



**Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do  
*Danio rerio***

**ANDRÉ SANTOS LEONARDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
NOVEMBRO/2015**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do  
*Danio rerio*

ANDRÉ SANTOS LEONARDO

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 114/2015

BRASÍLIA/DF

NOVEMBRO/2015

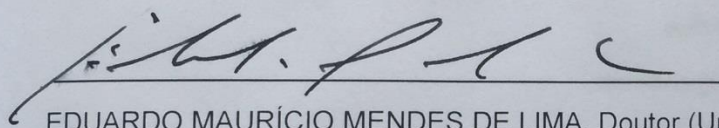
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do *Danio rerio*

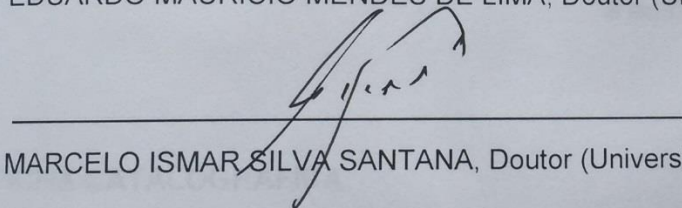
ANDRÉ SANTOS LEONARDO

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

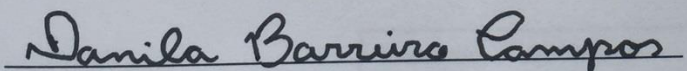
APROVADA POR:



EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, Doutor (Universidade de Brasília)



MARCELO ISMAR SILVA SANTANA, Doutor (Universidade de Brasília)



DANILA BARREIRO CAMPOS, Doutora (Universidade Federal da Paraíba)

BRASÍLIA/DF, 17 de NOVEMBRO de 2015

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

LEONARDO, A.S. Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do *Danio rerio*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 15 p. 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.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Leonardo, André Santos

Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do *Danio rerio*. / André Santos Leonardo; orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima – Brasília, 2015. 15 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M)– Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Coração. 2. Densidade numérica. 3. Densidade volumétrica. 4. Interstício. 5. Tecido conjuntivo. 6. Vasos. I. Leonardo, A. S. II. Título.

INDICE	Páginas
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
METODOLOGIA	4
RESULTADOS	7
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

## Avaliação Temporal dos Componentes Cardíacos do *Danio rerio*

### RESUMO

O *Danio rerio* é amplamente utilizado em estudos relacionados ao coração e por isso torna-se importante o conhecimento a respeito da morfologia desse órgão nestes peixes. Este estudo teve como objetivo avaliar as densidades numérica e volumétrica de cardiomiócitos ( $Nv(c)$  e  $Vv(c)$ , respectivamente), densidade volumétrica de interstício ( $Vv(i)$ ), além das quantidades e distribuições de tecido conjuntivo e vasos no miocárdio em diferentes idades. Para isto, foram analisados 65 peixes, machos e fêmeas, com idades entre 12-18 meses, durante treze semanas. Houve a partir da semana VIII uma diminuição significativa na densidade numérica de cardiomiócitos e na quantidade de vasos, com aumento na quantidade de tecido conjuntivo, além de um aumento significativo na densidade volumétrica de interstício entre as duas primeiras e duas últimas semanas. Comparando os animais da semana I com os da semana XIII, observou-se uma diminuição significativa de 20,7% na densidade numérica de cardiomiócitos e de 13,6% nos vasos, enquanto ocorreu um aumento significativo no conjuntivo de 17,8% e 12% na densidade volumétrica de interstício. Foi verificado que ao longo da idade estudada que não houve alteração significativa na densidade volumétrica de cardiomiócitos. Os resultados deste estudo proporcionam a descrição de componentes do coração do *Danio rerio* ao longo do tempo, estabelecendo parâmetros quantitativos que podem auxiliar no entendimento dos mecanismos morfofuncionais atuantes nesse órgão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Coração, Densidade numérica, Densidade volumétrica, Interstício, Tecido conjuntivo, Vasos.

