



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

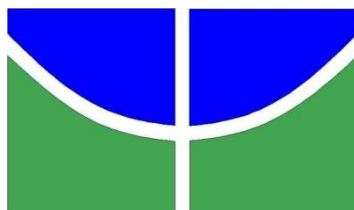
O CORAÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) - QUANTIFICAÇÃO DOS TECIDOS CONSTITUINTES

FABIENI TIEMY MENEZES OKIYAMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

OUTUBRO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

O CORAÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) - QUANTIFICAÇÃO DOS TECIDOS CONSTITUINTES

FABIENI TIEMY MENEZES OKIYAMA

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 102/2014

BRASÍLIA/DF

OUTUBRO/2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

O CORAÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) - QUANTIFICAÇÃO DOS TECIDOS CONSTITUINTES

FABIENI TIEMY MENEZES OKYIAMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:

EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA DOUTOR (UNB)

MARCIO BOTELHO DE CASTRO, DOUTOR (UNB)

DANILA BARREIRO CAMPOS, DOUTORA (UFPB)

BRASÍLIA/DF, 07 DE OUTUBRO DE 2014

BRASÍLIA/DF, 07 DE OUTUBRO DE 2014

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

OKIYAMA, F.T.M. **O Coração Do Zebrafish (*Danio rerio*) - Quantificação Dos Tecidos Constituintes.**

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 25p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Okiyama, Fabieni Tiemy Menezes

O Coração Do Zebrafish (*Danio rerio*) - Quantificação Dos Tecidos Constituintes. Fabieni Tiemy Menezes Okiyama

Orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima

Brasília, 2014. 25p

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2014

1. Miocárdio. 2. Peixe. 3. Colágeno I. Colágeno III. 4. Espaço intersticial. Lima, E.M.M. II. Doutor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Agradeço de coração aos meus pais por me criarem. Ao Rodrigo Augusto pelo companheirismo e paciência, e à minha irmã Diulieni Menezes por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Obrigada a todos os meus amigos mais íntimos pela paciência, pelo amor e carinho nos momentos que precisei, obrigada pelas palavras de incentivo e por se fazerem sempre presente mesmo com o pouco tempo disponível que tive.

Obrigada aos animais que já fizeram parte da minha vida: Dudinha, Tinenem, Mancueba, Amarela, Mussum, Lis, Didi, Popozinho, Johfry, Lilica, Perninha, Pipito, Pipita, Shiryu, Shunrey, Rubi, Duda, Gorazinho, Piupiu, Pipiriquitinho, etc, Devo minha escolha pela Veterinária a eles e a minha paixão pelos animais. MUITÍSSIMO obrigada aos que permanecem alegrando minha vida: Bebedizinho, Kititim, Lelo, Anita, Pituca, Lola, Frederico, Latifa, Flupe, Mel, Sara, Galo, Popó e Cocó. E a todos os bichinhos que de alguma forma tenho alguma ligação. É por causa de vocês que minha vida é maravilhosa.

Obrigada a todos os colegas, amigos, alunos, residentes, veterinários, e em especial ao Léo, que me ajudaram durante o processo de coleta e processamento de material, todos sempre com muita vontade de ajudar, trabalhar e aprender. Esse suporte foi essencial para o sucesso da pesquisa.

Agradeço especialmente à equipe do Laboratório de Anatomia Veterinária que tornaram o ambiente de trabalho um segundo lar para mim. Obrigada a todos pelos momentos de alegria, descontração, estudos e pelas constantes palavras de apoio.

Agradeço imensamente ao professor e orientador Eduardo pelo apoio e a oportunidade, por acreditar em mim e no meu trabalho. Obrigada por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações.....	vii
LISTA DE TABELA.....	viii
LISTA DE FIGURA.....	ix
ABSTRACT.....	2
RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS.....	6
DISCUSSÃO.....	12
CONCLUSÃO.....	14
FABRICANTES E MARCAS REGISTRADAS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
AT	Átrio
DF	Distrito Federal
EPM	Erro padrão da média
G1	Grupo com peixes machos e fêmeas juntos
G1-A	Grupo com peixes machos
G1-B	Grupo com peixes fêmeas
L	Litro
n°	Número
°C	Graus Celcius
pH	Potencial hidrogeniônico
pL	Picolitro
Tec.	Tecido
UnB	Universidade de Brasília
V	Volt
VT	Ventrículo

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Dados representados na tabela após o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov no átrio e ventrículo do GT.	8
Tabela 2.	Dados representados na tabela após o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov no átrio e ventrículo do GM e GT.	8

LISTA DE FIGURAS

- | | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. (A) Vista lateral da região cardíaca onde é visualizado o átrio (seta), bulbo (seta segmentada) e ventrículo (asterisco); (B) Trabéculas do ventrículo (setas); (C) Valva atrioventricular (seta) e valva bulboventricular (seta segmentada); e (D) Colágeno tipo I (seta segmentada) e colágeno tipo III (seta). Barra: 50 µm. <i>Picrosirius red</i> e microscopia de luz. | 9 |
| Figura 2. (A) Comparação da densidade do núcleo de cardiomiócitos entre o átrio e ventrículo do GT; (B) Comparação da densidade de miocárdio no átrio e ventrículo do GT; (C) Comparação da densidade de núcleos de cardiomiócitos do átrio entre machos e fêmeas; (D) Comparação da densidade de núcleos de cardiomiócitos do ventrículo entre machos e fêmeas; (E) Comparação da densidade do miocárdio do átrio entre machos e fêmeas; (F) Comparação da densidade do miocárdio do ventrículo entre machos e fêmeas. Representação gráfica da média ± EPM. $P \leq 0,05$ com aplicação do teste t pareado.. | 10 |
| Figura 3. (A) Comparação da densidade de tecido conjuntivo entre o átrio e ventrículo do GT; (B) Comparação da densidade de tecido conjuntivo no átrio entre GM e GF; (C) Comparação da densidade de tecido conjuntivo entre ventrículo de GM e GF. Representação gráfica da média ± EPM. $P \leq 0,05$ com aplicação do teste t pareado. | 11 |

Figura 4. (A) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio em G1 11 (machos e fêmeas juntos); (B) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no ventrículo em G1 (machos e fêmeas juntos); (C) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio e ventrículo juntos em G1 (machos e fêmeas juntos); (D) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio entre G1-A (machos) e G1-B (fêmeas); (E) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no ventrículo entre G1-A (machos) e G1-B (fêmeas). Representação Gráfica da média \pm EPM do G1, G1-A e G1-B. $P \leq 0.05$ com aplicação do teste t pareado.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A presente dissertação encontra-se formatada segundo as normas do sistema de submissão de artigos para publicação na revista **ZEBRAFISH** (journals).

