

# CONIC·SEMESP

14º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** INFARTO DO MIOCÁRDIO INDUZIDO POR EXTRATO DA PLANTA TETRAPTERYS MULTIGLANDULOSA (CIPÓ-FERRO) EM RATOS WISTAR: ANÁLISE EXPERIMENTAL

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** MEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE ANHANGUERA - UNIDERP

**AUTOR(ES):** FERNANDA ALMEIDA ANDRADE

**ORIENTADOR(ES):** DOROTY MESQUITA DOURADO, LUIZ ALBERTO OVANDO

**COLABORADOR(ES):** JOSÉ FÁBIO ALMIRO DA SILVA, KARIN VIRGÍNIA KUIBIDA, ROSEMARY MATIAS

Realização:



Apoio:



## Resumo

A principal causa de mortalidade e incapacidade no Brasil e no mundo são decorrentes de doenças cardiovasculares. Há vários estudos que buscam drogas protetoras efetivas sobre a lesão miocárdica que advém do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), e então há grande importância neste modelo experimental que é uma alternativa dentre os mais utilizados, e visa obter o IAM através da administração de *Tetrapteryx multiglandulosa* em ratos. Este projeto objetiva avaliar e colaborar para a validação deste método de infarto miocárdico induzido por *Tetrapteryx multiglandulosa* através das análises dos parâmetros histopatológicos; visto que há poucos relatos na literatura nacional. Foram utilizados dez ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), jovens, machos, pesando entre 200 e 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas, tratados com alimentação balanceada Nuvital e água *ad libitum* antes e durante todo o período experimental. Alocaram-se os animais alternadamente em dois grupos (n=5): grupo Controle, submetido à falsa indução de infarto do miocárdio; e grupo Infarto, com a dosagem de 125 mg/kg/dia de extrato aquoso de *Tetrapteryx multiglandulosa* durante três dias consecutivos. Após a última aplicação, aguardou-se 24 horas para que os ratos de todos os grupos fossem submetidos à eutanásia, para realização de coleta de sangue para e coleta de fragmento do miocárdio para exame histopatológico. Os resultados foram claros, não foram observadas alterações no grupo Controle; já no grupo Infarto, notaram-se alterações de classificação leve, a qual apresenta dano miócito focal com ligeiro grau de processo inflamatório e moderado processo inflamatório difuso.

**Palavras-chave** - Infarto do miocárdio. *Tetrapteryx multiglandulosa*. Ratos Wistar.

## Introdução

De acordo com os dados do DATASUS do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares representam as principais causas de morte no Brasil, e foram responsáveis por 29% dos óbitos em 2009. Comparando estas às neoplasias, as doenças cardiovasculares apresentaram praticamente o dobro da mortalidade geral.

No Brasil, a despeito da condição de país em desenvolvimento, apresenta progressiva redução das doenças infecciosas e degenerativas com acentuação

das doenças cardiovasculares correlacionadas ao aumento da expectativa de vida aliado à ingestão de dietas ricas em gorduras saturadas, hábito de vida sedentário e tabagismo (AVEZUM et al, 2005).

A injúria miocárdica é mais comumente causada por redução da oferta ou aumento da demanda miocárdica de oxigênio, os quais são superpostos a uma placa coronariana aterosclerótica com graus variados de obstrução e causam danos morfológicos, bioquímicos e funcionais. Há basicamente quatro processos patológicos que podem contribuir para esta injúria, e pode haver o envolvimento de mais de um: (1) ruptura ou erosão da placa com trombo não-oclusivo associado – causa mais comum; (2) obstrução dinâmica – p.ex., espasmo coronariano; (3) obstrução mecânica progressiva; e (4) Angina Instável secundária por aumento da demanda e/ou redução da oferta de oxigênio (FAUCY et al, 2008; SCHOEN, 2005).

