

Efeito do inibidor da galectina-3 na disfunção autonômica induzida pela administração da angiotensina II.

Autores: Pedro Bortoleto Colombo¹, Aline Barbosa Ribeiro²

Colaboradores: João Victor Silveira Camargo³, Vanessa Leiria Campo⁴

^{1,2,3,4}Centro Universitário Barão de Mauá

¹pedrobortoletocolombo.sg@gmail.com - Medicina, ²aline.barbosa@baraodemaua.br

Resumo

A hiperatividade simpática e a resposta inflamatória são fatores importantes tanto para o desenvolvimento quanto para a progressão da hipertensão arterial. A expressão elevada de galectina-3 em pacientes hipertensos, bem como a administração de seus inibidores modulam a resposta inflamatória. Dessa forma, o presente estudo avaliou a resposta hemodinâmica à angiotensina II (droga hipertensiva) com e sem administração prévia do inibidor de galectina-3 em ratos. Os resultados sugerem que a administração da angiotensina II promoveu uma bradicardia apenas nos grupos com a administração prévia com o inibidor, associada com redução da atividade simpática.

Introdução

A hipertensão arterial (HA) é uma doença cardiovascular altamente prevalente em todo o mundo. Trata-se de uma condição clínica sistêmica e multifatorial que é responsável por 45% das mortes por eventos cardiovasculares (FARIA-NETO *et al.*, 2022). Dessa forma, torna-se cada vez mais importante a identificação e o controle, não somente dos fatores de risco para seu desenvolvimento, mas também, das condições que contribuem para o aumento da mortalidade dos pacientes acometidos por essa enfermidade, uma vez que há uma quantidade significativa de pacientes resistentes às abordagens farmacológicas disponíveis (WILLIAMS *et al.* 2018).

Níveis elevados e sustentados da pressão arterial (PA) são característicos da hipertensão arterial e podem ser resultado de alterações na sensibilidade do barorreflexo, do desequilíbrio do sistema nervoso autônomo (aumento da atividade simpática e diminuição da modulação parassimpática), assim como do envolvimento de outros órgãos (rim, coração, vasos sanguíneos) (WILLIAMS *et al.* 2018).

Diversas abordagens em pesquisas pré-clínicas e clínicas visam investigar a modulação autonômica em condições normotensas e hipertensas. Dentre elas, é importante salientar marcadores como a

variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (VPA). Essas ferramentas podem fornecer informações prognósticas importantes em estados de saúde ou doença (RIBEIRO *et al.* 2020). Na hipertensão arterial, tanto a VFC quanto a VPA encontram-se alteradas, sugerindo uma disautonomia, caracterizada por um transtorno no sistema autônomo (TIWARI *et al.*, 2020).

Além da alteração autonômica, células imunes têm sido observadas infiltrando o rim e a vasculatura de humanos hipertensos e animais com hipertensão experimental. Evidências crescentes indicam que mecanismos imunes e inflamatórios induzem o aumento da PA. Esses processos se manifestam sistemicamente com a elevação das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios circulantes, tais como proteína C reativa, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (MURRAY *et al.*, 2021). Portanto, é essencial identificar as intervenções terapêuticas que abordem os alvos inflamatórios na hipertensão arterial.

Dentre esses mediadores inflamatórios, encontra-se a galectina-3. As galectinas representam um grupo de proteínas da família das lectinas definidas pela afinidade por β -galactosídeos e homologia primária no seu domínio de reconhecimento de carboidratos. Atualmente, pelo menos 15 tipos de galectinas foram identificadas numa variedade de tecidos de mamíferos, sendo que a galectina-3 tem sido amplamente avaliada nas respostas inflamatórias e correlacionada com alterações cardiovasculares (SUTHAHAR *et al.*, 2018).

Em corações normais de ratos, camundongos e humanos, a expressão de galectina-3 é baixa. No entanto, à medida que a doença cardiovascular progride, há um aumento da expressão da galectina-3. É possível relacionar o aumento dos níveis de galectina-3 no plasma de pacientes com a hipertensão, de modo que ela desempenha um papel importante no processo fisiopatológico, podendo ser utilizada como biomarcador por refletir o estado funcional da progressão da doença (SYGITOWICZ; MACIEJAK-JASTRZEBSKA; SITKIEWICZ, 2021).