O Coração Do Zebrafish (*Danio rerio*) - Quantificação dos Tecidos Constituintes. /Fabieni T. M. Okiyama

Do Laboratório de Anatomia Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (Okiyama, F. T. M.)

Autor para correspondência: Eduardo Maurício Mendes de Lima, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), ICC Sul, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70910-970, Brasil. limaemm@unb.br

Telefone: (61) 3107-2817

The heart of *Zebrafish (Danio rerio)* - Quantification of tissue constituents

Abstract: Problems relating to injuries and heart failure are troubling as well as morphological changes inherent in this condition. Longing in the retraction of innovative and applicable data cardiac anatomy was the motivation of the choice of the zebrafish (*Danio rerio*) as a research model. Plus its various morphological and functional qualities, and especially its ability to cardiac regeneration. Ten fish were used between males and females for histological preparation of their cardiac tissue. Quantified the density of cardiomyocytes, connective tissue and collagen type I and type III fibers, stained by Picrosirius red. All parameters comparing atrium (AT) and ventricular (VT) was no statistical difference, probably due to the size difference between its layers. The atrium of males and females together (GT) showed higher core density lobby ($6.93\% \pm 0.51$) than in the ventricle ($3.84 \pm 0.20\%$), and higher density of the ventricular myocardium ($68, 77\% \pm 1.25$) than in the atrium ($60.30\% \pm 2.44$). The GT ventricle ($8.02 \pm 0.61\%$) showed lower density of connective tissue that the atrium ($24.50 \pm 1.35\%$) and males (atrium: $22.80\% \pm 1.74$ and ventricle: $13.47\% \pm 1.08$) showed higher density in the ventricle and lower in females (atrium: $27.96\% \pm 1.97$ and ventricle: $4.63\% \pm 0.29$). Also in GT, the density of fibers type I in the atrium was lower compared to the fibers of type III ($4.28\% \pm 1.20$ and $5.68 \pm 1.90\%$) and higher in the ventricle ($3, 22\% \pm 0.89$ and $0.14 \pm 0.05\%$) as well as other species. Possibly this difference is linked to hormonal and behavioral factors in both the connective tissue and the collagen. Based on these results opens up the range within these parameters for future studies related to the species studied.

KEY WORDS: Myocardium, fish, collagen I, collagen III, interstitial space.

O Coração Do Zebrafish (*Danio rerio*) - Quantificação Dos Tecidos Constituintes

Resumo: Problemas relativos a lesões e insuficiência cardíaca são preocupantes, bem como as modificações morfológicas inerentes a esta afecção. No anseio da retratação de dados inovadores e aplicáveis a anatomia cardíaca foi a motivação da escolha do *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo de pesquisa. Acrescido ainda das suas diversas qualidades morfofuncionais e principalmente a sua capacidade de regeneração cardíaca. Utilizou-se 10 peixes, entre machos e fêmeas para a preparação histológica do seu tecido cardíaco. Quantificou-se a densidade de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e fibras de colágeno tipo I e tipo III, coradas pela coloração *Picrosirius Red*. Todos os parâmetros comparados entre átrio (AT) e ventrículo (VT) houve diferença estatística, provavelmente pela diferença de tamanho entre suas camadas. O átrio de machos e fêmeas juntos (GT) apresentou maior densidade de núcleo de cardiomiócitos no átrio ($6,93\% \pm 0,51$) que no ventrículo ($3,84\% \pm 0,20$), e maior densidade de miocárdio no ventrículo ($68,77\% \pm 1,25$) que o no átrio ($60,30\% \pm 2,44$). O ventrículo de GT ($8,02\% \pm 0,61$) apresentou menor densidade de tecido conjuntivo que o átrio ($24,50\% \pm 1,35$), sendo que machos (átrio: $22,80\% \pm 1,74$ e ventrículo: $13,47\% \pm 1,08$) apresentaram maior densidade no ventrículo e menor no átrio que fêmeas (átrio: $27,96\% \pm 1,97$ e ventrículo: $4,63\% \pm 0,29$). Ainda no grupo GT, a densidade de fibras tipo I no átrio foi menor comparado às fibras do tipo III ($4,28\% \pm 1,20$ e $5,68\% \pm 1,90$, respectivamente), e maior no ventrículo ($3,22\% \pm 0,89$ e $0,14\% \pm 0,05$, respectivamente) assim como em outras espécies. Possivelmente essa diferença está ligada a fatores hormonais e comportamentais tanto no tecido conjuntivo quanto no colágeno. Com base nos resultados encontrados abre-se o leque dentro destes parâmetros para estudos futuros relacionados à espécie estudada.