Devido ao grande déficit de perfusão de sangue oxigenado, há o desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico com conseqüente redução da produção de ATP, ocorrendo, então, a principal conseqüência bioquímica da isquemia miocárdica: a cessação da glicólise aeróbica; o que leva à produção inadequada de fosfatos de alta energia – fosfato de creatina e fosfato de adenosina, além do acúmulo de produtos de degradação com potencial nocivo, como o ácido láctico. Fatos que corroboram para as inúmeras alterações ultra-celulares, como os distúrbios da homeostase iônica celular, o relaxamento miofibrilar, a depleção de glicogênio e a tumefação mitocondrial e celular (SCHOEN, 2005; DE GROOT e RAUEN, 2007).

ZORNOFF et al (2008), relatou que uma das estratégias mais utilizadas para o estudo das alterações fisiopatológicas que advém das doenças obstrutivas coronarianas é o uso do modelo do infarto experimental em ratos. O que é justificado, principalmente, pela grande similaridade entre as alterações histopatológicas do infarto induzido e o IAM humano.

Os modelos experimentais de indução de IAM em ratos na literatura abordam o modelo da ligadura coronariana e o modelo de lesão miocárdica induzida pelo isoproterenol; o primeiro trata-se de um método mais complexo e invasivo, com pontos negativos como: maior incidência de morbimortalidade não relacionada ao IAM (ZORNOFF et al, 2008). O segundo modelo não é invasivo e tem o intuito de avaliar os efeitos da droga no contexto da injúria miocárdica, vem demonstrando

praticidade e eficácia (BLOOM e DAVIS, 1972; LOBO FILHO et al, 2011). Neste trabalho foi utilizada a técnica de um modelo de lesão miocárdica induzido por isoproterenol, no entanto, a indução do IAM será por meio da técnica de gavagem com o extrato aquoso da planta *Tetrapteryx multiglandulosa*.

A espécie *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) é uma planta conhecida por causar toxicidade cardiotônica em bovinos. Ocorre principalmente na região Sudeste do Brasil e é conhecida pelos nomes populares de “cipó-vermelho” e “cipó-ferro” (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). Apesar de sua ocorrência predominante na região Sudeste, recentemente, pela primeira vez, em Mato Grosso do Sul foi relatado casos de intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (CARVALHO et al., 2006).

As substâncias presentes na família, como os alcaloides e glicosídeos cardiotônicos, entre outros metabólitos secundários (MELO; DANTAS-BARROS, 1999), podem interferir na ação ou no desenvolvimento de diversos fungos que atacam as plantações.

Como foi abordado, a mortalidade e os gastos hospitalares devido às doenças cardiovasculares são de grandes proporções, ultrapassando as temidas neoplasias. Visto que para os estudos de novos fármacos que visem o tratamento e até mesmo a prevenção dessas enfermidades cardiovasculares, mais especificamente, o IAM, há a necessidade de pesquisas iniciais em animais, e para isso, deve-se induzir o infarto.

## **Objetivos**

Objetivo principal:

Avaliar o método de infarto miocárdico induzido pela planta *Tetrapteryx multiglandulosa* através das análises dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos e clínicos.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar os efeitos cardiotóxicos do extrato aquoso da planta tóxica *Tetrapteryx multiglandulosa* no coração de ratos.
- 2) Verificar através da coleta de material morfológico as alterações histopatológicas provocadas pelas diferentes dosagens do extrato da planta *Tetrapteryx multiglandulosa*.

## **Metodologia**

### *Planta*

Amostras da espécie botânica de *Tetrapteryx multiglandulosa*, foram coletadas na região de Bataguassu-MS, para sua coleta, utilizou-se: pá, saco virgem e tesoura de poda. As plantas foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi®). Em seguida essas foram trituradas, tamisadas e armazenadas em frascos para realização de testes. As folhas de *Tetrapteryx multiglandulosa*, foram submetidas à extração por ultrassom digital (Cleaner®), seguido por maceração. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo (Tecnal, Modelo MA120), obtendo-se o extrato bruto.

