

DIOGO TEODORO GALAN

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA EM RATOS DEFICIENTES
EM TIAMINA**

BELO HORIZONTE – MG

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DIOGO TEODORO GALAN

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA EM RATOS DEFICIENTES
EM TIAMINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia e Biofísica: Programa de Pós – Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

BELO HORIZONTE – MG

2009

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para sua realização. Em especial aos meus pais, Danilo Galan e Cristina Galan, meu irmão, Breno Galan, aos meus amigos e ao Prof. Jader Cruz que sempre confiaram em mim e me apoiaram em todas as decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que ao longo deste período contribuíram para o meu crescimento tanto pessoal como profissional, em especial:

Aos meus pais por tudo que me proporcionaram na vida.

Ao meu irmão Breno, melhor amigo que eu poderia ter.

A minha família, tios, tias, primos, primas, avó, madrinha que sem eles nada disso teria sentido.

Aos meus grandes amigos Carlos Augusto e Rafael Melo por estarem presentes em todos os momentos e por serem praticamente meus irmãos.

Aos amigos do LAMEX, pelos vários momentos que passamos juntos.

Aos membros do ELETROCEL e Laboratório de Biologia Cardiovascular.

Em especial a Eva e Nadia que foram muito mais do que amigas ao longo destes anos. Sempre estando presentes e dizendo nem sempre o que queria ouvir, mas que eu precisava ouvir.

Aos amigos de pós – graduação.

Agradeço ao grande amigo e muitas vezes professor Fernando Augusto.

Agradeço ao Professor Alvair Pinto por ter disponibilizado o seu laboratório e sempre estar presente e disposto a discutir os dados referentes a este trabalho.

Agradeço em especial ao não somente orientador, e sim grande amigo acima de tudo Jader Cruz que sempre acreditou e confiou em mim. Obrigado pelos ensinamentos científicos, profissionais e pessoais.

RESUMO

A tiamina é de suma importância para as células animais por ser utilizada desde no metabolismo de açúcares até na síntese de neurotransmissores. Sua deficiência constitui um problema que afeta um grande número de pessoas no mundo. Porém pouco se conhece sobre seus efeitos no sistema circulatório, principalmente no coração. Este trabalho procurou investigar a função cardíaca em ratos deficientes em tiamina. Os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina não apresentaram contratura de reperfusão após isquemia de 30, 45 ou 60 minutos. Animais submetidos a uma dieta controle em tiamina também não apresentaram contraturas após 45 ou 60 minutos. Examinamos o papel do canal mitocondrial para potássio sensível a ATP, entretanto não foi possível concluir seu papel no não aparecimento das contraturas, outros experimentos serão necessários para isso. Foi observado um aumento na concentração de cálcio mitocondrial bem como uma diminuição na marcação mitocondrial nos animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina comparado ao grupo controle. Podemos então concluir que os animais deficientes em tiamina se comportam como se tivessem passado por um período de adaptação fisio-metabólica. Tal condicionamento pode assegurar uma maior sobrevivência aos cardiomiócitos quando da presença de um insulto isquêmico de duração variada.

Palavras chaves: Deficiência em tiamina, mitocôndria, canal mitocondrial para potássio sensível a ATP e Langendorff.

ABSTRACT

The thiamine is extremely important for animal cells, being used in the metabolism of sugars and in neurotransmitters synthesis. Thiamine deficiency is a problem that affects a large number of people in the world. Little is known about its effects on the circulation system, mainly in the heart. The objective of this study was to investigate the cardiac function in deficient thiamine rat. Rats subjected to thiamin deficient diet did not present reperfusion contractures after 30, 45 and 60 minutes of ischemic. Animals subjected to a control thiamine diet did not present reperfusion contractures after 45 or 60 minutes of ischemic. We examined the role of mitochondria potassium channel sensitive to ATP, but it is not possible to conclude whether it works in no appearance of contractures during the reperfusion, other experiments will be needed for that. It was observed an increase mitochondrial calcium concentration as well as a decrease in fluorescence markers for mitochondria in animals subjected to a deficient diet. We conclude that thiamin deficient animals behave as if they had gone through a period of physiological - metabolic adaptation. This conditioning can ensure greater survival of cardiomyocytes when the presence of an ischemic insult of varying duration.

Key words: Deficiency in thiamine, contracture of reperfusion, mitochondria, mitochondrial potassium channel sensitive to ATP and Langendorff.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiamina

Figura 2. Vias metabólicas que utilizam a tiamina como co-fator enzimático.

Figura 3. Canal para potássio sensível a ATP.

Figura 4. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta controle submetidos a 30 minutos de isquemia.

Figura 5. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 30 minutos de isquemia.

Figura 6. Frequência Cardíaca (BPM) 30 minutos isquemia.

Figura 7. Tensão Sistólica (g) 30 minutos isquemia.

Figura 8. Tensão Diastólica (g) 30 minutos isquemia.

Figura 9. $+dT/dt$ (g/s) 30 minutos isquemia.

Figura 10. $-dT/dt$ (g/s) 30 minutos isquemia.

Figura 11. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta controle submetidos a 45 minutos de isquemia.

Figura 12. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 45 minutos de isquemia.

Figura 13. Frequência Cardíaca (BPM) 45 minutos isquemia.

Figura 14. Tensão Sistólica (g) 45 minutos isquemia.

Figura 15. Tensão Diastólica (g) 45 minutos isquemia.

Figura 16. $+dT/dt$ (g/s) 45 minutos isquemia.

Figura 17. $-dT/dt$ (g/s) 45 minutos isquemia.

Figura 18. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta controle submetidos a 45 minutos de isquemia.

Figura 19. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 60 minutos de isquemia.

Figura 20. Frequência Cardíaca (BPM) 60 minutos isquemia.

Figura 21. Tensão Sistólica (g) 60 minutos isquemia.

Figura 22. Tensão Diastólica (g) 60 minutos isquemia.

Figura 23. $+dT/dt$ (g/s) 60 minutos isquemia.

Figura 24. - dT/dt (g/s) 60 minutos isquemia.

Figura 25. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 30 minutos de isquemia após a perfusão de 5 – HD.

Figura 26. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina, e então submetido a 30 minutos de isquemia após a perfusão de 5-HD.

Figura 27. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta controle submetidos a 30 minutos de isquemia após a perfusão de diaxóido.

Figura 28. Fluorescência Mito Tracker Green FM.

Figura 29. Fluorescência Rhod 2AM.

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1: Composição da dieta normal e deficiente em tiamina

Tabela – 2: Composição da mistura de sais

Tabela – 3: Composição da mistura de sais

Tabela – 4: Solução nutritora Krebs – Ringer

Tabela – 5: Solução Tampão

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| 1. História e Coração | 2 |
| 2. Tiamina | 4 |
| 3. Canal para Potássio Sensível a ATP (mito K_{ATP}) | 8 |
| 4. Canal mitocondrial para Potássio Sensível a ATP (mito K_{ATP}) | 10 |
| 5. Isquemia e Reperusão | 10 |

II – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

| | |
|------------------------------|----|
| 1. Justificativa | 13 |
| 2. Objetivo Geral | 14 |
| 3. Objetivo Específico | 14 |

III – MATERIAL E MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 1. Animais | 16 |
| 2. Dieta | 16 |
| 3. Isquemia e Reperusão | 18 |
| 4. Registros | 20 |
| 5. Protocolos Experimentais | 21 |
| 6. Obtenção de Células Cardíacas Isoladas | 22 |
| 7. Microscopia Confocal | 23 |

| | |
|------------------------------|----|
| 8. Análise Estatística | 24 |
|------------------------------|----|

IV – RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 1. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente em tiamina submetidos à isquemia por 30 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca) | 26 |
| 2. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente submetidos à isquemia por 45 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca) | 34 |
| 3. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente submetidos à isquemia por 60 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca) | 42 |
| 4. Animais alimentados com dieta controle submetidos à isquemia por 30 minutos + agonista para mitoKATP (diazóxido) e animais alimentados com dieta deficiente em tiamina + antagonista para mitoKATP (5 – hidroxidecanoato) | 50 |
| 5. Avaliação da fluorescência do marcador para cálcio, Rhod 2 AM e marcador de membrana mitocondrial Mito Tracker Green FM em cardiomiócitos de animais submetidos a uma dieta controle e dieta deficiente em tiamina | 54 |

| | |
|--|-----------|
| V – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO | 57 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| VI – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
|--|-----------|

INTRODUÇÃO

HISTÓRIA E CORAÇÃO

Os gregos foram os primeiros a estudarem a fisiologia e anatomia do coração quando então lhe deram o nome de “*kardia*”, que posteriormente foi modificado pelos romanos para “*cor*”. Para Aristóteles o coração era a cadeira da alma onde estava a inteligência e a emoção do homem, o local onde todos os nervos se originavam. O coração era um órgão quente e seco, o cérebro juntamente com os pulmões tinha a simples função de resfriá-lo. (Opie, 1991)

Um dos médicos mais famosos do império romano e que até hoje é considerado o pai da fisiologia experimental foi Claudio Galeno (200 D.C.). Ele concordava com muitas das idéias de Aristóteles, porém discordava de outras. Para Galeno a expansão e contração do coração era a demonstração de sua inteligência, porém mesmo assim o coração estava em segundo lugar em uma hierarquia de importância. O fígado era o órgão mais importante, que produzia e enriquecia o sangue com nutrientes. As artérias até então transportavam a *pneuma*, espírito vital, formado pelo ar respirado que então sofria transformações e metamorfoses nos pulmões e coração. No coração também ocorria a mistura entre a *pneuma* e o sangue que assim era distribuído para o corpo. O espírito vital tinha a função de alimentar, refrescar e vivificar, sendo ainda responsável pela inteligência e a fonação. Galeno ainda disse que existiam poros no septo que separa os ventrículos e seria através destes poros que o espírito vital iria do ventrículo direito para o esquerdo (Baskett, P.J. *et al.*, 2001; Rebollo, 2002; Rebollo, 2006)

As idéias de Galeno se tornaram dogmas e somente no século XIII um médico árabe chamado Ibn Nafis rejeitou a idéia de Galeno de que o sangue poderia ser transportado através do septo ventricular. No século XVI um professor de anatomia em Pádua, Andreas Vesalius (1514 – 1564), através de seu atlas de anatomia “*De Humani Corporis Fabrica*” mostrou que não existiam poros no septo ventricular. Na mesma época Michael Servetus (1511 – 1553) definiu claramente a circulação pulmonar e demonstrou o funcionamento das válvulas cardíacas e pulmonares. (Katz, 1957)

As bases dos conceitos modernos sobre circulação foram fundadas por William Harvey (1578 – 1657). Embora Servetus tenha descoberto a circulação anteriormente todas as cópias de seu manuscrito “*Christianismi Restitutio*” foram destruídas. Portanto Harvey redescobriu a circulação e o papel do sangue. Harvey também descreveu a função dos ventrículos e provavelmente foi o primeiro a descrever o infarto do miocárdio. Seus estudos foram publicados em um trabalho denominado “*Anatomical Treatise on the Motion of the Heart and Blood in Animals*” que para muitos é o trabalho mais importante na história da cardiologia (Rebollo, 1999; Azizi *et al.*, 2008).

Outras descobertas ajudaram a fundamentar as leis da cardiologia moderna. Dentre elas os efeitos da *Digitalis purpurea* por William Withering em 1785 como um importante princípio farmacológico que aumentava a contratilidade cardíaca. A descoberta do estetoscópio por Laennec em 1816, o uso de nitratos para o tratamento de angina por Lauder Brunton em 1867, o raio-X por Röntgen em 1895 e o eletrocardiograma por Einthoven em 1903 foram sem nenhuma dúvida descobertas marcantes para o estudo da fisiologia cardiovascular. Vários outros estudos foram realizados com o intuito de investigar a geração e condução dos impulsos nervosos no coração, dentre estes podemos destacar os estudos de Purkinje (1839), Wilhelm His (1898), Sunao Tawara (1906) e Keith & Flack (1906) (Opie, 1991; Silverman *et al.*, 2006).

Dois importantes trabalhos relacionados à contração cardíaca e ao metabolismo do coração foram realizados por Sidney Ringer e Oscar Langendorff respectivamente. Ringer afirmou que o cálcio era necessário para a contração do coração e Langendorff descreveu um sistema artificial para o estudo do coração ex – vivo que até os dias de hoje é bastante utilizado. (Zimmer, 1998)

O primeiro pesquisador a correlacionar contração com metabolismo em corações isolados foi Ernest Starling (1866 – 1927), onde demonstrou que a quantidade de sangue que é bombeado pelo coração está relacionada com a quantidade de sangue que entra, e que a força de contração depende do

estado de dilatação das cavidades do coração. Enquanto Starling estudava o aumento do comprimento inicial da fibra muscular pelo aumento do volume de sangue no coração, Otto Frank (1865 – 1944) descreveu o período denominado de contração isovolumétrica, isto é, o período onde a fibra muscular ventricular pode contrair sem que ocorra variação no volume de sangue do ventrículo. As descobertas de Frank e Starling culminaram com a proposta da Lei de Frank – Starling (Knowlton F.P., & Starling E.H., 1912; Markwalder J, & Starling E.H., 1914; Opie, 1991; Zimmer, 2002).

O advento de técnicas nas áreas da eletrofisiologia e biologia molecular contribuíram bastante para a descoberta de diversos mecanismos fisiológicos. Inúmeros pesquisadores têm então tentado demonstrar os aspectos moleculares do acoplamento excitação – contração, como Katz, Weidmann, Langer, Ebashi, Fozzard, Fabiato, Bers, Lederer dentre outros. Todos com a expectativa de que dogmas como os de Galeno sejam quebrados e assim possamos entender melhor o funcionamento do coração.

TIAMINA

A história das vitaminas, incluída a tiamina, remonta ao século passado, onde Funk (Funk, 1911) estudou os efeitos do consumo de arroz polido em pombos e o aparecimento de polineurite que era curada após a administração de uma substância que estava presente nos grãos de arroz ainda não polidos. Funk descreveu que a substância possuía a capacidade de curar o beribéri nos homens e a polineurite em pombos. Esta substância foi então chamada de fator antineurítico sendo isolada pela primeira vez por Suzuki *et al.*, em 1912.

Hoje sabemos que quimicamente a tiamina pesa 337 daltons (Rindi & Laforenza, 2000) sendo constituída de um anel pirimidínico e um tiazólico que são unidos por uma ponte de metileno formando então a tiamina monofosfatada (Figura - 1) (Oliveira, 1994; Begley *et al.*, 1999). A tiamina é encontrada preferencialmente nos cereais e nas carnes como peixe e porco. A tiamina não é a única vitamina do complexo B, este sendo composto por outras

vitaminas como riboflavina, niacina, piridoxina, nicotinamida, ácido pantotênico, ácido p – aminobenzóico, inositol, colina, biotina e ácido fólico. (Elliot *et al.*, 1995; Walter & Talbot 1996; Lonsdale, 2006)

Nem todos os seres vivos tem a capacidade de sintetizá-la necessitando então de adquiri-la através da alimentação (Pekovich *et al.*, 1998), onde é um nutriente essencial para todos os tecidos (Martin *et al.*, 2003). A tiamina é hidrossolúvel e pode ser encontrada em quatro formas diferentes: livre (Oliveira, 1994), monofosfatada (Tiamina monofosfato), pirofosfatada (Tiamina pirofosfato) e trifosfatada (Tiamina trifosfato). A tiamina pirofosfato é a forma mais abundante e fisiologicamente ativa (Rindi & Laforenza, 2000). Um indivíduo adulto deve ingerir em média cerca de 1,0 miligrama de tiamina por dia que é absorvida pelo intestino delgado, (Parentoni, 2002) e então estocada em grandes quantidades nos músculos esquelético estriado e cardíaco, fígado, rins e cérebro (Singleton & Martin, 2001).

Absorção da tiamina ingerida pela alimentação ocorre principalmente na porção proximal do intestino liso, também podendo ocorrer em menor ênfase no estômago e no colón. A tiamina possui um valor máximo de absorção, isto é, valores ingeridos superiores a 2,5 miligramas diários não conseguem ser absorvidos e são então eliminados pelo organismo. A forma pela qual a tiamina é absorvida é a forma não fosforilada, esta podendo ser tanto por transportadores com gasto de energia ou por difusão simples. A absorção ainda pode ser inibida por anóxia e baixas temperaturas. (Rindi & Laforenza, 2000)

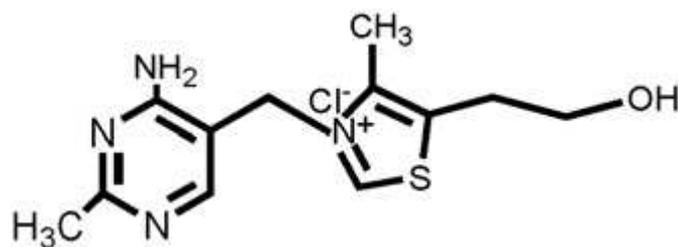


Figura 1. Tiamina. Tiamina livre (Depeint *et al.*, 2006).