Termos de indexação: Miocárdio, peixe, colágeno I, colágeno III, espaço intersticial

Introdução

Algumas enfermidades como a insuficiência cardíaca e o infarto do miocárdio reduzem a qualidade de vida, geram custos socioeconômicos significativos e representam a principal causa de morte nos países industrializados.¹ A alta prevalência e custo elevado da insuficiência cardíaca mostram a importância de se estabelecer modelos experimentais para pesquisa, e deste modo aprimorar os métodos de diagnóstico e de tratamento.²

Os modelos estudados de doenças cardiovasculares mais utilizados eram porcos e ovelhas que possuíam custos elevados de manutenção. Estes foram, em parte, substituídos por ratos, que são geneticamente menos semelhantes aos humanos, porém de custo mais baixo e de fácil manejo.² Hoje o modelo experimental em ascensão é o *Danio rerio*, também conhecido como paulistinha ou *zebrafish*. Sua utilização vem aumentando devido a diversos fatores, tais como a facilidade de administração e rápida absorção da maioria dos fármacos administrados na água e através da via intracelomática; desenvolvimento embrionário visível; base morfológica e molecular da embriogênese semelhante a de outros vertebrados, incluindo os seres humanos; tamanho pequeno, fácil reprodução e manejo; baixo custo de produção comparado a outros modelos;³ após 72 horas da fertilização, o sistema vascular cardíaco do *zebrafish* se apresenta completamente funcional e facilmente visualizado, facilitando estudos relacionados ao coração e o mais importante, sua capacidade de regeneração cardíaca.⁴

O coração do *zebrafish* possui apenas um átrio e um ventrículo como os demais peixes ósseos. Ambos são formados principalmente por cardiomiócitos, que são as maiores células estruturais do coração,⁴ e por tecido conjuntivo, que atua na regulação da distensão, transmissão de força durante a contração, relaxamento e resistência a deformações patológicas.⁵ Um dos principais constituintes desse tecido é o colágeno, apresentando-se em cinco tipos: tipo I, III, IV, V e VI, sendo predominante a fibra colágena tipo I (80%). Esta é responsável pela rigidez da câmara cardíaca como um todo, sendo mais abundante que a fibra tipo III (cerca de 12%). Assim como as fibras colágenas do tipo I, as do tipo III exercem papel importante no alinhamento nos feixes dos cardiomiócitos, formando pontes entre estes.⁶

A regeneração do coração dessa espécie se dá por completo em apenas dois meses, sendo este um ótimo modelo de plasticidade cardiovascular. A regeneração após a ressecção de 20% do ápice do ventrículo se inicia com a formação de um coágulo que é substituído por fibrina e colágeno, e finalmente

substituído pelos cardiomiócitos.⁴ Ainda não foi possível avaliar o infarto do miocárdio por isquemia coronária no *zebrafish*, mas o método mais próximo desta simulação é a hipóxia. No modelo de hipóxia induzida, ocorre a morte das células cardíacas e a regeneração por meio da ativação do tecido epicárdico, neovascularização e proliferação dos cardiomiócitos. Entretanto o mecanismo exato da regeneração ainda não foi elucidado.⁷ Este processo não ocorre com o miocárdio humano, mas suspeita-se de que a matriz de células progenitoras para otimizar a regeneração do miocárdio está presente, porém encontra-se inativada em mamíferos.⁸

O objetivo deste estudo foi promover parâmetros morfoquantitativos referentes à estrutura tecidual cardíaca do *Danio rerio*, servindo como base para estudos posteriores.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Brasília sob protocolo nº 127542/2013. Foram utilizados 10 peixes jovens adultos de 12 semanas de vida da espécie *Danio rerio*, quatro machos e seis fêmeas, oriundos de criatório (Psicultura Tropical Maeda, Brasília/DF, Brasil). Os animais passaram por um período de aclimação de 10 dias em aquários de 26L. O aquário possuía sistema de circulação fechado e temperatura constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ controlada por termostato, equipados com filtro biológico (bactérias), químico (carvão ativado) e mecânico (perlon). O pH era diariamente verificado com o auxílio do kit pH Tropical[®] (LabconTest) e corrigido com o corretivo de pH Alkali (Labcon[®]) caso não estivesse entre 6,8-7,0. Os peixes eram submetidos a um foto-período de 14/10 horas e alimentados duas vezes ao dia com ração em flocos por meio de alimentador automático (Auto Feeder AF-2009D RESUN[®]).

Para eutanasiá-los utilizou-se uma solução aquosa de tricáina metanossulfonato 0,2% em pH=7,0 (Finquel MS-222[®], Argent Laboratories Group[®]), seguida de imersão em água gelada (4°C) por 15 minutos. Em seguida, os peixes foram fixados inteiros em solução aquosa de Dietrich por 24 horas. Utilizou-se a técnica histológica convencional de desidratação crescente em álcool etílico, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados no plano sagital na espessura de 3µm com uso do micrótomo manual (Leica RM 2125RT). De cada peixe foram obtidos em média 10 cortes que foram corados de acordo com a técnica de *Picrosirius Red*.

Com o auxílio de um microscópio óptico (BX51 Olympus[®]) acoplado à câmera fotográfica e ao programa de captura e análise de imagens (ProgRes[®] Capture Pro 2.5) capturou-se imagens (TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) de 15 campos aleatórios de cada fragmento, usando como padrão áreas com as fibras cardíacas longitudinais. Para quantificar os cardiomiócitos, tecido conjuntivo e os tipos de colágeno desprezou-se a área sem tecido e/ou com hemácias e células satélites.

Para quantificar a área ocupada pelos cardiomiócitos utilizou-se o software de análise estereológica STEPanizer[®] (<http://stepanizer.com/>), utilizando 100 pontos na objetiva de 100x, onde cada ponto equivale uma área de 13,2µm², e deste modo obteve-se no final a área média de cada tecido analisado.⁹

As lâminas dos animais foram separadas em grupos: machos e fêmeas juntos (GT), somente machos (GM) e somente fêmeas (GF). Em cada grupo quantificou-se densidade de núcleos de cardiomiócitos, densidade de miocárdio, tecido conjuntivo e fibras de colágeno tipo I e tipo III. Contou-se o número de pontos correspondentes aos núcleos e aos miócitos do átrio e ventrículo, onde a diferença da área média de miocárdio pela área média de tecido conjuntivo equivale à área média de cardiomiócitos (N° cardiomiócitos = área média do miocárdio – área média do tecido conjuntivo).