## ABSTRACT

The zebrafish is widely used in studies related to the heart and therefore becomes important to know about the morphology of this organ in this fish. This study aimed to evaluate the numerical and volumetric densities of cardiomyocytes ( $Nv(c)$  and  $Vv(c)$ , respectively), the volumetric density of interstitium ( $Vv(i)$ ), besides of amounts and distribution of connective tissue and vessels in the myocardium at different ages. Sixty five fishes, males and females, aged 12-18 months were analyzed for thirteen weeks. There was a significant decrease in the numerical density of cardiomyocytes and vessels, with increased amount of connective tissue from week VIII, and a significant increase in volume density of interstitium between the first two and last two weeks. Comparing the animals of week I with the week XIII, there was a significant decrease of 20.7% in the numerical density of cardiomyocytes and 13.6% in the vessels, whereas there was a significant increase of 17.8% in connective tissue and 12% in volume density of interstitium. It was verified that throughout studied age no significant change in the volume density of cardiomyocytes. The results of this study provide a description of the components of the *Danio rerio* heart establishing quantitative parameters that can help understand the morphological and functional mechanisms that operate in this organ.

**KEY WORDS:** Connective tissue, Heart, Interstitium, Numerical density, Vessels, Volumetric density.

## INTRODUÇÃO

O *Danio rerio*, também conhecido como zebrafish ou palstinha, é um pequeno peixe tropical pertencente à ordem *Teleostei*. O coração dos teleósteos apresenta variabilidade considerável entre as espécies em relação à morfologia, histologia e vascularização do coração (HU et al., 2000). O desenvolvimento cardíaco destes peixes é semelhante ao de mamíferos e anfíbios, embora não progrida para a septação (SEDMERA et al., 2000).

O *Danio rerio* ganhou espaço rapidamente em estudos sobre os mais variados aspectos do coração devido às suas inúmeras vantagens como modelo experimental combinadas com as técnicas de análise e manipulação genética que permitiram o estudo de diferentes mecanismos do desenvolvimento, da regeneração e de doenças de uma maneira mais rápida e econômica do que as demais espécies de peixes estudadas (CHICO, INGHAMA e CROSSMAN, 2008).

Apesar do coração destes peixes ser um órgão com apenas duas câmaras, a sua eletrofisiologia se assemelha a do coração de mamíferos em muitos aspectos, principalmente em relação aos potenciais de ação (NEMTSAS et al., 2010). Devido a esta semelhança, pela capacidade de regeneração cardíaca e por ser possível reproduzir no *Danio rerio* as principais formas de cardiomiopatias (POON e BRAND, 2013), este peixe foi adotado como um modelo para estudos relacionados a esse órgão, tornando importante o conhecimento a respeito de sua morfologia.

Este estudo teve como objetivo descrever os componentes do coração do *Danio rerio* ao longo de 13 semanas através da análise das densidades numérica (Nv(c)) e volumétrica (Vv(c)) de cardiomiócitos, densidade volumétrica do interstício (Vv(i)) e das quantidades e distribuição de tecido conjuntivo e vasos, estabelecendo parâmetros quantitativos que possibilitarão nortear uma melhor compreensão dos mecanismos morfofuncionais que atuam na estrutura desse órgão.



## METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Brasília sob protocolo n° 127542/2013.

Sessenta e cinco peixes da espécie *Danio rerio*, 35 fêmeas e 30 machos, adultos, com aproximadamente 12-18 meses de idade, pesando  $0,4 \pm 0,2$  gramas no início do experimento participaram deste estudo. Os animais passaram por um período de aclimatização e quarentena, totalizando 60 dias, em um aquário de 19 L. Posteriormente, foram divididos randomicamente em dois grupos e colocados em dois aquários de 14 L, mantendo-se a densidade populacional de 10 peixes por litro.

Durante os períodos de aclimatização, de quarentena e do experimento, os animais foram submetidos a um ciclo de 14 horas luz: 10 horas escuro, alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos (Alcon Basic<sup>®</sup>) e criados em aquários com sistema de circulação fechada, à temperatura constante de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  controlada por um termostato (Atman<sup>®</sup>) e verificada com auxílio de um termômetro (Aquadene<sup>®</sup>). A água circulava continuamente pelos aquários com auxílio de uma bomba (S300, SARLO Better), passando através de um filtro de PVC contendo perlón, carvão ativado e tubos de cerâmica para as filtragens mecânica, biológica e química, respectivamente. A manutenção dos aquários foi realizada através da troca semanal de 10% da água e a limpeza destes e dos filtros realizada manualmente.