A forma ativa é co-fator para diversas enzimas envolvidas no metabolismo intermediário como a transcetolase, o complexo da piruvato desidrogenase e a alfa – cetogluturato desidrogenase dentre outras (Figura - 2) (Pekovich *et al.*, 1998; Stryer, 2004)

A deficiência em tiamina pode ocorrer devido a diversos fatores como uma alimentação inadequada, consumo de alimentos contendo tiaminases ou alimentos que passaram por um longo tempo de cozimento visto que a tiamina é a única vitamina do complexo B sensível ao calor (Walter & Talbot 1996). A deficiência também é observada em pacientes com desordens gastrointestinais, alcoolismo crônico, HIV positivos dentre outros. (Butterworth, 2001)

No ser humano a deficiência de tiamina causa duas síndromes distintas. A *wet beribéri* é caracterizada por insuficiência cardiovascular e a *dry beribéri* que se caracteriza por afetar o sistema nervoso causando neuropatia periférica. (Wilcox & Schereiner, 2004). Seus principais sintomas são: paralisia muscular, fraqueza, perda de peso e taquicardia (Martin *et al.*, 2003)

Do ponto de vista bioquímico e metabólico a deficiência em tiamina diminui a atividade da piruvato desidrogenase, α – cetogluturato desidrogenase e transcetolase. Esta última é uma enzima da via das pentoses que converte a glicose 6-fosfato em ribose 5-fosfato e produz equivalente redutor na forma de NADPH (Martin *et al.*, 2003). A piruvato desidrogenase converte o piruvato em acetil – coenzima A, a qual alimenta o ciclo do ácido cítrico que está diretamente relacionado com a produção de energia nas células eucariotas. (Parentoni, 2002). A α – cetogluturato desidrogenase converte o α – cetogluturato em succinil – coenzima A no ciclo do ácido cítrico. Uma diminuição da atividade das enzimas piruvato desidrogenase e α – cetogluturato desidrogenase resultam em uma diminuição da síntese de ATP (Singleton & Martin, 2001; Stryer, 2004)

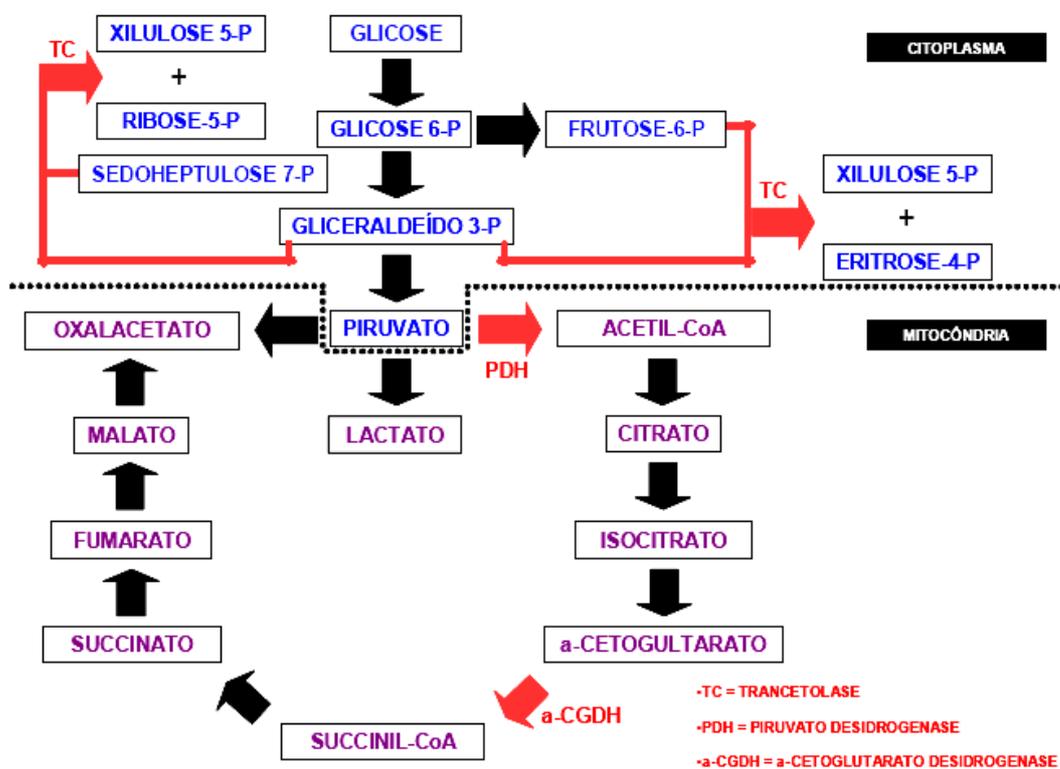


Figura 2. Vias metabólicas que utilizam a tiamina como co-fator enzimático. A tiamina atua como co-fator em diversas enzimas do metabolismo dos carboidratos. Entre elas podemos citar a transcetolase, α -cetogultarato desidrogenase e piruvato desidrogenase. As setas vermelhas indicam as reações que envolvem enzimas dependentes de tiamina. (Oliveira, 2006)

Como conseqüência da deficiência em tiamina ocorre então o comprometimento das enzimas relacionadas com o metabolismo intermediário dos carboidratos podendo ocorrer um aumento nos níveis de lactato e piruvato. A diminuição da síntese de ATP ocorre em decorrência da diminuição da produção de equivalentes redutores (NADH e FADH_2) através do ciclo do ácido cítrico os quais seriam re-oxidados pelos complexos I e II da cadeia respiratória. Portanto ocorre a diminuição do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço submembranoso da mitocôndria o que por sua vez diminui o gradiente eletroquímico o que por fim deixa de estimular a enzima ATP – sintase que tem como papel sintetizar ATP. Além de gerar energia na forma de ATP estas enzimas também possuem um papel importante na produção de neurotransmissores como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e aspartato (Martin *et al.*, 2003; Stryer, 2004).

Em ratos a redução da atividade de enzimas em que a tiamina atua como co-fator pode ser observada após uma dieta deficiente em tiamina. Após 14 dias a atividade da transcetolase no tecido nervoso cai para 40 % do valor normal (Munujos, *et al.*, 1996). Após 13 dias a atividade da alfa - cetoglutarato desidrogenase cai para 35% no tálamo e 55% no córtex (Sheu, 1998). O estresse oxidativo devido à deficiência em tiamina é sugerido como causa de diversas doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Wernick e Korsakoff. (Mousseau *et al.*, 1996; Stryer, 2004)

Os efeitos decorrentes da deficiência em tiamina podem ser revertidos com a administração de tiamina via intravenosa. Porém no caso da encefalopatia de Wernicke a demora no tratamento pode levar a lesões cerebrais irreparáveis. (Butterworth, 1982; Walter & Talbot 1996)

CANAL PARA POTÁSSIO SENSÍVEL A ATP (K_{ATP})

Os canais para potássio sensíveis a ATP foram descritos primeiramente por Noma em células musculares cardíacas do ventrículo esquerdo. (Noma, 1983). Em seguida estes canais também foram descritos em células musculares esqueléticas e em células pancreáticas secretoras de insulina. Podemos então dizer que os canais K_{ATP} fazem a ligação entre o metabolismo celular e a atividade elétrica da membrana plasmática regulando o fluxo de íons potássio através da membrana. Primeiramente estes canais foram denominados de canais para potássio dependentes de ATP devido ao ATP ter sido o primeiro modulador descrito para o canal. (Edwards & Weston 1993; Seino & Miki, 2004). Hoje em dia sabemos que vários outros fatores endógenos modulam a atividade do canal como pH, ácidos graxos, óxido nítrico, nucleotídeos, adenosina, acetilcolina etc (Edwards, 1993; Grover, 2000). Fatores exógenos também podem modular os canais K_{ATP} , como o diazóxido e o nicorandil que preferencialmente ativam o K_{ATP} mitocondrial ou pinacidil ou cromacalim que ativam tanto os K_{ATP} mitocondriais como os canais K_{ATP} presentes no sarcolema. Já a glibenclamida bloqueia K_{ATP} tanto mitocondrial

como do sarcolema e o 5-hidroxidecanoato bloqueia preferencialmente o K_{ATP} mitocondrial (Grover & Garlid, 2000; O'rourke, 2004).

Os K_{ATP} são formados por duas subunidades protéicas. A Kir6.x que é um membro da família dos canais retificadores de entrada (Seino & Miki, 2004) e uma subunidade moduladora que se liga as sulfoniluréas (SUR) (Enkvetchakul & Nichols, 2003). Para ser funcional um canal K_{ATP} precisa da interação de quatro subunidades Kir que formam o poro e quatro subunidades SUR que o regulam formando assim um octâmero (Nichols, 2006).

A subunidade Kir apresenta dois domínios transmembrana denominados M1 e M2 que irão formar o poro do canal e controlar a seletividade do mesmo. Dois tipos ou duas formas distintas da subunidade Kir, Kir 6.1 e Kir 6.2, estão associadas com o funcionamento dos K_{ATP} (Grover & Garlid, 2000).

A subunidade SUR é membro de uma superfamília de proteínas chamadas de ABC (*ATP binding cassette*) que utilizam a energia da hidrólise do ATP para realizar outras ações. (Burke, 2008). Igualmente à subunidade Kir, dois tipos de subunidades SUR podem compor o K_{ATP} . A SUR1 que é altamente expressa em células beta pancreáticas e a SUR2 que é expressa em células musculares esqueléticas e cardíacas (Grover & Garlid, 2000). A subunidade SUR contém dois domínios com 6 hélices transmembrana cada (TMD1 – TMD2) e outro domínio contendo 5 hélices transmembrana (TMD0). A subunidade SUR também apresenta duas regiões de ligação a nucleotídeos, NBF1 entre TMD1 e TMD2, e NBF2 após TDMD2. Estes nucleotídeos têm como função regular a atividade do K_{ATP} . O nucleotídeo NBF2 possui a capacidade de hidrolisar o ATP tendo como passo essencial a ligação de uma molécula de Mg^{2+} enquanto o NBF1 tem afinidade pelo ATP e ADP modulando assim o K_{ATP} . (Enkvetchakul,D. & Nichols,C.G., 2007; Burke, 2008)

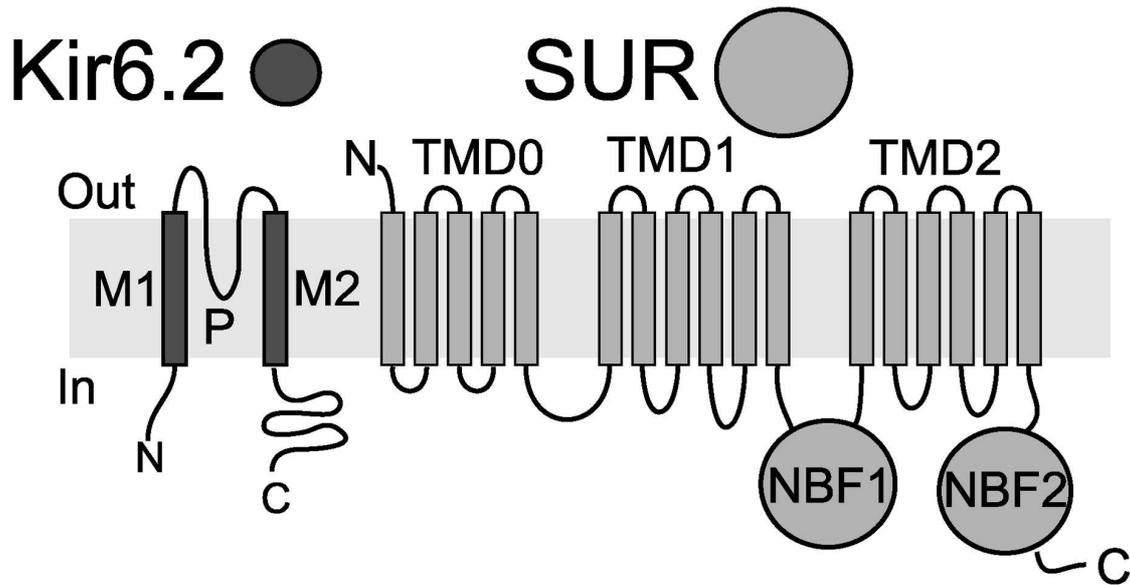


Figura 3. Canal para potássio sensível a ATP: Subunidade Kir6 que forma o poro do canal e subunidade reguladora SUR. (Enkvetchakul,D.& Nichols,C.G. 2007)

CANAL MITOCONDRIAL PARA POTÁSSIO SENSÍVEL A ATP

Os canais mitocondriais sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}) foram descritos pela primeira vez por Inoue e colaboradores (1991) em mitoplastos provenientes de fígado de ratos através da técnica de patch-clamp. Recentemente, os canais mitoK_{ATP} foram identificados como fundamentais na resposta cardioprotetora apresentada no modelo de isquemia e reperfusão (Dos Santos *et al.*, 2002; O'rourke, 2004).

ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Injúrias de reperfusão referem-se a disfunções celulares que ocorrem em virtude do restabelecimento do fluxo sanguíneo após uma isquemia. Dentro dos vários tipos de alterações durante o período de reperfusão estão as arritmias que incluem as arritmias ventriculares como taquicardias e fibrilações que ocorrem após o retorno do fluxo sanguíneo (Birnbaum *et al.*, 1997). Acidose intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da concentração de cálcio intracelular, diminuição da concentração de potássio

intracelular, perda da funcionalidade mitocondrial dentre outras causas podem desencadear as arritmias de reperfusão (Akar & Akar, 2006).

Os efeitos deletérios que ocorrem após a reperfusão criaram vários paradoxos. A reoxigenação do miocárdio após uma isquemia gera uma quantidade de radicais livres superior a que foi produzida durante a isquemia. Promovendo assim efeitos deletérios mais graves do que os produzidos pela isquemia. Com a reperfusão ocorre também um aumento abrupto na concentração de cálcio citoplasmático podendo resultar na morte da célula cardíaca. Vários fatores então ligam os efeitos nocivos da reperfusão a disfunções mitocondriais. (Eefting *et al.*, 2004; Ramaraj *et al.*, 2007)

Nos últimos anos tem se estudado as diversas conseqüências da reperfusão do músculo cardíaco. Um dos principais modelos para o estudo deste fenômeno é o modelo desenvolvido por Langendorff que permite estudos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos de uma maneira simples com alta reprodutividade e baixo custo fazendo deste modelo experimental uma poderosa ferramenta em pesquisas cardiovasculares. (Skrzypiec-Spring, *et al.*; 2007). Recentemente através de experimentos de perfusão em modelo de Langendorff os canais mitoK_{ATP} foram identificados como fundamentais na resposta cardioprotetora apresentada no modelo de isquemia e reperfusão (Dos Santos *et al.*, 2002; O'rourke, 2004).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares constituem um dos principais problemas do mundo moderno liderando as causas de morte e invalidez (Stanley *et al.*, 2005). Arritmias ventriculares com conseqüente morte súbita são as principais causas de mortalidade em pacientes com falência cardíaca (Akar & Akar, 2006).

A deficiência em tiamina (vitamina B1) constitui outro problema que afeta diversas pessoas no mundo (Butterworth, 2001). Inúmeros trabalhos têm demonstrado os efeitos da deficiência em tiamina no sistema nervoso (Oliveira *et al.*, 2007a; Carvalho *et al.*, 2006; Pannunzio *et al.*, 2000), pouco porém se conhece sobre seus efeitos no sistema circulatório, principalmente no coração (Oliveira *et al.*, 2007b).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que animais com alimentação deficiente em tiamina não desenvolveram arritmias de reperfusão (Oliveira *et al.*, 2007b).

Problemas cardiovasculares lideram as causas de morte de acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007). Existindo uma enorme necessidade de desenvolver estratégias para prevenir e tratar disfunções do miocárdio na população humana (Juhaszova *et al.*, 2005). Um passo crítico para tal é o desenvolvimento de ferramentas moleculares/bioquímicas para entender os mecanismos sub – celulares responsáveis pela injúria de reperfusão. Um dos centros reguladores da tolerância celular ao estresse metabólico é a mitocôndria, com um papel essencial na manutenção da homeostase energética (Jahangir *et al.*, 2001). As mitocôndrias ocupam um volume entre 30 e 40% das células cardíacas sendo responsáveis pela geração de mais de 90% de toda a ATP no cardiomiócito (Murphy & Steenbergen, 2007). Além disso, as mitocôndrias atuam como reguladores centrais podendo determinar a vida ou a morte celular (Kroemer & Reed, 2000). A manutenção das propriedades mitocondriais é portanto fator chave para a sobrevivência do tecido após condições de isquemia e reperfusão. O transporte iônico, a produção de ATP e a produção e liberação

de espécies reativas de oxigênio são fatores chaves para a sobrevivência do tecido após condições de isquemia e reperfusão (Garlid & Paucek, 2001 Ferranti *et al.*, 2003). Disfunções mitocondriais podem gerar diversas doenças neurodegenerativas como também cardiomiopatias (Duchen, 2004). Estudos recentes demonstraram que os canais para potássio sensíveis a ATP presentes na membrana mitocondrial interna (mitoK_{ATP}) são um dos principais responsáveis pela cardioproteção (Carreira *et al.*, 2005).

Estes resultados nos levaram a investigar qual(is) é (são) o(s) mecanismo(s) de cardioproteção no nosso modelo experimental.

OBJETIVO GERAL:

Estudar as alterações fisiológicas e morfológicas no músculo cardíaco de animais submetidos à deficiência em tiamina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Verificar a ocorrência de arritmias de reperfusão em animais deficientes ou não em tiamina após 30, 45 ou 60 minutos de isquemia.
2. Verificar efeitos de antagonistas (5 – hidroxidecanoato) e agonistas (diazóxido) para o canal mitoK_{ATP} em corações submetidos a isquemia e reperfusão em modelo de Langendorff.
3. Verificar se a deficiência em tiamina produz alterações sobre a concentração de Ca²⁺ na matriz mitocondrial.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos entre o segundo e terceiro mês de idade fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, e mantidos em caixas plásticas em ciclo claro/escuro (12h/12h) no biotério do Laboratório de Membranas Excitáveis desta mesma instituição (BIOMEX). Os animais foram divididos em dois grupos: controle com dieta com tiamina e deficiente com dieta sem tiamina. Ambos os grupos tinham livre acesso a água e comida. Os procedimentos experimentais estão registrados no comitê de ética em experimentação animal (CETEA) com o número de protocolo 042/06.