Utilizou-se microscopia com luz polarizada e o programa de análise de imagem Image-Pro Plus 6 para a diferenciação e cálculo da percentagem do tecido conjuntivo e colágeno tipo I (amarelo ao vermelho) e tipo III (verde) por microscopia polarizada.¹⁰

Submeteu-se os dados inicialmente à estatística descritiva. Aplicou-se, então, o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov seguido pelo teste T e pós-teste de Mann Whitney com o auxílio do programa GraphPad Prism[®]6. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Consideramos significativo $P \leq 0,05$.

Resultados

No tocante ao átrio, este é delgado, possui trabéculas finas, valva atrioventricular, parede muscular e algumas porções mais concentradas de tecido conjuntivo, principalmente nas bordas. O ventrículo possui valva bulboventricular e parede mais espessa que a do átrio, sendo uma camada interna com numerosas trabéculas, onde algumas apresentam tecido conjuntivo, e uma camada externa muscular compacta onde o

tecido conjuntivo é mais facilmente encontrado. O pericárdio circunda o coração e apresenta algumas áreas com pigmentação de melanina (Figura 1).

Quanto ao GT, o átrio apresentou densidade de núcleo de cardiomiócitos $6,0\% \pm 0,41$ e de miocárdio $60,30\% \pm 2,44$, menores que os do ventrículo que apresentou densidade de núcleo de cardiomiócitos $3,84\% \pm 0,20$ e de miocárdio $68,77\% \pm 1,25$ (Figura 2A e 2B). No átrio, o GM apresentou maior densidade de núcleos de cardiomiócitos e miocárdio ($6,93\% \pm 0,51$ e $60,18\% \pm 2,77$, respectivamente) em relação a GF ($6,38 \pm 0,47$ e $53,03 \pm 2,19$, respectivamente) (Figura 2C e 2D). No ventrículo o GM apresentou maior densidade de núcleos de cardiomiócitos e miocárdio ($3,88\% \pm 2,56$ e $69,64\% \pm 2,01$, respectivamente) em relação ao GF ($3,80 \pm 2,45$ e $67,99 \pm 1,55$, respectivamente) (Figura 2E e 2F).

Na quantificação do tecido conjuntivo do GT, o ventrículo apresentou densidade menor ($8,02\% \pm 0,61$) que o átrio ($24,50\% \pm 1,35$), quando comparando as duas câmaras (Figura 3A). O átrio e ventrículo do GM apresentaram maior densidade de tecido conjuntivo ($22,80\% \pm 1,74$ e $13,47\% \pm 1,08$, respectivamente) comparado também ao átrio e ventrículo do GF ($27,96\% \pm 1,97$ e $4,63\% \pm 0,29$, respectivamente), seguindo o mesmo entendimento dos outros parâmetros analisados (Figura 3B e 3C).

Em relação aos tipos de colágeno do GT do átrio e ventrículo juntos, estes apresentaram maior densidade de fibra tipo I ($3,61\% \pm 0,73$) em relação às fibras tipo III ($3,13\% \pm 1,05$) (Figura 4A). Ainda no grupo GT, a densidade de fibras tipo I no átrio foi menor ($4,28\% \pm 1,20$) comparado às fibras do tipo III ($5,68\% \pm 1,90$) (Figura 4B) e a densidade de fibras tipo I no ventrículo foi maior ($3,22\% \pm 0,89$) comparado às fibras do tipo III ($0,14\% \pm 0,05$) (Figura 4C). Quanto ao GM, a densidade total de fibras do tipo I no átrio e ventrículo apresentou-se maior ($7,65\% \pm 2,20$ e $5,33 \pm 2,05$, respectivamente) comparado ao GF ($0,92\% \pm 0,40$ e $2,67 \pm 0,99$, respectivamente) em ambas as câmaras. A densidade de fibras do tipo III do GM no átrio apresentou-se maior ($10,85\% \pm 3,58$) em relação às mesmas do grupo GF ($0,51\% \pm 0,25$) e menor no ventrículo de GM ($0,09\% \pm 0,05$) em relação ao GF ($0,16 \pm 0,06$) (Figuras 4D e 4E).

Quando corrigimos a área total de miocárdio pela diferença da área de tecido conjuntivo obtemos as seguintes áreas de cardiomiócitos/ μm^2 :

Átrio: GT (45,53), GM (46,46) e GF (38,20); e Ventrículo: GT (63,25), GM (60,26) e GF (64,84).

Tabela 1. Dados representados na tabela após o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov no átrio e ventrículo do GT.

PARÂMETROS GT (%)	ÁTRIO	VENTRÍCULO
	Média ± EPM	Média ± EPM
NÚCLEO DE CARDIOMIÓCITO	6,0 ± 0,41	3,84 ± 0,20
MIOCÁRDIO	60,30 ± 2,44	68,77 ± 1,25
TECIDO CONJUNTIVO	24,50 ± 1,35	8,02 ± 0,61
COLÁGENO TIPO I	4,28 ± 1,20	3,22 ± 0,89
COLÁGENO TIPO III	5,68 ± 1,90	0,14 ± 0,05

EPM: Erro-padrão da média; GT: Machos e Fêmeas.

Tabela 2 Dados representados na tabela após o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov no átrio e ventrículo do GM e GT.

PARÂMETROS GM E GF (%)	ÁTRIO	VENTRÍCULO
	Média ± EPM	Média ± EPM
NÚCLEO DE CARDIOMIÓCITO GM	6,93 ± 0,51	3,88 ± 2,56
NÚCLEO DE CARDIOMIÓCITO GF	6,38 ± 0,47	3,80 ± 2,45
MIOCÁRDIO GM	60,18 ± 2,77	69,64 ± 2,01
MIOCÁRDIO GF	53,03 ± 2,19	67,99 ± 1,55
TECIDO CONJUNTIVO GM	22,80 ± 1,74	13,47 ± 1,08
TECIDO CONJUNTIVO GF	27,96 ± 1,97	4,63 ± 0,29
COLÁGENO TIPO I GM	7,65 ± 2,20	5,33 ± 2,05
COLÁGENO TIPO I GF	0,92 ± 0,40	2,67 ± 0,99
COLÁGENO TIPO III GM	10,85 ± 3,58	0,09 ± 0,05
COLÁGENO TIPO III GF	0,51 ± 0,25	0,16 ± 0,06

EPM: Erro-padrão da média; GM: Machos; GF: Fêmeas.