### *Animais*

Foram utilizados 10 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, pesando entre 200-300 gramas, os quais foram alocados em gaiolas, tratados com alimentação balanceada Nuvital e água *ad libitum*. Os ratos foram divididos em dois grupos (n=5): G1: grupo Controle, com uso de solução salina; G2: grupo Infarto, com uso da dosagem de 125mg/kg/dia do extrato aquoso de *Tetrapteryx multiglandulosa* por três dias consecutivos.

### *Indução do Infarto*

Foi preparada uma solução de 25 mg/mL, a qual foi administrada por gavagem, conhecida também como “alimentação forçada”. A dose utilizada foi de 125 mg/kg/dia do extrato aquoso de *Tetrapteryx multiglandulosa*. Esta escolha foi baseada no estudo de Banerjee et al (2002) que avaliou o efeito de doses de 125, 250 e 500 mg/kg de alho em coração de ratos com injúria isquêmica por reperfusão. Optou-se pelo uso de 125 mg/kg por representar a menor dose avaliada capaz de apresentar efeito sobre o perfil de peroxidação lipídica e antioxidantes endógenos. Após a aplicação, os animais foram observados durante os períodos: 0 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 180 minutos, visando à avaliação clínica.

### *Eutanásia*

Um dia (24 horas) após a última aplicação, os animais foram anestesiados para realização da eutanásia. A técnica anestésica envolveu o uso de Ketamina na dose de 50 mg/kg do animal e xilasina na dose de 10 mg/kg do animal, administradas via intraperitoneal (CCAC, 1984).

#### *Obtenção das amostras*

Após eutanásia, foi realizada uma incisão em T invertido estendendo-se do pescoço ao púbis na região abdominal, segundo SLATTER (2003) E BOJRAB (2005). Para coleta de sangue, localizou-se o retroperitônio, onde foi dissecada a aorta abdominal, realizou-se por meio de uma punção com seringa descartável de 5 ml. Então, realizou-se imediatamente a abertura torácica e à retirada do coração; o qual foi lavado em solução salina, e posteriormente colocado em um frasco, com a identificação correta, contendo Formol Tamponado a 10% por 24 h.

#### *Avaliação histopatológica*

Os corações, previamente fixados em Formol Tamponado a 10%, foram submetidos aos cortes histológicos para melhor análise e, em seguida, processados em concentrações crescentes de álcool (álcool 70, 80, 95, 100 I, 100II, 100III, 100IV%, Xilol I e II) e embebidos em parafina. Cortes medindo 5 µm foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e observados microscopicamente.

### **Desenvolvimento**

#### *Subitem 1 – Preparação do extrato bruto*

As plantas foram colhidas no de ano de 2013 na região de Bataguassu-MS. As plantas foram secas em estufa de circulação de ar, e posteriormente, separaram-se apenas suas partes aéreas, das quais, utilizaram-se as folhas jovens para a preparação do extrato bruto. Aproximadamente 50g das folhas foram submetidas à extração em banho de ultrassom digital por 60 minutos seguido de maceração, à temperatura ambiente, conforme descrito na metodologia.

#### *Subitem 2 – Indução do Infarto*

Inicialmente preparou-se uma solução de 25 mg/mL baseada na dose de 125mg/Kg/dia do extrato aquoso de *Tetrapteryx multiglandulosa*. A solução foi

preparada diariamente para que a mesma não perdesse propriedades essenciais. Os animais foram pesados, e a partir destes dados, iniciou-se o procedimento pela técnica de gavagem com uso de equipamentos específicos (seringa de 5 ml e agulha para gavagem), como pode-se observar na Figura 1:



Figura 1 - Modelo animal para técnica de gavagem.

A aplicação foi realizada no mesmo horário por três dias consecutivos. Após a aplicação, os animais foram observados diariamente durante os períodos: 0 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 180 minutos, visando à avaliação clínica, onde se notou diferenças entre os dois grupos, principalmente nos primeiros 30 minutos.

