

**CAROLINA ROSA GIODA**

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS NO TECIDO  
CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA DIETA DEFICIENTE EM  
TIAMINA**

**Belo Horizonte-MG**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CAROLINA ROSA GIODA**

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS NO TECIDO  
CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA DIETA DEFICIENTE EM  
TIAMINA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor 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

Co-orientadora: Prof. Dra. Virginia Soares Lemos

**Belo Horizonte, MG**

**2009**

**CAROLINA ROSA GIODA**

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS NO  
TECIDO CARDÍACO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA DIETA  
DEFICIENTE EM TIAMINA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz- Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dra. Virginia Soares Lemos- Co-orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dra. Alicia J. Kowaltowski  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof. Dr. Eduardo A. Gomes-Garcia  
Universidade Federal do Sergipe

---

Prof. Dra. Leda Quércia Vieira  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Steyner de França Cortes  
Universidade Federal de Minas Gerais

## Queremos saber...

Queremos saber...o que vão fazer...com as novas invenções  
Queremos notícia mais séria, sobre a descoberta da anti-matéria e suas implicações  
Na emancipação do homem, das grandes populações  
Homens pobres das cidades, das estepes, dos sertões  
Queremos saber, quando vamos ter raio laser mais barato  
Queremos, de fato, um relato...retrato mais sério do mistério da luz  
Luz do disco voador...pra iluminação do homem  
Tão carente, sofredor...tão perdido na distância, da morada do senhor  
Queremos saber, queremos viver confiantes no futuro...  
Por isso se faz necessário prever qual o itinerário da ilusão...  
A ilusão do poder...pois se foi permitido ao homem  
Tantas coisas conhecer...é melhor que todos saibam o que pode acontecer  
Queremos saber, queremos saber, queremos saber, todos queremos saber...

*Gilberto Gil*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo amor incondicional, que nos permitiu crescer e caminhar tão longe...

As minhas irmãs, Adriana e Fabiane, por todo apoio, incentivo, atenção, zelo e amor.

A minha querida amiga Cinthia Vieira da Rocha, que me acolheu com tanto carinho e tornou minha adaptação em BH tão tranquila. Obrigada por sua amizade, atenção e conselhos inúmeros.

Ao Léo, uma pessoa especial em minha vida.

Ao meu orientador, Jader dos Santos Cruz, pela oportunidade e pelos ensinamentos. Considero-te um grande exemplo no meio acadêmico e uma pessoa admirável pela humildade, boa vontade e paixão pela pesquisa. Um exemplo a ser seguido em vários aspectos.

A minha co-orientadora, Virginia Soares Lemos, pela atenção, disponibilidade e auxílio em todas as horas.

Ao querido professor Jorge Luis Pesquero, pela ajuda, dicas e boa vontade.

A três gurias muito especiais, Laila Ribeiro, Ana Carolina Campos e Tatiane Barreto que considero minhas amigas de coração e que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo!!!

A meu querido amigo Luciano Capettini, a quem considero uma pessoa sem igual, de extremo caráter, paciência, inteligência e boa conduta. Obrigada pela parceria e enorme ajuda.

A amiga Sandra Lauton pela amizade e ajuda de sempre.

A algumas pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho: Thales Prímola - Gomes, Paula Peixoto, Daniel de Lima, Liliane Mendes, Danilo Romam-Campos, Jamil Silvano, Miguel Carneiro, Matheus de Souza, Karina da Silva, prof. Antônio José Natali, prof. Anilton Vasconcelos.

Aos queridos amigos do Lamex, Eletrocel e Fisiologia Cardiovascular.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação.

## RESUMO

A deficiência em tiamina é conhecida por causar disfunções no sistema cardíaco. Neste trabalho, vários parâmetros foram analisados tentando esclarecer aspectos até agora pouco conhecidos a respeito da deficiência de vitamina B1 sobre o coração. Foi realizada a análise histológica do ventrículo esquerdo onde se verificou uma menor espessura e um menor número de cardiomiócitos, bem como, uma menor largura e comprimento dos mesmos no coração de ratos deficientes em tiamina. Um outro parâmetro analisado foi a verificação da capacidade contrátil de células isoladas onde se pode observar uma redução na capacidade contrátil dos ratos DT quando estimuladas a frequência de 1Hz. Além disso, nos ratos deficientes em tiamina foi observado um menor consumo de oxigênio, bem como, aumento dos níveis de lactato plasmáticos. Quando se analisou a produção das espécies reativas do oxigênio em cardiomiócitos verificou-se um aumento na produção superóxido e peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima superóxido dismutase não demonstrou alteração nos coração de ratos deficientes em tiamina onde verificamos um aumento de sua expressão protéica neste tecido. A atividade e a expressão da catalase foram aumentadas, porém a atividade e a expressão da glutathiona peroxidase foram diminuídas. Um aumento nos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a presença de processo apoptótico foram verificados no coração de ratos deficientes em tiamina. As correntes de potássio sensível ao ATP ( $K_{ATP}$ ) mostraram uma maior sensibilidade a glibenclamida nos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina.

Palavras Chaves: Apoptose, Capacidade contrátil, Catalase, Coração, Deficiência em tiamina, Estresse oxidativo, Glutathiona peroxidase,  $K_{ATP}$ , Superóxido dismutase.

## ABSTRACT

Thiamine deficiency is known to cause dysfunction in the cardiac system. In this work, several parameters were trying to clarify issues so far little known about the deficiency of vitamin B1 on the heart. We performed histological analysis of the left ventricle where there was a lower density and a lower number of cardiomyocytes, as well as a smaller width and length of those in the heart of mice deficient in thiamin. Another parameter analyzed was the verification of the contractile capacity of isolated cells where they can see a reduction in the contractile capacity of DT mice when stimulated the frequency of 1Hz. Moreover, mice deficient in thiamin was observed a lower oxygen consumption, as well as increased levels of plasma lactate. When we analyzed the production of reactive oxygen species in cardiomyocytes, there was an increase in the production of superoxide and hydrogen peroxide. The activity of superoxide dismutase showed no change in the hearts of mice deficient in thiamin where we saw an increase of its protein expression in this tissue. The activity and expression of catalase were increased, but the activity and expression of glutathione peroxidase were decreased. An increase in the levels of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) and the presence of the apoptotic process were observed in hearts of mice deficient in thiamin. Currents of ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) showed a greater sensitivity to glibenclamide in cardiomyocytes of rats deficient in thiamin.

Keywords: Apoptosis, Catalase, Contractile capacity, Heart, K<sub>ATP</sub>, Glutathione peroxidase, Oxidative stress, Superoxide dismutase, Thiamine deficiency.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da Tiamina Pirofosfato.

Figura 2- - Enzimas dependentes de tiamina.

Figura 3- Formação de ROS na cadeia transportadora de elétrons.

Figura 4- Reação de Fenton e Haber - Weiss.

Figura 5- Reações seqüenciais envolvidas na peroxidação lipídica.

Figura 6- Mecanismos de ação dos diferentes sistemas antioxidantes.

Figura 7- Reação catalisada pela SOD Cu/Zn e Mn e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo.

Figura 8- Reação catalisada pela GPx e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio ativo.

Figura 9- Reação catalisada pela CAT e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no seu sítio ativo.

Figura 10- Diagrama esquemático mostrando vias apoptóticas induzidas por estresse oxidativo e os mecanismos de defesas antiapoptóticos envolvidos em diferentes doenças cardíacas.

Figura 11- Manuseio de  $Ca^{2+}$  nos miócitos ventriculares

Figura 12- O canal  $K_{ATP}$  formado por duas subunidades diferentes  $Kir_{6.x}$  e SUR e os locais de interação de nucleotídeos e ativadores.

Figura 13- Sistema utilizado para aquisição dos registros das contrações.

Figura 14- Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações.

Figura 15- Diagrama demonstrativo de uma contração celular.

Figura 16- Secções histológicas no tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) de ratos controles e deficientes em tiamina.

Figura 17- Comprimento dos cardiomiócitos cardíacos.

Figura 18- Largura dos cardiomiócitos.

Figura 19- Registros representativos da contratilidade celular.

Figura 20- Tempo para 50% da contração em cardiomiócitos estimulados a frequências de 1 e 3 Hz.

Figura 21- Tempo para 50% do relaxamento em cardiomiócitos estimulados a frequências de 1 e 3 Hz.

Figura 22- Velocidade máxima de contração ( $+dL/dt$ ,  $\mu\text{m/s}$ ) em cardiomiócitos de ratos estimulados a frequências de 1 e 3 Hz.

Figura 23- Velocidade máxima de relaxamento ( $-dL/dt$ ,  $\mu\text{m/s}$ ) em cardiomiócitos de ratos estimulados a frequência de 1 e 3 Hz.

Figura 24- Mensuração do consumo de oxigênio.

Figura 25- Concentração de lactato (mM) plasmático.

Figura 26- Produção de peróxido de hidrogênio e superóxido em cardiomiócitos.

Figura 27- Atividade da enzima superóxido dismutase (total) e a expressão das proteínas CuZn-SOD e Mn-SOD no miocárdio de ratos.

Figura 28- - Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) e sua expressão protéica no miocárdio.

Figura 29- Atividade da enzima catalase e a expressão protéica no miocárdio de ratos.

Figura 30- Níveis de TBARS no miocárdio de ratos.

Figura 31- Verificação da presença de apoptose em corte histológico de coração.

Figura 32- Atividade do canal sensível a potássio ( $K_{ATP}$ )

## LISTA DE TABELAS

Tabela I- Composição das dietas controle e deficiente em tiamina.

## SUMARIO

**I. REVISÃO DA LITETATURA**

1. TIAMINA.....	2
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E O ESTRESSE OXIDATIVO.....	7
3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	15
3.1. Superóxido dismutase (SOD).....	17
3.2. Glutaciona peroxidase (GPx).....	20
3.3. Catalase (CAT).....	23
4. APOPTOSE.....	26
5. O TECIDO CARDÍACO.....	30
5.1. Acoplamento excitação/ contração.....	33
6. CANAIS PARA POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP ( $K_{ATP}$ ).....	40

**II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

7. JUSTIFICATIVA.....	47
8. OBJETIVOS.....	49
8.1. Objetivo geral.....	49
8.2. Objetivos específicos.....	49

**III. MATERIAL E MÉTODOS**

9.0. Dieta.....	51
9.1. Grupo Experimental.....	52
9.2. Procedimento cirúrgico.....	52
9.3. Concentração de lactato no plasma.....	52
9.4. Mensuração do consumo de oxigênio.....	53
9.5. Análise histológica e morfométrica.....	54
9.6. Identificação e quantificação de apoptose.....	54
9.7. Preparo das células isoladas.....	55
9.8. Contratilidade Celular.....	56
9.9. Mensuração dos níveis intracelulares de ROS.....	58
9.10. Preparação do tecido para análises enzimáticas.....	59
9.11. Determinação da concentração de proteínas.....	59
9.12. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase .....	60
9.13. Determinação da atividade da Glutaciona Peroxidase.....	60

9.14. Determinação da atividade da Catalase.....	60
9.15. Determinação dos níveis de TBARS.....	61
9.16. Western blot.....	61
9.17. Eletrofisiologia.....	62
9.18. Análise estatística.....	64
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	
10. Discussão.....	86
11. Conclusão.....	98
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
<b>VII. ANEXO.....</b>	<b>113</b>

## **I. REVISÃO DA LITERATURA**

## 1. TIAMINA

A tiamina (figura 1), também conhecida como vitamina B1, foi a primeira vitamina a ser descoberta, sendo considerada um componente biologicamente ativo necessário para a atividade vital de homens e animais (Stepuro, 2005). Esta vitamina, solúvel em água, é encontrada em quantidades apreciáveis em grãos integrais, leveduras e em alguns legumes e frutas (Szefer & Lebidzinska, 2006). Pelo fato de não poder ser sintetizada pelo organismo, a dieta torna-se de fundamental importância para a obtenção da vitamina B1.

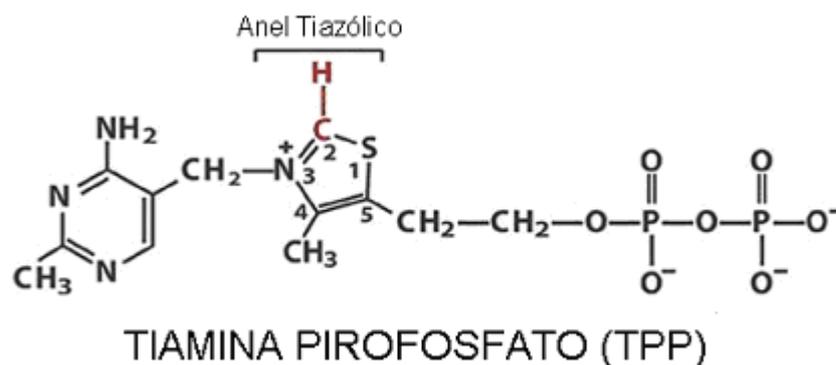


Figura 1- Estrutura molecular da tiamina pirofosfato

A deficiência de tiamina, que é considerada um problema de saúde em diversas populações mundiais, torna-se comum em pessoas com déficits nutricionais, com graves distúrbios gástricos, anorexia nervosa, prolongada nutrição parenteral ou que sofrem de alcoolismo crônico (Mcintyre & Stanley, 1971; Butterworth, 2003; Klein et al., 2004). Acrescenta-se ainda, que fatores físicos como pH e temperatura, cozimento prolongado de alimentos e a ingestão de alimentos contendo quantidades significantes de tiaminases e componentes anti-tiamina (presentes em plantas) podem auxiliar na perda desta vitamina (Butterworth, 2003; Batifoulier et al., 2005). No caso do alcoolismo, a deficiência de tiamina resulta de uma combinação de fatores decorrentes de uma absorção

inadequada da vitamina devido a uma pobre nutrição e/ou pela má absorção gastrointestinal, como consequência de doenças gástricas. Além disso, ocorrem perdas dos estoques de tiamina no fígado associadas a doenças hepáticas, devido à excessiva ingestão de álcool. Existem evidências de que o etanol, por si, inibe o transporte de tiamina através do trato gastrointestinal, além de inibir a fosforilação de tiamina para sua forma ativa, éster difosfato, que é requerida para o metabolismo energético (Butterworth, 2003). A ação do álcool no receptor NMDA de glutamato (neurotransmissor excitatório) aumenta a vulnerabilidade do indivíduo aos efeitos da deficiência de tiamina (Thomson & Marshall, 2005). Existem estudos de monitoramento de neurotransmissores cerebrais demonstrando que mesmo níveis normais de glutamato extracelular podem ser tóxicos e conduzir à morte celular em regiões vulneráveis à deficiência de tiamina (Todd & Butterworth, 2001).

As principais desordens devido à deficiência de vitamina B1 são o beribéri e a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (WKS) (Pires et al., 2005; Stepuro, 2005). Existem dois tipos de beribéri: o seco e o úmido. O beribéri seco causa danos ao sistema nervoso sendo caracterizado por neuropatia periférica que consiste em alterações na velocidade de condução dos nervos sensores e motores (Butterworth, 2003). Já o beribéri úmido causa danos ao sistema muscular e cardiovascular sendo caracterizados por taquicardia, dispnéia, hipotensão, cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva, fraqueza muscular e edema nos membros inferiores (Mcintyre & Stanley, 1971; Zangen & Shainberg, 1997; Hahn et al., 1998; Butterworth, 2003; Klein et al, 2004; Kioke et al, 2006). Menos comumente se apresenta como uma disfunção cardíaca fulminante, com baixo débito cardíaco, conduzindo à morte em poucas horas se não tratado; este recebe o nome de beribéri de Shoshin (Mcintyre & Stanley, 1971; king et al, 1972). Já a síndrome de Wernicke-Korsakoff é uma séria desordem neurológica associada à deficiência de tiamina, comum em pessoas que sofrem de alcoolismo crônico devido a uma má nutrição

e absorção da vitamina B1 (Homewood & Bond, 1999; Fellgiebel et al., 2003). É aceito que Wernick estaria relacionado a um quadro agudo devido à deficiência de tiamina, enquanto Korsakoff é considerado uma fase crônica que progride a partir de um agravamento de Wernick (Homewood & Bond, 1999). Esta doença, que é caracterizada por alterações em nível estrutural e/ou funcional, conduz a uma diminuição na densidade de células de Purkinje, degeneração cerebelar, danos neuronais, déficits de aprendizado e memória, conduzindo até mesmo, ao coma e morte (Homewood & Bond, 1999; Baker et al., 1999; Thomson & Marshall et al., 2005; Pires et al., 2005). Os sintomas decorrentes desta síndrome são oftalmoplegia, ataxia, confusão mental, apatia, lentidão psicomotora e, quando progride para um estado mais grave, que caracteriza Korsakoff, é comum se verificar quadros de amnésia (Butttherworth et al; 1993; Homewood & Bond, 1999; Fellgiebel et al., 2002; Munir et al; 2002). Wernick provavelmente resulta da combinação de alguns fatores como deficiência de tiamina, excessiva ingestão de álcool e suscetibilidade genética (Thomson & Marshall, 2005; Guerrini, et al., 2007). O desaparecimento dos sintomas em pacientes com deficiência desta vitamina é obtido com a administração de tiamina (oral, intra-venosa ou intra-muscular) que conduz a uma melhora progressiva do quadro (Munir et al., 2001; Thomson & Marshall, 2005). Resultados recentes obtidos pelo nosso grupo confirmaram a presença de desordem motora nos animais que foram submetidos a uma dieta livre de tiamina (Oliveira et al., 2007a).