Figura 1- (A) Vista lateral da região cardíaca onde é visualizado o átrio (seta), bulbo (seta segmentada) e ventrículo (asterisco); (B) Trabéculas do ventrículo (setas); (C) Valva atrioventricular (seta) e valva bulboventricular (seta segmentada); e (D) Colágeno tipo I (seta segmentada) e colágeno tipo III (seta). Barra: 50µm. *Picrosirius red*, microscopia de luz (A, B e C) e microscopia polarizada(D).

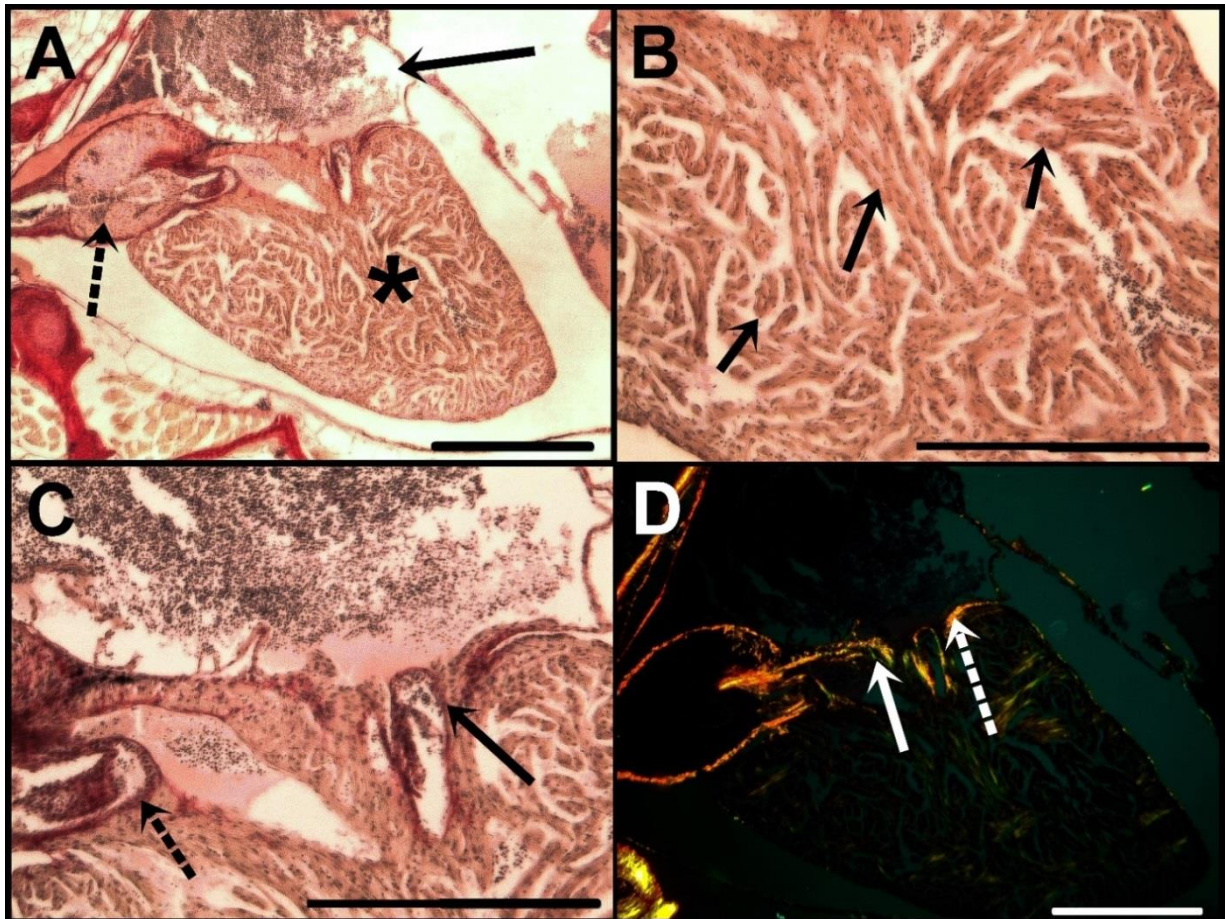


Figura 2- (A) Comparação da densidade do núcleo de cardiomiócitos entre o átrio e ventrículo do GT; (B) Comparação da densidade de miocárdio no átrio e ventrículo do GT; (C) Comparação da densidade de núcleos de cardiomiócitos do átrio entre machos e fêmeas; (D) Comparação da densidade de núcleos de cardiomiócitos do ventrículo entre machos e fêmeas; (E) Comparação da densidade do miocárdio do átrio entre machos e fêmeas; (F) Comparação da densidade do miocárdio do ventrículo entre machos e fêmeas. Representação gráfica da média \pm EPM. $P \leq 0,05$ com aplicação do teste t pareado.