DIETA

Ambas as dietas foram produzidas no próprio laboratório diferindo apenas quanto a presença ou não da tiamina de acordo com (Pires *et al.*, 2001).

| Nutriente | Quantidade em g/kg de ração |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Amido de milho | 676 |
| Caseína | 200 |
| Óleo de soja | 50 |
| Mistura de sais ^a | 50 |
| Mistura de vitaminas ^b | 10 |
| Celulose | 10 |
| Colina – HCl | 4 |
| Alfa – Tocoferol | 0,1 |

Tabela – 1: Composição da dieta normal e deficiente em tiamina

a ver tabela 2 b ver tabela 3

| Sais minerais | Quantidade em g% |
|---------------------------------------|-------------------------|
| NaCl | 13,93 |
| KI | 0,08 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 5,73 |
| CaCO ₃ | 38,14 |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 0,40 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 2,70 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0,05 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,05 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,02 |
| KH ₂ PO ₄ | 38,90 |

Tabela – 2: Composição da mistura de sais

| Vitamina | Quantidade em g/kg |
|-----------------------|---------------------------|
| Acetato de retinol | 4,0 |
| Colecalciferol | 0,6 |
| Menadiona | 0,5 |
| i – Inositol | 10,0 |
| Niacina | 4,0 |
| Pantotenato de Cálcio | 4,0 |
| Riboflavina | 0,8 |
| Tiamina – HCl * | 0,5 |
| Piridoxina | 0,5 |
| Ácido fólico | 0,2 |
| Biotina | 0,04 |
| Vitamina B12 | 0,003 |
| Sacarose | 974,9 |

Tabela – 3: Composição da mistura de sais

* ausente na dieta experimental

ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO SISTEMA DE LANGENDORFF

Os experimentos de isquemia e reperfusão foram realizados em modelo de Langendorff (Santos *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005). O sistema consiste de um tubo de vidro de aproximadamente 12 milímetros de diâmetro 90 centímetros de altura. Na extremidade inferior, o tubo é conectado a uma pequena cânula. Entre o tubo de vidro e o reservatório com a solução nutritora,

cujo suporte regulável permitia o ajuste da pressão de reperfusão que foi mantida em torno de 65 mm de Hg durante todo o experimento. O tubo de vidro era envolto por uma jaqueta de água em circulação aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A oxigenação foi feita diretamente no interior do tubo por meio de uma entrada localizada na base deste, a qual é conectada a saída da válvula reguladora do cilindro de carbogênio possibilitando assim o borbulhamento de mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) na solução nutritora.

| Composto | Concentração em mM |
|---|---------------------------|
| NaCl | 118,41 |
| KCl | 4,69 |
| KH_2PO_4 | 1,17 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,17 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,51 |
| Dextrose Anidra (glicose) | 11,65 |
| NaHCO_3 | 26,24 |

Tabela – 4: Solução nutritora Krebs – Ringer

Após um período de 35 dias os animais foram decapitados 15 minutos após a administração intraperitoneal de 400IU de heparina (Liquemine®). Em seguida foi realizada a toracotomia com a abertura das cartilagens costocondrais em ambos os lados e o rebatimento do externo. Exposta então a cavidade torácica seccionava-se a veia cava inferior, a veia cava superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago bem como parte dos pulmões, retirando-o assim em bloco. Depois de retirado o coração foi colocado em um béquer contendo solução nutritora oxigenada e resfriada com o propósito de diminuir o metabolismo do miocárdio e consumo de O_2 nos instantes anteriores

a canulação. O coração foi então colocado em uma placa de Petri onde os tecidos pulmonares e vasculares restantes foram removidos juntamente com a traquéia e esôfago.

O próximo passo foi seccionar a aorta ascendente na altura da primeira ramificação (tronco braquicefálico) e introduzi-la em uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de reperfusão com a solução nutridora.

Após o período de estabilização de 30 minutos foi realizada a oclusão da artéria coronária descendente esquerda. Com o auxílio de um porta agulha, passava-se um fio em volta da artéria coronária descendente esquerda que era amarrado em volta de um palito contra a artéria. Para se ter confirmada a oclusão o fluxo coronariano deveria cair pela metade assim como a tensão sistólica. O tempo de oclusão variou de acordo com os protocolos experimentais.

REGISTROS

A. Contração

A força de contração foi captada através de um pequeno anzol fixado ao ápice do coração que por sua vez conectava-se ao transdutor de força por meio de uma linha que passava através de uma roldana. Aplicava-se então uma tensão de força de $1,0 \pm 0,5$ grama ao coração (tensão diastólica) a qual era mantida durante o período de estabilização de 30 min.

B. Fluxo Coronariano

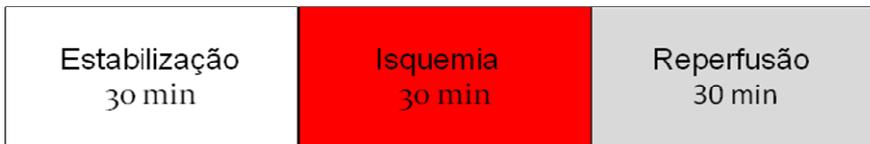
O volume do fluxo coronariano (ml/min) foi determinado colhendo o perfusato durante 1 minuto e definindo o volume em mililitros com o auxílio de uma proveta graduada (10 ml).

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

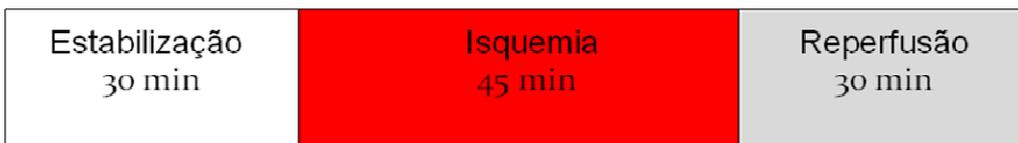
Todos os grupos experimentais foram realizados com animais controle e deficientes em tiamina. A legenda abaixo servirá como referência para todas as figuras dentro deste item.

-  = Estabilização
-  = Isquemia
-  = Reperusão
-  = 5 – hidroxidecanoato ou diazóxido

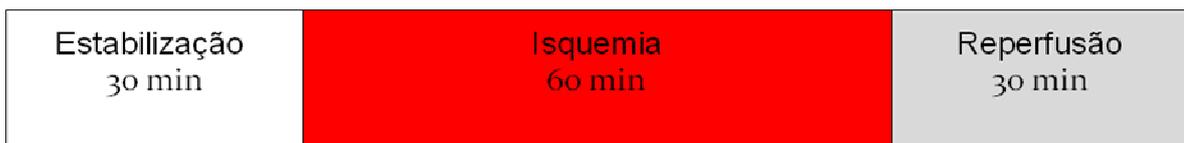
Grupo 1



Grupo 2



Grupo 3



Grupo 4 (5 – hidroxidecanoato)

| | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Estabilização 30 min | 5 – HD 20 min | Isquemia 30 min | Reperusão 30 min |
|-------------------------|------------------|--------------------|---------------------|

Grupo 5 (Diazóxido)

| | | | |
|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Estabilização 30 min | Diazóxido 20 min | Isquemia 30 min | Reperusão 30 min |
|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|

OBTENÇÃO DE CÉLULAS CARDÍACAS ISOLADAS

O procedimento de preparo do animal para retirada do coração foi similar ao mencionado anteriormente. Após este o coração foi colocado em uma placa de Petri contendo aproximadamente 150 ml de solução tampão (Tabela - 5) a aproximadamente 4° C acrescida de 25 microlitros de insulina para cada 250 mililitros de solução tampão, com pH em 7.4 ajustado com NaOH, que tinha como objetivo diminuir o metabolismo do tecido cardíaco. Os tecidos pulmonares e vasculares restantes foram removidos juntamente com a traquéia e esôfago. O coração foi então canulado pelo coto da aorta em uma cânula com o auxílio de duas pinças, e fixado na cânula por uma linha. O coração canulado foi então colocado no sistema de Langendorff para o início da perfusão retrógrada. O processo de dissociação enzimática do tecido cardíaco foi realizado como descrito por Mitra e Morad (1985) e modificado por Shioya em 2008. Basicamente uma solução extracelular contendo baixa concentração de Ca^{2+} adicionada de 1mg/ml de colagenase tipo II é perfundida através das coronárias por aproximadamente 25 minutos. Após este período o coração foi cortado em pequenos fragmentos e a concentração de Ca^{2+}

extracelular restaurada paulatinamente. As células então obtidas ficaram armazenadas em meio DMEM.

| Composto | Concentração em mM |
|----------------------------------|---------------------------|
| NaCl | 130 |
| KCl | 5,4 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,33 |
| MgCl ₂ | 0,5 |
| Ácido Láctico | 1 |
| Dextrose Anidra (glicose) | 22 |
| HEPES | 2,5 |
| Ácido Pirúvico | 3 |

Tabela – 5: Solução Tampão

MICROSCOPIA CONFOCAL

Todas as imagens foram feitas através do microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) (Cemel/ICB – UFMG). Após a obtenção, os cardiomiócitos foram carregados com 100 nmol/litro de Mitotracker Green FM (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 80 minutos ou com Rhod 2 AM 6 µmol/litro por 30 minutos (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Ambas as marcações foram feitas em estufa a 37°C e 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Após o carregamento dos cardiomiócitos com Mitotracker Green FM estes foram lavados para em solução fisiológica de Tyrode para remover o excesso da sonda fluorescente, e re – suspensos. Os cardiomiócitos carregados com Rhod 2 AM também foram lavados e re – suspensos após o

período de incubação , porém estes com DMEM. Tanto os cardiomiócitos carregados com Mitotracker Green FM como com Rhod 2 AM foram iluminados (comprimento de onda de 488 nanômetros) e o sinal fluorescente medido a um comprimento de onda acima de 520 nanômetros.

ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média. Os testes realizados foram t de *Student*. A significância foi estabelecida para um $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente em tiamina submetidos à isquemia por 30 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca)

A primeira fase do estudo procurou averiguar a ocorrência ou não, de contraturas após 30 minutos de oclusão da artéria coronária descendente esquerda. Tanto em animais submetidos a uma dieta controle, como em animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina. Além disto, também foram analisadas a frequência cardíaca, tensão sistólica, tensão diastólica, $+dT/dt$, e $-dT/dt$. Os animais submetidos a uma dieta controle apresentaram contratura irreversível de reperfusão praticamente em todos os animais com exceção de um ($n = 5$). Já os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina não apresentaram contraturas após isquemia em nenhum dos animais ($n = 5$).

As figuras 4 e 5 ilustram registros típicos da tensão cardíaca nos corações dos animais controle e deficiente. Na figura 4 pode-se observar o aparecimento das contraturas nos animais controle, e na figura 5 pode se observar a ausência das contraturas nos animais deficientes.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais após a oclusão da artéria coronária descendente esquerda por um período de 30 minutos. A única exceção foi a tensão diastólica durante a reperfusão.

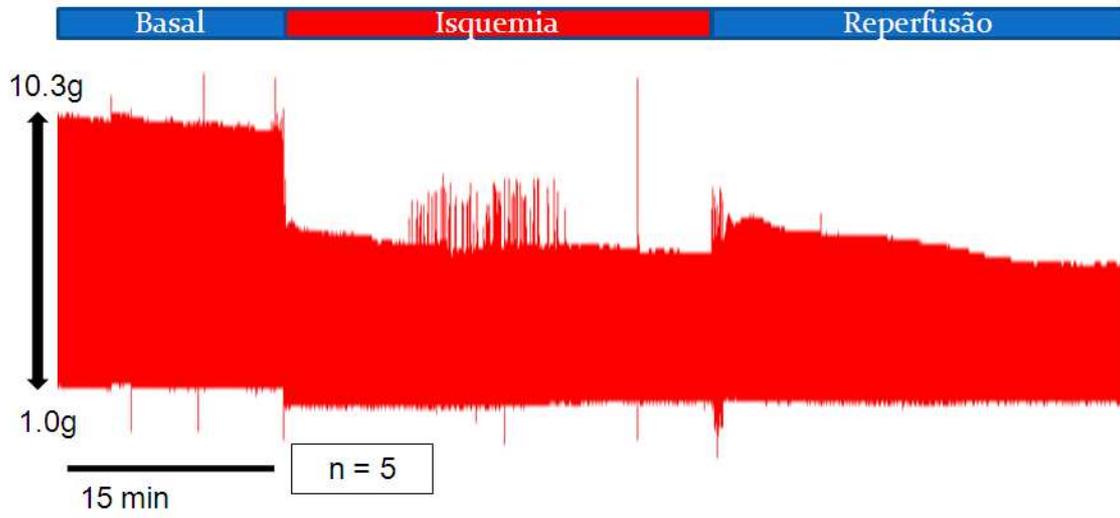


Figura 4. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta controle submetidos a 30 minutos de isquemia.

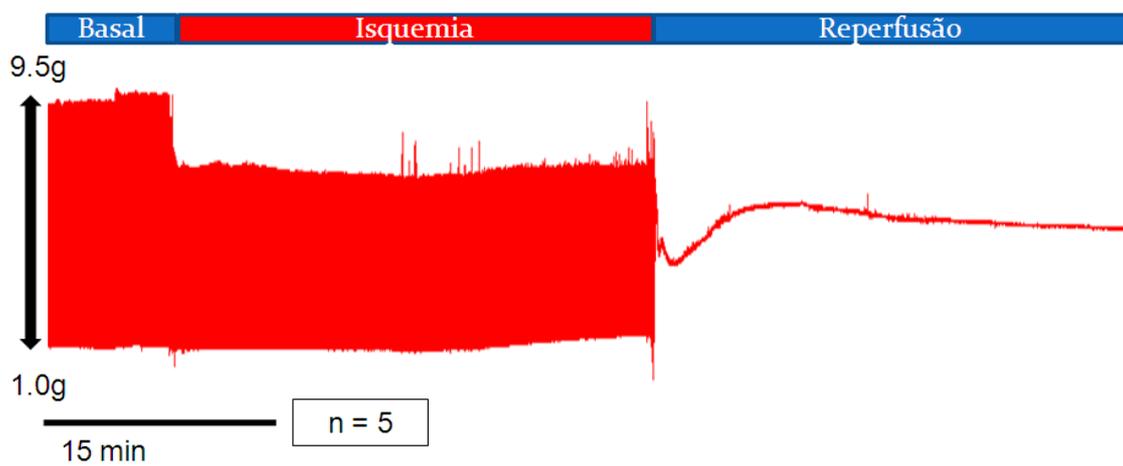


Figura 5. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 30 minutos de isquemia.

Durante todo o experimento não foram observadas diferenças em relação à frequência cardíaca, batimentos por minuto (BPM), nem tensão sistólica (gramas), entre os animais submetidos a uma dieta controle com os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina (Figuras 6 e 7 respectivamente).