### *Subitem 3 – Obtenção das amostras*

Um dia após a última aplicação do extrato aquoso, foi realizada a eutanásia com a combinação dos anestésicos (ketamina e xilazina) calculada de acordo com o peso de cada animal. Os valores podem ser observados na Tabela 1:

Tabela 1: Peso dos animais (gramas).

		INICIAL	EUTANÁSIA
Grupo Controle (GC)	Rato 1	205g	200g
	Rato 2	200g	195g
	Rato 3	210g	210g
	Rato 4	215g	200g
	Rato 5	220g	210g
Grupo Infarto (GI)	Rato 6	205g	170g
	Rato 7	220g	185g
	Rato 8	205g	175g
	Rato 9	210g	185g
	Rato 10	200g	195g

Para obtenção das amostras, foi realizada uma incisão em T invertido estendendo-se do pescoço ao púbis na região abdominal, conforme a Figura 2:

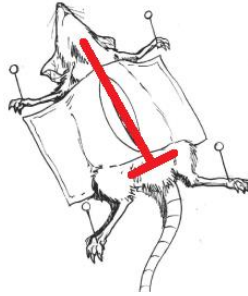


Figura 2 – Técnica cirúrgica para incisão em ratos.

Para coleta de sangue, localizou-se a aorta abdominal em sua porção infra-renal no retroperitônio, onde se coletou por meio de uma punção com o uso de uma seringa descartável de 5 ml. Colhidos 5 ml de sangue, 2 ml foram armazenados em um tubo específico com EDTA (cor: roxo) para realização do hemograma completo e o restante (3 ml) em outro tubo (cor: vermelha) para serem realizadas as dosagens bioquímicas (TGO, TGP, CK MB, creatinina e uréia). Os tubos foram identificados corretamente e colocados em um isopor com gelo.

Após a coleta do sangue, realizou-se imediatamente a abertura torácica e à retirada do coração; o qual foi lavado em solução salina, e em seguida foi verificado seu peso e medidas do diâmetro longitudinal e transversal, ambas com o uso de balança digital e paquímetro digital, respectivamente. Pode se observar o esquema da Figura 3 e os valores obtidos na Tabela 2. Posteriormente, foi colocado em um frasco, com a identificação correta, contendo o fixador Formol Tamponado a 10% por 24 h.

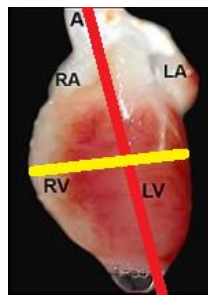


Figura 3 – Coração de rato. Linha vermelha: maior diâmetro longitudinal. Linha amarela: maior diâmetro transversal. Siglas: Aorta (A), Átrio direito (RA), Ventrículo direito (RV), Átrio esquerdo (LA) e Ventrículo esquerdo (LV).

Tabela 2: Pesagem e Diâmetro longitudinal (L) e transversal (T).

		PESO	L	T
<b>Grupo Controle (GC)</b>	<b>Rato 1</b>	0,882g	10,5mm	10mm
	<b>Rato 2</b>	1,074g	10,4mm	10mm
	<b>Rato 3</b>	0,725g	10,1mm	10mm
	<b>Rato 4</b>	0,987g	10,3mm	10,1mm



	<b>Rato 5</b>	1,050g	10,5mm	10,2mm
	<b>Rato 6</b>	1,410g	10,5mm	10,2mm
<b>Grupo Infarto (GI)</b>	<b>Rato 7</b>	1,320g	10,6mm	10,4mm
	<b>Rato 8</b>	0,866g	10,8mm	10,6mm
	<b>Rato 9</b>	1,327g	11,1mm	10,5mm
	<b>Rato 10</b>	1,250g	10,8mm	10,3mm

#### *Subitem 4 – Análise histopatológica*

Os corações, previamente fixados em Formol Tamponado a 10%, foram submetidos ao corte histológico para melhor análise e, em seguida, realizou-se o processamento histológico, o corte de 5  $\mu$ m e a coloração com HE para análise histopatológica.