A qualidade da água foi testada diariamente para pH = 6,8-7,0 (pH Tropical, LabconTest), semanalmente para amônia = 0 ppm (Amônia Tóxica, LabconTest) e mensalmente para oxigênio dissolvido = 6-8 mg/L (O<sub>2</sub> Dissolvido, LabconTest). Quando necessário, os parâmetros foram corrigidos utilizando o corretivo de pH Discus Buffer (Seachem) e o removedor de amônia Am Guard (Seachem). Os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos com auxílio de uma bomba para oxigenação (SARLO Better Mini).

O experimento teve duração de treze semanas levando em consideração a idade dos animais no final do experimento- entre 16 e 22 meses, o que corresponde ao início da idade senil e a aproximadamente 48% da expectativa de vida média destes animais em laboratório (GILBERT,

ZERULLA e TIERNEY, 2014). A eutanásia foi realizada semanalmente, com os animais tendo entre 12-18 meses na primeira eutanásia, através da imersão em solução aquosa de 3-etil-aminobenzoato 0,2% (Sigma-Aldrich Chemistry), seguida de imersão em água gelada (4°C) por 15 minutos (GUPTA e MULLINS, 2010), sendo cinco peixes eutanasiados semanalmente.

Em seguida, os peixes foram pesados e fixados inteiros em solução aquosa de Dietrich por 48 horas, conforme o recomendado pelo *Zebrafish International Resource Center (ZIRC)*. 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) e os cortes obtidos de cada animal foram corados com *Picrosirius red* e HE.

Imagens de 21 campos aleatórios de cada fragmento foram capturadas (TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) com o auxílio de um microscópio óptico (BX51 Olympus®) acoplado à câmera fotográfica (Moticam 3, Motic®) e ao programa de captura e análise de imagens (Motic Image Plus 2.0) para determinar as densidades volumétricas de cardiomiócitos ( $Vv_{(c)}$ ) e do interstício ( $Vv_{(i)}$ ), a densidade numérica de cardiomiócitos ( $Nv_{(c)}$ ) e as quantidades e distribuições do tecido conjuntivo e vasos no órgão.

As densidades volumétricas foram determinadas por contagem dos pontos que tocavam os cardiomiócitos ou o interstício cardíaco de acordo com a fórmula:

$$Vv[\text{estrutura}] = \frac{P[\text{estrutura}]}{Pt},$$

sendo  $P[\text{estrutura}]$  os pontos que tocavam os cardiomiócitos ou o interstício e  $Pt$  o número total de pontos da área teste (BRÜEL, 2010). A densidade numérica de cardiomiócitos foi calculada segundo a fórmula  $Nv[\text{cardiomiócito}] = \bar{Q}_A / \text{disector}$ , onde  $\bar{Q}_A$  corresponde a quantidade de núcleos vistos no plano superior do corte e disector é o volume-teste obtido multiplicando-se a espessura do corte pela área do sistema-teste (BRÜEL, 2010).