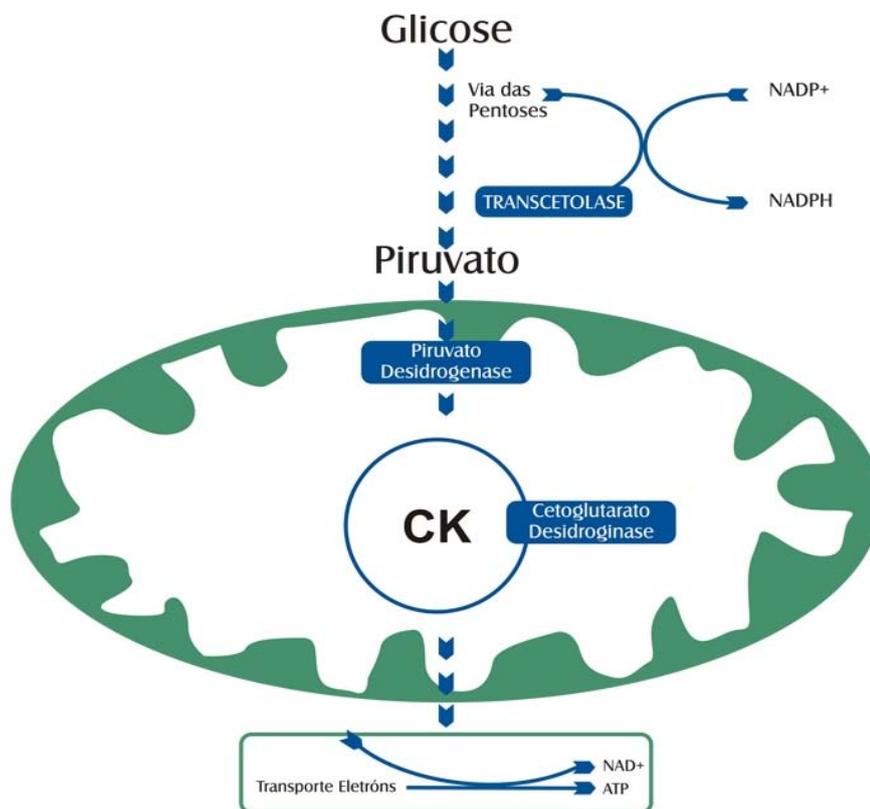
A tiamina e seus ésteres de fosfato (tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP) e tiamina trifosfato (TTP) funcionam como coenzimas, sendo que a tiamina difosfato é essencial para a atividade de importantes complexos como o da transcetolase, piruvato desidrogenase e da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (figura 2) (Zangen & Shainberg, 1997; Gibson & Zang, 2002; Bubber et al., 2004). Por isso, torna-se essencial para o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, ajudando na produção de

energia celular, de ribose, além de proteger os tecidos contra danos oxidativos por manter reduzida a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) formado na via das pentoses (da Cunha et al., 2007).

O complexo da piruvato desidrogenase (PDHC), uma enzima mitocondrial, é responsável pela descarboxilação do piruvato, provindo da oxidação da glicose, em acetil-CoA. Alterações no funcionamento da PDHC, devido à deficiência de vitamina B1, conduzem a uma oxidação incompleta da glicose (glicólise anaeróbica) que é uma das maiores causas do aumento plasmático e citosólico de ácido láctico (Naito et al., 2002; Bubber et al., 2004; Stryer et al., 2008). Além da PDHC, a atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (KGDHC), que também é uma enzima mitocondrial, é alterada em resposta ao déficit de tiamina (Bubber et al., 2004). Esta enzima, que faz parte do ciclo de Krebs, é responsável em conjunto com outras enzimas, pela oxidação de carboidratos, lipídios e proteínas. Sendo assim, alterações na sua atividade podem vir a causar diferentes disfunções metabólicas para o organismo, devido a uma menor produção de NADH e conseqüentemente da síntese de ATP (Szweda et al., 2002). A transcetolase, por outro lado, é uma enzima citosólica envolvida na via das pentoses fosfato. Esta enzima é uma transferase que tem por função converter o excesso de ribose 5-fosfato produzido no citosol em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato, que a seguir é encaminhado para a via glicolítica, onde poderá ser oxidado para obtenção de energia ou utilizado para a síntese de glicogênio (Bykova et al., 2001; Stryer et al., 2008).

Sabe-se que os estoques de tiamina no fígado e no músculo são esgotados após duas semanas de ausência da vitamina em ratos. Uma diminuição na atividade das enzimas da qual a tiamina é cofator, é verificada, assim como uma redução significativa na obtenção de energia a partir de combustíveis metabólicos como carboidratos, lipídios e aminoácidos (Szweda et al., 2002; Mancinelli et al., 2003). Bubber et al. (2004) mensuraram a atividade de todas as enzimas do ciclo de Krebs, bem como, do complexo

da piruvato desidrogenase em um estudo com cérebro de camundongos deficientes em tiamina durante 10 dias. Neste estudo, foram verificadas alterações em enzimas não dependentes de tiamina como succinato desidrogenase (27% de inibição) e malato desidrogenase (12% de inibição). Da mesma maneira, uma redução de 21,5% da atividade do complexo da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase foi observada e a atividade da piruvato desidrogenase, que foi diminuída em 10,5%. A diminuição da atividade das enzimas da qual a tiamina não é cofator foi atribuída a um provável aumento do estresse oxidativo, já que elas possuem grupamentos que seriam modificados por radicais livres.



Bubber et al., 2004

Figura 2 - Enzimas dependentes de tiamina: transcetolase, piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase.

## 2. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E O ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio molecular é uma molécula diatômica ( $O_2$ ) onde dois átomos de oxigênio estão ligados um ao outro possuindo dois pares de elétrons desemparelhados (Chandel & Budinger, 2007). O oxigênio é liberado das plantas pela fotossíntese sendo necessário para a respiração de organismos aeróbicos como os mamíferos, que utilizam essa molécula para geração de energia através da síntese de ATP nas mitocôndrias (Valko et al., 2006; Chandel & Budinger, 2007). Esta energia, requerida para a sobrevivência do organismo (crescimento celular, manutenção de estruturas e gasto de energia) é provida pelo fluxo de elétrons na cadeia respiratória devido aos processos de oxidação de moléculas orgânicas, sendo o oxigênio oceptor final destes elétrons (Schafer & Buettner, 2001). Porém, apesar da necessidade de  $O_2$  para existência de vida, esta molécula pode interferir em processos de transferência de elétrons no ambiente formando espécies reativas do oxigênio (ROS) (Chandel & Budinger, 2007). ROS podem ser derivadas tanto do oxigênio quanto do nitrogênio sendo o oxigênio essencial para formação de todas as ROS e RNS (espécies reativas do nitrogênio) (Fang et al., 2002; Valko et al., 2006). Os derivados do oxigênio incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ ), alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ) e o hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), já os derivados de nitrogênio, incluem o óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $\cdot NO_2$ ). Todas estas espécies são caracterizadas por ter um ou dois elétrons desemparelhados sendo instáveis e muito reativas (Fang et al., 2002; Valko et al., 2006). Tanto os radicais livres derivados do oxigênio quanto os derivados do nitrogênio podem ser convertidos em outras espécies reativas não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Fang et al., 2002).

A mitocôndria é considerada o principal local de formação de superóxido e este processo ocorre principalmente nos complexos I, II e III da cadeia respiratória, sendo que,

a formação de ROS nos complexos I e II ocorre na matriz mitocondrial e no complexo III ocorre tanto na matriz mitocondrial quanto no espaço intermembrana (figura 3) (Valko et al., 2006; Chandel & Budinger, 2007). Uma pequena porcentagem dos elétrons transferidos para os complexos protéicos na mitocôndria se complexa com o oxigênio circundante formando as espécies reativas do oxigênio (Urso et al., 2003). Além da mitocôndria, outra fonte de geração de ânions superóxido na célula é o complexo da NAD(P)H oxidase, uma enzima presente na membrana celular de fagócitos (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos), fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e no coração (Murdoch et al., 2006; Oudot et al., 2006). No momento em que um fagócito é exposto a um estímulo ele tem a habilidade de reconhecer partículas estranhas e destruí-las por desencadear uma série de reações chamadas de explosão respiratória devido à produção de  $O_2^-$  (Sharikabad et al., 2004; Zhao et al., 2008). Além deste, a oxidação da xantina ou hipoxantina pela xantina oxidase, a autooxidação de monoaminas (epinefrina, norepinefrina e adrenalina), a oxidação da hemoglobina na presença de metais de transição, a redução de um elétron do  $O_2$  pelo citocromo P450 e pela enzima óxido nítrico sintase são também fontes geradoras de ânions superóxido na célula (figura 4, 6) (Matés & Sanchez-Jiménez, 2000; Masella et al., 2005). Adicionalmente, diversas flavoproteínas mitocondriais como o sítio da  $\alpha$ - lipoamida desidrogenase do complexo da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ou a flavoproteína que faz a transferência de elétrons pela  $\beta$  oxidação são possíveis candidatos para a formação de ROS na mitocôndria (Kudin et al., 2005).

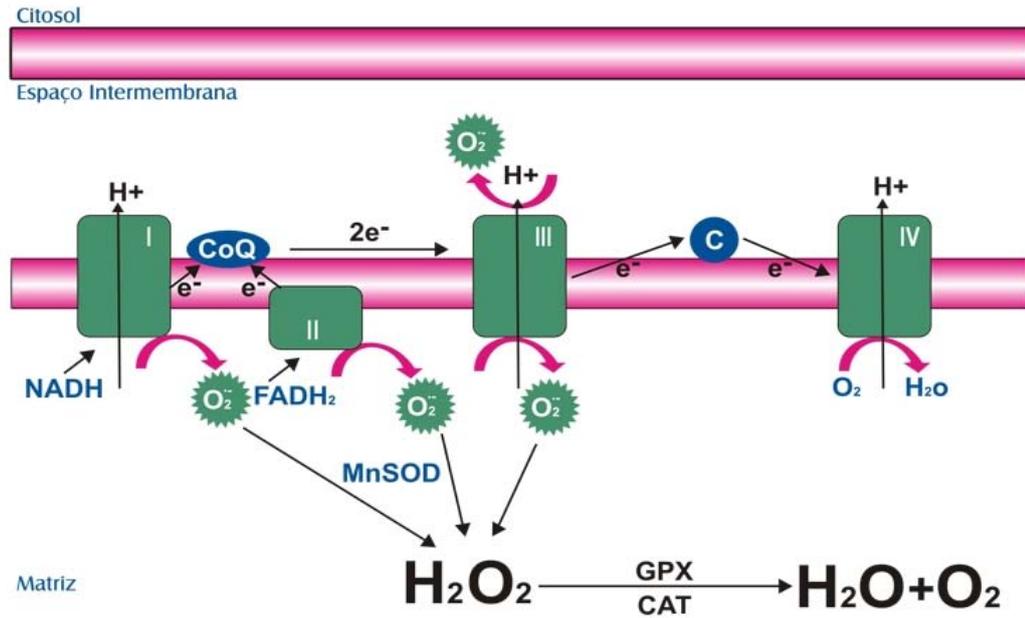
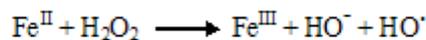


Figura 3 - Formação de ROS na cadeia transportadora de elétrons.

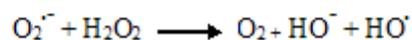
Nos sistemas biológicos, a célula possui um conjunto de moléculas mantidas no estado redox em muitos constituintes celulares (Schafer & Buettner, 2001). Este estado tem sido definido como a razão da interconversão entre formas oxidadas e reduzidas a partir de um acoplamento redox específico como, por exemplo, o do [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] e GSSG/2GSH (Schafer & Buettner, 2001). O estado redox da célula, mantido dentro de uma estreita variação sob condições normais, determina o funcionamento celular podendo ser alterado sob condições patológicas (Valko et al., 2006). Este estado pode ser comprometido, por exemplo, pelas concentrações aumentadas de metais de transição como o ferro, cobre, cobalto e cromo devido às reações redox que são desencadeadas pelos mesmos (Valko et al., 2006). A liberação destes metais das proteínas celulares, bem como, sua presença no ambiente intracelular faz com que os mesmos participem de reações de Fenton gerando como produto final o radical hidroxil (figura 4) (Sheline & Wei, 2006). Acrescenta-se ainda que o ânion superóxido é capaz de liberar o ferro do interior de proteínas ajudando no desencadeamento da reação de Fenton (Kehrer, 2000). Além

disso, o superóxido e  $\text{H}_2\text{O}_2$  participam das reações de Haber - Weiss (figura 4) formando radical hidroxil (Kehrer, 2000). A formação de ROS ou RNS pode ser danosa por eles serem extremamente reativos, já que o acúmulo das ROS é conhecida por causar estresse oxidativo, danos no DNA e membranas, mutagenicidade, degeneração dos tecidos, envelhecimento prematuro e morte celular por apoptose (Matés & Sanchez - Jiménez, 2000; Giles et al, 2001; Orhan et al., 2006). O superóxido e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são produzidos em vários sistemas biológicos, mas reagem com outras moléculas em baixas concentrações principalmente quando comparados com radical hidroxil (Molina & Garcia, 1997) e são metabolizados efetivamente e seletivamente próximos aos locais onde são produzidos (Kira, Sato & Inoue et al., 2002). Já o radical hidroxil tem uma alta reatividade sendo a mais perigosa ROS produzida intracelularmente sendo conhecido por reagir com componentes do DNA danificando bases nitrogenadas e também pentoses como a desoxirribose (Barja, 2002; Day 2004; Du & Gebicki, 2004).

1) Reação de Fenton



2) Reação de Haber-Weiss



Chandel & Budinger, 2007

Figura 4- Reação de Fenton e Haber –Weiss

Sabe-se que a célula continuamente produz radicais livres e ROS como parte dos processos metabólicos normais e, apesar das diversas disfunções celulares ocasionadas por estas espécies elas são essenciais para a vida sob condições fisiológicas (concentrações baixas ou moderadas) (Cnubben et al., 2001; Urso et al., 2003). Estes compostos estão envolvidos na defesa do organismo contra agentes infecciosos,

detoxificação de xenobióticos, em transdução de sinais, transcrição de genes, indução de uma resposta mitogênica na replicação celular, regulação do metabolismo e ativação da enzima guanilato ciclase nas células (Cnubben et al., 2001; Urso et al., 2003; Forman 2007). Tem sido mostrado que o condicionamento isquêmico pode ser bloqueado por “scavengers” de ROS e tem sido sugerido que a cardioproteção seria iniciada por ROS que levariam à ativação de sinais que conduziram a cardioproteção (Kabir et al., 2006). Kabir et al., 2006 demonstrou que a cardioproteção no condicionamento isquêmico induzido por ROS é dependente da ativação de PKC. Acrescenta-se ainda que ROS como o peróxido de hidrogênio e o superóxido medeiam a ativação e a inibição de fosforilação e desfosforilação catalisada por proteínas kinases e fosfatases (Afanas' ev, 2006). Diversos estudos têm demonstrado que o peróxido de hidrogênio e o superóxido são capazes de ativar essas enzimas independentemente. O peróxido de hidrogênio é capaz de ativar e inibir proteínas kinases e o superóxido é capaz de inibir a desfosforilação catalisada por proteínas fosfatases, fazendo essa sinalização através de duas proteínas as serina/treonina fosfatases e as tirosinas fosfatases (Afanas' ev, 2006). Além disso, o aumento na formação de ROS não necessariamente significa que elas causarão danos oxidativos na célula, já que essas espécies podem ser detoxificadas pelos sistemas antioxidantes (Orhan et al., 2006). Porém, ROS podem se tornar citotóxicas quando em excesso conduzindo a uma condição chamada de estresse oxidativo (Masella et al., 2005).

O estresse oxidativo se caracteriza por um desbalanço intracelular entre sistemas antioxidantes e ROS de modo que as defesas antioxidantes são insuficientes para limpar e neutralizar totalmente os níveis aumentados de ROS que são formadas por reações metabólicas que utilizam o oxigênio (Cnubben et al., 2001; MacCarthy & Shah, 2003). ROS podem modificar covalentemente resíduos dentro de proteínas específicas, sejam elas citosólicas ou fatores de transcrição nuclear e isto pode ter importantes implicações

para um número de doenças cardiovasculares onde se acredita que o estresse oxidativo exerça importantes funções (Liu et al., 2005). Conseqüentemente, o aumento destas espécies reativas pode conduzir a mudanças permanentes na transdução de sinal e expressão de genes comprometendo assim a integridade e a sobrevivência da célula (Matés et al., 1999; Cnubben et al., 2001). A degradação de estruturas intracelulares como lipídios, proteínas e DNA pode implicar no desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes mellitus, injúria de isquemia e reperfusão, aterosclerose, doenças cardiovasculares, desordens degenerativas e envelhecimento (Matés et al., 1999; Cnubben et al., 2001; Johnson, 2002). Diversos estudos têm demonstrado que ROS estão aumentadas na insuficiência cardíaca, contribuindo para esta patofisiologia por iniciar processos apoptóticos, bem como interferir diretamente na homeostase do cálcio (Farré & Casado, 2001).

Quando o aumento dos radicais livres for maior que a habilidade da célula para neutralizá-los, estes radicais poderão atacar componentes celulares especialmente lipídios de membrana iniciando reações em cadeia denominadas peroxidação lipídica (LPO) que, conduzem à geração de mais radicais e ROS que podem vir a danificar outros componentes celulares como proteínas e DNA (Urso et al., 2003). A peroxidação lipídica é uma complexa sequência de reações bioquímicas, amplamente definida como uma deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (Ahmad, 1995). O resultado da quebra destes lipídios é a formação de produtos tóxicos para a célula como o pentano, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), malondialdeído (MDA), hidroperóxidos lipídicos e dienos conjugados (Cnubben et al., 2001). É conhecido que o HNE inibe o complexo da piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, provavelmente por modificar covalentemente o ácido lipóico presente na estrutura dessas enzimas (Sheline & Wei, 2006). A verificação da peroxidação lipídica inclui a avaliação dos níveis destes compostos, sendo que, em muitos estudos os níveis de MDA têm sido comumente

utilizados através do ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) como um biomarcador de danos oxidativo aos lipídios (Urso et al., 2003; Lykkesfeldt, 2007).