A gravidade e a extensão do IAM foram observadas em lâminas histológicas de cada rato, de cada grupo. Os achados foram classificados de 0 a 3, compondo uma escala histopatológica de lesão miocárdica: (0) Sem alterações; (1) Leve – dano miócito focal ou pequena degeneração multifocal com ligeiro grau de processo inflamatório; (2) Moderado – extensa degeneração miofibrilar e/ou processo inflamatório difuso; (3) Acentuado – necrose com processo inflamatório difuso.

### **Resultados**

#### *Grupo Controle*

No grupo controle não se observou desordens da arquitetura cardíaca.

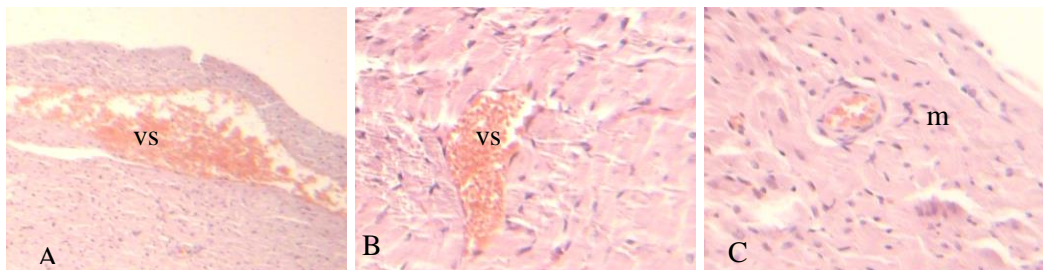


Figura 4: Grupo controle. Ápice do coração. Vasos sanguíneos (vs); musculo cardíaco (m). HE. 40x.



Figura 5: Grupo controle. Base do coração. Vasos sanguíneos (vs); musculo cardíaco (m). HE. 40x.

### Grupo Infarto

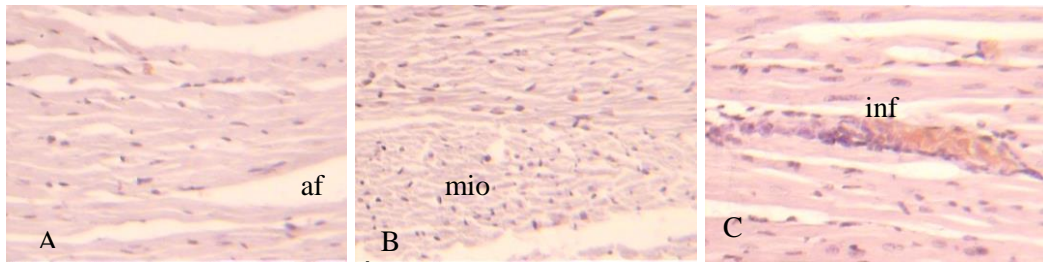


Figura 6: Figura 4: Grupo controle. Ápice do coração. Afrouxamento das fibras (af); miócitos (mio); inflamação (inf). HE. 40x.

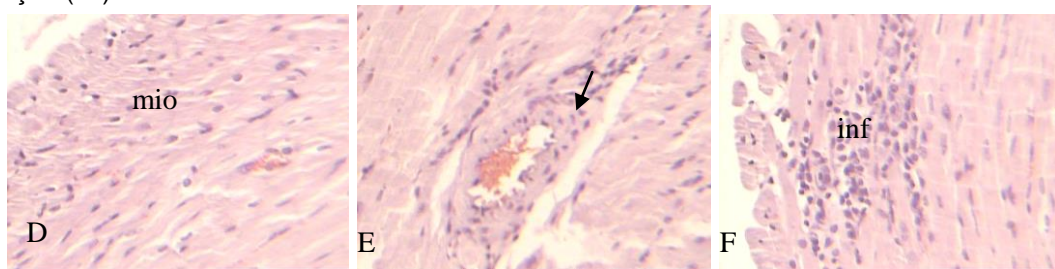


Figura 7: Grupo controle. Base do coração. miócitos (mio); espessamento da parede dos vasos (seta); inflamação (inf). HE. 40x.