Em contrapartida, a inibição ou bloqueio da expressão da galectina-3 por meio de drogas reduz a fibrose cardíaca e renal, de modo que ela pode ser utilizada como um novo alvo para intervenção farmacológica. De acordo com um estudo prévio, a inibição da expressão de galectina-3 e do conteúdo proteico previne a disfunção ventricular esquerda induzida pelo isoproterenol e a fibrose em camundongos. Além disso, inibidores de galectina-3 reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (SYGITOWICZ; MACIEJAK-JASTRZĘBSKA; SITKIEWICZ, 2021).

Embora existam evidências pré-clínicas e clínicas da associação da galectina-3 com doenças cardiovasculares (BLANDA *et al.*, 2020), pouco se sabe do impacto da galectina-3 na disfunção autonômica na hipertensão arterial. Assim, a obtenção de dados de VFC e VPA que correlacionem o efeito dos inibidores sintéticos da galectina-3 em ratos submetidos à agente hipertensivo poderá elucidar se a galectina-3 pode atuar na disfunção autonômica. Logo, tal efeito dos inibidores da galectina-3 pode representar alvos terapêuticos frente à modulação autonômica em alterações cardiocirculatórias.

Objetivos

O presente trabalho objetiva investigar se a administração do inibidor sintético de galectina-3, previne as alterações autonômicas (hiperatividade simpática) induzidas pelo aumento da PA aguda pela administração angiotensina II.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* (250-300 g) provenientes do Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, 4 animais por caixa, acondicionados em condições padronizadas de temperatura (24-25 °C), ciclo de luz claro/escuro de 12 h, e temperatura controlada (24 °C), água e ração *ad libitum*. Foram utilizados 6 animais por grupo, conforme detalhado a seguir.

Aspectos éticos

Todo o protocolo experimental foi conduzido de acordo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Centro Universitário Barão de Mauá (Processo N477/22).

Delineamento experimental

A avaliação da PA e da frequência cardíaca (FC) foi realizada como descrito por Ribeiro *et al.* (2021). Os ratos foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg, i.p., União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP,

BR) e Xilazina (10 mg/kg, i.p., Hertape Calier Saúde animal S/A, Juatuba, MG, BR). Antes da anestesia, o analgésico Tramadol (2 mg/kg, s.c.) foi administrado, a fim de minimizar a dor pós-operatória.

Após verificação dos animais anestesiados, cateteres de polietileno (PE-50 soldado ao PE-10) foram implantados na artéria e veia femorais, para registro da PA e administração de drogas, respectivamente. Após 24 h, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão e o sinal da PA foi amplificado (*BridgeAmp, ADInstruments, Australia*) e amostrado (1 kHz) em um IBM/PC acoplado a uma interface analógico-digital (*Power Lab/4, AD Instruments, Mountain View, CA, USA*). Os valores da FC foram calculados em tempo real, a partir do sinal da PA, por um programa computacional específico (*Blood Pressure Module for LabChart, ADInstruments, Austrália*).

Após 15 minutos de registro basal da PA, o inibidor 1,2,3-triazol-galactosil arilsulfonamidas (nas doses 0,5 mg/Kg e 1 mg/Kg) ou o veículo (salina) foi administrado por gavagem. Os ratos foram conectados novamente no sistema registro, e após 30 minutos a angiotensina II (200 mg/kg, Sigma Chemical CO., lote 87H803, CAS 4474-91-3, PA 98%) foi administrada na veia femoral. O registro da pressão foi realizado até 100 minutos após a administração da angiotensina II. Após o registro, os ratos foram eutanasiados com sobredose anestésica.

Assim, os animais (n=18) foram alocados nos grupos conforme detalhado a seguir:

GRUPO SALINA + ANGIO II (n=6);

GRUPO INIBIDOR (In 0,5 mg/Kg) + ANGIO II (n=6);

GRUPO INIBIDOR (In 1 mg/Kg) + ANGIO II (n=6);

Canulação

As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno (PE-10) (4 cm para a artéria e 2 cm para veia) soldado a outro tubo de polietileno (PE-50) (15 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Os ratos foram anestesiados e um cateter foi introduzido na veia e outro na artéria femoral. Uma vez implantadas as cânulas, essas foram dirigidas pelo tecido subcutâneo para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura.