O processo de LPO (figura 5) se dá quando radicais livres e outras espécies reativas ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{HOO}\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ) extraem um átomo de hidrogênio a partir de um ácido graxo insaturado e um radical lipídico é formado (Fang et al., 2002). Em seguida, um átomo de oxigênio é adicionado a este radical formando um radical lipídico peroxil ( $\text{LOO}\bullet$ ). Este, por sua vez, propaga reações em cadeia de peroxidação por abstrair um átomo de hidrogênio a partir do ácido graxo insaturado próximo, com a produção de um hidroperóxido lipídico que pode ser decomposto para formar o radical alcoxil ( $\text{LO}\bullet$ ) e outros produtos (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003). Esta série de reações de peroxidação lipídicas iniciadas por ROS com produção de radicais peroxil e alcoxil lipídicos quando em excesso podem danificar a integridade celular (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).

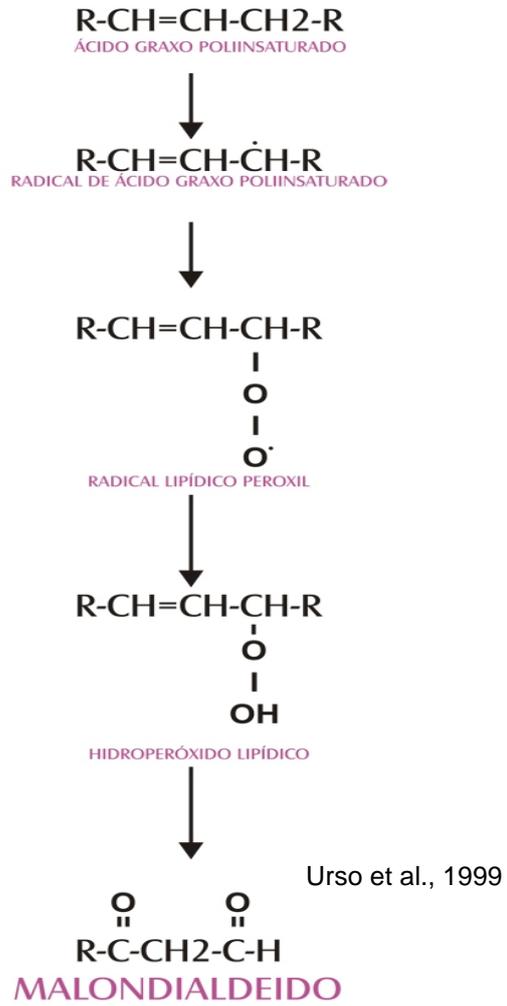


Figura 5- Reações seqüenciais envolvidas na peroxidação lipídica.

### 3. Sistemas Antioxidantes Enzimáticos

Devido à produção de radicais livres nos diferentes processos metabólicos e à necessidade dos mesmos para manter a homeostase celular, diferentes sistemas enzimáticos de defesas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase, entre outros, são produzidos na célula como mecanismo de defesa (figura 6) (Molina & Garcia, 1997; Urso et al., 2003). A função destes sistemas é a de evitar um desbalanço na relação sistema antioxidantes/ROS, já que o aumento das ROS pode conduzir a várias condições patológicas (Matés et al., 1999). Além disso, em resposta ao estresse oxidativo as células ativam a expressão de um número de genes incluindo aqueles que são requeridos para a detoxificação das ROS, bem como os de reparo e manutenção da homeostase celular (Liu et al., 2005).

O bom funcionamento das enzimas antioxidantes se dá devido à presença e capacidade de oxi-redução de metais de transição presentes em sua estrutura. Metais de transição exercem importantes funções em sistemas bioquímicos, em particular, nos sítios ativos de algumas enzimas que são, por este fato, denominadas de metaloenzimas (Carrasco et al., 2006). A estrutura eletrônica no local ativo do metal representa uma inter-relação entre diferentes estados de oxidação dos mesmos (Carrasco et al., 2006). Tanto a SOD quanto CAT e GPx são metaloenzimas responsáveis por defender o organismo de ROS e desse modo manter a integridade celular (MacCarthy & Shah, 2003; Sahin & Gümüslü et al., 2006). Além destes, sistemas não enzimáticos como as vitaminas A, C, E, glutathione (GSH), flavonóides e ubiquinóis também atuam contra ROS (Matés et al., 1999; Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).

Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo envolvem a prevenção da formação de ROS, mecanismos de reparo, defesas físicas e defesas antioxidantes (Ahmad, 1995; Valko et al., 2006). A determinação da atividade e expressão protéica de

sistemas antioxidantes (SA), a mensuração do produto de macromoléculas oxidadas e a detecção direta de radicais livres têm sido comumente utilizadas em diversos estudos para avaliar o estresse oxidativo celular (Fang et al., 2002).

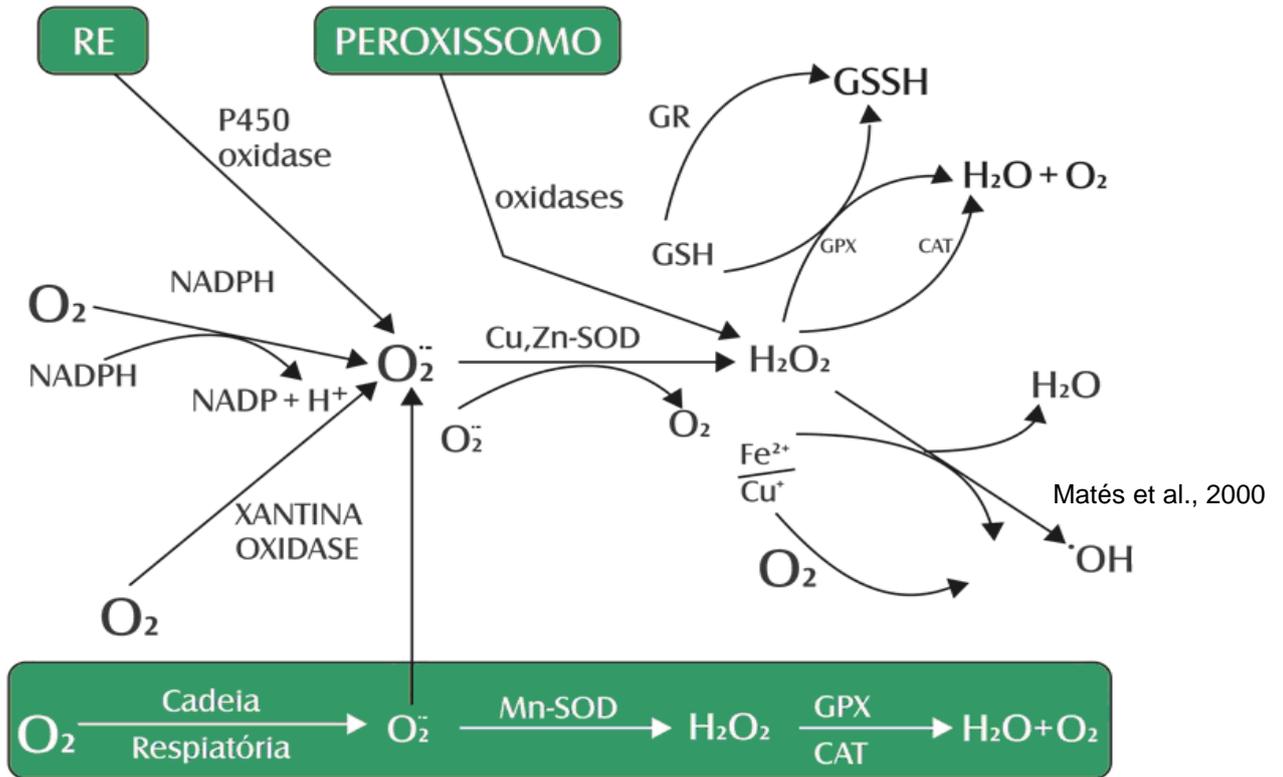


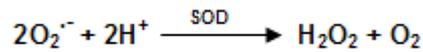
Figura 6 - Mecanismos de ação dos diferentes sistemas antioxidantes

### 3.1. Superóxido dismutase (SOD)

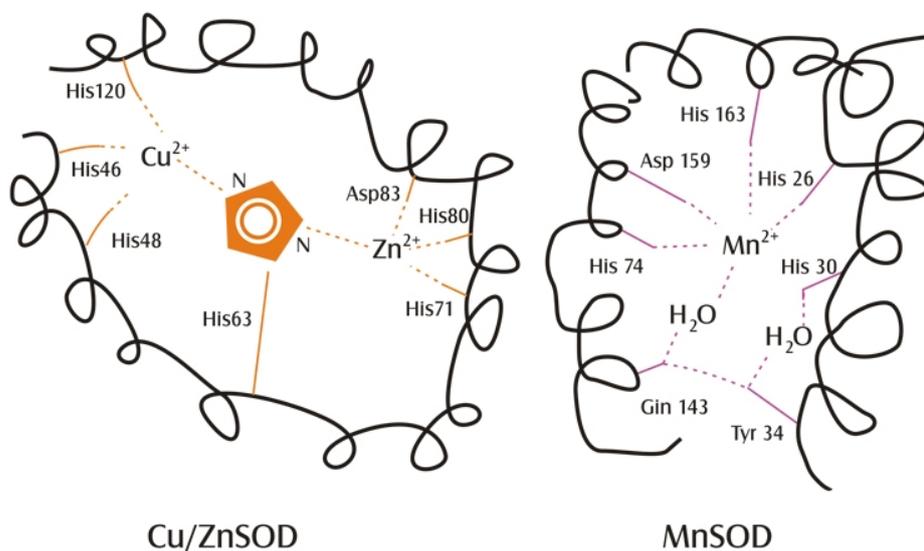
A reação de dismutação (figura 7) de duas moléculas de ânion superóxido resulta na formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), considerada a primeira linha de defesa contra superóxido (Matés et al., 1999; Skulachev, 1999; Chandel & Budinger, 2007; Fernandes et al., 2007). As células de mamíferos tem três isoformas da SOD uma dependente de cobre e zinco (CuZn - SOD ou SOD1), uma dependente de manganês (Mn -SOD ou SOD2) e uma extracelular também dependente de cobre e zinco (EC-SOD ou SOD3) (Nozyk Grayck et al., 2005; Chandel & Budinger, 2007). A CuZn-SOD (32KDa) (figura 7) está localizada no espaço intermembranar da mitocôndria, núcleo, citosol e peroxissomas e possui duas subunidades idênticas, onde cada uma possui um átomo de Zn e um de cobre no seu sítio ativo (Kira, Sato & Inoue 2002; Chandel & Budinger, 2007). A Mn-SOD (figura 7) localizada na matriz mitocondrial é um homotetrâmero de peso molecular de 96KDa que possui um átomo de Mn por subunidade que cicliza entre Mn(II) e Mn(III) e retorna a Mn(III) durante os dois passos de dismutação do superóxido (Matés & Sanchez - Jiménez, 2000). Já a EC-SOD (135KDa) é uma proteína tetramérica secretada extracelularmente e ligada a polissacarídeos sulfatados na superfície de membranas com alta afinidade a glicosaminoglicanos como heparina (Matés et al., 1999; Nozyk Grayck et al., 2005; Chandel & Budinger, 2007). Sua função é detoxificar o superóxido do compartimento extracelular, limitando, assim, a reação do ânion superóxido com óxido nítrico, a fim de evitar a formação de peroxinitrito na matriz (Nozyk Grayck et al., 2005). Em células de mamíferos tanto a Cu/Zn quanto a Mn SOD são reguladas por uma variedade de sinais incluindo a regulação em resposta ao estresse oxidativo (Landis & Tower, 2006). Estudos recentes mostram a importância das SODs nos processos anti-

inflamatórios, anti-câncer e anti-envelhecimento, além de ajudar a evitar o infarto do miocárdio (Carrasco et al., 2007).

Reação:



Estrutura Molecular



Landis & Tower 2006

Figura 7– Reação catalisada pela SOD Cu/Zn e Mn e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio ativo.

Estudos com knockout da SOD Cu/ Zn indicam que a eliminação do seu gene em roedores está associada com hepatocarcinogênese, infertilidade em fêmeas, doenças degenerativas e diminuição do tempo de vida (Cullota et al., 2006). É conhecido que a ativação do receptor  $\beta$ -adrenérgico no coração contribui para a progressão da insuficiência cardíaca e que esta estimulação aumenta o estresse oxidativo no coração. Em um estudo com ratos adultos estimulados com isoproterenol, Srivastava et al. 2007

observaram hipertrofia, aumento da função sistólica e aumento do estresse oxidativo. Neste estudo eles observaram aumento dos produtos de lipoperoxidação (MDA e HNE) e verificaram também significativa redução na atividade da CuZn- SOD, bem como, uma diminuição nos níveis de seu RNAm, sendo que, nenhuma mudança na atividade e níveis de RNAm na Mn- SOD, CAT e GPx foi observada.

A importância da Mn-SOD foi demonstrada em um estudo com nocautes homocigotos para essa enzima, onde os mesmos desenvolveram-se normalmente no útero, porém morreram depois do nascimento apresentando cardiomiopatia dilatada (Sawyer et al., 2000). Acrescenta-se ainda um estudo em que Misawa et al. 2006 demonstraram que camundongos deficientes para SOD-Mn morriam durante a vida embrionária ou em estágio precoce do desenvolvimento pós-natal.

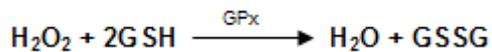
### 3.2. Glutathione peroxidase (GPx)

A glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), uma importante peroxidase responsável pela remoção de  $H_2O_2$  em água e oxigênio (figura 8) é encontrada em mamíferos no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo (Antunes et al., 2002). A GPx (figura 8) é uma enzima com quatro subunidades idênticas com peso molecular de 80KDa possuindo 5 isoenzimas em mamíferos, sendo que, o nível de cada isoforma varia dependendo do tecido (Matés et al., 1999, Fukuhara et al., 2005). A GPX-1 está localizada na maioria dos tecidos, a GPx-2 é encontrada principalmente no trato gastrointestinal, a GPX-3 é a isoforma encontrada no plasma, a GPx-4 é encontrada junto de fosfolípidios de membrana e a GPx-5 é encontrada no epidídimo (Matés & Sanchez - Jiménez, 2000; Fukuhara et al., 2005).

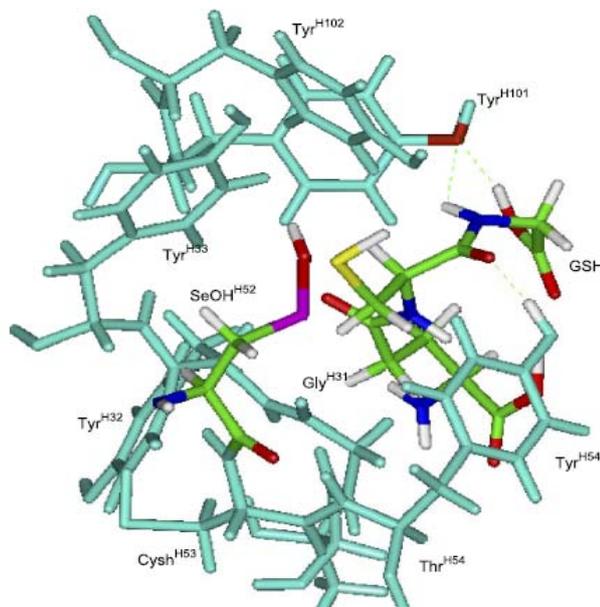
Embora o substrato da GPx, assim como o da catalase, é o  $H_2O_2$  ela pode atuar também em lípidios e outros hidroperóxidos orgânicos (Matés et al., 1999). A GPx pode ser dividida em dois tipos de enzimas uma dependente e uma independente de selênio (Cnubben et al., 2001). As dependentes de selênio catalisam a remoção de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgânicos e as independentes de selênio são inativas frente ao  $H_2O_2$  e só detoxificam hidroperóxidos (Cnubben et al., 2001). Para a GPx exercer sua atividade e detoxificar o  $H_2O_2$  esta enzima precisa oxidar a glutathione (GSH) formando glutathione dissulfeto (GSSG), impondo para isso um estresse oxidativo e energético para a célula, já que a redução da glutathione oxidada (GSSG) é um processo dependente de energia (Giles et al; 2001; Antunes et al., 2002). A enzima glutathione redutase utiliza o NADPH para conseguir reduzir a GSSG e regenerar GSH que será utilizada pela GPx (Fang et al., 2002). O metabolismo da glicose e o ciclo das pentoses fosfato exerce uma função crucial na produção de NADPH e manutenção da razão de GSH:GSSG e consequentemente no estado redox normal da célula (Fang et al., 2002). Quando a concentração intracelular de

GSH diminui e de GSSG aumenta a demanda por NADPH aumenta marcadamente (Fang et al., 2002). Este evento necessita de um aumento do metabolismo da glicose pela via das pentoses, o maior responsável pela produção do NADPH intracelular (Fang et al., 2002).

Reação:



Estrutura molecular



Zhang et al (2005)

Figura 8- Reação catalisada pela GPx e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio ativo.

A GSH, considerada o maior tampão citosólico redox, está presente dentro das células em concentrações milimolares e atua como primeira linha de defesa para detoxificação das ROS (Masella et al., 2005). A GSH, um cofator para diversas enzimas, é um tripeptídeo sintetizado a partir do glutamato, cisteína e glicina, necessária para que a mesma consiga detoxificar os peróxidos produzidos como consequência de várias

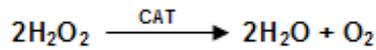
reações metabólicas (Schafer & Buettner, 2001; Townsend et al., 2003). Este tripeptídeo é conhecido por atuar como um agente redutor e, quando reage com as ROS são oxidadas por estas espécies, formando pontes dissulfeto com as mesmas e neutralizando-as (Giles et al., 2001). No núcleo, a GSH mantém o estado redox de proteínas que contém sulfidrilas que são necessárias para o reparo do DNA, já que os resíduos de aminoácidos presentes nessas proteínas, em particular os de cisteína, são suscetíveis à oxidação pelas ROS/RNS (Valko et al., 2006). A GSH pode reagir também com uma variedade de xenobióticos uma reação catalisada pela glutathione-S-transferase e também limpar diretamente e indiretamente ROS (radical peroxil lipídico, peroxinitrito e  $H_2O_2$ ) (Fang et al., 2002). Acrescenta-se ainda, que a GSH metaboliza carcinogênicos, poluentes ambientais, drogas e diversos xenobióticos (Cnubben et al., 2001).