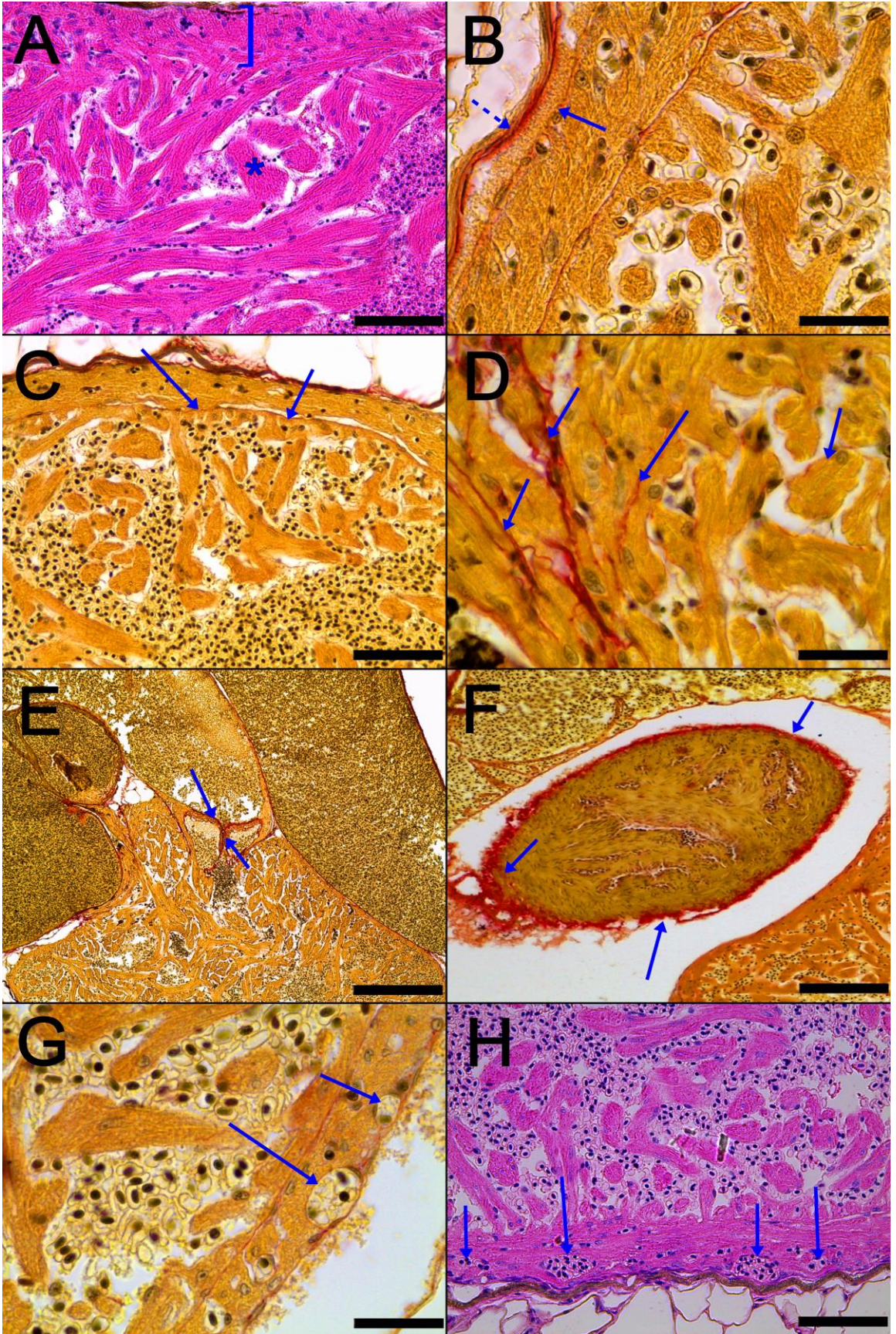
Para quantificar as densidades numéricas e volumétricas utilizou-se o software de análise estereológica STEPanizer® (<http://stepnizer.com/>). No cálculo das densidades volumétricas foram

utilizados 100 pontos na objetiva de 40x, onde cada ponto equivale uma área de  $16\mu\text{m}^2$ , gerando uma área total de  $1600\mu\text{m}^2$ . Esta mesma área total foi utilizada no cálculo da densidade numérica. Para a quantificação do tecido conjuntivo foi empregado programa de análise de imagem Image- Pro Plus 6.0<sup>®</sup> e os vasos foram quantificados por contagem de campo.

Os dados obtidos foram submetidos inicialmente à estatística descritiva para a obtenção da média e erro-padrão da média. Em seguida foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, *one-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis, Holm Sidak ou Dunn, de acordo com o resultado obtido no teste de normalidade, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>6, sendo considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