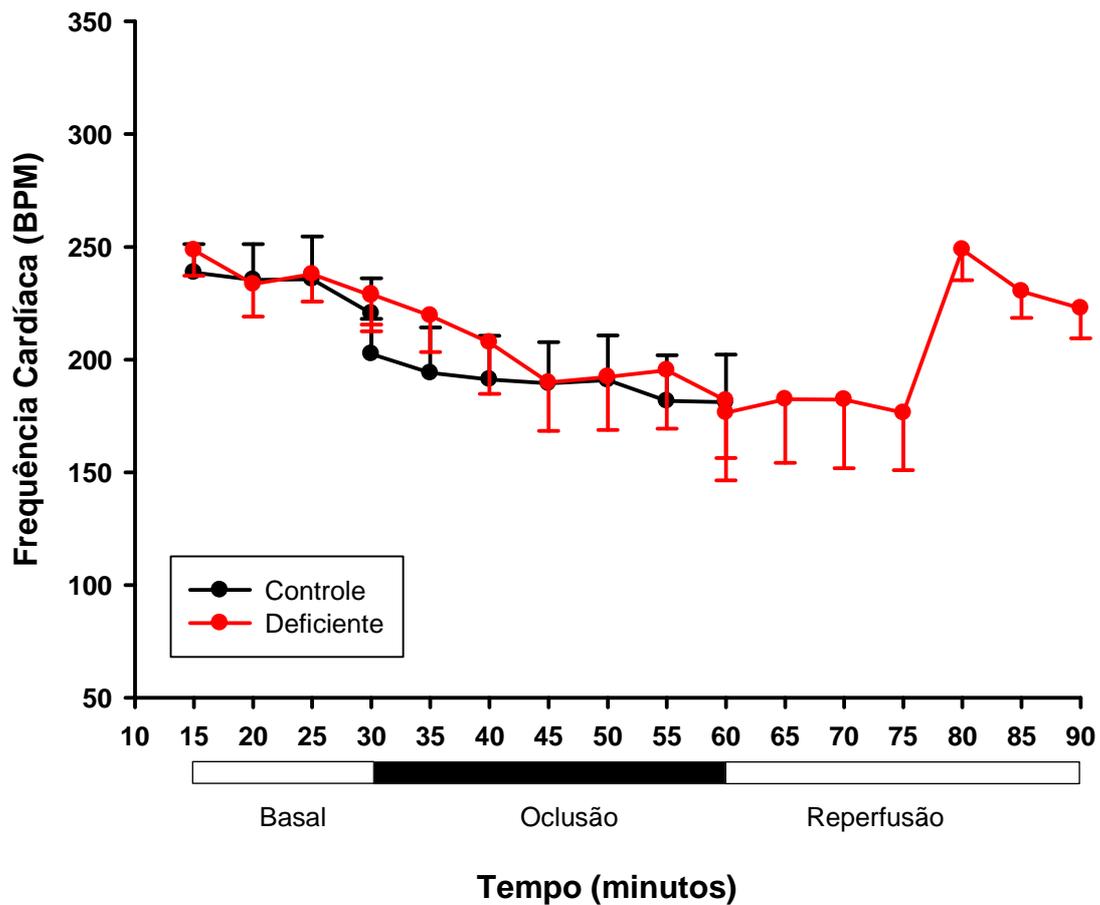


Figura 6. Frequência Cardíaca (BPM) 30 minutos isquemia – Gráfico representando frequência cardíaca em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 30 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

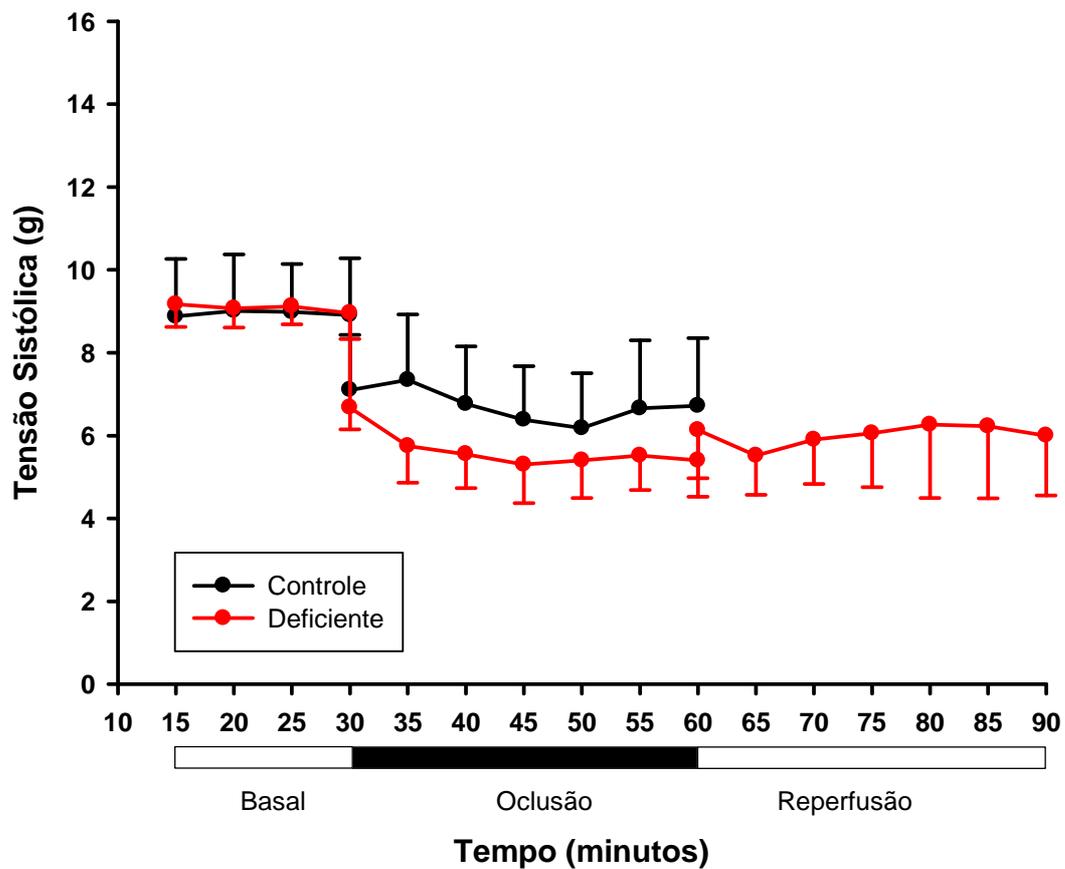


Figura 7. Tensão Sistólica (g) 30 minutos isquemia – Gráfico representando tensão sistólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 30 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

Os animais submetidos a uma dieta controle apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da tensão sistólica durante a reperfusão quando comparados aos animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina. Como demonstrado na figura 8.

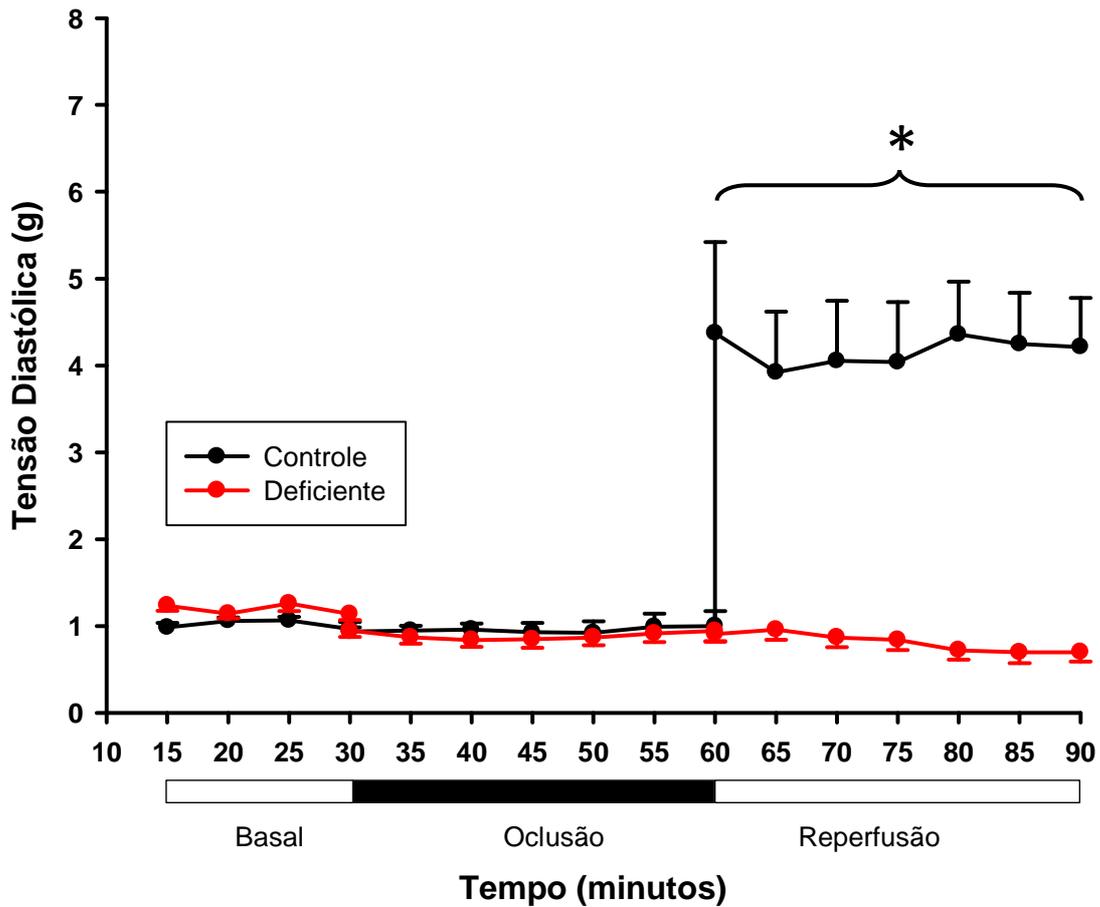


Figura 8. Tensão Diastólica (g) 30 minutos isquemia – Gráfico representando tensão diastólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 30 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; * $P < 0,05$.

Não foram observadas diferenças em relação à dT/dt máxima (g/s) ou dT/dt mínima (g/s) entre os animais submetidos a uma dieta controle com os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina (Figuras 9 e 10 respectivamente).

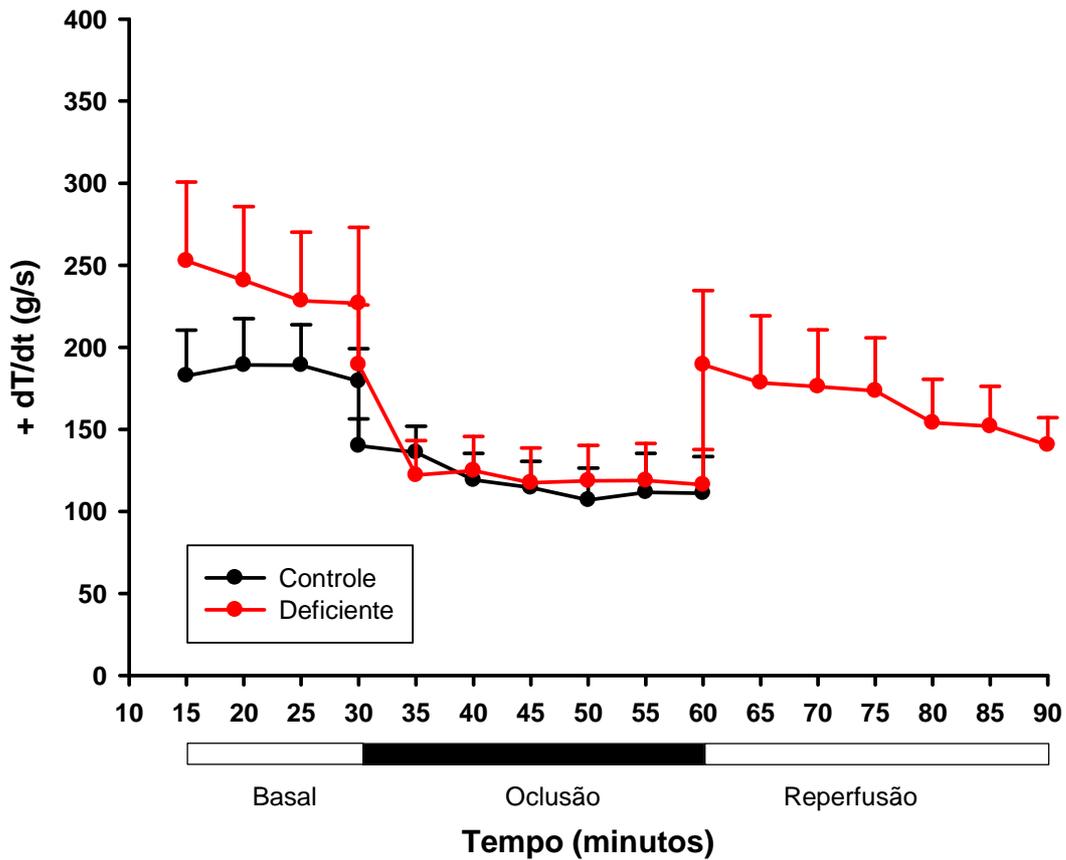


Figura 9. $+dT/dt$ (g/s) 30 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt máximo em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 30 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

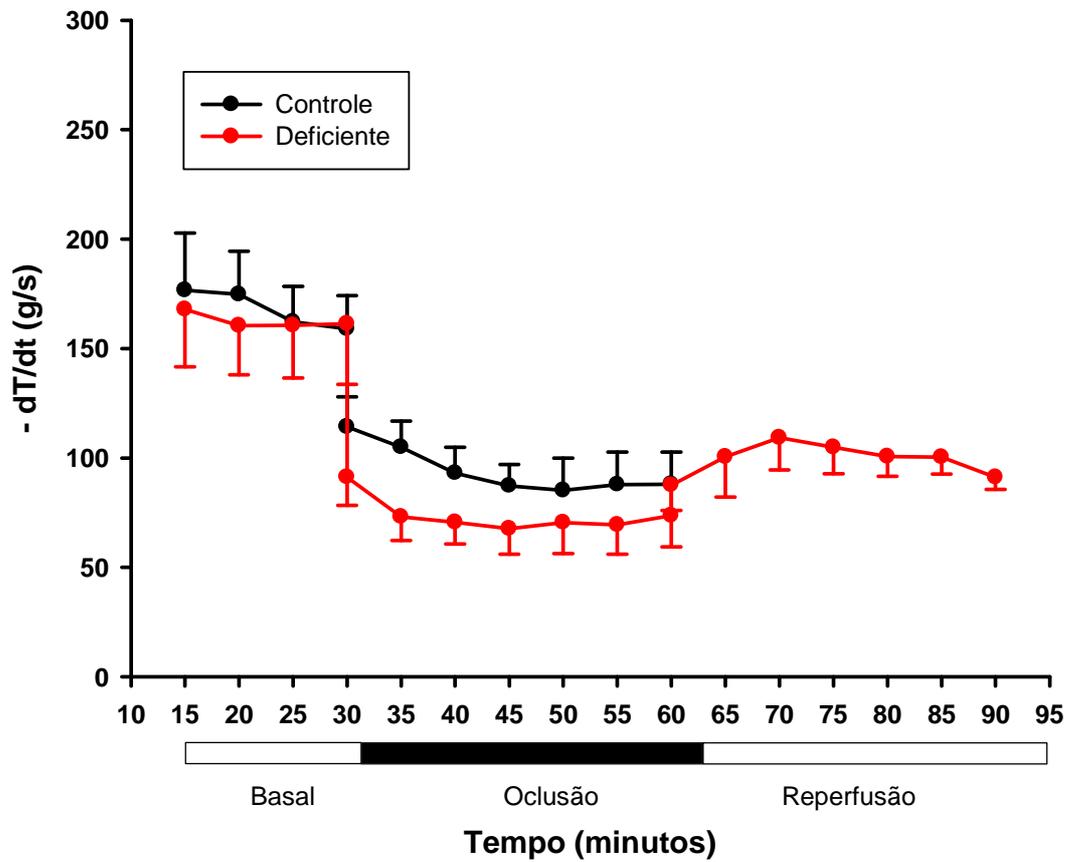


Figura 10. - dT/dt (g/s) 30 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt mínimo em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 30 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

2. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente submetidos à isquemia por 45 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca)

Após averiguar que a oclusão da artéria coronária descendente esquerda, não gerou contratatura após 30 minutos de isquemia em animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina, resolvemos aumentar o tempo de isquemia para 45 minutos, afim de verificar a continuidade do não aparecimento das contraturas de reperfusão. Portanto a segunda fase do estudo procurou investigar a ocorrência ou não de contraturas de reperfusão após 45 minutos de oclusão da artéria coronária descendente esquerda tanto em animais submetidos a uma dieta controle como animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina, como também analisar a frequência cardíaca, tensão sistólica, tensão diastólica, dT/dt máxima, e dT/dt mínima de ambos os grupos experimentais.

Para a nossa surpresa tanto os animais submetidos a uma dieta controle (n = 6) como uma dieta deficiente em tiamina (n = 6) não apresentaram contratatura após 45 minutos de isquemia. As figuras 11 e 12 ilustram registros típicos da tensão cardíaca nos corações dos animais submetidos a uma dieta controle e deficiente respectivamente.

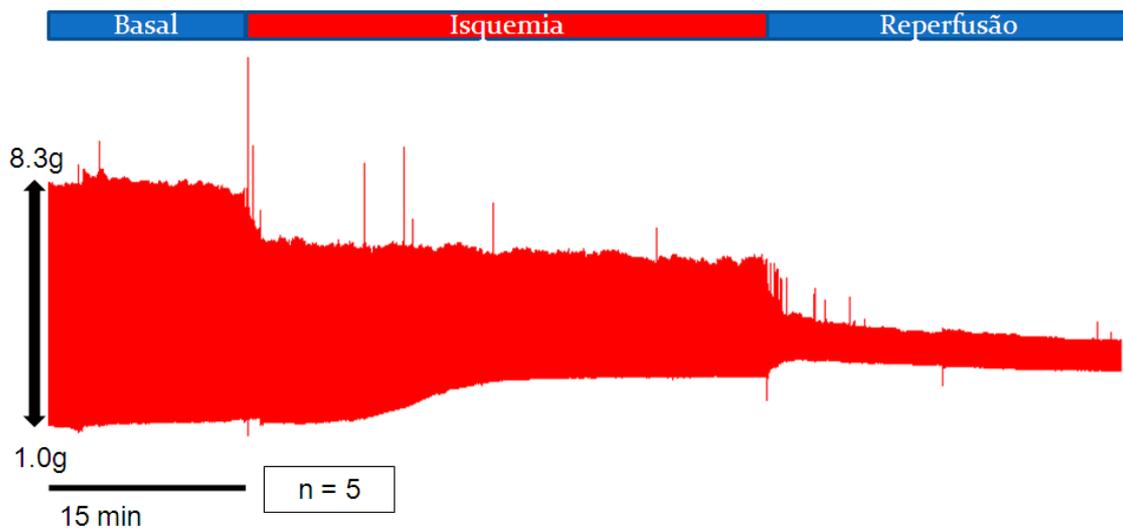


Figura 11. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta controle submetidos a 45 minutos de isquemia.