Shiomi et al. 2004 em um estudo com camundongos transgênicos que super expressavam GPx demonstraram um aumento na atividade desta enzima no coração, sem mudança na atividade das outras enzimas antioxidantes. A expressão excessiva da GPx inibiu o remodelamento do ventrículo esquerdo e a insuficiência cardíaca depois da indução do infarto do miocárdio nos animais transgênicos, onde o melhoramento das funções do ventrículo esquerdo foi acompanhado por uma menor hipertrofia, apoptose e fibrose. Além disso, as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram diminuídas nos camundongos transgênicos em relação aos controles.

### 3.3. Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6) (figura 9) é uma enzima que atua na remoção de duas moléculas de  $H_2O_2$  formando duas moléculas de água e oxigênio ( $O_2$ ), produtos não tóxicos a célula, sendo encontrada nos peroxissomos e em menores níveis no citosol e mitocôndria cardíaca (Antunes et al., 2002; Diaz et al., 2005). Os peroxissomos contêm grandes concentrações de catalase, prevenindo a acumulação de  $H_2O_2$  produzido devido ao alto consumo de  $O_2$  utilizado para oxidação de moléculas biológicas (Valko et al., 2006). A catalase é uma proteína tetramérica constituída de quatro subunidades idênticas de 60 KDa e com uma massa molecular de 240 KDa que possui um grupamento heme em seu sítio ativo localizado internamente, o que explica a habilidade desta enzima em usar somente substratos pequenos (Diaz et al., 2005; Kirkman & Gaetani, 2006). Enzimas contendo heme como algumas peroxidases dentre elas a catalase, formam um intermediário em comum, o oxiferril porfirina, que é gerado via reação do  $H_2O_2$  com o átomo de ferro presente no heme e, esta reação é determinada pela acessibilidade do substrato ( $H_2O_2$ ) a seu sítio ativo (Fujji, 2002; Matsunaga & Shiro, 2004). O heme funciona como um reservatório de elétrons providenciando um potencial redox requerido para uma variedade de funções catalíticas (Matsunaga & Shiro, 2004). A atividade catalítica desta enzima é considerada uma das mais altas encontradas em mamíferos (Kirkman & Gaetani, 2006).

Reação:



Estrutura Molecular

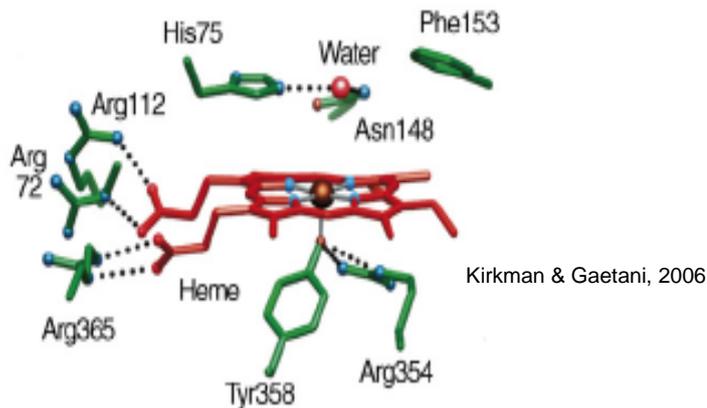


Figura 9- Reação catalisada pela CAT e a distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no seu sítio ativo.

A catalase possui menor atividade em tecidos específicos sob condições normais, quando comparado a glutathiona peroxidase, exercendo uma importante função de defesa sob condições de estresse oxidativo, como uma resposta adaptativa celular (Matés et al., 1999). O tecido cardíaco contém baixos níveis de catalase e esta enzima funciona com uma menor função na detoxificação do peróxido de hidrogênio em relação à GPx, comparado a outros tecidos como o fígado (Molina & Garcia, 1997). Ren et al (2007) em um estudo com camundongos transgênicos com diferentes idades que expressavam excessivamente a catalase observaram que esta enzima pode interferir no envelhecimento, prolongando o tempo de vida. Esta conclusão pode ser explicada devido à atenuação das disfunções contráteis, bem como, a melhora na mobilização de cálcio intracelular em camundongos que super expressavam de forma exagerada esta enzima.

Esse resultado demonstrou que a catalase protege o cardiomiócito das disfunções contráteis induzidas pelo envelhecimento.

#### 4. APOPTOSE

A morte celular é um dos eventos chaves na biologia, onde a homeostase celular é mantida por um balanço entre o aumento e a diminuição no número de uma população de células (Kunnapuli et al., 2006). Este processo é regulado fisiologicamente e geneticamente, exercendo função central no desenvolvimento normal dos órgãos, controle do número e deleção de células não funcionais e anormais (McConkey, 1998; Kumar & Jugdutt, 2003; Takemura & Fujiwara, 2004).

A morte celular programada ou apoptose traz diversas mudanças celulares, dentre elas, a perda de contato com as células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, condensação/fragmentação da cromatina que envolve a ativação e/ou síntese de endonucleases que fragmentam o DNA (McConkey, 1998; Kunnapuli et al., 2006). O núcleo é fragmentado, mas outras organelas subcelulares são preservadas morfológicamente até o estágio final (Takemura & Fujiwara, 2004). A célula fragmentada, chamado corpo apoptótico, é circundada pela membrana plasmática que ainda permanece intacta fazendo com que o conteúdo celular não seja liberado (Takemura & Fujiwara, 2004). Os corpos apoptóticos são removidos rapidamente antes da perda da integridade da membrana, na ausência de processos inflamatórios (McConkey, 1998; Kunnapuli et al., 2006). Além disso, na célula apoptótica ocorrem mudanças na superfície da membrana celular que são caracterizadas pelo movimento de "flipping" da fosfatidilserina da membrana interna para a externa da membrana plasmática devido à oxidação induzida pelas ROS (McConkey, 1998). Depois do aparecimento da fosfatidilserina no folheto externo, da membrana mitocondrial externa, ocorre o reconhecimento da célula apoptótica pelos fagócitos (Skulachev, 1999).

A apoptose pode ser induzida por uma variedade de estímulos, dentre os bioquímicos encontra-se uma depleção moderada de ATP, aumento do cálcio intracelular,

depleção da GSH, inibição de Bcl-2 e produção das ROS (McConkey, 1998). Este evento, bioquimicamente distinto da necrose, acontece sem a presença de inflamação e ocorre por uma via coordenada e pré-determinada, que pode ser modulada para manter a viabilidade celular (Abdelwahid & Smith, 2007). Além disso, a apoptose é controlada por uma inte-relação entre um grupo de proteínas pró-apoptóticas chamado Bax e proteínas anti-apoptóticas chamadas Bcl-2, sendo que, o balanço relativo entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas determina a susceptibilidade da célula à morte programada (Thatte et al., 2004). Já a necrose é acompanhada por processos inflamatórios que resultam de um efeito somatório, a partir de muitos processos bioquímicos independentes, que são ativados por grave perda de energia e sendo de difícil prevenção (Abdelwahid & Smith, 2007). A explicação ortodoxa para a perda de miócitos seria a necrose celular, mas na última década diversos estudos mostram a função da apoptose na gênese da insuficiência cardíaca (Garg et al., 2005). O aumento, a diminuição ou a ausência de apoptose exerce importantes funções no desenvolvimento de várias doenças, incluindo as autoimunes, neurodegenerativas e desordens cardiovasculares (Kumar & Jugdutt, 2003).

Kumar & Jugdutt, 2003 hipotetizaram que o estresse oxidativo pode ser o maior estímulo apoptótico em diferentes doenças cardíacas (figura 10). Diversas disfunções celulares podem levar a um desbalanço entre a produção das ROS e os sistemas antioxidantes, sendo que, um aumento das ROS é responsável por levar a abertura de um poro de permeabilidade transitória dependente das ROS na membrana mitocondrial interna (Skulachev, 1999). A abertura deste poro faz com que a mitocôndria não sobreviva por um longo tempo, já que a síntese de ATP e o importe de proteínas requer a manutenção do potencial de membrana, que todavia, colapsa devido ao desarranjo da membrana mitocondrial interna devido à abertura deste poro (Skulachev, 1999). A perda da integridade da membrana mitocondrial, além de levar a dissipação do potencial de

membrana, faz com que ocorra um aumento do volume celular devido à liberação de todas as proteínas mitocondriais para o citosol, dentre elas, o citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e algumas pró-caspases (McConkey, 1998; Skulachev, 1999). Tem sido demonstrado que a mitocôndria gera a cascata apoptótica inicial através da redução no potencial mitocondrial e liberação do citocromo c que se complexa e ativa uma proteína citosólica chamada APAF-1 (fator ativador 1 da protease apoptótica) que ativa a cascata das caspases 3, 8 e 9, resultando em danos no DNA e apoptose (Thatte et al., 2004; Dent et al., 2007).

As caspases, uma família de aspartil-cisteíno proteases, existem na forma de pró-enzimas em todas as células e mediam processos apoptóticos por ações proteolíticas em um número de outras proteínas estruturais, aumentando a disfunção sistólica na insuficiência cardíaca (Garg et al., 2005). Nas caspases ocorre a hidrólise da pró-caspase inativa 9 para uma forma ativa caspase 9 que então hidrolisa a pró-caspase 3 para caspase 3, esta ataca diversas proteínas que ocupam posição chave no mapa metabólico resultando em dramáticas mudanças no metabolismo celular que resultam em morte celular programada (Skulachev, 1999). A actina, que é o principal componente da banda Z no músculo, é um dos alvos das caspases 3, onde, a degradação da actina pode auxiliar na disfunção do ventrículo esquerdo e progressão do remodelamento cardíaco (Garg et al., 2005).

Durante o desenvolvimento a apoptose contribui para a morfogênese do coração, além de contribuir para a morfogênese de outros órgãos. A morte por apoptose do cardiomiócito ocorre durante a embriogênese e depois do nascimento, sendo que, a apoptose está envolvida na morfogênese do sistema de condução, incluindo o nodo átrio ventricular e suas fibras (Takemura, & Fujiwara, 2004). A apoptose é considerada uma falha patológica chave para o remodelamento na insuficiência cardíaca funcionando como um fator de transição entre um mecanismo compensado/descompensado no

desenvolvimento desta patologia (Garg et al., 2005; Abbate et al., 2008). A presença de apoptose depois de um infarto do miocárdio se correlaciona com uma severa insuficiência cardíaca provavelmente devido à perda do miocárdio funcional e aumento do remodelamento do ventrículo esquerdo (Garg et al., 2005). A perda aguda de miócitos e o progressivo remodelamento na tentativa de sobrevivência do ventrículo contribuem para a disfunção do mesmo (Garg et al., 2005).

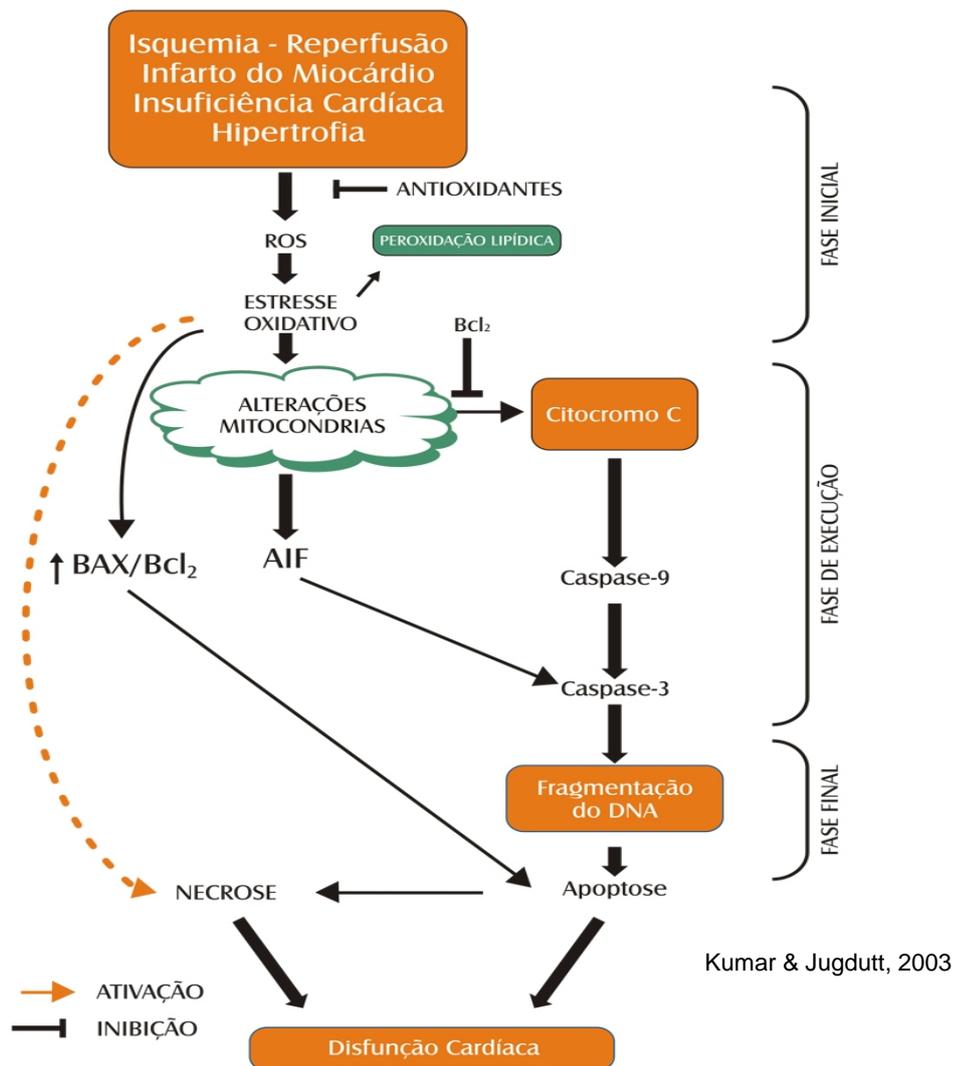


Figura 10- Diagrama esquemático mostrando vias apoptóticas induzidas por estresse oxidativo e os mecanismos de defesas antiapoptóticas envolvidos nas diferentes doenças cardíacas.

## 5. O TECIDO CARDÍACO

O coração é um órgão metabolicamente ativo que consome aproximadamente de 20-30 vezes seu próprio peso em ATP por dia (Ormerod et al., 2008). O músculo cardíaco pode metabolizar uma variedade de moléculas produtoras de energia como lactato e corpos cetônicos, porém, a maior parte do ATP provém da oxidação de ácidos graxos (60-90%) e da glicose (20-40%) (Ormerod et al., 2008). Esta demanda de energia é proveniente da respiração mitocondrial (aproximadamente 90%), sendo que esta organela ocupa cerca de um terço do volume do cardiomiócito (Ormerod et al., 2008). No músculo cardíaco de ratos, a densidade mitocondrial é alta constituindo acima de 35% do volume celular (Bers 2001; Sheran & Pepe, 2006). Existe uma relação estequiométrica entre a razão de oxidação de combustíveis carbonados, redução química de NADH e FADH<sub>2</sub>, fluxo através da cadeia transportadora de elétrons, consumo de oxigênio, fosforilação oxidativa, hidrólise de ATP, interação actina-miosina e contratilidade cardíaca (Stanley et al., 2005). A regulação do metabolismo no miocárdio está ligada a concentração de substratos, concentração de hormônios, fluxo coronariano e estado nutricional do tecido (Stanley et al., 2005). O consumo de oxigênio corporal total (VO<sub>2</sub>) normalmente é determinado pela necessidade metabólica dos tecidos, sendo a frequência cardíaca ajustada para manter a liberação adequada de O<sub>2</sub> nos tecidos (Rady et al., 1994). A redução do débito cardíaco e da liberação de O<sub>2</sub> tem sido associada à alta mortalidade na insuficiência cardíaca (Rady et al., 1994). Devido à tiamina ser uma coenzima de enzimas importantes envolvidas no metabolismo intermediário, sua deficiência acarreta uma diminuição do metabolismo oxidativo e conseqüentemente a produção de ATP (Bubber et al., 2004) o que conduz a mudanças estruturais e bioquímicas que auxiliam no progresso da cardiomiopatia neste modelo (Gibson & Zang, 2002; Butterworth et al., 2003; Oliveira et al., 2007).

Anormalidades cardíacas devido a disfunções bioquímicas e estruturais são provocadas por uma diminuição na produção de ATP e caracterizam o estágio final da insuficiência cardíaca (Stanley et al., 2005). A insuficiência cardíaca pode ser vista como uma desordem progressiva crônica, com alto índice de morbidade e mortalidade, que resulta de uma variedade de doenças cardíacas incluindo infarto ou isquemia do miocárdio, cardiomiopatias e estados de sobrecarga e pressão devido a uma interação de distúrbios hemodinâmicos, neurohormonais, imunológicos e metabólicos (Anker et al., 1999; Casado & Farré, 2001; Garg et al., 2005). Esta desordem normalmente é iniciada depois que algum dano acontece ao músculo cardíaco devido a mudanças nas funções dos cardiomiócitos que podem tanto levar à perda dos mesmos como a mudanças nas funções sistólica e diastólica o que leva à incapacidade do miocárdio em gerar força e do coração de se contrair normalmente (Piano et al., 1998; Casado & Farré, 2001). Sabe-se que a performance do miocárdio em mamíferos depende de fatores que incluem a arquitetura dos ventrículos, a sobrecarga contra a qual o músculo deve trabalhar e o estado contrátil do miocárdio, sendo que a capacidade do coração de realizar trabalho mecânico é essencial para o movimento do sangue através do sistema circulatório (McDonald et al., 1998). A alteração no esvaziamento ou enchimento dos ventrículos, que caracteriza a insuficiência cardíaca, faz com que a demanda dos tecidos periféricos por oxigênio e metabólitos seja insuficiente (Piano et al., 1998).