Análise dos Dados

Os registros da PA foram analisados por um programa computacional que detecta pontos de inflexão em sinais periódicos (LabChart Pro ADInstruments, Colorado Springs, CO). Foram geradas séries temporais da PA sistólica, batimento a batimento. Séries temporais de intervalo de pulso (IP) também foram calculadas

usando os intervalos entre consecutivos valores de pressão pulsátil.

A VPA foi quantificada por meio do desvio padrão de valores sucessivos de PA (SD), e a variabilidade do IP foi quantificada pelo desvio padrão (SDNN) no domínio do tempo, indicando a VFC. A variabilidade do IP também foi estudada no domínio da frequência por análise espectral. As séries temporais de IP batimento a batimento foram convertidas em séries uniformemente espaçadas a 10 Hz usando interpolação cúbica. O espectro de cada segmento foi calculado usando a transformada rápida de Fourier e integrado em bandas de baixa frequência (LF, 0,2–0,8 Hz). Foram estimadas as potências medianas nas bandas LF normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos apenas para a série IP calculando a proporção da potência LF em relação à potência total do espectro.

O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade de cada variável. As variáveis apresentaram distribuição não normal, assim, os resultados são apresentados como mediana (primeiro e terceiro quartis), e o teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado para comparação dos grupos. Quando foram observadas diferenças, foi aplicado o pós-teste de *Dunn*.

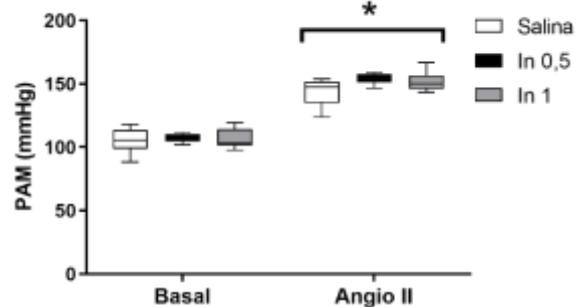
Para todas as análises, foi considerada significância estatística quando $P < 0,05$. O *GraphPad Prism* versão 8.0 para *Windows* (GraphPad Software 8.0, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para realizar a análise estatística e posterior construção do gráfico.

Resultados e Discussão

Diversos modelos experimentais visam mimetizar a hipertensão arterial, dentre eles é possível destacar o modelo de administração da angiotensina II por vários dias ou semanas, que induz lesões cardiovasculares caracterizadas por fibrose e necrose (NOSALSKI *et al.*, 2020). Uma das formas de investigar o efeito da angiotensina II no aumento da PA e resposta autonômica sem induzir lesões cardiovasculares é avaliar a sua administração de forma aguda.

Nossos resultados indicaram que a administração de angiotensina II foi capaz de promover um aumento significativo da pressão arterial média (PAM) durante os 2 minutos após a sua administração ($P < 0,05$). O uso prévio com as duas doses de inibidor de galectina-3 não alterou a resposta da PAM à angiotensina II. A Figura 1 mostra os valores pressóricos antes (basal) e após a administração de angiotensina II nos três grupos avaliados.

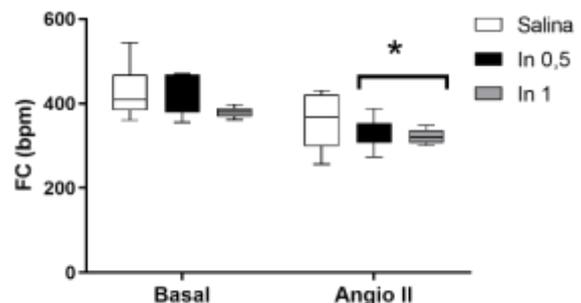
Figura 1 – A administração de Angiotensina II (Angio II) aumenta a pressão arterial média (PAM)



Fonte: elaborado pelo autor

O aumento rápido da PA estimula uma resposta barorreflexa pautada no balanço autonômico entre o sistema nervoso simpático e parassimpático. O inibidor de galectina-3 nas duas doses avaliadas promoveu uma bradicardia em resposta a angiotensina II em comparação com o tempo basal dos ratos que receberam salina ($P < 0,05$). Isso sugere uma redução da atividade simpática. A Figura 2 representa os valores da FC antes (basal) e após a administração de angiotensina II.