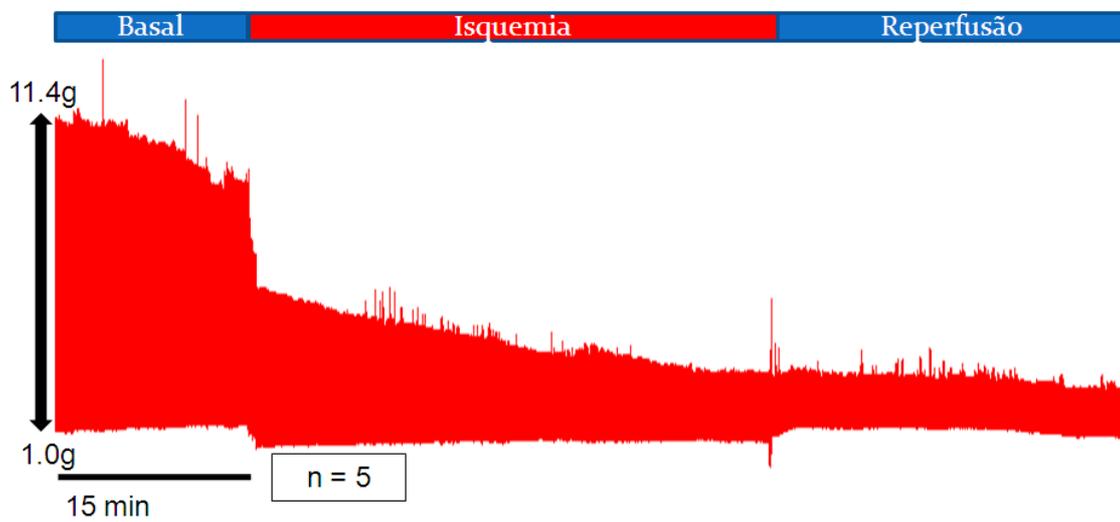


Figura 12. Registro representativo de tensão cardíaca dos animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 45 minutos de isquemia.

Não foram observadas diferenças em relação à frequência cardíaca, batimentos por minuto (BPM), entre os animais submetidos a uma dieta controle com os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina (Figura 13).

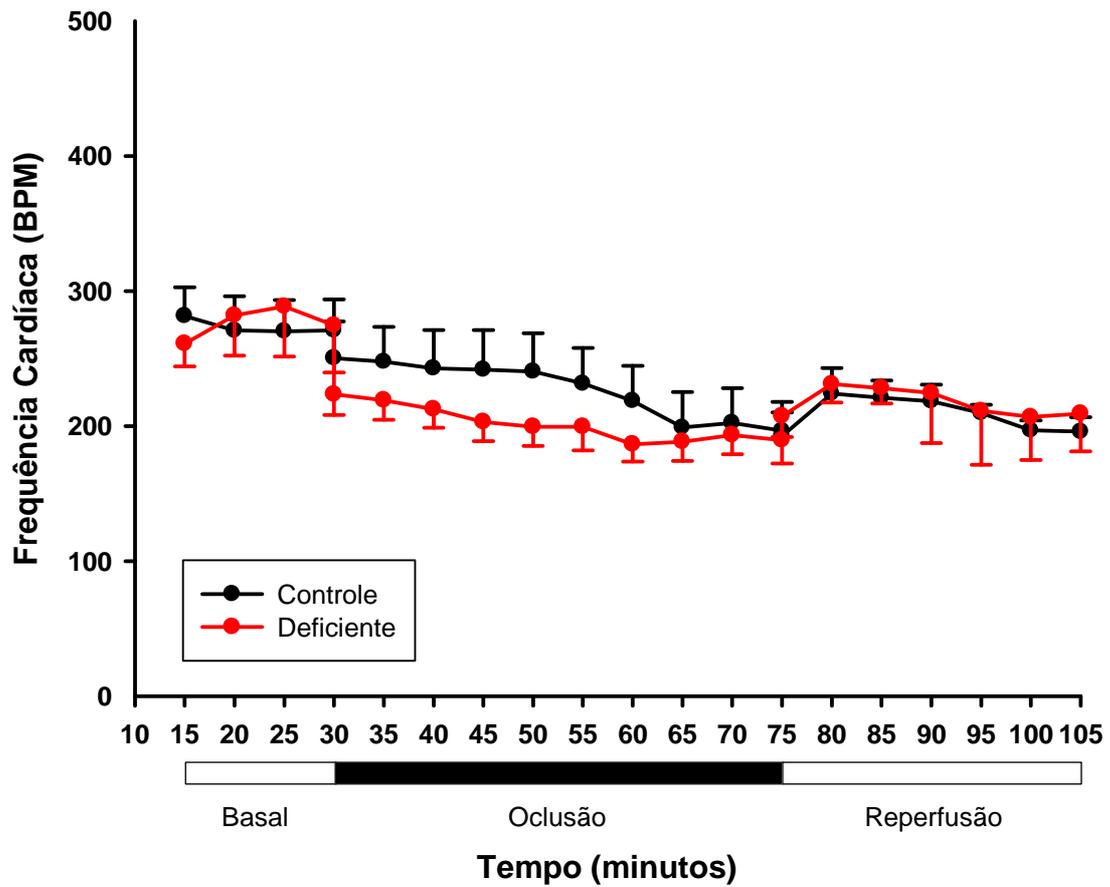


Figura 13. Frequência Cardíaca (BPM) 45 minutos isquemia – Gráfico representando frequência cardíaca em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 45 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

Os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da tensão sistólica durante apenas um período (15 minutos) da estabilização quando comparados aos animais submetidos a uma dieta controle como pode ser observado na figura 14.

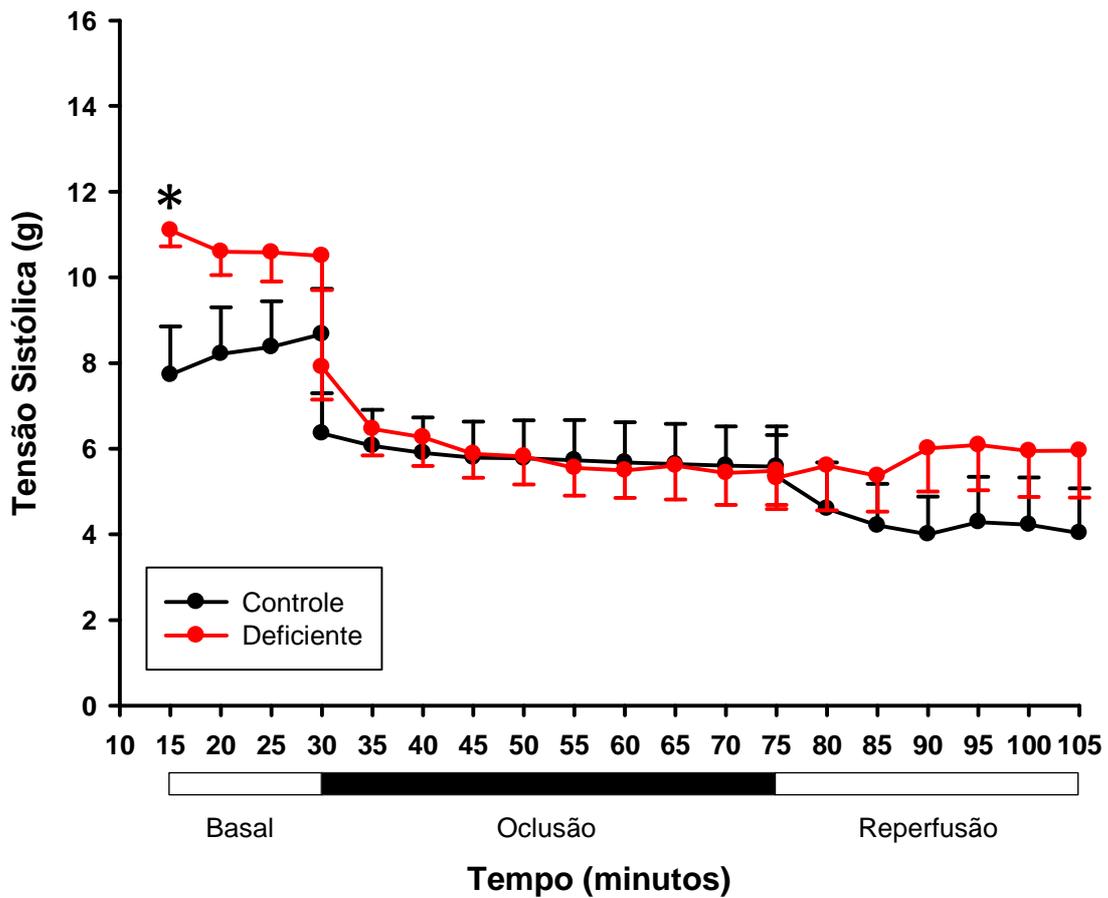


Figura 14. Tensão Sistólica (g) 45 minutos isquemia – Gráfico representando tensão sistólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 45 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; * $P < 0,05$ quando comparado o grupo controle com deficiente.

Os animais submetidos a uma dieta controle apresentaram um aumento da tensão diastólica durante a isquemia, porém este foi significativo ($P < 0,05$) apenas no final da reperfusão quando comparados aos animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina como pode ser observado na figura 15.

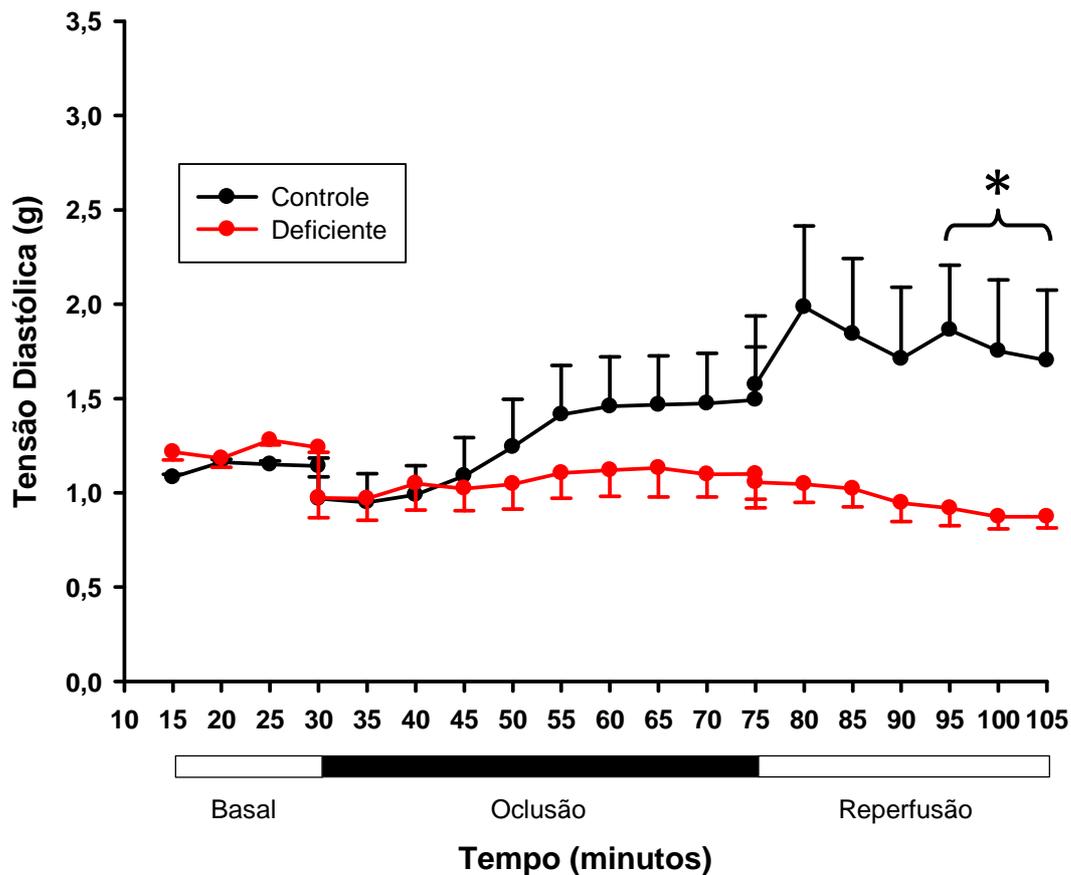


Figura 15. Tensão Diastólica (g) 45 minutos isquemia – Gráfico representando tensão diastólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 45 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; * $P < 0,05$ quando comparado o grupo controle com deficiente.

Os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da dT/dt máxima durante toda a estabilização e reperfusão quando comparados aos animais submetidos a uma dieta controle (Figura 16).

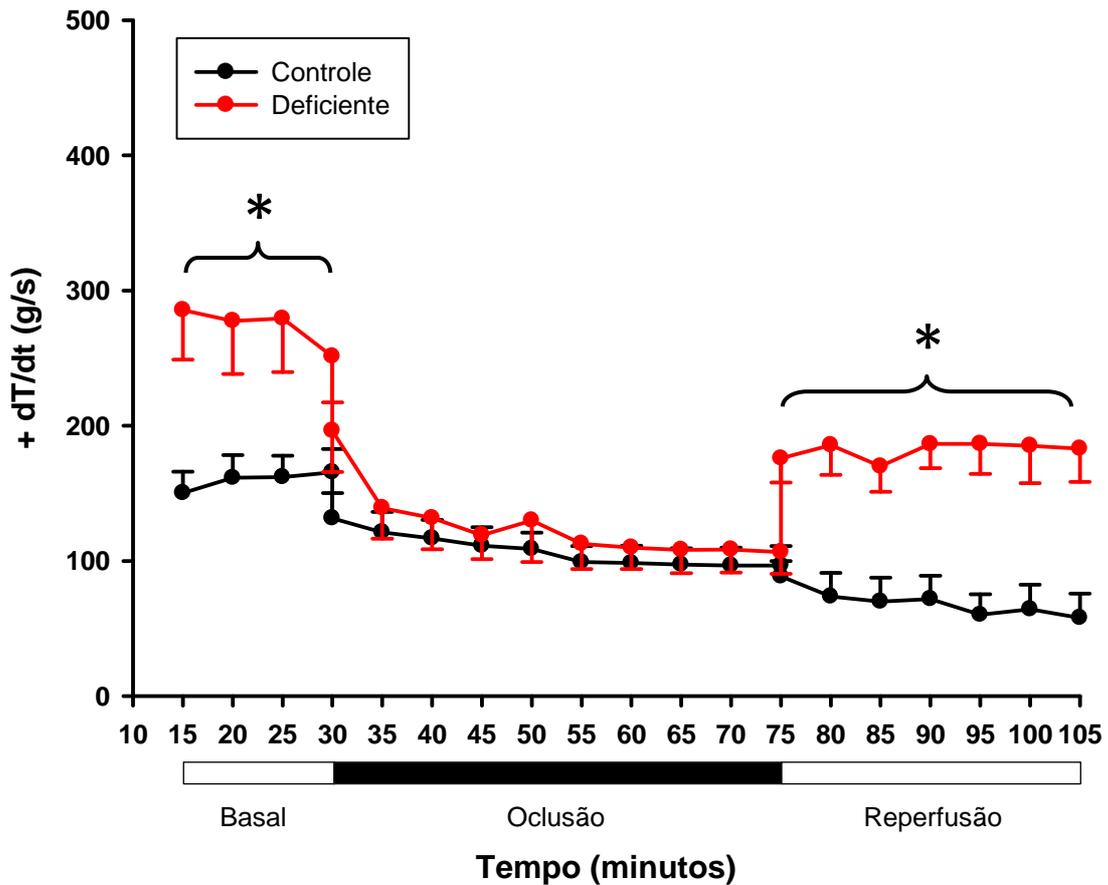


Figura 16. $+dT/dt$ (g/s) 45 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt máximo em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 45 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; * $P < 0,05$ quando comparado o grupo controle com deficiente.

Os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da dT/dt mínima um período da reperfusão (15, 20 e 25 minutos) como pode ser observado na figura 17 quando comparamos com os animais submetidos a uma dieta controle.

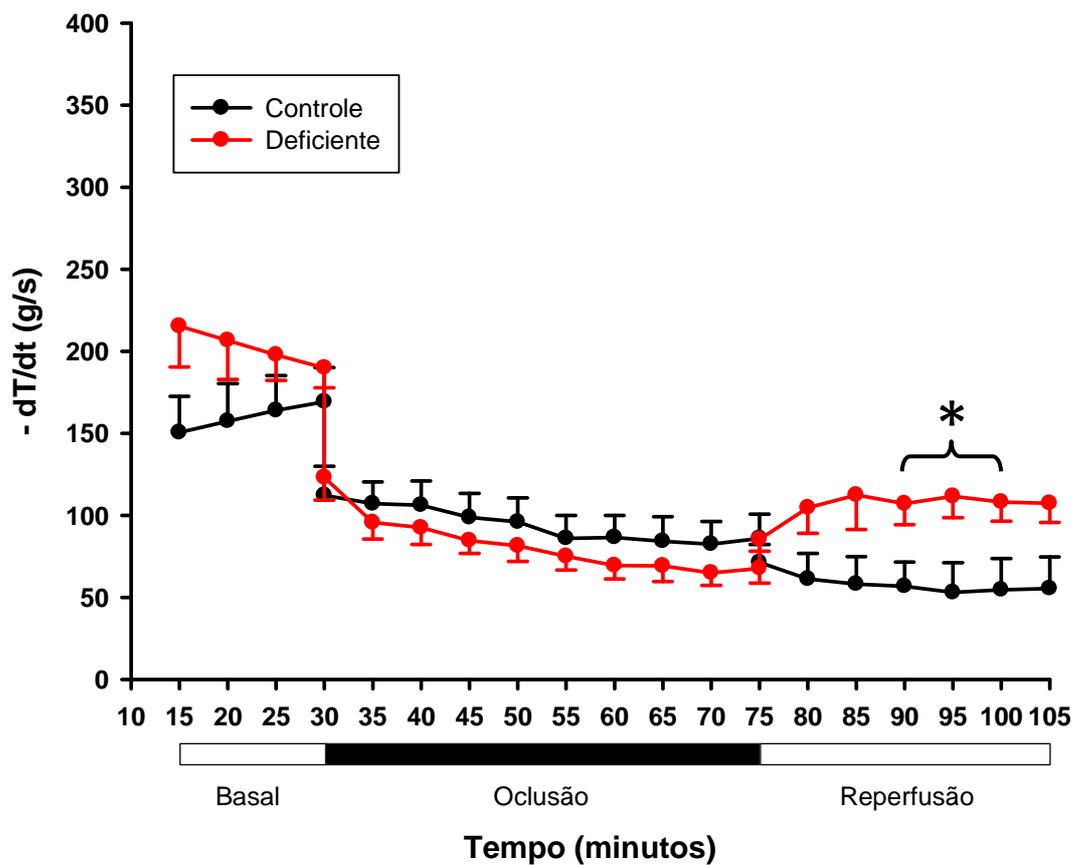


Figura 17. - dT/dt (g/s) 45 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt mínimo em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 45 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; * $P < 0,05$ quando comparado o grupo controle com deficiente.