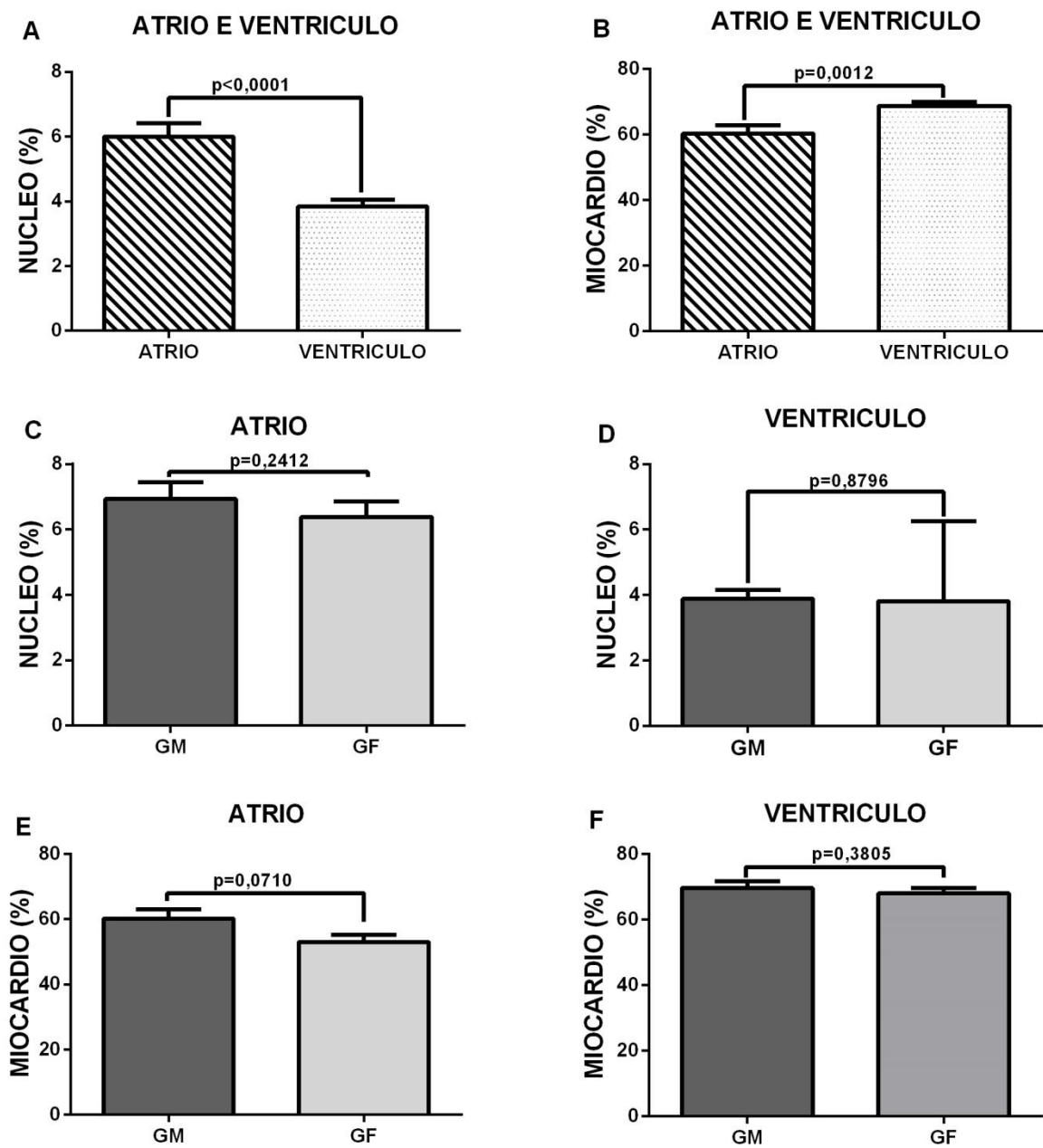


Figura 3- (A) Comparação da densidade de tecido conjuntivo entre o átrio e ventrículo do GT; (B) Comparação da densidade de tecido conjuntivo no átrio entre GM e GF; (C) Comparação da densidade de tecido conjuntivo entre ventrículo de GM e GF. Representação gráfica da média \pm EPM. $P \leq 0,05$ com aplicação do teste t pareado.

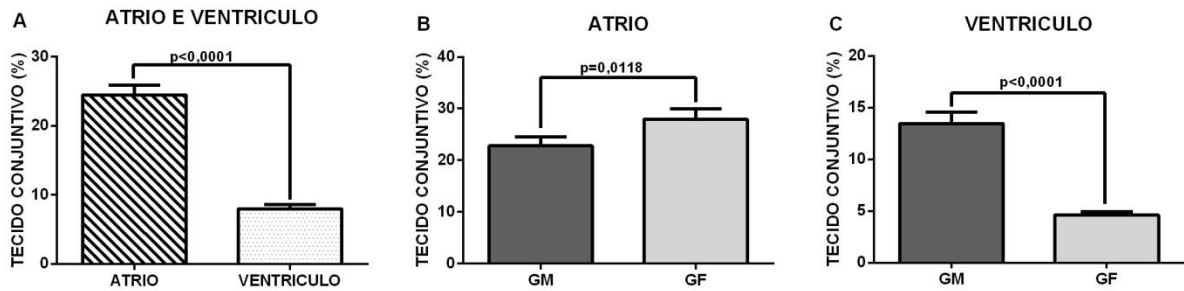
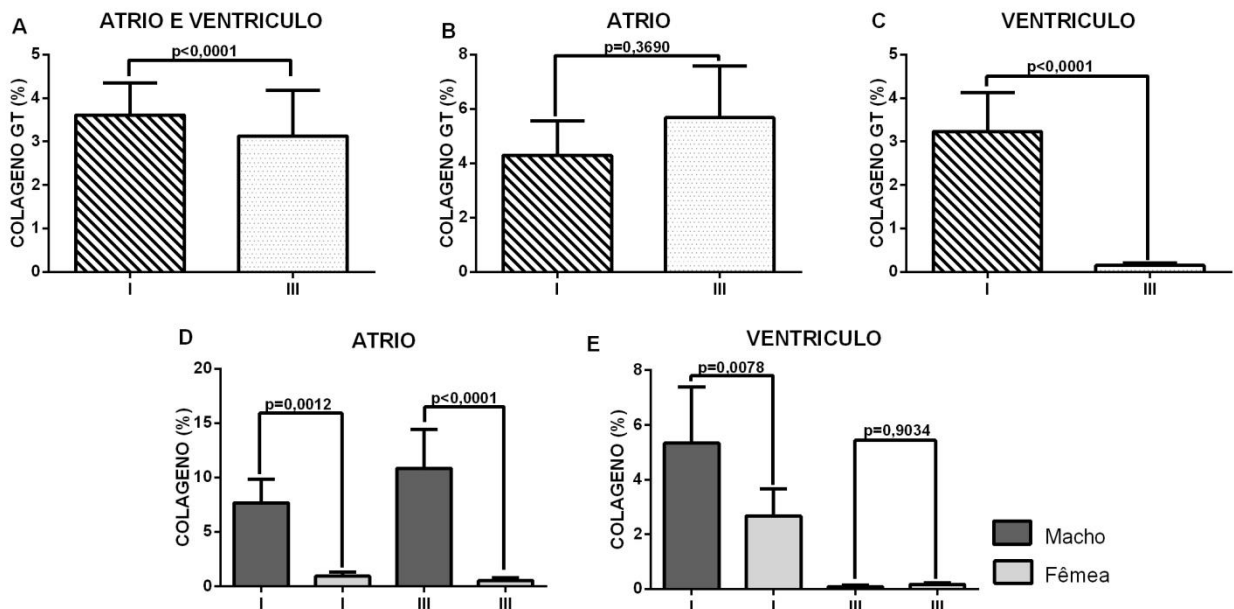