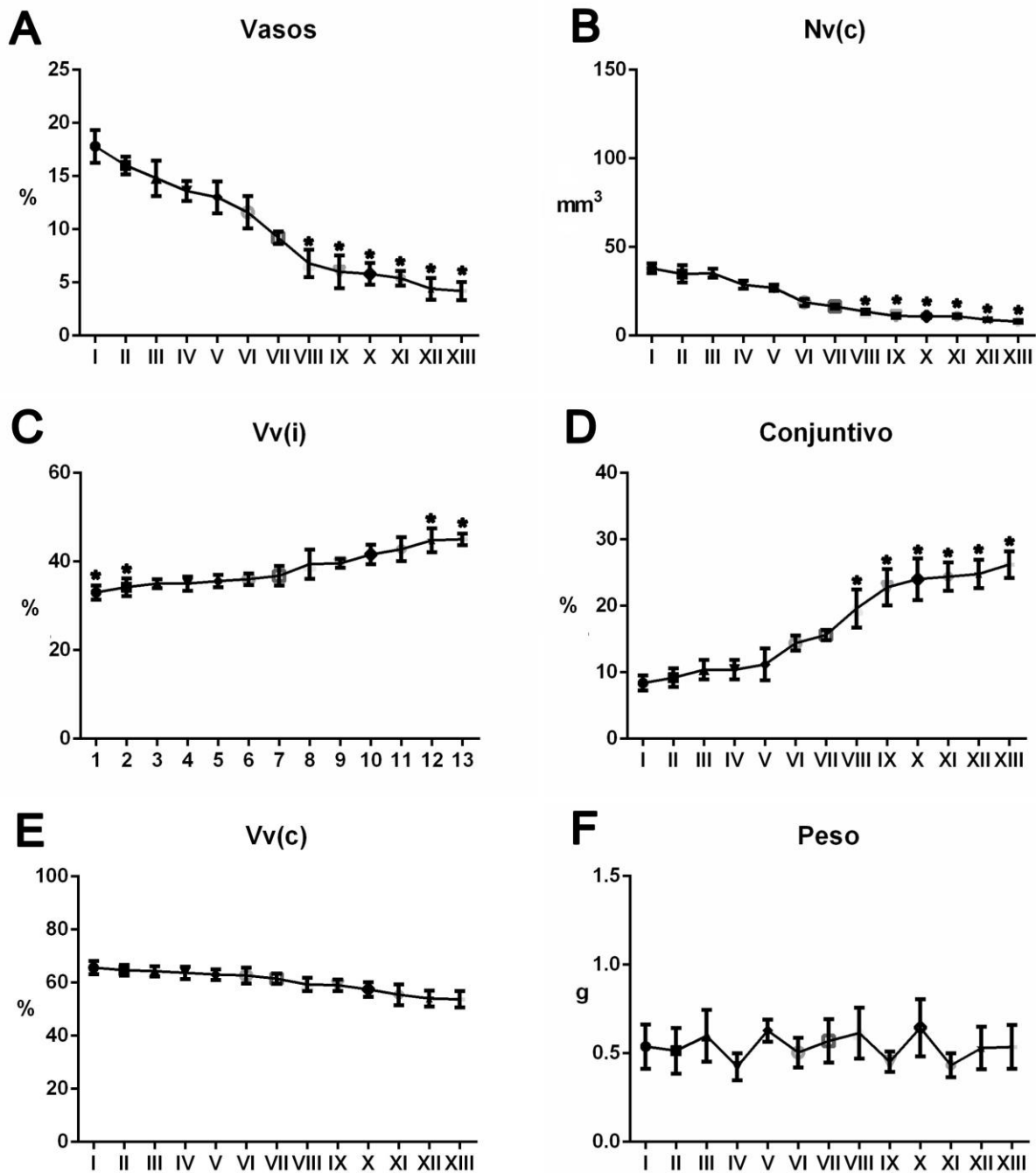
## RESULTADOS

O miocárdio apresentou uma camada externa de cardiomiócitos, com espessura variável, envolvendo uma camada mais interna que foi caracterizada por um arranjo trabecular que abrangia todo o lúmen do ventrículo (**Figura 1-A**). O tecido conjuntivo foi encontrado no pericárdio (**Figura 1-B**), entre as camadas interna e externa (**Figura 1-C**), envolvendo os cardiomiócitos (**Figura 1-D**), na valva atrioventricular (**Figura 1-E**), no bulbo arterial (**Figura 1-F**) e ao redor dos vasos (**Figura 1-G**), que foram encontrados apenas na camada mais externa do miocárdio (**Figura 1-H**).