O estresse oxidativo, manifestado como uma excessiva produção de espécies reativas do oxigênio e uma acumulação de cálcio intracelular e considerado mediadores chave para a progressão de doenças cardiovasculares como a insuficiência cardíaca, injúria de isquemia e reperfusão, inflamação, arritmias, disfunções mecânicas do ventrículo esquerdo e infarto do miocárdio (Wattanapitayakul & Bauer, 2001, Wang et al., 2008). Na insuficiência cardíaca um desbalanço entre a produção das ROS e das defesas antioxidantes celulares, assim como alterações do metabolismo energético cardíaco

podem influenciar, direta ou indiretamente, as funções do miocárdio (Seiva et al., 2008). Evidências do aumento das ROS no miocárdio têm sido observadas em modelos animais com insuficiência cardíaca, onde uma diminuição da atividade ou expressão de enzimas antioxidantes pode contribuir para o estresse oxidativo e progressão desta patologia (Sam et al., 2005).

Alterações no conteúdo de cálcio intracelular também podem conduzir a muitos problemas na contratatura do cardiomiócito. O  $\text{Ca}^{2+}$  é um dos maiores reguladores dos mecanismos celulares no músculo cardíaco, por exemplo, no processo de acoplamento excitação-contração, que é iniciado pela geração de um potencial de ação, sendo determinado por uma interrelação de vários canais iônicos, transportadores e outras proteínas (Calaghan et al., 1999; Bers, 2001).

## 5.1. Acoplamento excitação/ contração

A membrana plasmática exerce uma importante função atuando como uma barreira separando o conteúdo celular do meio externo fazendo com que as concentrações iônicas dentro das células sejam diferentes das do lado extracelular (Hille 2001). Devido a isso, existe uma diferença de potencial elétrico entre o citoplasma e o meio extracelular fazendo com que um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática seja estabelecido para cada espécie iônica. Devido a estas diferenças nos gradientes eletroquímicos ocorre a sinalização entre as células e o sistema como um todo (Stanfield & Aidley, 1996). A atividade elétrica nas células é determinada por uma complexa inter-relação entre diferentes tipos de canais iônicos. Os canais iônicos são um grupo de proteínas que estão inseridas na membrana celular e que permitem o rápido fluxo de íons através da mesma, sendo que este movimento de íons gera uma corrente elétrica (Stanfield & Aidley, 1996). Disfunções nesses canais são a causa de diversas doenças, sendo que um grande número de drogas e toxinas animais e vegetais tem sido estudado por atuarem sobre os mesmos com finalidades terapêuticas (Elinder et al., 2007).

Os canais iônicos possuem três principais propriedades: eles conduzem íons, reconhecem e selecionam íons específicos e se abrem e se fecham em resposta a diferentes sinais (Stanfield & Aidley, 1996). A seletividade é uma propriedade conferida pelos canais iônicos onde somente íons particulares, que denominam o canal, passam pela membrana tais como sódio, potássio, cálcio ou cloreto. Outros são seletivos para uma ampla variedade de grupos iônicos tais como cátions monovalentes ou cátions em geral (Hille, 2001). A seletividade se dá, pois o canal possui regiões estreitas que atuam como se fossem verdadeiras “peneiras moleculares” fazendo com que o íon ainda hidratado, neste local, perca a maior parte de sua água de hidratação e em troca forme ligações químicas fracas com resíduos de aminoácidos polares localizados na parede dos

canais iônicos (Hille, 2001). Logo, podemos entender que a seletividade dos canais iônicos se deve tanto a interações químicas específicas quanto a “peneira molecular” resultante do diâmetro do poro (Hille, 2001). O fluxo de íons através dos canais iônicos é passivo, não sendo necessário gasto de energia metabólica pelos canais (Hille, 2001).

Vários estímulos podem levar a abertura ou ao fechamento de um canal, já que a abertura e o fechamento do poro regulam as correntes iônicas através da membrana e conseqüentemente as funções corporais vitais (Elinder et al., 2007). Alguns canais são abertos por fatores químicos como neurotransmissores ou moléculas mensageiras citoplasmáticas, outros são abertos por mudanças na voltagem e outros por estímulos sensoriais de vários tipos (estiramento, pressão, temperatura) (Stanfield & Aidley, 1996). Além dos canais regulados, existem os que não são modulados e que estão constantemente abertos ou fechados na célula em repouso contribuindo para a manutenção do potencial de repouso (Hille, 2001). Nos canais dependentes de voltagem as freqüências de abertura e fechamento são altamente dependentes do potencial de membrana (Hille, 2001). Esses canais são essenciais nas funções do sistema nervoso e muscular formando a base para a condução de impulsos nervosos, contração muscular e transmissão sináptica (Elinder et al., 2007). Para que um estímulo cause a transição de um canal do estado fechado para o aberto deve-se fornecer energia que, nos canais dependentes de voltagem, é suprida pela movimentação de uma região carregada na proteína do canal denominada sensor de voltagem, através do campo elétrico da membrana (Hille, 2001). Este movimento de cargas do sensor de voltagem através do campo elétrico confere ao canal uma variação de energia livre, alterando seu equilíbrio entre os estados fechado e aberto (Hille, 2001). Este local chamado região S4 é um motivo dotado de cargas positivas, sendo que, a despolarização tende a mover estas cargas para fora através do campo elétrico da membrana e este movimento de cargas pode ser medido como um componente da corrente capacitiva. Canais dependentes de

voltagem podem assumir um estágio refratário após sua ativação e esse processo é chamado de inativação. Os canais assumem três estados conformacionais: fechado e passível de ser ativado (repouso), aberto (ativo), e fechado e não passível de ser ativado (“refratário”) (Hille, 2001).

Nas células excitáveis o potencial de ação é gerado por fluxos iônicos através de diversos canais iônicos (Roepke & Abbott et al., 2006). Diferentes estímulos, como os elétricos, mecânicos e químicos podem alterar o potencial de repouso da membrana para um valor crítico, denominado limiar, que resulta em um potencial de ação (Bers et al., 2001). Quando a resistência da membrana é alta, ou seja, os canais estão fechados, pequenas mudanças na atividade dos canais podem exercer efeitos dramáticos no potencial de membrana e na atividade elétrica celular (Proks et al., 2008).

O potencial de ação de uma célula cardíaca ocorre devido à rápida despolarização inicial e à reversão da polaridade da membrana que são causadas pelo influxo rápido de íons  $\text{Na}^+$  para o meio intracelular, através dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ), sendo esses chamados de canais rápidos (Bers 2001). Os canais para sódio têm como função gerar uma grande e breve corrente de entrada  $I_{\text{Na}}$  e causar o desencadeamento do potencial de ação e, isto se dá, por uma breve abertura destes canais (Bers 2001). Os canais para  $\text{Na}^+$  se inativam rapidamente para que ocorra a recuperação do potencial de membrana para seus valores negativos e estes canais requerem repolarização para se recuperarem da inativação antes que outro potencial de ação possa ocorrer (Bers 2001). Durante a despolarização inicial dos miócitos cardíacos o potencial de ação entra em um estado de platô que é causado principalmente pelos canais para cálcio do tipo L (Stanfield & Aidley 1996). Estes canais se abrem e se inativam mais lentamente que os canais rápidos para sódio. Existem dois tipos de canais para cálcio nos miócitos cardíacos os do tipo T e os do tipo L, sendo que, as correntes dos canais para cálcio do tipo L são predominantes na maioria das espécies estudadas

(Bers 2001). As correntes do tipo T não são detectáveis na maioria dos miócitos ventriculares, mas estão presentes nas células dos sistemas de condução e nos atriais (Bers 2001). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre inicialmente através de uma ativação rápida dos canais para cálcio do tipo T e é sustentada pelos canais para cálcio do tipo L na fase de platô (Abbott et al., 2006). As correntes de cálcio do tipo T se ativam em potenciais mais negativos que as do tipo L contribuindo para fases iniciais do potencial de ação (Abbott et al., 2006). A inativação das correntes do tipo L é mais lenta que as do tipo T e dependente tanto do potencial de membrana quanto de cálcio. Quanto maior a amplitude dos transientes de cálcio mais acelerada é a inativação dessas correntes (Bers 2001). As correntes de cálcio do tipo L contribuem para uma corrente despolarizante de entrada no potencial de ação cardíaco sendo sustentada durante o platô do potencial de ação e esta é a corrente de entrada que deve ser contrabalançada pelas correntes de potássio dependentes de voltagem  $\text{K}_v$  (Abbott et al., 2006).

O evento de acoplamento excitação-contração cardíaca é um processo de condução elétrica do miócito que é mediado por mudanças no cálcio citosólico livre devido à liberação deste íon a partir do retículo sarcoplasmático ativando os filamentos contráteis (Bers 2002; Iribe & Kohl, 2008). A entrada de cálcio através dos canais para cálcio do tipo L é essencial para desencadear a contração celular, pois a entrada deste íon provoca a liberação de mais cálcio do retículo sarcoplasmático da célula através de um canal conhecido como receptor de rianodina (Venetucci et al., 2007) Devido a isso, a entrada de cálcio pelos canais para cálcio do tipo L é uma chave molecular para gerar sinais químicos e elétricos essenciais para a fisiologia celular (Cens et al., 2006). A atividade contrátil nos miócitos cardíacos é determinada pela concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  e da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{+2}$  (Verdujin et al., 2007). A entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  e sua liberação do retículo sarcoplasmático aumentam a concentração do cálcio livre intracelular e este íon liga-se à proteína troponina C ativando a maquinaria contrátil (Bers

2001, 2002). A sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio é modulada por um delicado balanço entre a fosforilação por quinases, por exemplo, a proteína kinase A e C (PKA e PKC), a kinase de cadeia leve da miosina (MLCK) e a kinase II dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  - calmodulina (CaMKII) e também pela desfosforilação por fosfatases (Verduyn et al., 2007). Por outro lado, para que aconteça o relaxamento deve haver a remoção do  $\text{Ca}^{+2}$  a partir do citosol. Diferentes proteínas são responsáveis por diminuir a concentração do cálcio intracelular, entre elas, a  $\text{Ca}^{+2}$  - ATPase do retículo sarcoplasmático e sarcolemal, o trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  e o uniporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{+2}$  (Bers 2002; Iribe & Kohl, 2008). As alterações no acoplamento excitação-contração que caracterizam a insuficiência cardíaca acontecem devido a mudanças na dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  que modificam o potencial de ação e o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  modificando a capacidade de contração e relaxamento do cardiomiócito (Luo et al., 2006). Sabe-se que a geração do potencial de ação é essencial para a excitabilidade elétrica propagando informações de célula para célula no coração e fazendo com que este órgão funcione como um sincício (Bers, 2001). A completa repolarização celular e o fim do potencial de ação ocorrem pelo fechamento dos canais para cálcio do tipo L e pela abertura e aumento da condutância dos canais para potássio (Abbott et al., 2006). Os canais para potássio no miócito cardíaco são o mais diverso grupo exercendo diversas funções como, por exemplo, determinar o potencial de repouso da membrana, a frequência cardíaca, a forma e duração do potencial de ação (Tamargo et al., 2004). Além disso, são os mais importantes alvos para a ação de neurotransmissores, hormônios, drogas e toxinas que modulam a função cardíaca (Tamargo et al., 2004). Nas células musculares atriais e ventriculares o potencial de repouso é próximo de -80mV sendo que o potencial de ação tem uma fase de despolarização muito rápida e um overshoot a partir de 0mV para alcançar um pico entre +30 e +50mV (Bers, 2001). Já a repolarização é muito mais rápida nos átrios que nos

miócitos ventriculares e fibras de Purkinje, sendo que, nas fibras ventriculares, há um platô mais proeminente (Bers, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado alterações que acontecem na contratilidade de miócitos cardíacos quando o organismo é submetido à deficiência em tiamina, já que, esta deficiência é conhecida por acarretar mudanças no metabolismo cardíaco, mudanças eletrofisiológicas e na morfologia do miocárdio (Aldinger 1965; Rindi and Rapuzzi 1966; McCandless et al. 1970; Cappeli et al. 1990; Zanghen & Sahinberg 1997, Oliveira et al., 2007). Porém, uma menor atenção tem sido dada às alterações nas propriedades contráteis neste modelo. Estudos com miócitos cardíacos isolados em outros modelos têm mostrado as propriedades mecânicas em cardiomiócitos medindo-se o encurtamento celular e mostrando diferenças na magnitude de contração e na velocidade de encurtamento do músculo cardíaco (Cazorla et al., 2000). A contratilidade cardíaca é modulada pela freqüência de estimulação, onde freqüências de estimulação menores (1- 3Hz) são tipicamente utilizadas nos estudos de contratilidade dos miócitos (Natali et al., 2001). Em diferentes espécies o aumento da freqüência pode levar tanto a uma diminuição, quanto a um aumento na contratilidade e isto tem sido atribuído às mudanças na concentração de cálcio intracelular (Natali et al., 2001).

Diversos fatores que afetam as ligações cruzadas entre os filamentos de actina e miosina e, então, a velocidade de encurtamento, têm sido investigados por caracterizar uma relação entre velocidade-força de uma variedade de preparações de músculo cardíaco (MCDonald et al., 1998). O aumento do comprimento celular, dependente da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, é considerado uma explicação para melhorar o desempenho sistólico cardíaco e aumentar o volume ventricular na diástole (Édes et al., 2007). Mudanças na carga e/ ou na contratilidade são conhecidos por afetar o débito cardíaco durante fenômenos fisiológicos normais tais como exercício e condições patológicas como hipertensão e insuficiência cardíaca (MCDonald et al., 1998).

Além disso, mudanças no estado de redução e oxidação das proteínas também se refletem em mudanças na função celular. Estas modificações podem acontecer nas proteínas envolvidas na liberação e recaptura do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular devido a um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio que modulam a atividade de canais, trocadores, bombas e proteínas em geral (Zima & Blatter, 2006).

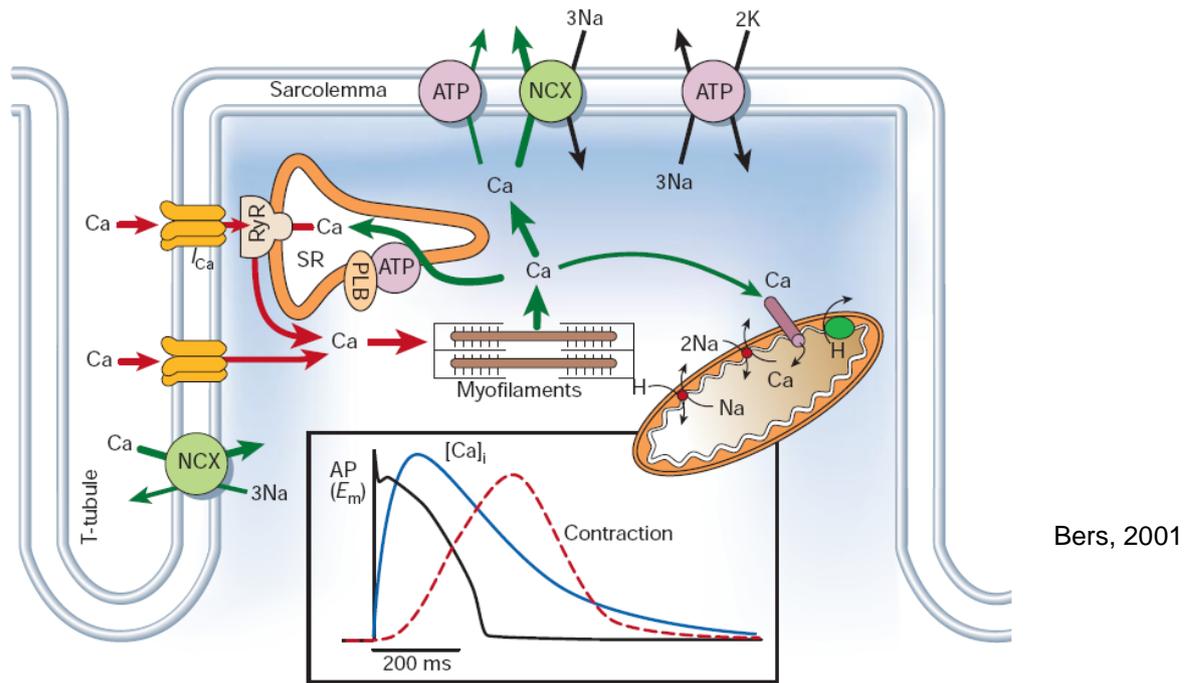


Figura 11- Manuseio do  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos ventriculares.

## 6. CANAIS PARA POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP ( $K_{ATP}$ )

A configuração e a duração do potencial de ação cardíaco variam consideravelmente entre as espécies e diferentes regiões cardíacas (átrio e ventrículo) e em áreas específicas dentro dessas regiões (epicárdio e endocárdio) (Tamargo et al., 2004). Esta heterogeneidade reflete diferenças no tipo e/ou expressão de canais para  $K^+$  que participam na gênese do potencial de ação cardíaco (Tamargo et al., 2004). Os canais para  $K^+$  são estruturalmente agrupados em duas classes: os canais para potássio abertos por mudanças no potencial de membrana  $K_v$ , ou seja, os dependentes de voltagem clássicos e os retificadores de entrada  $K_{ir}$  que não são abertos por despolarização, sendo geralmente modulados por ligantes (Stanfield & Aidley, 1996). Existem diferentes categorias de canais para potássio, uma delas inclui uma corrente transitória de saída que se ativa e inativa rapidamente ( $I_{to}$ ), uma corrente ultra rápida ( $I_{Kur}$ ), uma rápida ( $I_{Kr}$ ) e uma lenta ( $I_{Ks}$ ) que são componentes característicos da corrente macroscópica retificadora retardada e o grupo retificadores de entrada ( $I_{k1}$ ), onde os canais modulados por ligantes incluem aqueles ativados por uma diminuição na concentração de adenosina trifosfato ( $K_{ATP}$ ) ou os ativados por acetilcolina ( $K_{ACh}$ ) (Tamargo et al., 2004).