Figura 2 – A administração do Inibidor de Galectina-3 (In) promove redução da frequência cardíaca (FC) reflexa



Fonte: elaborado pelo autor

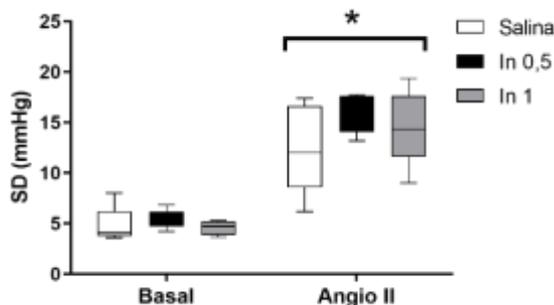
As análises da VFC e da VPA são realizadas, principalmente, a partir de métodos lineares. Entre os métodos lineares, destacam-se aqueles que avaliam as características estatísticas de séries de valores do intervalo cardíaco a cada batimento e da PA, portanto, medem a variabilidade total desses parâmetros. Esses são chamados de métodos no domínio do tempo e guardam estreita relação com a modulação autonômica do coração e do músculo liso vascular. São valiosas ferramentas para o diagnóstico de disautonomias, e têm valor preditivo para estratificação de risco cardíaco e morbimortalidade, em doenças cardiovasculares ou sistêmicas, tais como Hipertensão Arterial, Insuficiência Cardíaca,

Diabetes Mellitus tipo II, dentre outras (TIWARI *et al.*, 2020).

A variabilidade da PA (Figura 3) foi aumentada pela administração da angiotensina II em relação ao tempo basal ($P < 0,05$). Da mesma forma, a variabilidade da FC (Figura 4) também foi aumentada pela administração da angiotensina II em comparação ao tempo basal ($P < 0,05$). A administração prévia com o inibidor não modificou a VPA e VFC em comparação ao efeito da angiotensina II nos ratos previamente tratados com salina.

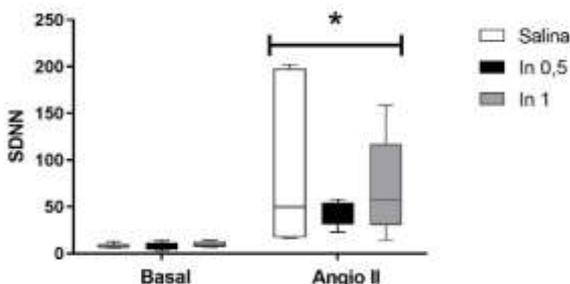
Dados mais recentes sustentam a associação entre doenças inflamatórias crônicas e a maior susceptibilidade ao desenvolvimento da alteração autonômica por meio do aumento da VPA e da atividade simpática (Ribeiro *et al.* 2020). Ademais, a análise da VFC mostra que o componente oscilatório de alta frequência apresenta-se reduzido em pacientes hipertensos, indicando déficit na modulação parassimpática cardíaca (TIWARI *et al.*, 2020). Entretanto, nossos resultados indicaram que a administração da angiotensina-II promoveu um aumento da VFC. Isso pode ser compreendido devido a administração ter sido feita de forma aguda.

Figura 3 – A administração de Angiotensina II (Angio II) aumenta a Variabilidade da Pressão Arterial (VPA)



Fonte: elaborado pelo autor

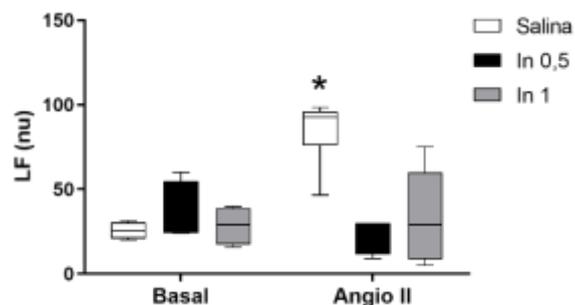
Figura 4– A administração de Angiotensina II (Angio II) aumenta a Variabilidade da Frequência Cardíaca (FC)