Figura 4- (A) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio e ventrículo do GT; (B) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio do GT; (C) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no ventrículo do GT; (D) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no átrio entre GM e GF; (E) Comparação da densidade de colágeno tipo I e III no ventrículo entre GM e GF. Representação gráfica da média \pm EPM do GT, GM e GF. $P \leq 0,05$ com aplicação do teste t pareado.



Discussão

Apesar de o zebrafish ser amplamente empregado como modelo experimental, seu uso é recente e ainda não apresenta os aspectos morfofuncionais plenamente conhecidos, em especial, aqueles relacionados ao coração. O *zebrafish* tem a capacidade de regenerar o tecido cardíaco, mesmo após extensa perda tecidual,⁴ mas pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesse processo. Com base nessa lacuna do conhecimento acerca da regeneração cardíaca do *zebrafish*, a densidade de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e fibra de colágeno tipo I e tipo III do coração destes animais foi objeto de quantificação nesta investigação.

O *zebrafish* possui cardiomiócitos do ventrículo maiores que do átrio e ocupando mais da metade do volume total da cavidade. Além disso, a maioria dos cardiomiócitos ventriculares apresentam-se de forma arredondada, assim como os de mamíferos, e com um volume de $2,2 \pm 0,2 \text{ pL}$ ¹¹ Estas características são similares a achados em outras espécies de peixes.¹⁰ O padrão geral da descrição e arranjo do cardiomiócitos no *zebrafish* coincide de forma geral com os demais relatos da literatura mencionada, revelando que a principal diferenciação é vista entre as cavidades, o que entendemos ocorrer pela distinta funcionalidade das cavidades.

O ventrículo apresenta um sistema de camadas musculares estratificadas que favorece a eficiência da contratilidade e pressão ventricular.¹¹ Observamos nos animais avaliados a ocorrência de diferença estatística no ventrículo em relação ao átrio devido a sua parede estratificada e camada média espessa, que enfatiza a característica funcional diferenciada das câmaras cardíacas.¹² A densidade deste tecido nas cavidades atrial e ventricular, mesmo demonstrando aspectos funcionais distintos, não apresentou diferença estatística entre machos e fêmeas. Isso sugere que os hormônios gonadais não foram capazes de interferir na densidade dos cardiomiócitos entre as paredes do átrio e do ventrículo, diferentemente de outras espécies onde o estrógeno atua impedindo o remodelamento cardíaco e a apoptose de cardiomiócitos.¹³

Observou-se que machos possuem uma densidade de tecido conjuntivo maior no ventrículo e menor no átrio em relação às fêmeas. Este fato provavelmente está relacionado ao risco de doenças cardíacas, que é menor entre as mulheres em comparação a homens da mesma idade¹⁴, possivelmente por causa da ação protetora do estrógeno que evita a deposição de colágeno no coração.¹⁵ Assim, sugere-se que pode haver um fator diferencial pré-estabelecido pelo sexo.

Os dados quantitativos das fibras de colágeno encontradas nos *zebrafish*, tanto em relação ao átrio, como em relação ao ventrículo são determinantes para a elucidação do seu papel estrutural na ancoragem das camadas de cardiomiócitos, e ainda na sustentação das estruturas vasculares e nervosas. Em peixes o tecido conjuntivo disposto no coração além de responder pela integridade das camadas esponjosa e compacta dos cardiomiócitos, mantém as mesmas juntas¹⁶.

A densidade de fibras colágenas no miocárdio de *zebrafish* é superior à verificada no miocárdio de tilápias.¹⁰ Estudos em enguias da espécie *Anguilla anguilla* L. mostrou-se que o colágeno é capaz de aumentar a rigidez da camada compacta e melhorar a resiliência do órgão, podendo contribuir para melhorar a performance mecânica do coração.¹² De forma diferencial quantificamos no *zebrafish*, por meio da polarização, as médias das densidades dos colágenos tipo I (3,61%) e tipo III (3,13%) no coração. Comparativamente, no homem o colágeno total cardíaco representa cerca de 1-4%¹⁷ e ratos de 2-4%¹⁵ do interstício cardíaco.

A partir dos resultados relativos aos tipos de colágenos, é evidente o predomínio das fibras do tipo I no coração, sendo no ventrículo essa maior predominância. Esta fibra é caracterizada por ser uma estrutura mais rígida e responsável pela força tensional de resistência no tecido. A fibra tipo III, que é mais elástica, responde pela manutenção da função estrutural cardíaca e também de outros órgãos expansíveis. Há a necessidade da diferença na concentração das duas fibras e a manutenção dessa diferença,¹⁸ pois é isto que garante fundamentalmente a manutenção da contratilidade cardíaca. No entanto, apesar do predomínio das fibras do tipo I, é notório que as mesmas demonstrem um papel adicional em conjunto com os demais tecidos presentes no interstício, e não somente respondam pela sua atividade contrátil.