Os canais de  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) possuem a habilidade de conduzir correntes de entrada (influxo) melhor do que as correntes de saída (efluxo). São ativados em potenciais de membrana próximos ou mais negativos do que o potencial de repouso (Bers 2001). Estes canais formam uma importante classe de canais para  $K^+$  que regulam a excitabilidade, a frequência cardíaca, o tônus vascular e a liberação de insulina (Bichet et al., 2003). Entre os membros da família  $K_{ir}$  existem os que apresentam uma retificação mais significativa ( $K_{ir2.x}$  e  $K_{ir3.x}$ ) e os mais fracos ( $K_{ir1.x}$  e  $K_{ir6.x}$ ). A retificação é essencial no controle do potencial de membrana no repouso e para manter o limiar de excitação. Para isso, diferentes níveis de retificação ocorrem na célula gerando respostas específicas a

um dado estímulo (Bichet et al., 2003). A atividade dos  $K_{ir}$  pode ser modulada por diferentes fatores citoplasmáticos incluindo PIP2, ácido araquidônico,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{+2}$ , pH, proteínas G, ATP, fosforilação e reações de óxido-redução (Cruz & Matsuda, 1994; Bichet et al., 2003).

Os canais  $K_{ATP}$  são um exemplo de canais retificadores de entrada que são modulados pelos níveis de ATP intracelulares. Foram descritos pela primeira vez por Noma (Noma, 1981) estudando o efeito da inibição da cadeia respiratória sobre as correntes de membrana. Estes são caracterizados por um comportamento cinético complexo consistindo por uma rápida rajada de eventos de abertura seguido por longos intervalos fechados (Reimann et al., 2003). A atividade dos canais  $K_{ATP}$  providencia uma ligação entre a energética celular e a excitabilidade elétrica sendo por isso considerados sensores do metabolismo celular. (Nichols, 2006; Proks et al., 2008). Esse canal é expresso em vários tecidos incluindo células  $\beta$  pancreáticas, cérebro, músculos cardíaco, esquelético e liso exercendo importantes funções nestes tecidos (Matsuo et al., 2005). Nas células pancreáticas, estes canais exercem importantes funções na secreção de insulina estimulada pela glicose. O aumento na concentração de ATP, devido a um aumento no metabolismo da glicose, fecha estes canais despolarizando a membrana celular e conduzindo a abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem, que conduzem a um aumento do cálcio intracelular. O aumento das concentrações de cálcio intracelular conduz a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreática (Seino & Miki, 2003). No sistema cardiovascular, estes canais são componentes regulatórios e protegem o miocárdio da injúria letal provocada por isquemia e hipóxia, eventos que diminuem a concentração intracelular de ATP (Alekseev et al., 2005). No coração, com condutâncias entre 70-90 pS, sua principal função é aumentar o efluxo de potássio e, desse modo, encurtar o potencial de ação dos cardiomiócitos evitando assim condições patológicas como arritmias (Seino & Miki, 2003; Tamargo et al.,

2004). No sistema vascular, estes canais auxiliam na regulação do tônus conduzindo a um relaxamento do músculo liso devido ao efluxo de potássio e encurtamento do potencial de ação, desse modo, auxiliam na regulação da pressão sanguínea (Seino & Miki, 2003). Além disso, os canais  $K_{ATP}$  exercem efeito protetor em células neuronais contra danos durante estresse metabólico no cérebro (Matsuo et al., 2005). No cérebro, são encontrados em muitos tipos de células incluindo neurônios do hipocampo, substância negra, células gliais, neurônios hipotalâmicos e neurônios vagais dorsais (Seino & Miki, 2003).

O canal  $K_{ATP}$  é um hetero-octâmero formado pela combinação de duas proteínas diferentes uma pertencente à família dos canais para  $K^+$  retificadores de entrada  $K_{ir6.X}$  ( $K_{ir6.1}$  e  $K_{ir6.2}$ ), e outra que circunda os  $K_{ir6.X}$  que é formada por quatro subunidades que são os receptores para sulfoniluréias SUR (SUR1 e SUR2) (figura 12). A inibição do canal por ATP resulta da interação deste nucleotídeo com a subunidade Kir6, onde a ativação requer a interação entre MgADP com a subunidade SUR (Nichols, 2006). Quando a razão de ATP/ADP é diminuída o ATP liga-se a NBF-1 e o MgADP liga-se a NBF-2 levando a um estado conformacional onde a interação da subunidade SUR com  $K_{ir6.x}$  reduz a afinidade deste pelo ATP, ativando o canal. Já quando as razões ATP/ADP aumentam, a diminuição da concentração de MgADP induz dissociação da ligação MgADP de NBF-2 resultando na liberação de ATP a partir de NBF-1 inibindo o canal (Seino & Miki, 2003). A porção do canal correspondente à subunidade Kir consiste de duas hélices transmembranas M1 e M2 ligadas por uma alça que gera a porção estreita do poro responsável pela seletividade iônica (figura 12) (Nichols, 2006). Já a porção SUR, pertencente à família cassete ABC que tem locais para a ligação de nucleotídeos, exerce uma função reguladora conferindo sensibilidade a vários moduladores do canal  $K_{ATP}$ , já que possui local para ligação para diferentes fármacos. Esta porção contém dois domínios com seis hélices transmembrana (TMD1 e TMD2) e outro TMD0 que contém

cinco hélices transmembrana (figura 12). Existem evidências que o domínio TMD0 é crucial para controlar o “gating” da subunidade  $K_{ir6.x}$  (Nichols, 2006). Além disso, SUR contêm locais para a ligação de nucleotídeos denominados NBF1 (alta afinidade por nucleotídeo, independente de Mg) e NBF-2 (baixa afinidade por nucleotídeo, dependente de Mg) (Matsuo et al., 2005) localizados nas alças entre TMD1 e TMD2 e no C - terminal respectivamente. A expressão heteróloga de diferentes combinações de  $K_{ir6.1}$  e  $K_{ir6.2}$  e de SUR1 e SUR2 e suas variantes (SUR2A e SUR2B) dão origem a diferentes tipos de canais  $K_{ATP}$  com propriedades eletrofisiológicas e sensibilidade de ligação para fármacos e nucleotídeos distintas (Seino & Miki, 2003). Os canais presentes nas células cardíacas são compostos pelas subunidades SUR2A e  $K_{ir6.2}$  (Matsuo et al., 2005). Porém, estudos realizados por Flagg et al., 2008 demonstraram a presença da subunidade SUR1 nos átrios, mas não nos ventrículos de camundongos e, que esta subunidade exerce uma importante função na atividade do canal nos átrios. Estudos com camundongos nocautes para  $K_{ir6.2}$  mostraram que esses animais apresentaram disfunções na excitabilidade cardíaca, inadequada homeostase de cálcio e arritmias ventriculares, demonstrando que o  $K_{ir6.2}$  é necessário para a adaptação ao estresse (Tamargo et al., 2004).

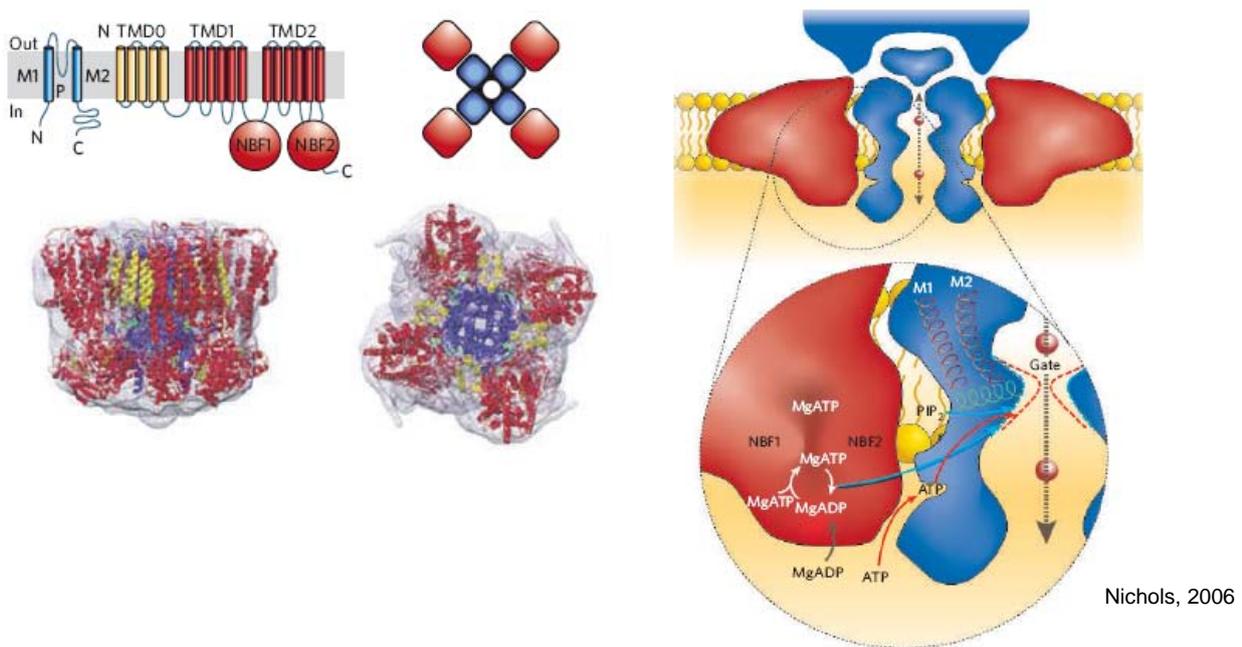


Figura 12- O canal  $K_{ATP}$  formado por duas subunidades diferentes  $K_{ir6.x}$  e SUR e os locais de interação de nucleotídeos e ativadores (PIP2).

Desde a descoberta do  $K_{ATP}$  na membrana dos miócitos ventriculares, muita de suas propriedades tem sido investigadas, dentre elas, a proteção do miocárdio devido à ativação desse canal (San- qing et al., 2006). O pré- condicionamento isquêmico, onde simples ou múltiplos períodos breves de isquemia no miocárdio conferem proteção contra uma isquemia prolongada reduz o tamanho e gravidade do infarto do miocárdio, bem como, incidência de arritmias cardíacas (Ardehali & O' Rourke, 2005). Este é um mecanismo que tem sido utilizado para estimular vias endógenas a proteger o coração da injúria isquêmica e, entre estas vias protetoras está à estimulação do  $K_{ATP}$ , sendo que a prevenção se dá por um aumento do suprimento sanguíneo para áreas do miocárdio em risco (Ardehali & O' Rourke, 2005). A abertura dos canais  $K_{ATP}$  na membrana celular conduz à hiperpolarização da membrana encurtando deste modo o tempo de

despolarização celular e conseqüentemente a duração do potencial de ação (Ardehali & O'Rourke, 2005).

## **II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 7. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a deficiência em tiamina é considerada um problema de saúde em diversas populações mundiais e que sua privação pode vir a causar danos aos diferentes tecidos e ao organismo como um todo.

No Brasil, além de casos isolados em decorrência da deficiência em tiamina, no período de 2006 e 2007 foi registrado um grande número de pessoas em determinadas populações que vieram a sofrer de beribéri (Lira & de Andrade, 2008). Investigações desses casos demonstram que as causas da deficiência em tiamina seria prevalentemente pelo abuso de álcool, grandes jornadas de trabalho, dieta, exposição a pesticidas e ao consumo de arroz contaminado por fungos (Lira & de Andrade, 2008).

Como já mencionado registros da literatura demonstram que a deficiência de tiamina é mais comum em pessoas que vivem em comunidades isoladas, em pessoas desnutridas, no período da infância, em mulheres grávidas, em alcoólicos crônicos e pessoas submetidas à nutrição parenteral. O período que se desenvolve o beribéri no homem submetido a uma dieta deficiente em vitamina B<sub>1</sub> é de aproximadamente 80 a 90 dias (Cook, 1996), já no rato este período é menor (30-35 dias) (Oliveira et al., 2007a).

O modelo de ausência de tiamina na dieta torna-se interessante por ser a tiamina uma vitamina essencial para o bom funcionamento do metabolismo energético e produção de ATP. A alteração na produção de energia com consequente diminuição na produção de ATP tem sido citado como agravante de várias patologias cardíacas sendo a causa, muitas vezes, de insuficiência cardíaca. Devido a isto, este trabalho nos parece importante, já que objetiva um melhor conhecimento dos efeitos da deficiência desta vitamina na dieta sobre o tecido cardíaco e sobre as adaptações que o mesmo pode vir a apresentar. Acreditamos que este estudo venha a esclarecer vários aspectos fisiológicos e bioquímicos principalmente aqueles relacionados com a morfologia, contratilidade e

estresse oxidativo no miocárdio. Além destes parâmetros avaliamos a influência da dieta deficiente em tiamina sobre o funcionamento do canal  $K_{ATP}$ , um canal que é modulado por níveis de nucleotídeos intracelulares.

## 8. OBJETIVOS:

### 8.1 Objetivo geral:

Verificar alterações morfo-funcionais no coração de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina.

### 8.2 Objetivos específicos:

- ♣ Verificar através de análise histológica diferenças morfométricas em ratos submetidos à dieta com ausência de vitamina B1;
- ♣ Investigar possíveis alterações da capacidade contrátil cardíaca em células isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina B1;
- ♣ Mensurar os níveis de lactato plasmático e o consumo máximo de O<sub>2</sub>;
- ♣ Verificar a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) nos cardiomiócitos de ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina B1;
- ♣ Mensurar a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no coração de ratos deficientes em vitamina B1;
- ♣ Determinar os níveis de expressão protéica da catalase, da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase no coração de ratos deficientes em vitamina B1;
- ♣ Investigar a ocorrência de peroxidação lipídica pela medida dos níveis de TBARS no coração de ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina B1;
- ♣ Verificar a ocorrência de apoptose no tecido cardíaco de ratos deficientes em vitamina B1;
- ♣ Medir as correntes de potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) em cardiomiócitos de ratos submetidos à dieta deficiente em tiamina;

### **III. Materiais e Métodos**

## 9. Dieta

A dieta foi preparada como previamente descrito por Oliveira et al., 2007a. As duas dietas controle e deficiente são isocalóricas e a única diferença entre elas é a presença ou ausência de tiamina na mistura de vitaminas. Ambas as dietas contém 20% proteína, 1% celulose, 5% de mistura de sais, 1% mistura de vitaminas, 5% óleo, 0,4% colina, e 67,6% amido.

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

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

Vitamina	Quantidade em g/kg
Acetato de retinol	4,0
Colecalciferol	0,6
Menadiona	0,5
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 1- Composição das dietas controle e deficiente em tiamina

### **9.1. Grupo experimental**

Ratos Wistar machos pesando entre 200-250g foram mantidos no biotério do ICB-UFMG a 25°C em um ciclo claro/ escuro de 12 horas com alimentação e água a vontade. Antes do período experimental os ratos foram aclimatados por 7 dias e posteriormente alimentados com uma dieta deficiente em tiamina durante 35 dias (este período foi previamente determinado por Oliveira et al., 2007b). Depois deste período, os ratos foram sacrificados e o coração (ventrículos) e sangue coletados para realização das análises propostas. Para as análises enzimáticas e western blot o coração foi congelado a -80°C. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética n° 042.

### **9.2. Procedimento cirúrgico**

Os animais foram submetidos à implantação de um catéter na veia jugular para avaliação do lactato plasmático. Um dia antes dos experimentos os animais foram anestesiados com solução de xilasina e quetamina (0,125 mL/100g de peso corporal, i.p.) e submetidos a implante de uma cânula de silicone (0,5 mm de DI, 0,94 mm de DE, Down Corning, EUA) no átrio direito através da veia jugular externa para a coleta de amostras de sangue segundo a técnica de Harms & Ojeda, 1974. A cânula foi preenchida com heparina em solução salina, ficando exposta no dorso do animal apenas a extremidade da mesma sendo fechada com um oclusor metálico.

### **9.3. Concentração de lactato no plasma**

Um dia depois do procedimento cirúrgico, as amostras de sangue (0,2 mL) foram retiradas através de uma seringa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g em centrífuga refrigerada a -20°C e o plasma coletado para a medida dos níveis de lactato. O lactato plasmático foi determinado usando o sistema 2300 STATPLUS (Yellow String Inst., EUA).

#### 9.4. Mensuração do consumo de oxigênio

Os animais foram pesados e colocados numa câmara hermeticamente fechada e calibrada para o registro do consumo de oxigênio no repouso ( $VO_2$ , mL  $O_2 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ). A taxa metabólica foi mensurada utilizando um sistema de fluxo aberto de calorimetria indireta (OXYMAX v500, Columbus Instruments/Ohio, EUA), previamente calibrado com uma mistura de gases com certificado padrão do fabricante (20,5% de  $O_2$  e 0,5% de  $CO_2$ ; White Martins, Brasil). A taxa metabólica de repouso dos animais foi mensurada durante 30 minutos em intervalos de 1 minuto usando um sistema computadorizado (Oxymax Apparatus, Columbus Instruments, EUA). Todos os experimentos foram realizados a 25°C entre 10:00 e 15:00 horas.

#### 9.5. Análise histológica e morfométrica

O coração foi retirado cuidadosamente, dissecado e fixado em formalina (10% diluída em solução salina) por no mínimo 48 horas e processado rotineiramente para inclusão em parafina. As seções de 5 $\mu$ m obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) ou submetidas à reação de TUNEL (para detecção *in situ* da fragmentação do DNA) (Gavrieli et al., 1992).

Para realização das análises morfométricas foram obtidas imagens de 30 campos distintos por lâmina usando-se uma objetiva planocromática (40x) e o número de cardiomiócitos (núcleos isolados e bem definidos) foram contados. A espessura da parede do ventrículo esquerdo foi visualizada com uma objetiva (4x). As imagens das seções transversais foram obtidas a partir de três campos distintos por lâmina correspondendo à área total do ventrículo, e três diferentes pontos a partir de cada imagem foram mensurados. As imagens reais foram vistas em um microscópio e digitalizadas através de uma microcâmera JVC TK-1270/JGB e transferidas para software onde foram feitas as análises (Kontron Electronics, Carl Zeiss – KS300 version 2).

## 9.6. Identificação e quantificação da apoptose

Utilizou-se a técnica de TUNEL para marcar as células em apoptose considerando-se o aspecto morfológico das células analisadas (Vasconcelos, 2001). Os corpos apoptóticos, quando inúmeros e próximos uns dos outros, foram quantificados como o resultado de uma única célula em apoptose. Quando distantes entre si, foram considerados como resultado de apoptose em células diferentes e contabilizados. A técnica de TUNEL para a marcação “*in situ*” da fragmentação do DNA combina princípios histoquímicos e imuno-histoquímicos e é aplicada em cortes de tecido embebidos em parafina identificando as células apoptóticas.

