

José Felipe Pinho da Silva

**PAPEL DA PI3K δ NO CONTROLE DA
CONTRATILIDADE VASCULAR NO DIABETES
MELLITUS TIPO I: ESTUDO FUNCIONAL E
ELETROFISIOLÓGICO**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

José Felipe Pinho da Silva

**PAPEL DA PI3K δ NO CONTROLE DA
CONTRATILIDADE VASCULAR NO DIABETES
MELLITUS TIPO I: ESTUDO FUNCIONAL E
ELETROFISIOLÓGICO**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora Prof^a Dr^a Virginia Soares Lemos
Co-Orientador Prof^o Jader dos Santos Cruz

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof^o Clélio Campolina Diniz

Vice-reitora: Prof^a Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO

PRÓ-REITORA: Prof^o Ricardo Santiago Gomez

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DE MINAS GERAIS

DIRETOR: Prof^a Tomaz Aroldo da Mota Santos

Vice-Diretor: Prof^a Janetti Nogueira de Francisci

PÓS-GRADUAÇÃO FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

COORDENADORA: Prof^a Adelina Martha dos Reis

Sub-Coordenador: Prof^o Christopher Kushmerick

RESUMO

O Diabetes está diretamente relacionado a danos em vários órgãos e sistemas incluindo o sistema vascular. Os problemas vasculares representam a principal causa de morbidade e mortalidade no Diabetes. No entanto, os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares associadas ao diabetes não são completamente esclarecidas. O objetivo deste estudo foi investigar as vias de sinalização envolvidas na disfunção vascular em um modelo murino de diabetes tipo I induzida por streptozotocina. **Método:** Os experimentos funcionais foram conduzidos com a aorta torácica de camundongos C57BL/6 em um sistema de banho de órgãos. As correntes para Ca^{2+} foram medidas em células recém-dispersas utilizando a técnica de *patch-clamp* na configuração *whole-cell*. A expressão protéica foi medida através da técnica de Western blot. A técnica de antisense foi usada para diminuir agudamente (*knockdown*) a expressão da PI3K δ . **Resultados:** A resposta vasorelaxante não foi diferente entre os grupos controle e diabéticos. No entanto, os vasos dos animais diabéticos apresentaram uma resposta contrátil bastante aumentada em relação ao controle quando estimulados com fenilefrina ou KCl. Os dados de Western blot mostraram um aumento da expressão dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L ($Ca_v1.2$), da PI3K δ e da Rho na aorta dos animais diabéticos. Nos animais diabéticos tratados com antisense para a PI3K δ a expressão da Rho e dos $Ca_v1.2$ foi normalizada. A inibição farmacológica ou com antisense para a PI3K δ normalizou a densidade de corrente através dos $Ca_v1.2$ para o nível do controle. Os inibidores da RhoK, fasudil (10 μ mol/L) e Y27632 (5 μ mol/L) também foram efetivos em normalizar as correntes para Ca^{2+} através dos $Ca_v1.2$ nos animais diabéticos. Os efeitos da inibição da PI3K δ e da RhoK sobre os $Ca_v1.2$ não foram aditivos. Surpreendentemente, a nifedipina, bloqueador de $Ca_v1.2$, apesar de ter tido um efeito inibitório mais pronunciado sobre a contração dos animais diabéticos, não restaurou completamente a resposta contrátil ao nível do animal controle. Estes resultados sugerem que o aumento de corrente para cálcio através dos $Ca_v1.2$ não é o único mecanismo implicado no aumento da contratilidade vascular dos animais diabéticos. A PI3K δ e a RhoK devem agir também em outra via que controla o processo contrátil, além dos $Ca_v1.2$. A inibição (farmacológica e com antisense) da PI3K δ normalizou a resposta contrátil do animal diabético sugerindo que todos os mecanismos envolvidos na alteração contrátil do diabetes envolvem a PI3K δ . A inibição da RhoK com Y27632 praticamente aboliu a resposta contrátil do animal controle e do animal diabético, mostrando que esta via é fundamental no controle da contração na aorta dos camundongos. **Conclusões e implicações:** Os resultados mostram que no diabetes tipo 1 induzido por STZ ocorre uma remodelação dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da resposta contrátil do músculo liso da aorta, incluindo o aumento da expressão da PI3K δ , $Ca_v1.2$ e Rho. No animal diabético, a PI3K δ , via Rho/RhoK, promove um aumento das correntes para cálcio através dos $Ca_v1.2$ e do grau de fosforilação dos filamentos contráteis. Dessa forma, o bloqueio da PI3K δ pode representar um novo alvo terapêutico para o tratamento das disfunções vasculares em pacientes diabéticos.

ABSTRACT

Diabetes is associated to damage in several organs and systems including the vascular system. Vascular diseases are the main cause of mortality and morbidity in diabetes patients. However, the mechanisms that determine vascular modifications on diabetes disease are unclear. Our main goal was to investigate signaling pathways involved in vascular dysfunction in a murine model of streptozotocin-induced diabetes type I. **Method:** The thoracic aorta of C57BL/6 mice was isolated, cut in rings and mounted in a myograph. Vascular studies were performed using isometric transducers in an organ bath system. Calcium currents were recorded by *patch-clamp* technique (in whole cell configuration) from aorta cells freshly dissociated. Protein expression was measured by western blot technique. Antisense oligonucleotides were used to knockdown PI3K δ expression. **Results:** there was no difference in the vasorelaxation response of control and diabetic animals aorta. However, aorta from diabetic animals showed a higher contractility in the presence of phenylephrine or KCl. Western blot data also demonstrated an increased expression of L-type voltage-gated calcium channels (Ca_v1.2), PI3K δ and Rho on aorta from diabetic animals. In the diabetic animal treated with antisense for PI3K δ , the expression of Ca_v1.2 and Rho was normalized. Both PI3K δ pharmacological inhibition and the administration of oligodeoxynucleotides antisense against PI3K δ recovered Ca_v1.2 current densities to the same level as control animals. Also, Rho inhibitors, fasudil (10 μ Mol/L) and Y27632 (5 μ Mol/L), normalized Ca_v1.2 calcium currents in diabetic animals. The inhibition of PI3K δ and Rho did not have additive effect. Surprisingly, although nifedipine, a Ca_v1.2 blocker, had the highest inhibitory effect over aorta cells of diabetic animals it still could not recover the contractile response to the same level as control animals. These results suggest that the increased calcium influx through Ca_v1.2 channels is not the only mechanism responsible for the diabetic animals increased vascular contractility. Furthermore, the activation of Ca_v1.2 channels, PI3K δ and Rho may also act in a different pathway to control the contractile response. Both pharmacological and antisense inhibition of PI3K δ normalized the contractile response on diabetic animals suggesting that all the mechanisms involved on the regulation of the contractility on diabetic animals are related to PI3K δ activity. The Y27632 (inhibition of Rho) abolished the contractile response either on diabetic or control animals demonstrating the fundamental role of this pathway in the contractile control aorta from mice. **Conclusions and implications:** our results showed that diabetes type 1 induced by STZ occurs by a remodeling process of the molecular mechanisms involving the contractile response control in smooth muscle from aorta, including the increase in expression of PI3K δ , Ca_v1.2 and Rho. On diabetic animals, PI3K activates the Rho/RhoK pathway inducing an increase in calcium currents through Ca_v1.2 channels and increase the phosphorylation level of the contractile filaments. Therefore, the PI3K δ inhibition can represent a new therapeutic target for the treatment of vascular dysfunction in diabetic patients.