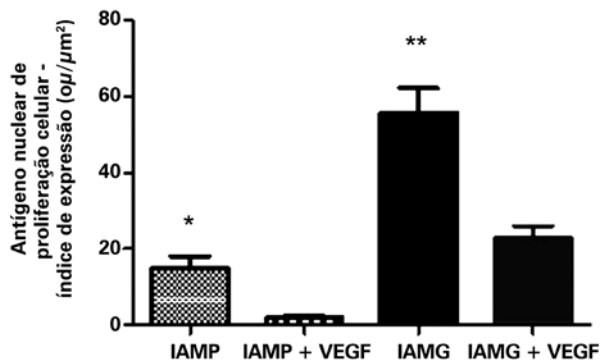


Figura 3. Expressão de antígeno nuclear de proliferação celular em animais infartados submetidos ou não ao tratamento com VEGF₁₆₅. Os valores indicam a média e o desvio padrão obtidos por análise da intensidade de expressão, após quantificação digital das reações de imuno-histoquímica, como descrito detalhadamente em métodos. O número de animais em cada grupo foi 10 ($n=10$). Asteriscos (*) indicam os valores de p obtidos para cada marcador, comparando-se os resultados adquiridos de animais tratados com VEGF versus grupo não tratado. * $p=0,0078$; ** $p=0,0006$. IAMP: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) sem tratamento; IAMP + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto pequeno) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅; IAMG: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) sem tratamento; IAMG + VEGF: grupo de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (infarto grande) tratados com transferência gênica contendo VEGF₁₆₅.

DISCUSSÃO

Em resultados previamente publicados por nosso grupo, foi descrito que a expressão máxima de VEGF₁₆₅ ocorre aos 14 dias após a transferência gênica. Consequentemente, a avaliação das amostras foi realizada no período de 6 semanas após a indução do infarto e posterior tratamento com transferência gênica. Foi avaliada, então, a resposta tardia do efeito promovido pelo tratamento com VEGF₁₆₅, como previamente descrito por Mataveli et al.⁽¹³⁾

Dados da literatura sugeriram que o aumento da expressão de moléculas que determinam indiferenciação possa estar relacionado com aumento no grau de proliferação celular.⁽¹⁰⁾ Resultados obtidos do presente estudo sugeriram que o aumento da expressão de fibronectina, na área do infarto, está relacionado com maior proliferação celular, a qual ocorre no miocárdio após o tratamento com VEGF₁₆₅ (especificamente nas áreas de pequeno infarto).

O aumento significativo de CD44, após o tratamento com VEGF₁₆₅, indicou a formação e a regeneração de vasos sanguíneos no miocárdio após infarto, independentemente do tamanho do infarto.

A diminuição da expressão de vimentina, que corresponde a um filamento intermediário do citoesqueleto celular, característico de fibroblastos e células mesenquimais, demonstrou que possivelmente tais células não eram responsáveis pelos processos de remodelamento do tecido cardíaco, após infarto do miocárdio.

É importante ressaltar que a E-caderina representa uma proteína de adesão presente nas células cardíacas e serve para a manutenção da sístole e da diástole.^(16,19) O aumento da expressão de E-caderina, após o tratamento com VEGF₁₆₅, indica que provavelmente tal marcador apresenta função fundamental para a proteção e a manutenção da contratilidade cardíaca, estimulada por transferência gênica com VEGF₁₆₅, principalmente em áreas de grande infarto.

O aumento da expressão de CD24 no grupo IAMP tratado com transferência gênica sugeriu que o VEGF₁₆₅ pudesse estimular a proliferação e a migração de células endoteliais, promovendo, dessa forma, a formação de novos vasos e maior facilidade de regeneração tecidual do miocárdio.

Seria esperado um aumento no número de vasos sanguíneos após o tratamento com VEGF₁₆₅ em ambos os grupos de animais, com pequena ou grande área infartada. Entretanto, não foi observado aumento significativo de CD24 nas áreas de grande infarto. Possivelmente, o VEGF₁₆₅ apresentou um papel mais efetivo para o tratamento de pequenas lesões do miocárdio.

A expressão aumentada do anticorpo anti-alfa-1-actina nos grupos submetidos à terapia gênica indicou que tal fator de crescimento possivelmente promoveu a indução da proliferação de miócitos. Portanto, os dados obtidos evidenciaram que miócitos estavam possivelmente envolvidos no processo de remodelamento da matriz extracelular do miocárdio após infarto.

O fato de não ter sido observada diferença na marcação dos miócitos nos tecidos de animais do grupo de grande infarto evidenciou, mais uma vez, que, possivelmente, o VEGF₁₆₅ não foi efetivo para induzir à pro-

liferação de miócitos, quando a área acometida pelo infarto era muito grande.