**Figura 1.** Disposição dos tecidos constituintes e estruturas adjacentes do miocárdio do *Danio rerio*. **A.** Camadas externa (colchete) e interna (asterisco) do miocárdio; Semana III, HE, barra: 25  $\mu\text{m}$ . **B.** Lâminas visceral (seta) e parietal (seta tracejada) do pericárdio; Semana VII, *Picrosirius red*, barra: 25  $\mu\text{m}$ . **C.** Lâmina de tecido conjuntivo (setas) separando as camadas do miocárdio; Semana XI, *Picrosirius red*, barra: 25  $\mu\text{m}$ . **D.** Tecido conjuntivo envolvendo os cardiomiócitos (setas), Semana XII, *Picrosirius red*, barra: 25  $\mu\text{m}$ . **E.** Tecido conjuntivo nas válvulas da valva atrioventricular; Semana VI, *Picrosirius red*, barra: 50  $\mu\text{m}$ . **F.** Tecido conjuntivo no bulbo arterial; Semana VIII, *Picrosirius red*, barra: 50  $\mu\text{m}$ . **G.** Tecido conjuntivo ao redor dos vasos, Semana VI, *Picrosirius red*, barra: 25  $\mu\text{m}$ . **H.** Vasos presentes somente na camada externa do miocárdio; Semana XIII, HE, barra: 50  $\mu\text{m}$

A análise dos componentes do miocárdio do *Danio rerio* durante as trezes semanas de estudo demonstrou que houve uma diminuição na quantidade de vasos (**Figura 2-A**) e na  $Nv_{(c)}$  (**Figura 2-B**) e um aumento na  $Vv_{(i)}$  (**Figura 2-C**) e na quantidade de tecido conjuntivo (**Figura 2-D**). Não houve diferença estatística entre as semanas em relação a  $Vv_{(c)}$  (**Figura 2-E**) e ao peso (**Figura 2-F**). Diferença estatística foi encontrada ao analisar a  $Nv_{(c)}$ , o tecido conjuntivo e os vasos a partir da semana VIII de experimento e entre as duas primeiras semanas quando comparadas com as duas últimas semanas ao analisar a  $Vv_{(i)}$ .



**Figura 2.** Avaliação temporal dos componentes do miocárdio do *Danio rerio*. Valores representados como média  $\pm$  erro-padrão da média. Testes estatísticos realizados com ANOVA ou Kruskal-Wallis, Holm Sidak ou Dunn,  $p \leq 0,05$  (asterisco). Nv<sub>(c)</sub>- Densidade numérica de cardiomiócitos, Vv<sub>(i)</sub>- Densidade volumétrica de interstício, Vv<sub>(c)</sub>- Densidade volumétrica de cardiomiócitos.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, as camadas interna e externa do miocárdio foram facilmente distinguíveis, estando justapostas uma à outra, separadas por uma fina camada de tecido conjuntivo. As fibras musculares na camada externa estavam densamente organizadas, enquanto na camada interna encontravam-se dispostas em redes entrelaçadas, formando um arranjo trabecular. Disposição anatômica semelhante a encontrada no coração do *Danio rerio* esteve presente em outros peixes teleósteos (ICARDO et al.,2005), em répteis como os lagartos Teiú (*Tupinambis merianae*) (SILVEIRA et al.,2013) e durante os primeiros estágios de desenvolvimento dos corações de aves e mamíferos (SEDMERA et al., 2000).

A saúde do sistema cardiovascular é vital para a integridade de cada tecido e longevidade do organismo como um todo. Com o passar do tempo, o coração passa por complexas alterações que modificam a sua composição celular e que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LAKATTA e LEVY, 2003). O conhecimento destas alterações possibilita uma melhor compreensão de processos patológicos como a aterosclerose, a hipertensão e a hipertrofia cardíaca, sendo estas amplamente estudadas, inclusive no *Danio rerio* (HU et al., 2000; POON e BRAND, 2013).

O tecido conjuntivo foi encontrado principalmente no pericárdio, nas regiões próximas ao bulbo arterial e a valva atrioventricular e envolvendo os cardiomiócitos, aumentando gradativamente a sua quantidade ao longo das semanas, havendo diferença estatística a partir da semana VIII, quando os animais estavam com idades entre 14 e 20 meses. Alterações na distribuição e proporção do tecido conjuntivo podem provocar distúrbios mecânicos e elétricos no coração, comprometendo o funcionamento deste órgão, por isso se torna importante o conhecimento sobre o comportamento e distribuição deste tecido ao longo do tempo (NORTH e SINCLAIR, 2012).