A reação requer o uso de uma enzima exógena, a transferase terminal de deoxinucleotídeo (TdT) que incorpora um nucleotídeo marcado na extremidade 3’OH do DNA supostamente em fragmentação. Os nucleotídeos marcados inseridos são posteriormente identificados como grumos (Gavrieli et al., 1992) amarronzados a partir da reação da diaminobenzidina (DAB) com a peroxidase (POD). Utilizou-se o kit da Oncogene (TdT –FragEL™) *DNA Fragmentation Detection Kit*. Posteriormente as lâminas foram incubadas com 20 g/mL de proteinase K (Cat # P5568, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e a peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol. Desoxinucleotidil- transferase Terminal (TdT) e desoxinucleotídeos foram aplicados nas lâminas e colocados em uma atmosfera úmida a 37°C de 2 a 6 horas. A reação foi parada por um tampão de bloqueio e, então, as lâminas tratadas com peroxidase conjugada à streptavidina, colocada em uma atmosfera úmida a 37°C por 0,5-1 hora. Finalmente elas foram lavadas e tratadas com diaminobenzidina e contra-coradas com verde metila.

A quantificação das células apoptóticas foi determinada conforme critério morfológico e realizada pelo método de TUNEL. O número de células totais e apoptóticas foram quantificados usando imagem de 10 campos obtidos com uma objetiva policromática 40x usando software específico (Media Cybernetics Image Pro Plus, version

4.50.29). Quantificaram-se as células marcadas pela reação e com aspecto morfológico típico de apoptose presentes em cada campo. O parâmetro morfométrico utilizado - o índice de marcação de apoptose (IA) - referiu-se à proporção de células em apoptose em relação ao número total de células por campo microscópico. O índice apoptótico (IA) foi obtido da seguinte fórmula:  $IA = (n^\circ \text{ células apoptóticas} / n^\circ \text{ total de células}) \times 100$ . Para evitar falsos positivos na análise das células apoptóticas foi usado como critério de detecção algumas características do processo apoptótico como condensação da cromatina, retração celular e fragmentação do núcleo.

### **9.7. Preparo das células isoladas**

Os cardiomiócitos foram dissociados enzimaticamente conforme Oliveira et al., 2007b. Os corações foram mantidos em um sistema de Langendorff e perfundidos por cinco minutos com uma solução nominalmente livre de cálcio contendo (mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 piruvato, 22 glicose e 25 HEPES (pH 7.4). Posteriormente o coração foi perfundido 15-20 minutos com uma solução extracelular com baixo Ca<sup>2+</sup> contendo 1mg/ml de colagenase tipo II (Worthington, EUA). O coração digerido foi removido da cânula e os ventrículos foram cortados em pequenos fragmentos. As células foram dissociadas por agitação mecânica e o Ca<sup>2+</sup> extracelular foi restaurado para 1,8 mM e posteriormente mantidas em meio DMEM (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, EUA). Os experimentos foram realizados dentro de até 6 horas que corresponde ao tempo médio de sobrevivência das células isoladas (Cruz & Matsuda, 1994).

### 9.8. Contratilidade celular

As contrações celulares foram medidas através da técnica de alteração do comprimento diastólico dos miócitos usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix Corporation, Milton, MA, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA). Os miócitos foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados por uma solução de Tyrode mantidos à temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) e visualizados em um monitor com um aumento de 400x, através de uma objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Foram utilizadas para as análises das contrações somente as células que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, além de imóveis quando não estimuladas.

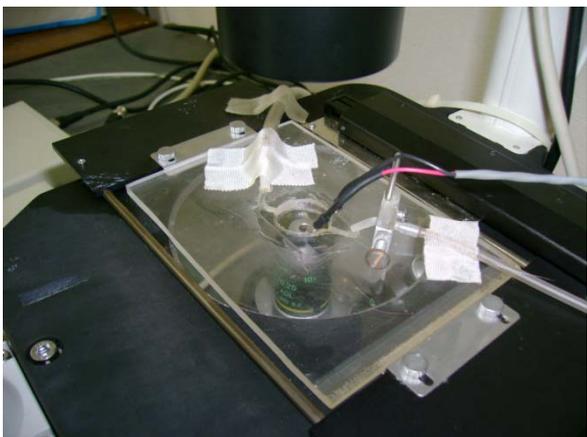


Figura 13. Sistema utilizado para aquisição dos registros das contrações. Observa-se o microscópio com câmera acoplada, o estimulador elétrico (seta preta) e a câmara experimental (seta azul) acoplada ao microscópio.

As células foram estimuladas externamente a frequência de 1 e 3Hz (10 Volts, duração de 5 ms) utilizando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA) e visualizadas em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz (Figura 13).

As bordas das células foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) alinhadas ao longo do comprimento do cardiomiócito. A definição das bordas foi ajustada através do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada das células (figura 14).

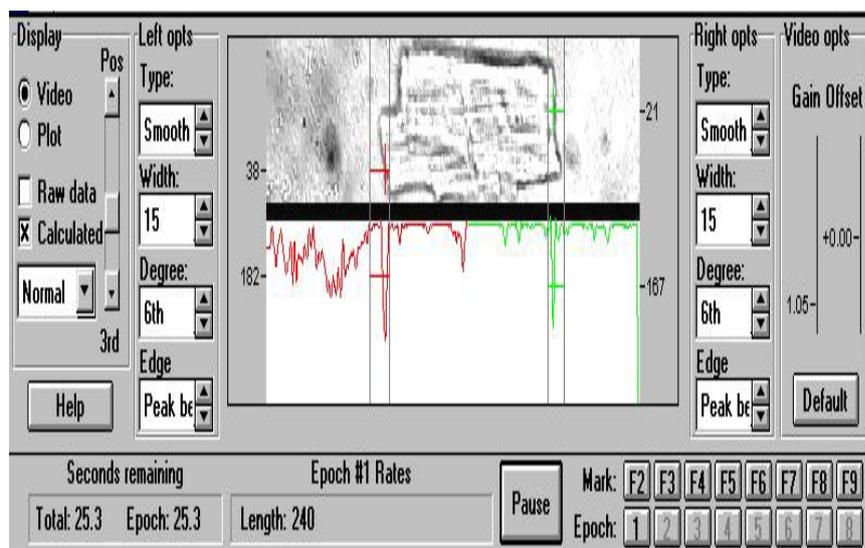


Figura 14. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações. Definição das bordas direita e esquerda são projetadas através do pico verde e do pico vermelho.

Os movimentos das bordas dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção (Ionwizard, Ionoptix, EUA, Figura 14) e armazenados para análise posterior. Foram analisados: 1) a porcentagem de encurtamento, 2) o tempo para 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento em ms), 3) o tempo para 50% da contração (tempo compreendido desde a amplitude máxima de relaxamento até 50% da contração em ms), 4) a velocidade máxima de relaxamento (velocidade-pico de encurtamento celular,  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) e 5) a velocidade máxima de relaxamento (velocidade-pico de relaxamento celular,  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ).

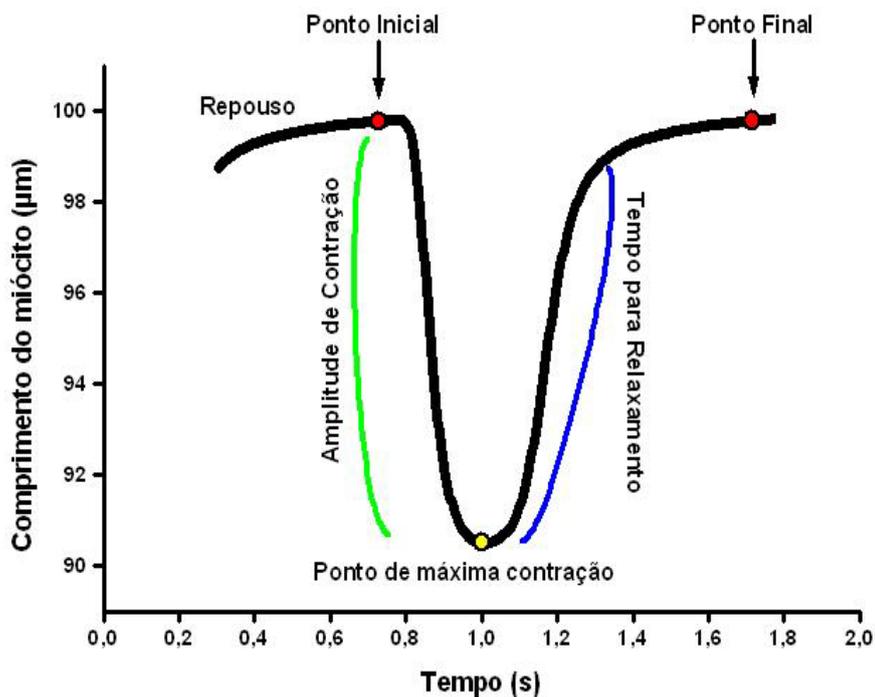


Figura 15. Diagrama demonstrativo do decurso temporal de evento de contração celular em resposta à estimulação elétrica para uma frequência ajustada de 1 Hz e dos respectivos parâmetros da contração analisados.

## 9.9. Mensuração dos níveis intracelulares das ROS

Para a detecção dos níveis intracelulares de superóxido e do  $H_2O_2$ , as células cardíacas de ratos controles e deficientes em tiamina foram obtidas como previamente descrito. As células foram carregadas com  $10 \mu M$  da sonda fluorescente dihidroetídio (DHE, para detecção do superóxido) e com  $0,1 \mu M$  da sonda diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato ( $H_2DCFH-DA$ ). Esta última sonda é desacetilada intracelularmente por uma esterase não específica que é posteriormente oxidada pelo  $H_2O_2$  intracelular formando o composto 2,7-diclorofluoresceína (DCF) cuja a emissão de fluorescência pode ser correlacionada aos níveis de  $H_2O_2$  intracelulares. As células foram incubadas com as sondas em um solução de Tyrode contendo (mM): 140 NaCl, 5 KCl,  $0,5 MgCl_2$ ,  $1,8 CaCl_2$ , 5 HEPES e 5 glicose, por 15 min a  $37^\circ C$  e então lavadas no mesmo tampão para remover o excesso das sondas. Acrescenta-se que a sonda DCF não é específica para o  $H_2O_2$  detectando também a presença do radical hidroxil. As células foram analisadas em um sistema confocal Meta LSM 510 (Zeiss GmbH, Jena, Germany) com a objetiva de imersão em óleo (63x) e o software do IMAGEJ (NIH) foi usado para o processamento das imagens.

#### **9.10. Preparação do tecido para as análises enzimáticas**

Ventrículos foram retirados e imersos em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,2 e em seguida lavados na mesma solução para a retirada do sangue. Posteriormente o tecido foi pesado e diluído em PBS na proporção de 0,1 g de tecido por mL de tampão e, então, homogeneizado (Euro Turrax T20b IKA LABORTECHNIK) por 3 min a  $\sim 0-4^\circ C$  (banho gelado). Depois deste processo o homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a  $10,000g$  (Jouan BR4i) e o sobrenadante retirado para uso nos ensaios bioquímicos.

#### **9.11. Determinação da concentração total de proteínas**

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Este método consiste na adição de 0,02 mL de homogeneizado, 2,5mL da mistura (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% CuSO<sub>4</sub> e 2% de tartarato duplo de sódio). As proporções dos mesmos reagentes são de 100:1:1. Depois de incubar por 20 minutos adicionou-se 0,25mL do reagente de folin (Espectrofotômetro Hitachi, Japão). sendo a leitura realizada em 660nm. Utilizou-se albumina bovina como padrão.

### **9.12. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi realizada de acordo com Dieterich et al. (2000) com algumas modificações inseridas pelo nosso grupo. Este ensaio consiste na adição de 0,04 mL de homogeneizado que foi adicionado ao tampão fosfato de sódio 50mM (1 mL, pH 7.8 a 37°C) contendo 1mM de ácido dietilenotriamino-pentacético (DTPA). A reação foi iniciada com a adição de 2mM de pirogallol e as leituras realizadas durante 3 minutos a 420 nm (Espectrofotômetro Hitachi, Japão). A atividade da SOD foi calculada em unidades por miligrama de proteína onde uma unidade de enzima foi considerada como sendo a quantidade que causou a inibição da autooxidação do pirogallol em 50%.

### **9.13. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase**

As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5 contendo 5 mM EDTA e 1 mM DTT) e centrifugadas a 4°C (10,000 g) por 15 minutos. O experimento foi realizado usando o Kit Cayman conforme as instruções contidas no mesmo. Foi adicionado 120µl de tampão de ensaio (50mM Tris-HCl, pH 7,6 contendo 5mM de EDTA) e 50µl da mistura de co-substratos (NADPH, glutathiona, glutathiona redutase). A reação foi iniciada com a adição de 20µl do substrato da GPx, cumeno de hidroperóxido. Todo procedimento foi realizado a 25°C e as leituras foram realizadas a 340nm. Os resultados foram expressos em nmol NADPH consumido/min/mL.

#### **9.14. Determinação da atividade da catalase**

O ensaio da catalase foi realizado conforme o método de Nelson & Kiesov (1972) com algumas modificações. A atividade da enzima foi determinada em 2mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) onde alíquotas do homogeneizado (0,06mL) foram adicionados. A reação foi iniciada com a adição de 0,04mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3M) e a leitura realizada em 240 nm (Espectrofotômetro Hitachi, Japão) a 25° C. A atividade da catalase foi calculada em  $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$  proteína.  $\Delta E$ = variação da absorbância

#### **9.15. Determinação dos níveis de TBARS**

Os níveis de TBARS foram realizados pelo método de Ohkawa et al. (1979) e Janero et al. (1990). A técnica foi realizada no mesmo dia do sacrifício dos animais onde o tecido foi homogeneizado em tampão PBS pH 7,0 e centrifugado por 10 minutos a 5,000g. Posteriormente alíquotas do homogeneizado (0,01mL) foram adicionadas a 0,02mL de dodecyl sulfato de sódio (SDS) 8.1%, 0,05 mL de ácido acético (pH 3.4) 2,5M, 0,05 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8%). A mistura foi incubada por 60 minutos a 95° C. As leituras das amostras foram realizadas a 532 nm (Espectrofotômetro Hitachi, Japão). A concentração de malondialdeído (MDA) produzida foi expressa em nanomoles de MDA por miligrama de proteína (nMol MDA/mg proteína) e foi interpretado como os níveis de TBARS.

#### **9.16. Western Blot**

As amostras do tecido cardíaco (ventrículos) foram homogeneizados no gelo em um tampão Tris-HCl (50 mM) contendo: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Nonidet P40, 0.3 % triton X-100, 0,5 % deoxicolate de sódio, 100 mM DTT, 10 mg/mL aprotinina, 15.7 mg/mL benzamidina, 1 mg/mL pepstatina A, 100 mM fluoreto de fenilmetilsilfonila (PMSF). O homogenado foi centrifugado a 10,000 g for 30 min at 4°C e o sobrenadante aliquoteado e imediatamente mantido a -80°C. A quantidade de proteínas

usada foi (em  $\mu\text{g}$ ): 30 para CAT, 45 para GPx, 20 para Mn-SOD e 30 para Cu/Zn-SOD. As amostras das proteínas foram misturadas com tampão desnaturante de SDS-PAGE e aquecidas a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 min. A corrida das amostras foi realizada em um gel de poliacrilamida a 10% sendo posteriormente realizada a transferência para uma membrana de nitrocelulose. As bandas de proteínas presentes na membrana, para conferir a eficiência da transferência, foram detectadas usando o corante ponceau-s. A seguir a membrana foi incubada com os anticorpos específicos nas diluições recomendadas (anti-catalase (Sigma, EUA), anti-glutathiona-peroxidase, anti-Mn-SOD e anti-Cu/Zn-SOD (Calbiochem, EUA) e anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e uma peroxidase conjugada ao anticorpo secundário. O sinal foi detectado usando o sistema de detecção para western blot ECL (G.E. Biosciences, IL, EUA). As imagens obtidas foram analisadas a partir dos níveis de proteínas com o uso do software IMAGE-J (NHI, EUA). Os pesos moleculares das proteínas foram determinados com referência nos marcadores de peso molecular (G.E. Biosciences, IL, EUA).

### **9.17 Eletrofisiologia**

As células foram estudadas sob a platina de um microscópio invertido. O conjunto é montado sobre uma mesa pneumática anti-vibração (TMC, EUA). Um micromanipulador piezoelétrico de alta precisão foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes da membrana celular. Um outro micromanipulador mecânico foi usado para posicionar a pipeta de perfusão da solução controle ou daquela contendo glibenclamida. As correntes foram estudadas com a ajuda de um amplificador (HEKA, EPC9 double, Alemanha) controlado pelo “software” PULSE.

As correntes foram filtradas por um filtro passa baixa a 2,5 kHz, convertidas em sinais digitais com frequência de 10 kHz e armazenadas em computador para posterior análise.

Correntes de vazamento (“leakage”) foram removidas, usando-se um protocolo do tipo P/P4 no qual quatro pulsos de amplitude igual a  $\frac{1}{4}$  do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente foi somada e subtraída da corrente do pulso teste (BEZANILLA; ARMSTRONG, 1977). Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos. As resistências em série foram compensadas em pelo menos 50 %. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 10 M $\Omega$ ) ou que não se mantiveram estáveis não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas em um computador MacPC ou PC-compatível usando-se o “software” PULSE (HEKA, Alemanha). Para o processamento dos dados, foram usados, também, os programas Excel (Microsoft, EUA) e SigmaPlot v 10.0 (Jandel Inc., EUA).