Fonte: elaborado pelo autor

A administração do inibidor de galectina-3 atenuou a resposta simpática à angiotensina II, uma vez que apenas nos ratos que receberam salina ocorreu um aumento no tônus simpático ($P < 0,05$). Na Figura 5 é possível observar que o LF foi aumentado pela angiotensina II apenas nos ratos que foram previamente tratados com salina, o que sugere um efeito inibitório da droga sobre a resposta simpática. Esse resultado corrobora com o efeito do inibidor nas duas doses avaliadas na FC, já que a redução do tônus simpático modula a força e a frequência dos batimentos do coração. Estudos prévios demonstram que um dos aspectos relacionados ao estado hipertensivo é o aumento da atividade simpática, a qual participa do desenvolvimento do aumento da PA e da sua progressão (GRASSI; RAM, 2016). Evidências clínicas têm demonstrado que a hiperatividade simpática está relacionada com a lesão de órgãos-alvos, como o coração; causando hipertrofia cardíaca, disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca, assim como alterações estruturais e funcionais, frequentemente detectadas em grandes, médias, e pequenas artérias (GRASSI; RAM, 2016).

Figura 5– A administração do inibidor de Galectina-3 (In) impede o aumento da atividade simpática (LF) induzida pela Angiotensina II (Angio II)



Fonte: elaborado pelo autor

Conclusão

Nossos resultados sugerem que a galectina-3 modula o sistema autônomo simpático em resposta ao aumento da PA. Embora existam evidências pré-clínicas e clínicas da associação da galectina-3 com doenças cardiovasculares, esses resultados são inéditos em demonstrar o possível efeito do inibidor de galectina-3 na disfunção autonômica induzida por agente hipertensor. Tal inibidor representa, assim, uma importante ferramenta para a investigação de novas terapias frente à alteração autonômica, a qual contribui para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial.

Referências

BLANDA, V. *et al.* Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9232, 3 dez. 2020.

FARIA-NETO, J. R. *et al.* Challenges faced by patients with dyslipidemia and systemic arterial hypertension in Brazil: a design of the patient journey. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 22, n. 1, 21 maio 2022.

GRASSI, G.; RAM, V.S. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. **J Am Soc Hypertens**, v. 10, n. 5, p. 457-466, 2016.

MOUTON, A. J. *et al.* Obesity, Hypertension, and Cardiac Dysfunction: Novel Roles of Immunometabolism in Macrophage Activation and Inflammation. **Circulation research**, v. 126, n. 6, p. 789–806, 13 mar. 2020.

MURRAY, E. C. *et al.* Therapeutic targeting of inflammation in hypertension: from novel mechanisms to translational perspective. **Cardiovascular Research**, 26 out. 2021.

NOSALSKI, R. *et al.* T-Cell-Derived miRNA-214 Mediates Perivascular Fibrosis in Hypertension. **Circulation Research**, v. 126, n. 8, p. 988–1003, 10 abr. 2020.

RIBEIRO, A. B. *et al.* Short-term effect of ligature-induced periodontitis on cardiovascular variability and inflammatory response in spontaneously hypertensive rats. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, 11 out. 2021. 9.

RIBEIRO, A. B. *et al.* Cardiovascular and Autonomic Dysfunction in Murine Ligature-Induced Periodontitis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 23 abr. 2020.

SUTHAHAR, N. *et al.* Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. **Theranostics**, v. 8, n. 3, p. 593–609, 2018.

SYGITOWICZ, G.; MACIEJAK-JASTRZĘBSKA, A.; SITKIEWICZ, D. The Diagnostic and Therapeutic Potential of Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, p. 46, 29 dez. 2021.

TIWARI, R. *et al.* Analysis of Heart rate Variability and Implication of Different Factors on Heart Rate Variability. **Current Cardiology Reviews**, v. 16, 31 dez. 2020.

WILLIAMS, B. *et al.* 2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 36, n. 12, p. 2284–2309, dez. 2018.