Os vasos foram encontrados apenas na camada mais externa do miocárdio, diminuindo a sua quantidade ao longo do tempo de modo significativo a partir da semana VIII, quando os animais estavam com idades entre 14 e 20 meses. Este tipo de arranjo correspondeu a classificação do coração pertencente ao tipo II que é caracterizado por apresentar uma fina camada de tecido conjuntivo entre as camadas externa e interna do miocárdio e vasos apenas na camada externa (GRIMES e KIRBY,2009).



Comparando os animais da semana I com os da semana XIII, observou-se uma diminuição significativa de 20,7% na  $Nv_{(c)}$  e de 13,6% nos vasos e um aumento significativo no conjuntivo de 17,8% e de 12% na  $Vv_{(i)}$ . É importante ressaltar que, ao final do estudo, os peixes estavam com idades entre 16 e 22 meses, o que corresponde ao início da idade senil (GILBERT, ZERULLA e TIERNEY, 2014), havendo uma substituição morfofuncional dos cardiomiócitos por tecido conjuntivo devido a complacência cardíaca, e que não desenvolvem doenças cardiovasculares análogas às observadas em outras espécies (CHICO, INGHAMA e CROSSMAN, 2008).

## CONCLUSÃO

Ao longo das semanas houve diminuição na  $Nv_{(c)}$  e nos vasos, com concomitante aumento no conjuntivo de maneira significativa a partir da semana VIII, além de um aumento significativo na  $Vv_{(i)}$  entre as duas primeiras e duas últimas semanas. Os resultados deste estudo proporcionam a descrição de componentes do coração do *Danio rerio* ao longo do tempo através do estabelecimento de parâmetros quantitativos que servirão para se compreender melhor os mecanismos morfofuncionais que atuam-na estrutura do coração.

## REFERÊNCIAS

BRÜEL, ANNEMARIE. Stereological challenges when working with heart muscle fibres. **Image Analysis & Stereology**, 29(1), 35-43, 2010.

CHICO, T.J.A.; INGHAMA, P.W.; CROSSMAN, D.C. Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 18(4), 150–155, 2008.

GILBERT, M.J.; ZERULLA, T.C.; TIERNEY, K.B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: Physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**, 50, 106–113, 2014.

GRIMES, A.C.; KIRBY, M.L. The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. **Journal of Fish Biology**, 74, 983–1036, 2009.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, 37, e.1717, 2010.

HU, N.; SEDMERA, D.; YOST, H.J.; CLARK, E.B. Structure and function of the developing zebrafish heart. **The Anatomical Records**, 260, 148-157, 2000.

ICARDO, J. M.; IMBROGNO, S.; GATTUSO, A.; COLVEE, E.; TOTA, B. The heart of *Sparus auratus*: a reappraisal of cardiac functional morphology in teleosts. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, 303A (8): 665–675, 2005.

LAKATTA, E.G.; LEVY, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises, part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. **Circulation**, 107, 139–146, 2003.

NEMTSAS, P.; WETTWER, E.; CHRIST, T.; WEIDINGER, G.; RAVENS, U. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 48(1), 161-171, 2010.

NORTH, B.J.; SINCLAIR, D.A. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circulation Research**, 110, 1097-1108, 2012

POON, K.L.; BRAND, T. The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. **Global Cardiology Science & Practice**, 4, 1-20, 2013.

SEDMERA, D.; PEXIEDER, T.; VUILLEMIN, M.; THOMPSON, R. P.; ANDERSON, R. H. Developmental patterning of the myocardium **The Anatomical. Records**, 258, 319–337, 2000.

SILVEIRA, L.C.; NASCIMENTO, L.F.; COLQUHOUN, A.; ABE, A.S.; SOUZA, S.C. Cardiac hypertrophy and structural and metabolic remodeling related to seasonal dormancy in the first annual cycle in tegu lizards. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 165(3), 371–380, 2013.