3. Animais alimentados com dieta controle ou deficiente submetidos à isquemia por 60 minutos. (Avaliação da Função Cardíaca)

Após averiguar que a oclusão da artéria coronária descendente esquerda, não gerou contratura após 45 minutos de isquemia, tanto em animais alimentados com dieta controle como alimentados com uma dieta deficiente em tiamina, resolvemos aumentar o tempo de isquemia. Portanto a terceira fase do estudo procurou averiguar a ocorrência ou não de contraturas, após 60 minutos de oclusão da artéria coronária descendente esquerda, tanto em animais submetidos a uma dieta controle como animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina. Além da constatação da existência ou não das contraturas também foram analisados a frequência cardíaca, tensão sistólica, tensão diastólica, $+dT/dt$, e $-dT/dt$. Tanto os animais submetidos a uma dieta controle ($n = 3$) como uma dieta deficiente em tiamina ($n = 6$) apresentaram contratura após isquemia.

As figuras 18 e 19 ilustram registros típicos da tensão cardíaca nos corações dos animais submetidos a uma dieta controle e deficiente respectivamente.

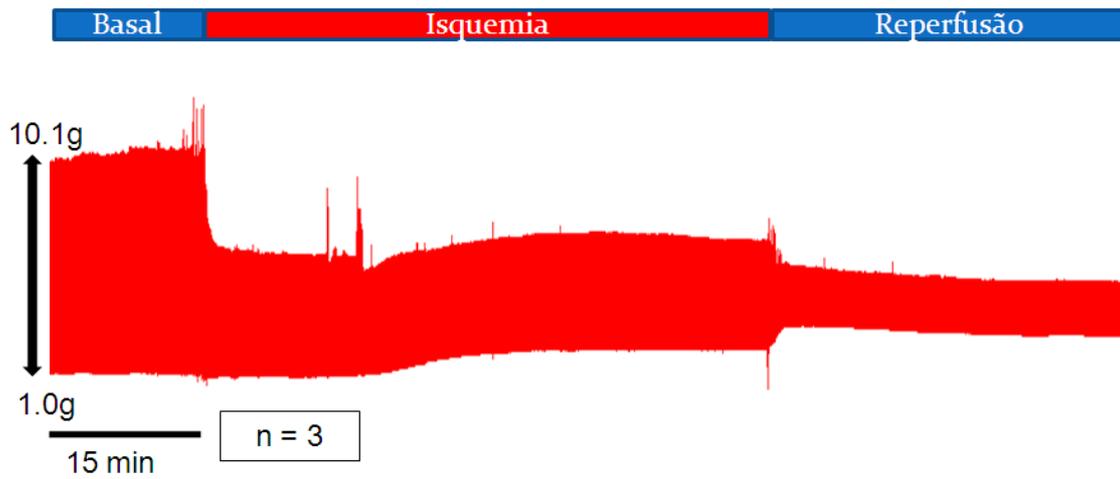


Figura 18. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta controle submetidos a 60 minutos de isquemia.

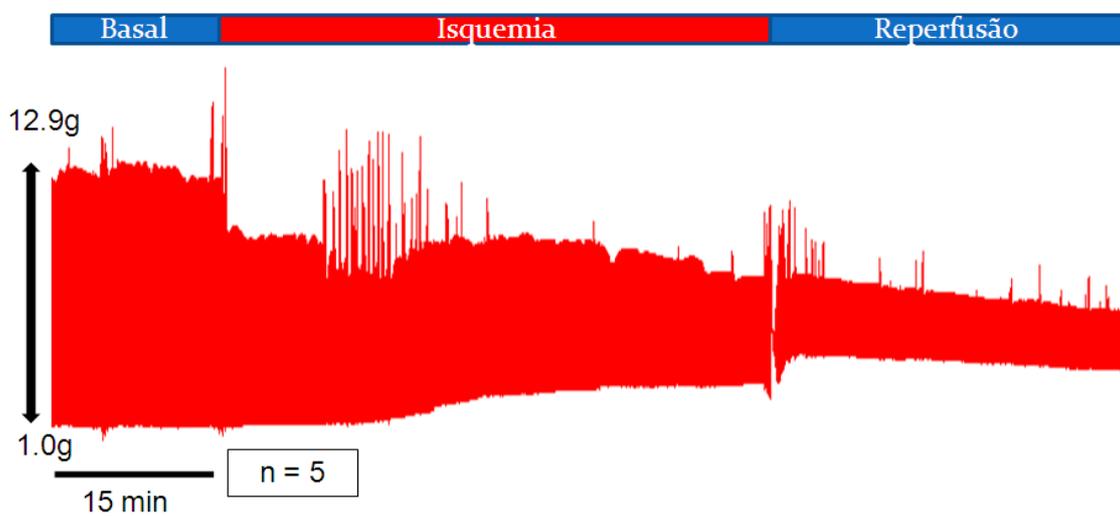


Figura 19. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 60 minutos de isquemia.

Não foram observadas diferenças em relação à frequência cardíaca, batimentos por minuto (BPM) e tensão sistólica (g/s) entre os animais submetidos a uma dieta controle e os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina (Figura 20 e figura 21 respectivamente).

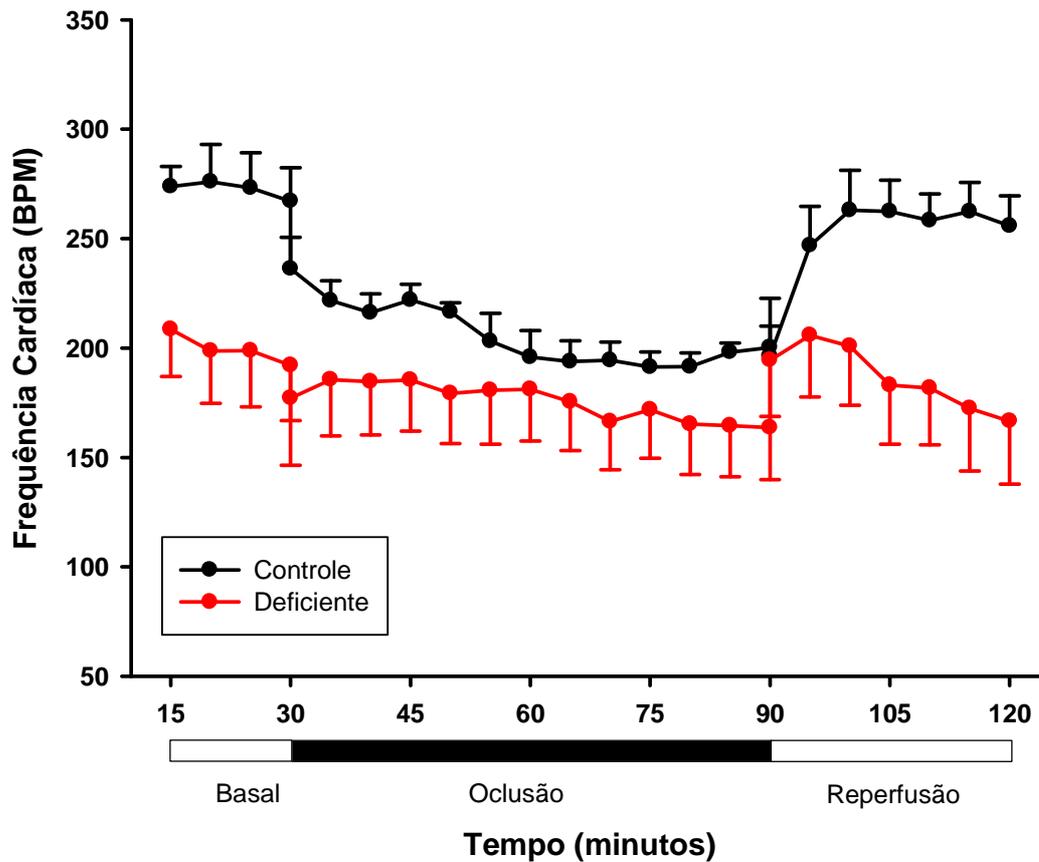


Figura 20. Frequência Cardíaca (BPM) 60 minutos isquemia – Gráfico representando frequência cardíaca em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 60 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

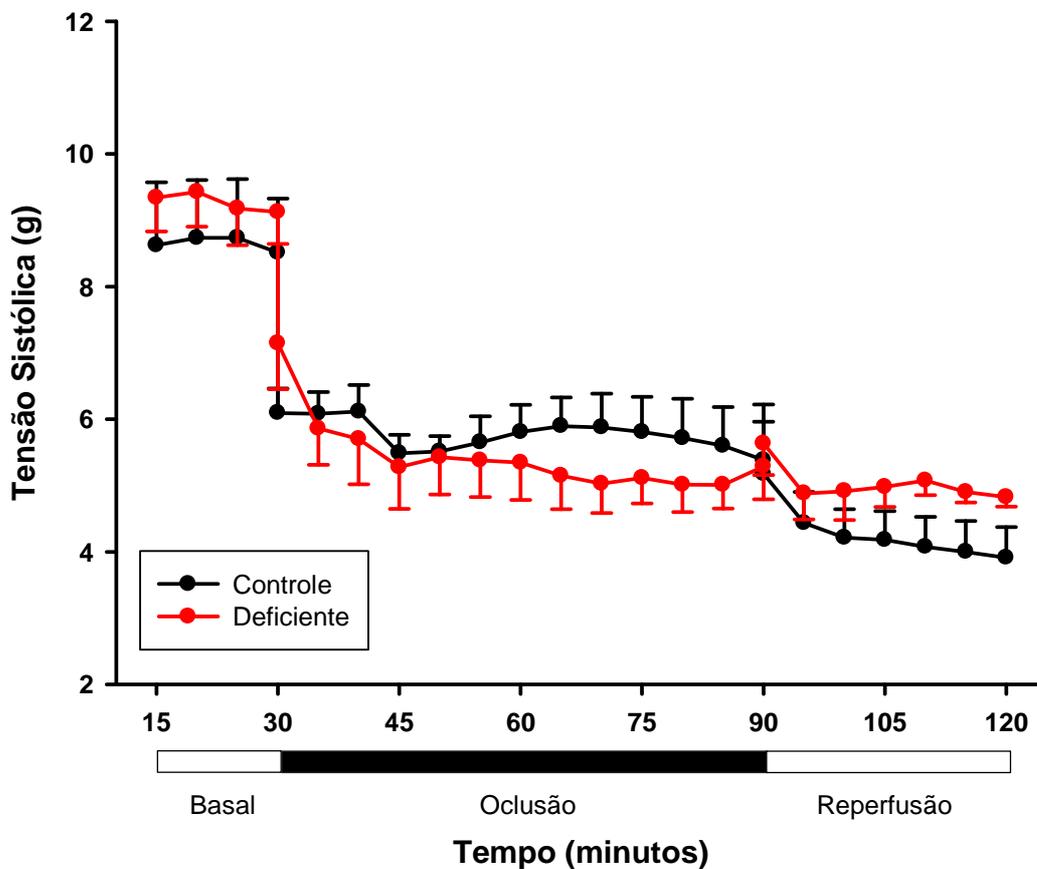


Figura 21. Tensão Sistólica (g) 60 minutos isquemia – Gráfico representando tensão sistólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 60 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; não houve diferença estatística entre os grupos.

Os animais submetidos a uma dieta controle em tiamina apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da tensão diastólica durante praticamente todo o período de isquemia e durante todo o período de reperfusão.

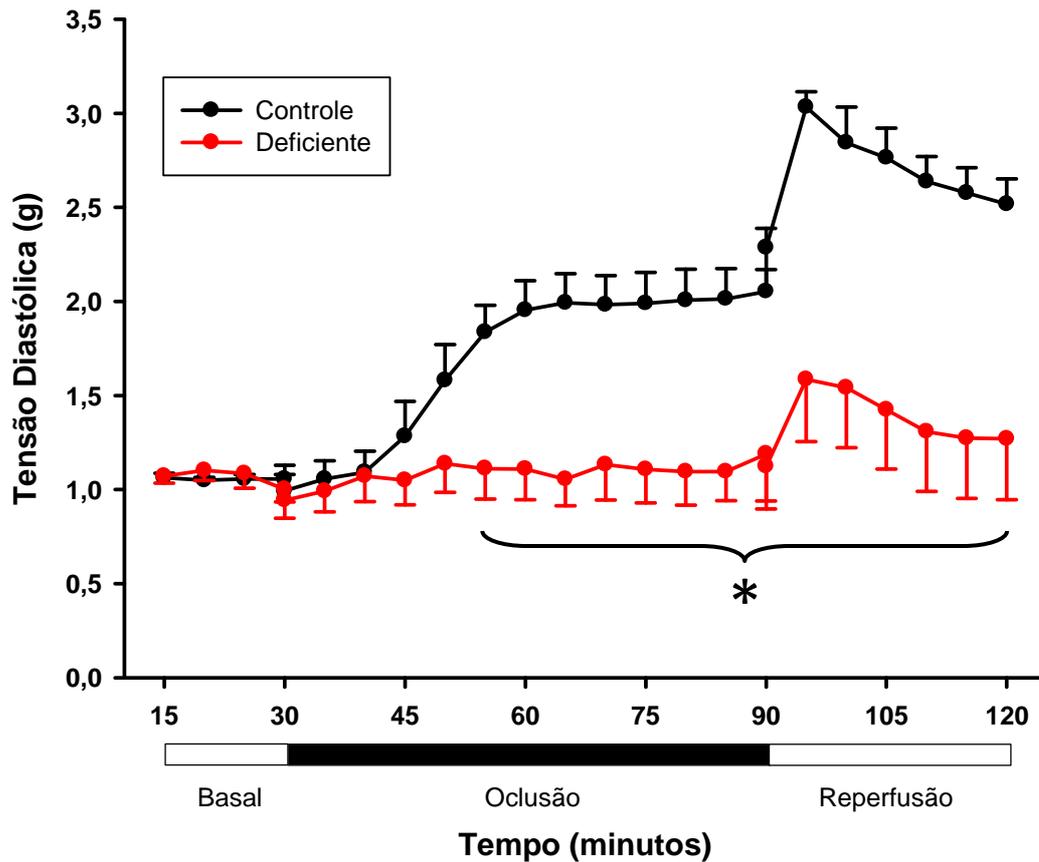


Figura 22. Tensão Diastólica (g) 60 minutos isquemia – Gráfico representando tensão diastólica em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 60 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM.

Os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) da dT/dt máxima durante todo o período de reperfusão após isquemia de 60 minutos quando comparados com os animais submetidos a uma dieta controle em tiamina.

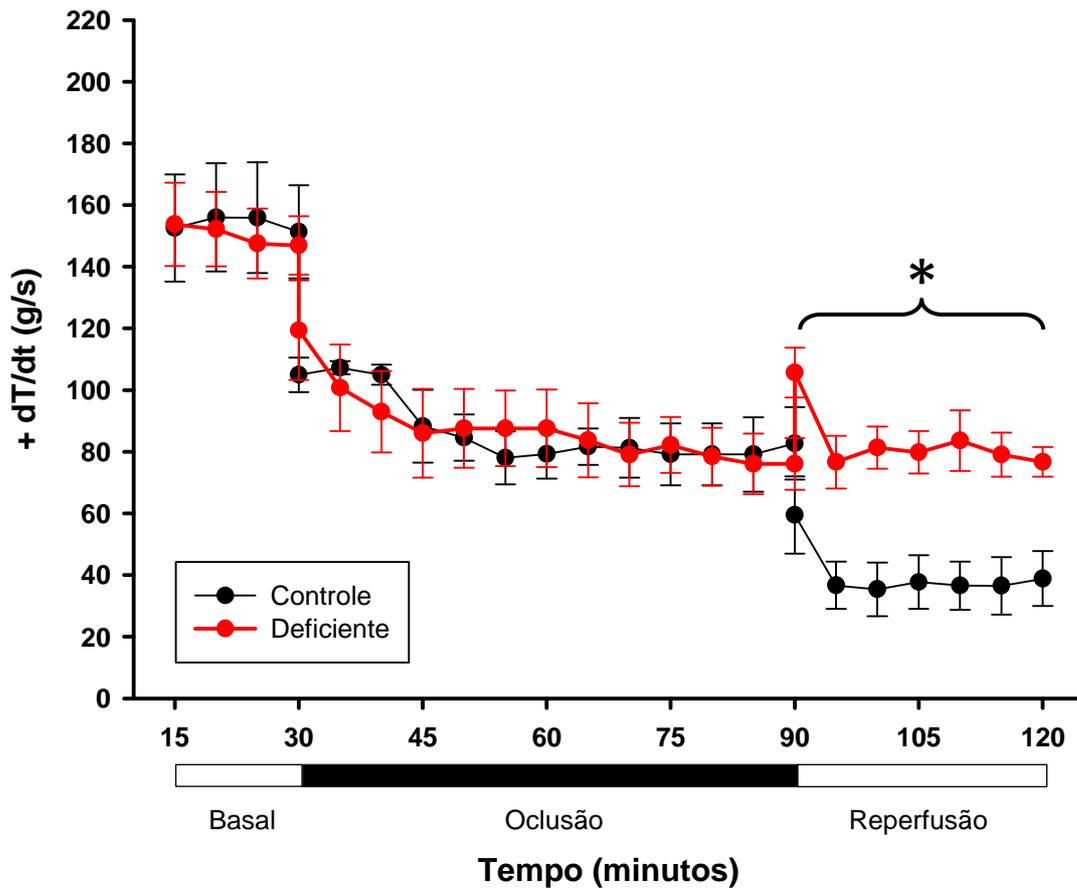


Figura 23. $+dT/dt$ (g/s) 60 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt máxima em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 60 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM;

Praticamente não houve diferença na dT/dt mínima entre os grupos controle e experimental a não ser em um período durante a isquemia.

