



Análise muscular durante o desenvolvimento embrionário e fetal no modelo pré-clínico da Distrofia Muscular de Duchenne

Muscle analysis during embryonic and fetal development in the preclinical model of Duchenne Muscular Dystrophy

Daniela M. Oliveira^{1*}, Amilton C. Santos¹, Ana C.O. Carreiro², Paula Fratini¹, Maria A. Miglino¹, Antônio C.A. Neto¹

¹Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

²Chemistry Institute, Biochemistry Department, Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL-NETCEM), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*E-mail: oliveiradm@usp.br

O modelo de estudo GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) apresenta sintomas clínicos fenotipicamente característicos da DMD (Distrofia Muscular de Duchenne) em humanos e, por esta razão, tem sido amplamente utilizado como modelo de estudos pré-clínicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o tecido muscular, ao longo da gestação, no modelo canino. De acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de ética no uso de animais”, protocolado sob o nº 3018/2013. Fêmeas, portadoras do gene distrófico, foram monitoradas por citologia vaginal e dosagem de progesterona (P4). O momento da ovulação foi monitorado pelo exame clínico, citologia vaginal e determinação dos níveis séricos de P4, em dias alternados, a partir do surgimento dos sinais de proestro. O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração de P4 atingiu valores \geq a 5 ng/ml. Durante a ovulação, as fêmeas foram inseminadas com sêmen fresco. No 25º dia, pós-inseminação, as fêmeas foram submetidas a exames de ultrassonografia para confirmar a gestação. As fêmeas gestantes passaram por uma ovariosalpingohisterectomia (OSH) para a retirada dos embriões e fetos nos seguintes períodos gestacionais: 28º, 33º e 38º dias. Após coleta, os animais foram divididos em três grupos, de acordo com a idade gestacional, totalizando 23 amostras. Posteriormente, foi realizada morfometria das amostras e fragmentos de tecido muscular foram utilizados para PCR convencional, histologia e imuno-histoquímica. Por intermédio da microscopia de luz, nota-se que nas idades de 33º e 38º dias de gestação, o grupo controle apresentou uma intensa atividade celular de fibras musculares primárias e secundárias, demonstrando que estas fibras já estão se diferenciando. No grupo afetado, não foi observado tais características teciduais, o que corrobora com um desenvolvimento tardio, apesar de serem embriões e fetos gerados de uma mesma gestação. A distrofina está ausente em animais distróficos adultos, porém, na análise de imuno-histoquímica, comprovou-se a marcação positiva para distrofina em ambos os grupos. Estes dados sugerem que animais distróficos apresentam músculo sadio durante a fase gestacional. Sugerimos que estudos futuro sejam realizados em fases precoces, ainda in-utero ou na fase neonatal de animais distróficos por expressarem distrofina e por não apresentarem alterações inflamatórias no tecido.

Palavras-chave: duchenne, embriões, fetos, canino, distrofina.

Keywords: *duchenne, embryos, fetuses, canine, disrophin.*



Evidência para o envolvimento da Angiotensina(1-7) no desenvolvimento do corpo lúteo em ratas

Evidence for the involvement of Angiotensin(1-7) in the rat corpus luteum development

Virgínia Mara Pereira^{1*}, Gregório Nunes Viana², Adelina Martha dos Reis³

¹Docente do Departamento de Medicina Veterinária, UFJF, MG, Brasil; ²Departamento de Morfofisiologia, UFPI, PI, Brasil;

³Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG, MG, Brasil.

*E-mail: virginiamara@gmail.com

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA), conhecido por seu papel na regulação da pressão sanguínea e do volume hidroeletrólítico, foi descrito em ovários de diversas espécies, onde participa de maneira parácrina da fisiologia ovariana. Dados do nosso grupo de pesquisa mostraram a presença da Angiotensina(1-7) [Ang(1-7)], um novo componente biologicamente ativo do SRA, e seu receptor Mas no folículo ovariano de coelhas, ratas e mulheres, além do efeito estimulatório desse peptídeo sobre o desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e ovulação. O objetivo deste trabalho foi investigar a imunorreatividade para Ang(1-7) através de imunohistoquímica (IHQ), e a expressão do mRNA para o receptor Mas e para a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2), principal formadora da Ang(1-7), em fases distintas do desenvolvimento de corpos lúteos (CL) em ratas. O presente estudo é parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFS (Protocolo n^o 11/2010-CEPA/UFS). Neste estudo, utilizamos 26 ratas Wistar pré-púberes (23-25 dias) que foram submetidas ao protocolo de superovulação com PMSG/hCG e os experimentos realizados 24h (Grupo 1; n=6), 72h (Grupo 2; n=6) ou 120h (Grupo 3; n=6) após o tratamento para a obtenção de CL em diferentes fases de desenvolvimento. O grupo controle (CONT) recebeu solução salina (n=8). No dia do experimento, as ratas foram anestesiadas (ketamina 90mg/kg + xilazina 10 mg/kg), submetidas à laparotomia e os ovários esquerdos imediatamente removidos, congelados em N₂ líquido e mantidos a -20 °C para ensaios de PCR em tempo real. Em seguida, as ratas foram perfundidas via ventrículo esquerdo, até exsanguinação total, com tampão PBS contendo inibidores de proteases, seguido por perfusão com paraformaldeído, processo que leva à morte dos animais. Os ovários direitos foram removidos, fixados em paraformaldeído e incluídos em parafina. Imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada pelo método da avidina-biotina peroxidase, com anticorpo monoclonal anti-Ang(1-7). Para avaliação da expressão do mRNA do receptor Mas e ECA2, o RNA total foi extraído do homogenato ovariano com Trizol e quantificado por PCR em tempo real usando Kit Sybr Green. Os dados da IHQ mostraram imunorreatividade para Ang(1-7) em todas as fases do desenvolvimento dos corpos lúteos, entretanto a marcação foi mais intensa nas células luteínicas do Grupo 2, comparada aos Grupos 1, 3 e CONT. Os resultados obtidos com o PCR em tempo real (média ± EPM) mostraram maior expressão do receptor Mas no Grupo 2 (3,36±0,48) comparado aos Grupos 1 (1,66±0,46), 3 (1,25±0,32) e CONT (1,02±0,25). Expressão para ECA2 também foi maior no grupo 2 (2,45±0,26) comparado aos Grupos 1 (1,29±0,25), 3 (1,85±0,47) e CONT (1,00±0,20). Concluímos neste estudo que ocorre um aumento da expressão dos componentes do eixo ECA2/Ang(1-7)/receptor Mas em CL maduros em relação aos CL nas fases iniciais de formação e de regressão, apontando para a participação da Ang(1-7) como um regulador local do desenvolvimento do CL.

Palavras-chave: ovário de rata, corpo lúteo, angiotensina(1-7), imunohistoquímica.

Keywords: rat ovary, corpus luteum, angiotensin(1-7), immunohistochemistry.