Com 24 horas após o último procedimento do experimento os animais foram anestesiados e foi realizada a eutanásia. Observou-se em alguns pontos a necrose muscular evidente, acompanhada por infiltração por linfócitos. Foram vistos, também, acúmulos de células semelhantes aos fibroblastos. Acredita-se que os miofibroblastos sejam fibroblastos modificados pelo TGF- $\beta$  secretado pelos monócitos e responsáveis pela síntese de colágeno I e III, que começa a acumular-se na região periférica do infarto (JUGDUTT, 2003). Os achados foram classificados como leve, com dano miócito focal ou pequena degeneração multifocal com ligeiro grau de processo inflamatório e moderado processo inflamatório difuso.

Além disso, macroscopicamente, observou-se a mudança da coloração dos pêlos dos animais do Grupo Infarto, as quais se tornaram amareladas; e também houve alteração nas fezes, que estavam fétidas e com consistência amolecida. Quanto ao comportamento, notou-se a mudança no ritmo cardíaco, o qual tornou-se taquicárdico e arritmico, indicando estado de sonolência e fadiga.

### Considerações Finais

As alterações cardíacas que decorreram da aplicação do extrato aquoso da planta *Tetrapteryx multiglandulosa* são notórias. Há grande importância farmacológica nesta planta, a qual pode tornar-se tão eficaz na indução de infarto

do miocárdio quanto o composto utilizado atualmente – o isoproterenol. Há a viabilidade no desenvolvimento da pesquisa, visto que estão sendo feitos os mesmos procedimentos descritos com o restante dos animais (30 ratos), e destarte, aumentando o número da população, tornar-se-á claro os maiores detalhes e alterações em congruência.

### Fontes consultadas

AVEZUM, A. et al. **Aspectos epidemiológicos do infarto agudo do miocárdio no Brasil**. Divisão de Pesquisa - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo: 2005.

BANERJEE, S. K., et al. Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induce by ischemic reperfusion injury. **BMC Pharmacol**, vol. 2, p.16, 2002.

BLOOM, S.; DAVIS, D. L. Calcium as mediator of isoproterenol – induced myocardial necrosis. **Am J Pathol**, Philadelphia: v. 69, p. 459-470, 1972.

BOJRAB, M. J.. **Técnicas atuais em cirurgias de pequenos animais**. 5ª ed. São Paulo: Roca, p. 869, 2005.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Ottawa: **Canadian Council on Animal Care**, 1984.

CARVALHO, N.M.; et al. Intoxicação por *Tetrapteryx multiglandulosa* em bovinos em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.139-146, 2006.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Ischemia-reperfusion injury: process in pathogenetic networks: a review. **Transplant Proc**, Estados Unidos: v. 39, p. 481-484, 2007.

JUGDUTT BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? **Circulation**, v.108: p.1395-1403, 2003.

LOBO FILHO, H. G.; et al. Modelo experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São José do Rio Preto: vol. 26, n. 3, p. 469-476, 2011.

MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Triagem fitoquímica preliminar de *tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). **Rev. bras. toxicol**; vol. 12, p. 55-62, 1999.

SCHOEN, F. J., O coração. In: COTRAN, R. S et al. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, cap. 12, p. 583-650.

SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3ª Ed. Philadelphia: Saunders, vol. 2, p. 2830, 2003.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. **Arq Bras Cardiol**, Botucatu: vol. 93, n. 4, p. 434-440, 2009.