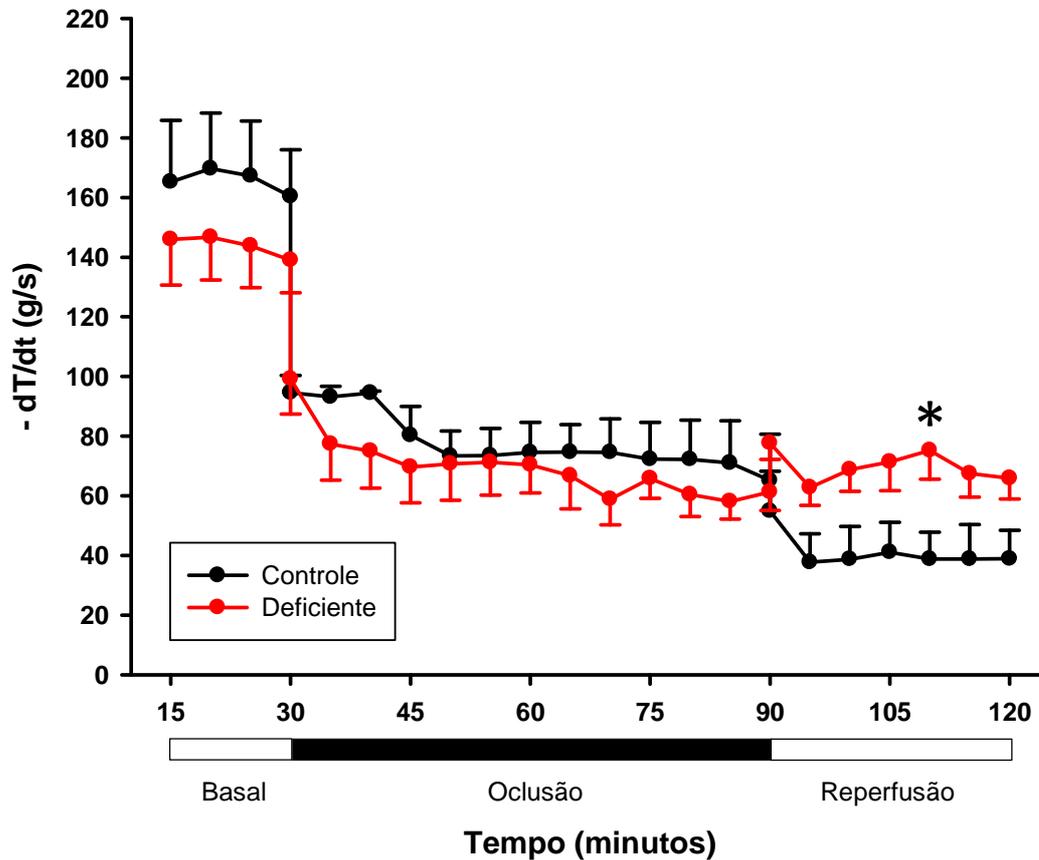


Figura 24. - dT/dt (g/s) 60 minutos isquemia – Gráfico representando dT/dt mínimo em animais submetidos a uma dieta controle e deficiente após 60 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como médias \pm EPM;

4. Animais alimentados com dieta controle submetidos à isquemia por 30 minutos + agonista para mitoKATP (diazóxido) e animais alimentados com dieta deficiente em tiamina + antagonista para mitoKATP (5 – hidroxidecanoato)

Nesta etapa do projeto averiguamos a participação ou não dos canais mitocondriais para potássio sensíveis a ATP (mitoKATP) na prevenção das contraturas após isquemia. Os corações dos animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina foram perfundidos com 5 – HD, antagonista para mitoKATP, por 20 minutos antes da oclusão da artéria coronária descendente esquerda por um período de 30 minutos. Já os corações dos animais submetidos a uma dieta controle foram submetidos ao mesmo protocolo, porém foram perfundidos com um agonista para mitoKATP, diazóxido.

Os animais submetidos a uma dieta deficiente (n = 6) e que então foram perfundidos com 5 – HD apresentaram uma resposta bastante variada. Dois animais apresentaram contraturas após isquemia como pode ser visto na figura 25, dois apresentaram contratura nos primeiros 5 minutos de reperfusão (figura 26) e dois não apresentaram contratura.

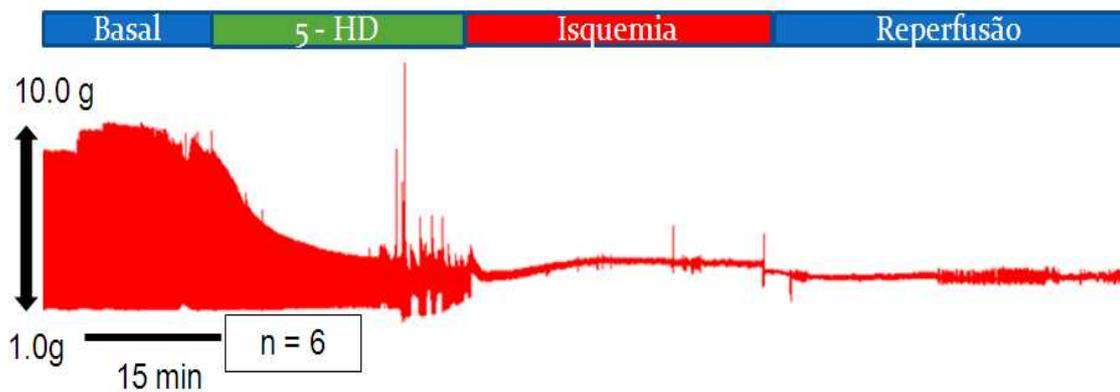


Figura 25. Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina submetidos a 30 minutos de isquemia após a perfusão de 5 – HD.

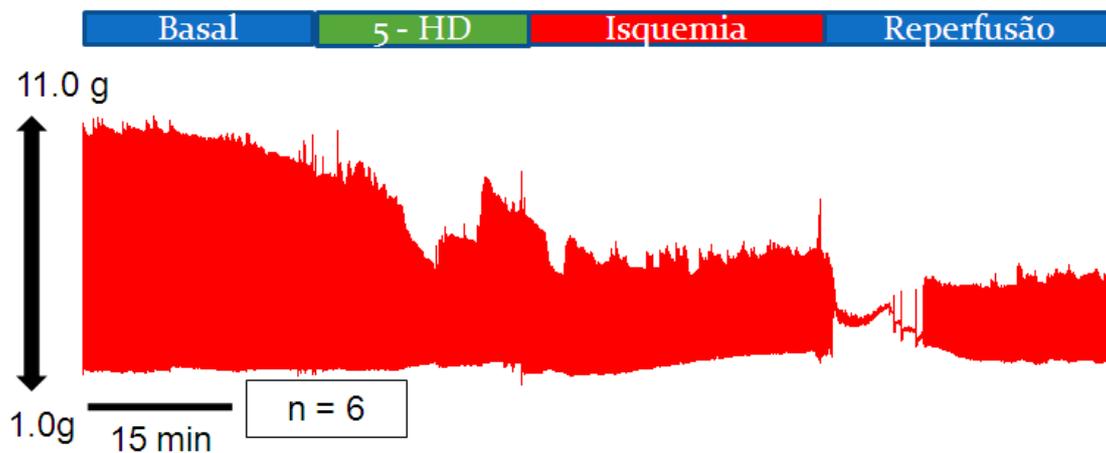


Figura 26. - Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta deficiente em tiamina, e então submetido a 30 minutos de isquemia após a perfusão de 5 – HD.

Os animais submetidos a uma dieta controle e então perfundidos com diaxózido (n = 4) também apresentaram uma resposta variada. Dois animais apresentaram contraturas de reperusão e outros dois animais não apresentam qualquer sinal de contratura como pode ser observado na figura 27.

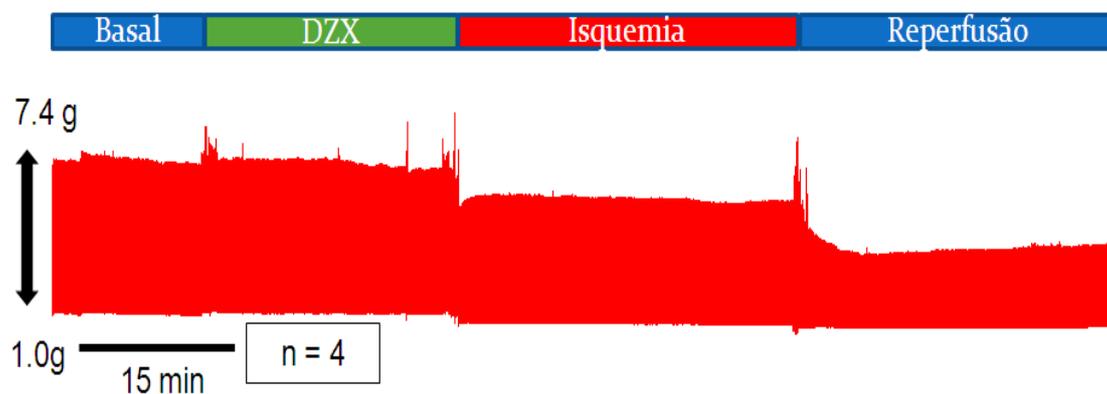


Figura 27. - Registro representativo de tensão cardíaca dos corações de animais alimentados com dieta controle submetidos a 30 minutos de isquemia após a perfusão de diaxózido.

5. Avaliação da fluorescência do marcador para cálcio, Rhod 2 AM e marcador de membrana mitocondrial Mito Tracker Green FM em cardiomiócitos de animais submetidos a uma dieta controle e dieta deficiente em tiamina.

Afim de averiguar possíveis mudanças na ciclo do cálcio como também alterações mitocôndrias. Os cardiomiócitos dos animais submetidos tanto a dieta controle como deficiente em tiamina foram marcados como Mito Tracker Green FM e Rhod 2 AM.

O marcador Mito Tracker Green FM pode - se difundir através da membrana plasmática e acumular em mitocôndrias ativas. Os animais controle apresentaram uma maior marcação por Mito Tracker Green FM, porém esta não foi estatisticamente significante como pode ser observado na figura 27.

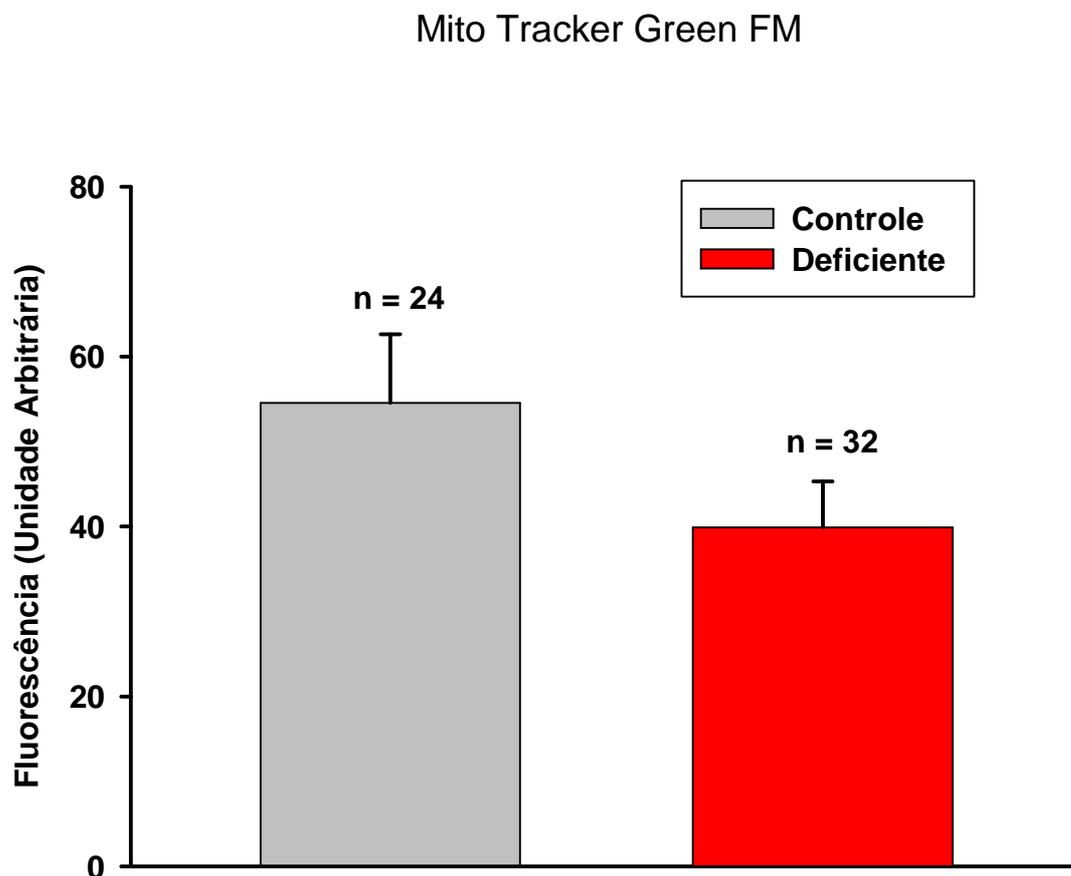


Figura 28. – Fluorescência Mito Tracker Green FM – Gráfico representando a fluorescência do marcador, Mito Tracker Green FM, em cardiomiócitos de animais submetidos a uma dieta controle ou deficiente em tiamina. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; Não houve diferença estatística entre os grupos.

Já a marcação por Rhod 2 AM procurou averiguar se existia uma diferença de concentração de cálcio mitocondrial entre os dois grupos experimentais. Como pode ser observado na figura 28 os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentaram uma maior concentração ($p < 0,05$) de cálcio mitocondrial quando comparados com os animais submetidos a uma dieta controle.

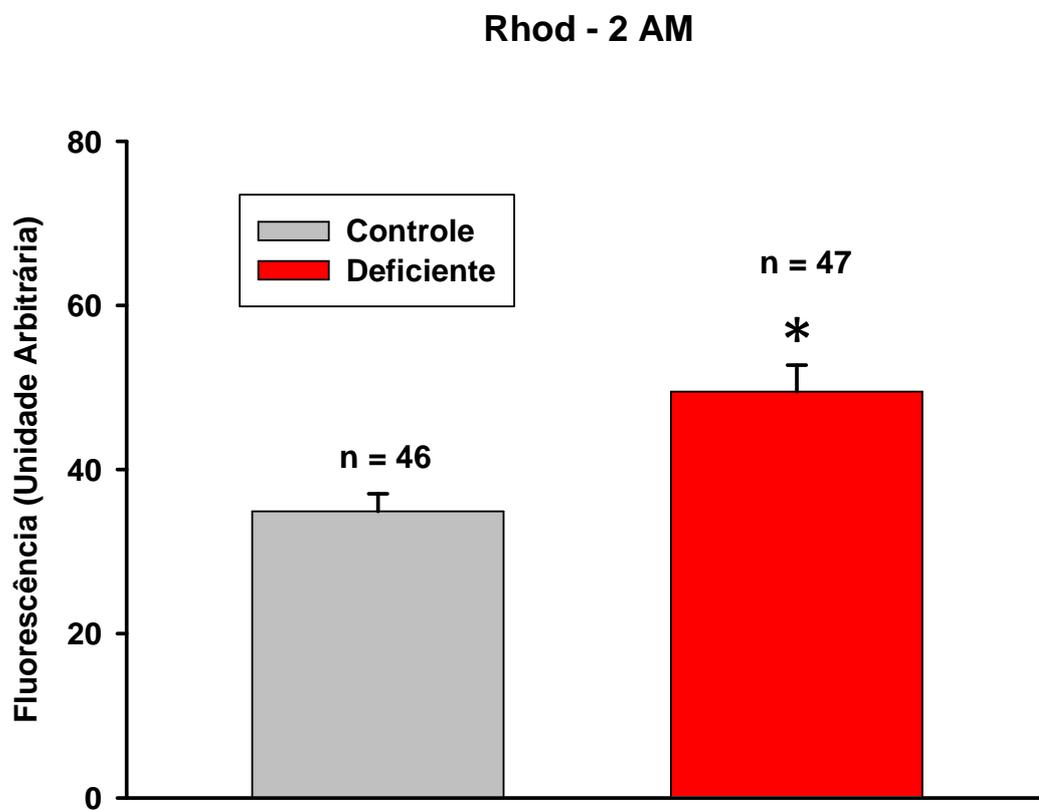


Figura 29. Fluorescência Rhod 2AM – Gráfico representando a fluorescência do marcador, Rhod 2AM, em cardiomiócitos de animais submetidos a uma dieta controle ou deficiente em tiamina. Os dados estão expressos como médias \pm EPM; O grupo deficiente mostrou um aumento significativo da fluorescência $p < 0,05$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As doenças cardiovasculares constituem um dos principais problemas do mundo moderno liderando as causas de morte e invalidez (Stanley *et al.*, 2005). Arritmias ventriculares com conseqüente morte súbita são as principais causas de mortalidade em pacientes com falência cardíaca (Akar & Akar, 2006). A deficiência em tiamina (vitamina B1) constitui outro problema que afeta diversas pessoas no mundo (Butterworth, 2001). Inúmeros trabalhos têm demonstrado os efeitos da deficiência em tiamina no sistema nervoso (Oliveira *et al.*, 2007a; Carvalho *et al.*, 2006; Pannunzio *et al.*, 2000), pouco porém se conhece sobre seus efeitos no sistema cardiovascular, principalmente no coração (Oliveira *et al.*, 2007b).