Os grupos que receberam tratamento com VEGF₁₆₅ apresentaram menor expressão de PCNA e, portanto, menor proliferação celular. A diminuição da taxa de proliferação no tecido, após transferência gênica do VEGF₁₆₅, corrobora os dados já mencionados, que evidenciaram intenso processo de diferenciação celular.

Portanto, 6 semanas após o tratamento com VEGF₁₆₅, foi possível evidenciar que o VEGF₁₆₅ esteve relacionado com alterações na área de infarto, responsáveis pelo aumento da expressão de marcadores específicos de diferenciação celular. Ainda, os resultados demonstraram que miócitos eram as células diferenciadas responsáveis por tal processo. Dados obtidos no presente estudo elucidaram que o tecido lesionado após o infarto encontrou-se em intenso remodelamento e não representou apenas um tecido cicatricial, como sugerido na literatura.

CONCLUSÕES

O tratamento com VEGF₁₆₅ representou uma alternativa fundamental para o remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio, promovendo estímulo da diferenciação celular. Miócitos participaram ativamente do processo de remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o financiamento obtido para realização deste trabalho da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com Auxílio Regular de Pesquisa, Processo 2011/188638-300, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 127212/2010-8, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Sanderson JE, Mayosi B, Yusuf S, Reddy S, Hu S, Chen Z, et al. Global burden of cardiovascular disease. *Heart*. 2007;93(10):1175
- McGinn AN, Nam HY, Ou M, Hu N, Straub CM, Yockman JW, et al. Bioreducible polymer-transfected skeletal myoblasts for VEGF delivery to acutely ischemic myocardium. *Biomaterials*. 2011;32(3):942-9.
- Katara RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(3):405-12.
- Novotny NM, Ray R, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y, et al. Stem cell therapy in myocardial repair and remodeling. *J Am Coll Surg*. 2008;207(3):423-34. Review.
- Furlani AP, Kalil RA, Castro I, Cañedo-Delgado A, Barra M, Prates PR, et al. Effects of therapeutic angiogenesis with plasmid VEGF165 on ventricular function in a canine model of chronic myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24(2):143-9.
- Wang R, Crystal RG, Hackett NR. Identification of an exonic splicing silencer in exon 6A of the human VEGF gene. *BMC Mol Biol*. 2009;10:103.
- Ward MR, Stewart DJ. Progenitor cell therapy for cardiac regeneration following acute myocardial infarction: So far, so good? *Can J Cardiol*. 2008;24(Suppl C):5C-10C.
- Payne TR, Oshima H, Okada M, Momoi N, Tobita K, Keller BB, et al. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(17):1677-84.
- Kivelä R, Bry M, Robciuc MR, Räsänen M, Taavitsainen M, Silvola JM, et al. VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart. *EMBO Mol Med*. 2014 Mar;6(3):307-21.
- Levashova Z, Backer M, Backer JM, Blankenberg FG. Imaging vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in turpentine-induced sterile thigh abscesses with radiolabeled single-chain VEGF. *J Nucl Med*. 2009;50(12):2058-63.
- Yan D, Wang X, Li D, Liu W, Li M, Qu Z, et al. Macrophages overexpressing VEGF target to infarcted myocardium and improve neovascularization and cardiac function. *Int J Cardiol*. 2013;164(3):334-8.
- Sato D, Otani H, Enoki C, Fujita M, Minato N, Iwasaka T. Phenotypic modulation and turnover of bone marrow-derived cells after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(3):146-55.
- Mataveli FD, Han SW, Nader HB, Mendes A, Kanishiro R, Tucci P, et al. Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer cardiac extracellular matrix remodeling. *Growth Factors*. 2009;27(1):22-31.
- Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(4):530-44. Review.
- Ye L, Zhang W, Su LP, Haider HK, Poh KK, Galupo MJ, et al. Nanoparticle based delivery of hypoxia-regulated VEGF transgene system combined with myoblast engraftment for myocardial repair. *Biomaterials*. 2011;32(9):2424-31.
- Zhang Y, Furumura M, Morita E. Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF 121 and VEGF 165. *Growth Factors*. 2008;26(3):125-31.
- Hagikura K, Fukuda N, Yokoyama S, Yuxin L, Kusumi Y, Matsumoto T, et al. Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. *Int J Cardiol*. 2010;142(1):56-64.
- Vilahr G, Juan-Babot O, Peña E, Oñate B, Casaní L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(3):522-33.
- Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol*. 2008;14(15):2349-57.
- Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (São Paulo)*. 2006;61(5):417-24.