Em relação ao gênero observou-se que a densidade de colágeno foi maior em fêmeas no átrio e maior nos machos no ventrículo, acompanhando o tecido conjuntivo que se comportou da mesma forma. Em um estudo com ratas não histerectomizadas, estas apresentaram uma maior taxa de colágeno cardíaco em comparação as ratas histerectomizadas com reposição hormonal de estrógeno, sugerindo que fêmeas apresentam uma taxa maior de proteção cardíaca devido aos hormônios femininos.¹⁵ O aumento do colágeno tipo I do miocárdio pode também contribuir para a diminuição da elasticidade do ventrículo com a idade, prejudicando o funcionamento normal do miocárdio.¹⁸ Possivelmente o *zebrafish* do sexo feminino tem essa ação protetora dos hormônios gonadais femininos, já que tanto o tecido conjuntivo quanto o colágeno tipo I estão têm concentrações menores no seu ventrículo.

Conclusão

A quantidade de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e colágeno são maiores no ventrículo em relação ao átrio, sendo que o tecido conjuntivo e colágeno tipo I são maiores no ventrículo de machos. Os resultados deste estudo proporcionam a descrição de componentes do coração do *zebrafish* jovem adulto, que servirão de parâmetros para se compreender melhor os mecanismos normais e anormais da morfologia e funcionalidade do coração, embasando posteriormente pesquisas relacionadas.

Fabricantes e marcas registradas

- a. ácido acético glacial Vetec®
- b. álcool etílico 100% ITAJÁ®
- c. alimentador automático Auto Feeder AF-2009D RESUN®
- d. análise de imagem Image-Pro Plus.6.0
- e. análise estereológica STEPanizer® (<http://stepanizer.com/>)
- f. formol 10% Vetec®
- g. GraphPad Prism®6
- h. kit pH Tropical® LabconTest
- i. microscópio óptico (BX51 Olympus®)
- j. micrótomo manual (Leica RM 2125RT)
- k. bomba submersa SB 160V, Sarlo® Better
- l. parafina purificada Vetec®
- m. pH Alcali Labcon®
- n. *Picrosirius Red* INLAB®
- o. ProgRes® Capture Pro 2.5
- p. solução de Dietrich
- q. tricaína metanossulfonato 0,2% Finquel MS-222®, Argent Laboratories Group®
- r. xilol Vetec®

Referências

1. Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagem T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 2004; 25: 1639-1647.
2. Chan J, Marbly JD. Dissection of cardiovascular development and disease pathways in *zebrafish*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2011; 100: 111-145.
3. Zhu JJ, Xua YQ, Hea JH, Yua HP, Huangc CJ, Gaoc JM. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology* 2013; 34: 139-148.
4. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002; 298: 2188-2190.
5. Benedicto G, Bombonato PP. Quantificação de tecido conjuntivo do músculo cardíaco de cães. *Brasilian Journal of veterinary research and animal Science* 2003; 40: 108-116.
6. Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2001; 8: 63-75.
7. Parente V, Balasso S, Pompilio G, Verduci L, Colombo GI, Milano G et al. Hypoxia/Reoxygenation Cardiac Injury and Regeneration in Zebrafish Adult Heart. *Plos one* 2013; 8: 53748.
8. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during *zebrafish* heart regeneration. *Cell* 2006; 127: 607-619.
9. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2003; 75: 469-486.
10. Waldemarin KCA, Alves RN, Beletti ME, Rantin FT, Kalinin AL. Copper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. *Ecotoxicology* 2012; 21: 783-794.
11. Hu N, Yost HJ, Clark EB. Cardiac morphology and blood pressure in the adult *zebrafish*. *The Anatomical Record* 2001; 264: 1-12.
12. Cerra MC, Imbrogno S, Amelio D, Garofalo F, Colvee E, Tota B, et al. Cardiac morphodynamic remodelling in the growing eel (*Anguilla anguilla* L.). *The Journal of Experimental Biology* 2004; 207: 2867-2875.

13. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E. Female sex and estrogen receptor- attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *American Journal Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2010; 298:1597–1606.
14. Vaccarino V, Badimon L, Corti R, de Wit C, Dorobantu M, Hall A, et al. Ischaemic heart disease in women: are there sex differences in pathophysiology and risk factors? *Nature Reviews Cardiology* 2011; 90: 9-17.
15. Cabanelas LA, Carbonel AAF, Santos MA, Simões RS, Liberatori-Filho AW, Baracat EC, et al. Morfologia dos Cardiomiócitos e quantificação do colágeno no miocárdio de ratas tratadas com isoflavonas ou estrogênios. *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*. 2012; 3:447-452.
16. Lafontant PJ, Behzad AR, Brown E, Landry P, Hu N, Burns AR. Cardiac myocyte diversity and a fibroblast network in the junctional region of the zebrafish heart revealed by transmission and serial block-face scanning electron microscopy. *PloS one* 2013; 8: 72388.
17. Bregagnollo IF. Remodelação miocárdica e mecanismos de falência do coração nas sobrecargas pressóricas. *Revista Clínica e Terapêutica* 2006; 32: 68-78.
18. Souza, R. R. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology* 2002; 3: 325-335.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA


O CORAÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) - QUANTIFICAÇÃO DOS TECIDOS CONSTITUINTES

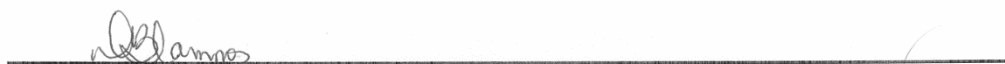
FABIENI TIEMY MENEZES OKYIAMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:


EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA DOUTOR (UNB)


MARCIO BOTELHO DE CASTRO, DOUTOR (UNB)


DANILA BARREIRO CAMPOS, DOUTORA (UFPB)

BRASÍLIA/DF 07 DE OUTUBRO DE 2014

iii