Diferente do que foi observado anteriormente por Cohen e colaboradores (1976), e Zangen (1997) os corações dos animais deficientes em tiamina não apresentaram diferença na força de contração quando comparados com os animais submetidos a uma dieta controle. Porém em nenhum dos dois trabalhos citados anteriormente as medidas foram realizadas com o coração intacto.

Observamos também que os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina não desenvolveram contraturas durante a reperfusão após 30, 45 ou 60 minutos de oclusão da artéria coronária descendente esquerda. Estes dados são similares ao observado por Oliveira e colaboradores (2007), onde foi demonstrado que animais que recebiam uma dieta deficiente em tiamina, e então eram submetidos à isquemia por 15 minutos seguida de reperfusão em modelo de Langendorff não desenvolveram contraturas durante a reperfusão. (Oliveira *et al.*, 2007b).

A tiamina é cofactor para diversas enzimas relacionadas ao metabolismo. Sua deficiência reduz a atividade da piruvato desidrogenase, α – cetoglutarato desidrogenase e transcetolase (Martin *et al.*, 2003). A deficiência em tiamina gera então um aumento na concentração de piruvato no sangue o que melhora o funcionamento do coração em condições normais de oxigenação.REF O aumento na concentração de piruvato também pode ativar o poro de transição de permeabilidade mitocondrial em seu estágio de baixa

condutância o que contribui para a proteção induzida por episódios curtos de isquemia (Bunger *et al.*, 1989; Zoratti & Szabo 1995).

Na maioria das células o principal papel da mitocôndria é fornecer energia através da fosforilação oxidativa. Nos cardiomiócitos isto não é diferente (Halestrap, 2009). A mitocôndria exerce um papel de suma importância para a produção de energia nos cardiomiócitos correspondendo a 40% do volume total do sarcoplasma. O número de mitocôndrias é um fator importante para manter o funcionamento normal do coração (Bers, 2002; (Murphy & Steenbergen, 2007).

A retomada do fluxo sanguíneo após um infarto do miocárdio ou uma diminuição do fluxo sanguíneo pode gerar danos maiores do que os gerados durante a isquemia, este fenômeno é denominado de injúrias de reperfusão. A reoxigenação leva a um aumento na produção de radicais livres e um aumento excessivo de cálcio tanto citoplasmático como mitocondrial podendo resultar em morte celular via abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Engler *et al.*, 1994; Moukarbel *et al.*, 2004; Halestrap *et al.*, 2007).

Para manter a homeostasia, os cardiomiócitos possuem mecanismos que removem o excesso de cálcio do meio intracelular. A bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), trocador sódio/cálcio do sarcolema (NCX), bomba de cálcio do sarcolema e o uniporte para Ca^{2+} mitocondrial (Bers, 2002). A mitocôndria além de gerar energia através da fosforilação oxidativa também tem função de tamponar o excesso de cálcio no sarcoplasma, diminuindo então os efeitos nocivos do aumento da concentração de cálcio (Maack, *et al.*, 2006; Liu & O'Rourke, 2008). Este fato, portanto, poderia reduzir a ocorrência das contraturas durante a reperfusão, nos animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina, visto que eles apresentaram uma maior concentração de cálcio mitocondrial comparados aos animais submetidos a uma dieta controle. Os cardiomiócitos sob inibição metabólica bem como em condições patológicas apresentam um aumento da concentração de cálcio mitocondrial (Murata, *et al.*, 2001; Boyden, 2005), o que corrobora com os nossos resultados.

O íon cálcio também ativa inúmeras enzimas que compõem o ciclo do ácido cítrico como: piruvato desidrogenase, a-cetoglutarato desidrogenase e isocitrato desidrogenase, aumentando assim a produção de NADH (Gunter et al., 2004). Portanto, o Ca^{2+} tem papel de suma importância para a produção de energia, ATP, pela mitocôndria. Este aumento de Ca^{2+} mitocondrial poderia então de alguma forma tentar aumentar a atividade de enzimas ligadas à formação de ATP. O que estaria compensando a diminuição da formação de ATP devido à menor atividade das enzimas que dependem da tiamina como cofator.

Outra hipótese que pode ser levantada por este dado seria uma possível explicação para a menor concentração de cálcio no retículo sarcoplasmático observada por Oliveira e colaboradores (2007). Porém para podermos validar esta hipótese é necessário quantificar a concentração real do Ca^{2+} mitocondrial.

Os canais mitocondriais para potássio sensíveis ao ATP (mito K_{ATP}) foram identificados como fundamentais na resposta cardioprotetora apresentada nos modelos de isquemia e reperfusão (Dos Santos *et al.*, 2002; O'Rourke, 2004). A deficiência em tiamina e a conseqüente diminuição na produção de ATP, poderia ativar estes canais. Podendo assim gerar o efeito cardioprotetor observado. A ativação do mito K_{ATP} acarreta na entrada de potássio para a matriz mitocondrial acarretando um aumento do volume mitocondrial (inchamento), (Garlid & Paucek, 2003) como também a uma diminuição na liberação das espécies reativas de oxigênio e na hidrólise de ATP. ****REF****. O diazóxido, um agonista específico para o mito K_{ATP} , tem sido relatado como um potente cardioprotetor em diversos trabalhos (Liu *et. al.*, 1998; Kim *et. al.*, 2006). Assim como o antagonista 5 – hidroxidecanoato que apresenta efeitos contrários àqueles observados na presença do diazóxido (Grover & Garlid 2000; Kim *et. al* 2006; Abdallah *et. a.*, 2009). Neste trabalho ambas substâncias apresentaram uma resposta bem heterogênea, o que não permitiu afirmar se a cardioproteção observada era devido a ativação ou não do mito K_{ATP} .

Concluindo podemos dizer que animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina não desenvolveram contraturas durante a reperfusão após 30, 45 ou 60 minutos de isquemia. Um resultado surpreendente foi a ausência de contratura durante a reperfusão após 45 ou 60 minutos de isquemia nos animais que receberam a dieta controle. Através dos experimentos com microscopia confocal não foi possível afirmar se os animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina apresentam mudanças em relação a localização das mitocôndrias. Para isso serão necessários experimentos com microscopia eletrônica, os quais estão em andamento. Os animais deficientes em tiamina apresentaram uma maior concentração de cálcio mitocondrial o que poderia ser um fator relacionado à cardioproteção apresentada pelos animais. Até o momento não foi possível afirmar se esta cardioproteção é mediada via ativação dos canais mitoK_{ATP}.

Podemos dizer que os animais deficientes em tiamina se comportam como se tivessem passado por um período de adaptação fisio-metabólica. A baixa disponibilidade de ATP em função da deficiência em tiamina levou a um “condicionamento” metabólico. Tal condicionamento pode assegurar uma maior sobrevivência aos cardiomiócitos quando da presença de um insulto isquêmico de duração variada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah Y.; Wolf C.; Meuter K.; Piper H.M.; Reusch H. P.; & Ladilov Y. (2009) Preconditioning with diazoxide prevents reoxygenation-induced rigor-type hypercontracture. *Mol Cell Cardiol.* In press

Akar, J. G. & Akar, F. G. (2006). Mapping arrhythmias in the failing heart: from Langendorff to patient. *J.Electrocardiol.* **39**, S19-S23.

Azizi, M. H.; Nayernouri T.; Azizi, F. (2008) *Arch Iranian Med* **11** 345 – 350

Belisle E and Kowaltowski AJ. (2002) Opening of mitochondrial K⁺ channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 285 – 298

Begley, T.P.; Downs, D.M.; Ealick, S.E.; McLafferty, F.W.; Van Loon, A.P.; Taylor, S.; Campobasso, N.; Chiu, H.J.; Kinsland, C.; Reddick, J.J.; Xi, J. (1999) Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* **171** 293 – 300

Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 2002.

Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415** 198 – 205
Birnbaum, Y.; Leor, J.; Klöner, R.A.

Boyden, P.A.; ter Keurs, H. (2005) Would modulation of intracellular Ca²⁺ be antiarrhythmic? *Pharmacol. Ther.* **118** 149 – 179

Bunger R, Mallet RT & Hartman DA. (1989) Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* **180** 221 – 233

Burke,M.A.; Mutharasan,R.K.; Ardehali,H. (2008) The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel. *Circ.Res.* **102** 164 – 176

Butterworth,R.F. (2001) Maternal thiamine deficiency: still a problem in some world communities. *Am.J.Clin.Nutr.* **74** 712 – 713

Cohen,E.M.; Abelmann,W.H.; Messer,J.V.; Bing,H.L. (1976) Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental thiamine deficiency. *Am.J.Physiol.* **231** 1390 – 1394

Depeint,F.; Bruce,W.R.; Shangari,N.; Mehta,R.; O'Brien,P.J. (2006) Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem.Biol.Interact.***163** 94 – 112

Dos Santos. P., Kowaltowski, A. J., Laclau, M. N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J. B., Tariosse, L., & Garlid, K. D. (2002). Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**, H284-H295.

Edwards G.; Weston A. H. (1993) The Pharmacology of ATP-Sensitive Potassium Channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33** 597 – 637

Eefting,F.; Rensing,B.; Wigman,J.; Pannekoek,W.J.; Liu,W.M.; Cramer,M.J.; Lips,D.J.; Doevendans,P.A. (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.***61** 414 – 426

Enkvetchakul, D. & Nichols, C. G. (2003). Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J.Gen.Physiol* **122**, 471-480.

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T and O'Rourke B. (2006) Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* **99**: 172 – 182

Funk,C. (1911) On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished Rice. *Bio-chemical Department, Lister Institute of Preventive Medicine* **43** 395 – 400

Garlid KD and Paucek P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606: 23 - 41,

Gary J. Grover G. J.; & Garlid K. D. (2000) ATP-Sensitive Potassium Channels: A Review of their Cardioprotective Pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 677 – 695.

Gottlieb,R.A.; Burtleson,K.O.; Kloner,R.A.; Babior,B.M.; Engler,R.L. (1994) erfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J.Clin.Invest* **94** 1621 – 1628

Grover, G. J. & Garlid, K. D. (2000). ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**, 677-695.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA and Salter JD. (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**: 96 – 102

Halestrap,A.P. (2009) Mitochondria and reperfusion injury of the heart-A holey death but not beyond salvation. *J.Bioenerg.Biomembr.* in press

Halestrap,A.P.; Clarke,S.J.; Khaliulin,I. (2007) The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim.Biophys.Acta* **1767** 1007 – 1031

Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., & Higuti, T. (1991). ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-247.

Katz,A.M. (1957) Knowledge of the circulation before William Harvey *Circulation* **15** 726 – 734

Kim M-Y.; Kim M.J.; Yoon I.S.; Ahn J. H.; Lee S. H.; Baik E. J.; Moon C-H.; & Jung Y-S. (2006) Diazoxide acts more as a PKC- ϵ activator, and indirectly activates the mitochondrial KATP channel conferring cardioprotection against hypoxic injury. *British Journal of Pharmacology* **149** 1059 – 1070.

Knowlton FP, Starling EH. (1912) The independence of variations in temperature and blood pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *J Physiol (Lond)*. **44** 206 – 219

Lionel H. Opie (1991). *The Heart - Physiology and Metabolism, Second Edition*.

Liu T and O'Rourke B. (2008) Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circ Res* **103**: 279 – 288

Liu Y, Sato T, O'Rourke B and Marban E. (2008) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* **97**: 2463 – 2469

Lonsdale, D. (2006) A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evid. Based. Complement Alternat. Med* **3** 49 – 59

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. (2006) Elevated Cytosolic Na⁺ Decreases Mitochondrial Ca²⁺ Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **99** 172 – 182.

Markwalder J, Starling EH. (1914) On the constancy of the systolic output under varying conditions. *J Physiol (Lond)*. **48** 348 – 356

Martin, P. R., Singleton, C. K., & Hiller-Sturmhofel, S. (2003). The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res. Health* **27**, 134-142.

Moukarbel, G.V.; Ayoub, C.M.; Abchee, A.B. (2004) Pharmacological therapy for myocardial reperfusion injury. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4** 147 – 153

Mousseau,D.D.; Rao,V.L.; Butterworth,R.F. (1996) Vesicular dysfunction during experimental thiamine deficiency is indicated by alterations in dopamine metabolism. *Eur.J.Pharmacol.* **317** 263 – 267

Munujos P, Coll-Canti J, Beleta J, Gonzalez-Sastre F and Gella FJ. (1996) Brain pyruvate oxidation in experimental thiamin-deficiency encephalopathy. *Clin Chim Acta* **255**: 13 – 25.

Murata,M.; Akao,M.; O'Rourke,B.; Marban,E.(2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ.Res.* **89** 891 – 898

Nichols, C. G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470-476.

Noma,A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305** 147 – 148

Oliveira F. A. Efeitos Neurodegenerativos Causados pela Deficiência de Vitamina B1. 2006. Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Oliveira, F. A., Galan, D. T., Ribeiro, A. M., & Santos, C. J. (2007a). Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Res.* **1134**, 79-86.

Oliveira, F. A., Guatimosim, S., Castro, C. H., Galan, D. T., Lauton-Santos, S., Ribeiro, A. M., Almeida, A. P., & Cruz, J. S. (2007b). Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine deficient rats. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.*

Oliveira, M. A. P. de. Efeitos da deficiência de tiamina em camundongos NMRI no desenvolvimento da patologia desencadeada pelo *Trypanosoma cruzi* da

cepa Y / Milton Adriano Pelli de Oliveira. Enio Cardillo Vieira. 1994. Dissertação apresentada ao Curso de Pós - Graduação em Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

O'Rourke, B. (2004). Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ.Res.* **94**, 420-432.

Parentoni, A. N. Estudo morfométrico e bioquímico do sistema colinérgico central em ratos wistar adultos submetidos ao consumo crônico de etanol associado ou não à deficiência de Tiamina. Pitella, José Eymard Homem. 2002. Tese apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Pekovich, S. R., Martin, P. R., & Singleton, C. K. (1998). Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types. *J.Nutr.* **128**, 683-687.

Ramaraj R., Forman M. B., Jackson E. K., Lowenstein C. J., Ibanez B., Cimmino G., Badimon J. J., Korantzopoulos P. G., Goudevenos J. A., Yellon D. M., Hausenloy D. J. (2007) Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* **357** 2408 – 2410.

Rebollo, R. A. (1999) Estudo anatômico sobre o movimento do coração e do sangue nos animais William Harvey 1628. *Caderno de Traduções USP.* **5** 3 – 92

Rebollo, R. A. (2002) A difusão da doutrina da circulação do sangue: a correspondência entre William Harvey e Caspar Hofmann em maio de 1636. *História, Ciências, Saúde.* **9(3)** 479 – 513

Rebollo, R. A. (2006) O legado hipocrático e sua fortuna no período greco romano de Cós a Galeno *Scientiæ zudia.* **4** 45 – 82

Rindi, G. & Laforenza, U. (2000). Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **224**, 246-255.

Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL and Bader M. (2004) Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* **17**: 292 – 299

Settembre,E.; Begley,T.P.; Ealick,S.E. (2003) Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **13** 739 – 747

Silverman,M.E.; Grove,D.; Upshaw,C.B.,Jr. (2006) Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation* **113** 2775 – 2781

Singleton, C. K. & Martin, P. R. (2001). Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr.Mol.Med.* **1**, 197-207.

Skrzypiec-Spring,M.; Grotthus,B.; Szelag,A.; Schulz,R. (2007) Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **55** 113 – 126.

Sternbach,G.L.; Varon,J.; Fromm,R.E.; Sicuro,M.; Baskett,P.J. (2001) Galen and the origins of artificial ventilation, the arteries and the pulse *Resuscitation.* **49** 119 – 122

Wilcox C.; Schreiner G. (2004) Do diuretics cause thiamine deficiency? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* **134** 192 – 193

Zangen,A. & Shainberg, A. (1997) Thiamine deficiency in cardiac cells in culture. *Biochem.Pharmacol.* **54** 575 – 582

Zimmer H. G. (1998) The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci* **13** 203 – 210

Zimmer H.G. (2002) Who discovered the Frank–Starling mechanism?, *News Physiol. Sci.* **17** 181 – 184

Zoratti M, & Szabo I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241** 139 – 176

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)