As pipetas (PERFECTA, Brasil) feitas de vidro comum neutro foram confeccionadas por meio de um estirador vertical de 2 estágios (Narishige, PP 830, Japão). As pipetas foram preenchidas com solução salina que continha (mM): KCl 130, Hepes 10, EGTA 2 em pH 7,3 . As resistências das pipetas assumiram valores entre 1,5-2 M $\Omega$ . Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na pipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua vez, foi conectado à entrada do amplificador EPC9. As células foram banhadas por uma solução externa mM: NaCl 145, KCl 5,4, CaCl<sub>2</sub> 1,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5 Glicose 10, Hepes 10 em pH 7,4. Os “gigaselos” foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta e os miócitos foram montados, na configuração “whole cell” (HAMILL et al., 1981), foi realizada com a ajuda de uma sucção mais vigorosa. Esta permitiu romper o pequeno fragmento de membrana que separa a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicará a obtenção da configuração de “whole cell”.

Todos os registros foram feitos em células submetidas a um sistema de perfusão que consistiu em uma pipeta de vidro com aproximadamente 100  $\mu$ m de diâmetro interno e que estava conectada à saída de uma válvula solenóide, alimentada por dois reservatórios de 5

mL. A válvula solenóide serve para selecionar qual dos compartimentos ficará ligado à pipeta de perfusão, estabelecendo, assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos (0,1 mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade. Foram realizados protocolos tipo rampa (com duração de 1s) na qual a variação de voltagem foi de -120mV a +50mV ( $dV/dt= 180mV/s$ ) na ausência e na presença de glibenclamida (100 $\mu$ m/L) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A análise levou em consideração a amplitude das correntes de efluxo medidas em +50 mV na ausência e na presença de glibenclamida desta forma determinamos a magnitude da corrente de potássio sensível à glibenclamida que é atribuída aos canais sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ). O veículo usado não mostrou efeito sobre as correntes medidas na concentração usada.

### **9.18. Análise estatística**

Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM. A comparação entre o grupo controle e DT foram realizadas utilizando one way ANOVA usando teste *t* de Student's, teste de Tukey e Bonferroni. Em todos os testes estatísticos o  $p < 0.05$  foi usado como uma medida de significância estatística.

## **IV. Resultados**

## 10. Resultados

Relatos existentes na literatura demonstram que a deficiência em tiamina pode levar a insuficiência cardíaca (IC) (Ozawa et al. 2001; Singleton and Martin 2001; Suter and Vetter 2000). Em função desses relatos, verificamos primeiramente através da análise histológica do tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) se estava ocorrendo alguma alteração em nível morfológico que pudesse se correlacionar com o desenvolvimento da IC. Como pode ser visto nas figuras 16A e 16C fez-se a análise da espessura do ventrículo esquerdo em ratos controles (CT) e DT respectivamente. Visualizando a figura, podemos observar a menor espessura da parede do ventrículo esquerdo dos ratos DT quando comparados ao CT (~40 %). Na figura 16E, está representada a quantificação dessa diferença através do gráfico de barras demonstrando a diferença estatística entre os grupos.

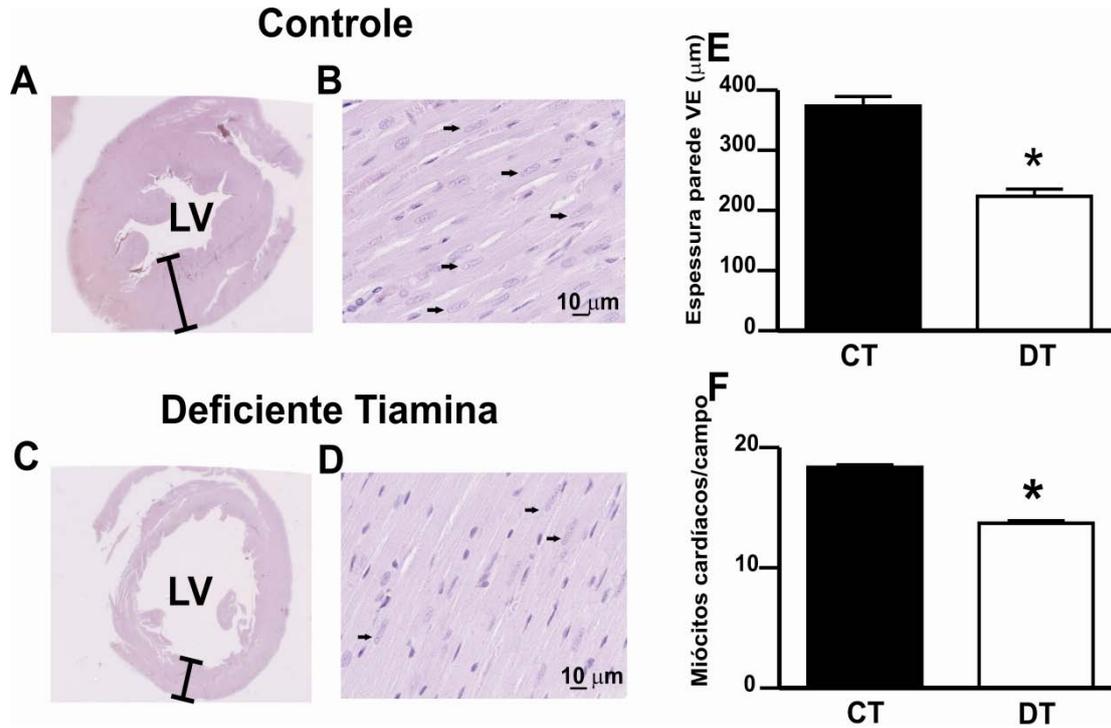


Figura 16- Secções histológicas ( $5\mu\text{m}$ , coradas com H&E) do tecido cardíaco (ventrículo esquerdo; LV) de ratos controles (A e B) e deficientes em tiamina (C e D). Espessura da parede do ventrículo esquerdo (E) foi medida em três pontos distintos do ventrículo esquerdo nos ratos controle (CT) e deficiente em tiamina (DT). Número de miócitos cardíacos nos ratos controle e DT(F). As setas indicam os núcleos. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de 7 grupos de animais. \* $P < 0.05$ .

Nesta análise também foi verificado o número de miócitos cardíacos por campo, que foram quantificados através da contagem dos núcleos dos cardiomiócitos como mostrado nas figuras 16B e 16D (veja as setas). A figura 16F mostra a quantificação dessa análise que demonstra também a diferença estatística entre os dois grupos, onde os ratos DT apresentaram um menor número de núcleos por campo avaliado. O nosso próximo parâmetro analisado foi a largura e o comprimento dos cardiomiócitos nos ratos controle e DT.

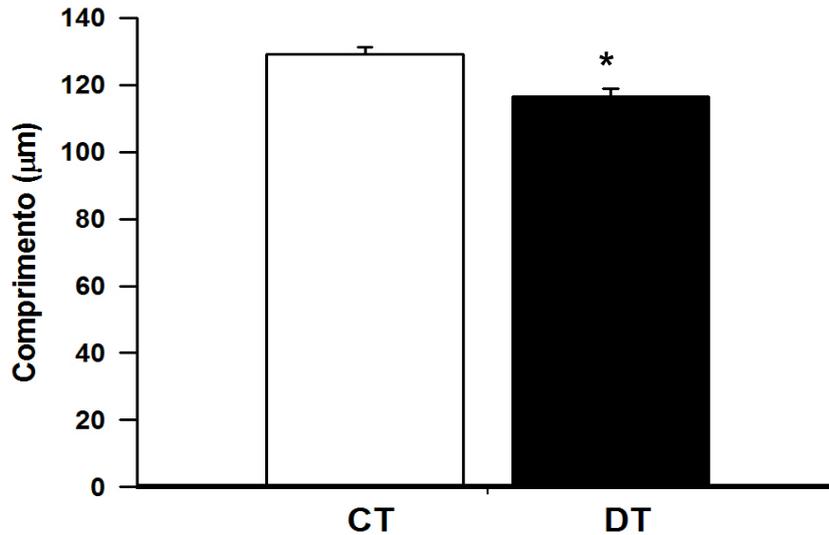


Figura 17- Comprimento dos cardiomiócitos ( $\mu\text{m}$ ) nos ratos controle (CT, n=21) e deficientes em tiamina (DT, n=31). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$ .

Através da figura 17 podemos observar que o comprimento dos cardiomiócitos é significativamente menor nos ratos DT quando comparados ao CT. A média do comprimento dos miócitos cardíacos para o grupo controle foi de  $129.2 \pm 3.6 \mu\text{m}$  (n=21) e  $123.7 \pm 3.2 \mu\text{m}$  (n=31) para as células cardíacas nos ratos DT. A figura 18 representa as medidas da largura das células cardíacas ventriculares nos dois grupos estudados. As células dos animais DT mostraram uma menor largura dos miócitos quando comparadas ao grupo CT. A largura média das células para o grupo controle foi de  $15.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$  (n=30) e  $13.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (n=39) para as células DT. Ao contrário do encontrado na literatura, nossos resultados demonstraram uma menor espessura da parede e um menor número de miócitos cardíacos no ventrículo esquerdo somado a um menor comprimento (~12%) e largura (~14%) dos cardiomiócitos indicando um quadro de hipotrofia celular.

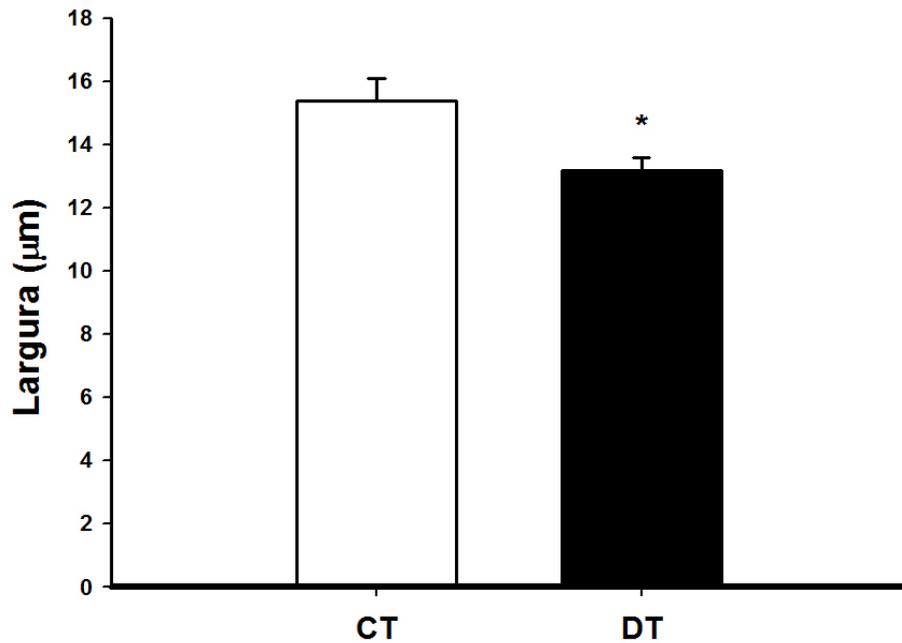


Figura 18 - Largura dos cardiomiócitos ( $\mu\text{m}$ ) nos ratos controle(CT, n=30) e deficiente em tiamina (DT, n=39). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$ .

Devido às disfunções ocorridas em nível morfológico nosso próximo objetivo foi estudar se havia alguma disfunção mecânica no coração de ratos tratados durante 35 dias com uma dieta deficiente em tiamina. A capacidade contrátil foi determinada nas células ventriculares. A figura 19A mostra quatro grupos de registros representativos onde se podem avaliar as fases de contração e relaxamento quando as células são estimuladas em frequências de 1 e 3 Hz. Os cardiomiócitos obtidos dos ratos deficientes apresentaram uma porcentagem de encurtamento aproximadamente 25% menor que o do controle (CT:  $14.7 \pm 1.1$  %, n=30; DT:  $11.1 \pm 0.9$  %, n=39;  $P < 0.05$ ), quando estimulados a frequência de 1Hz.

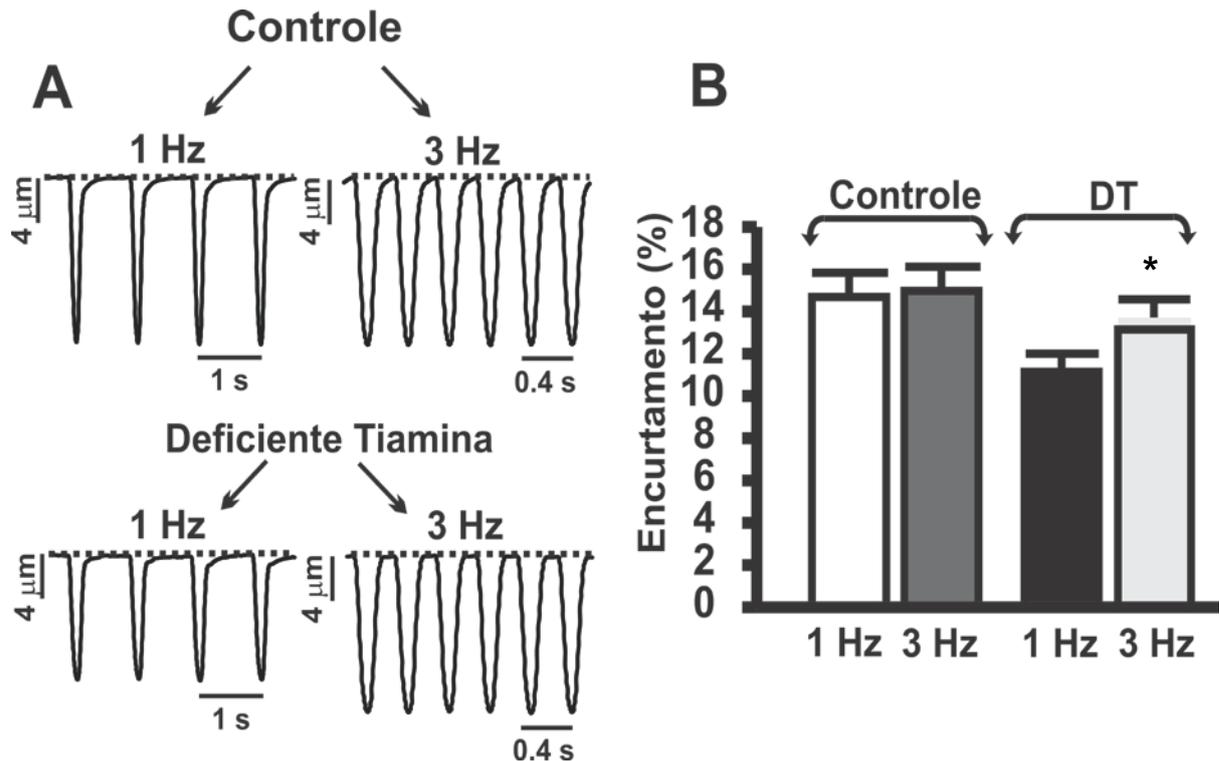


Figura 19- Registros representativos da contratilidade celular. (A) Traçados representativos para cardiomiócitos (ambos os ventrículos) em registro controle (CT, n=30) e deficiente em tiamina (DT, n=39) nas frequências de 1 e 3 Hz. (B) Porcentagem (%) de encurtamento das células cardíacas. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM \*P<0,05. A comparação dos dados foi realizada entre \* 1 Hz DT vs 3 Hz DT.

A figura 19B representa a análise estatística do encurtamento tomado como porcentagem de encurtamento, ou seja, a razão entre o tamanho da célula no máximo da contração pelo tamanho da célula no repouso. Podemos verificar na figura 19B que não houve diferença da capacidade contrátil, expressa como porcentagem de encurtamento, nos miócitos controles estimulados a frequências de 1 e 3 Hz. Porém, observamos uma redução da capacidade contrátil nos cardiomiócitos de ratos DT quando os mesmos foram estimulados a frequência de 1Hz em relação aos cardiomiócitos estimulados a frequência de 3Hz.

O tempo necessário para atingir 50% da contração e o relaxamento ( $T_{50}$ ) também foi calculado para as frequências de 1 e 3Hz. Na figura 20 observamos que o  $T_{50}$  para a

contração foi aumentada na freqüência de 1 Hz nos ratos deficientes quando comparada ao grupo de 3Hz, sendo que também houve um aumento do tempo de contração nos ratos DT estimulados a freqüência de 1Hz em relação aos ratos controles estimulados a mesma freqüência.

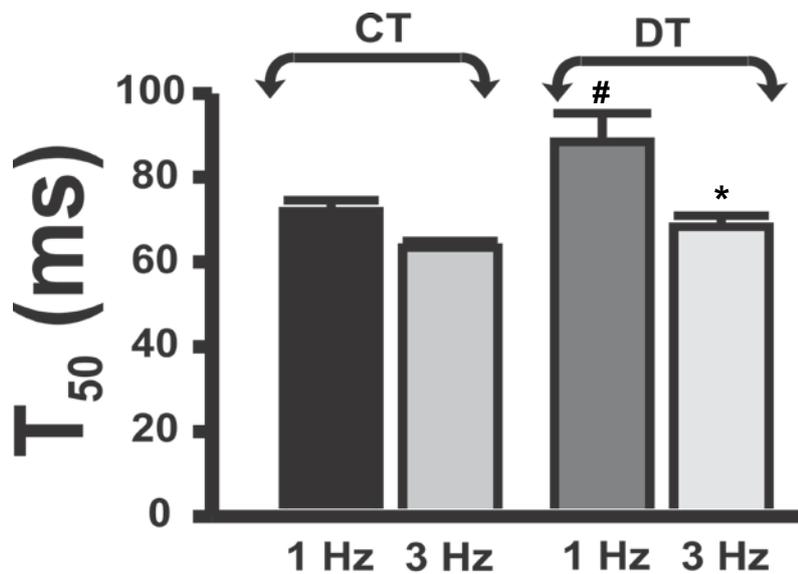


Figura 20- Tempo para 50% de contração em cardiomiócitos (ambos ventrículos) em ratos controle (CT) e deficientes em tiamina (DT) estimulados a freqüências de 1 e 3 Hz. As barras representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0.05$ . A comparação dos dados foi realizada entre \* 1Hz DT vs 3Hz DT e <sup>#</sup> 1Hz CT vs 1 Hz DT.

Por outro lado, o T<sub>50</sub> para o relaxamento dos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina e nos ratos controles não diferiram quando estes foram estimulados a freqüências de 1 e 3 Hz como mostrado na figura 21.

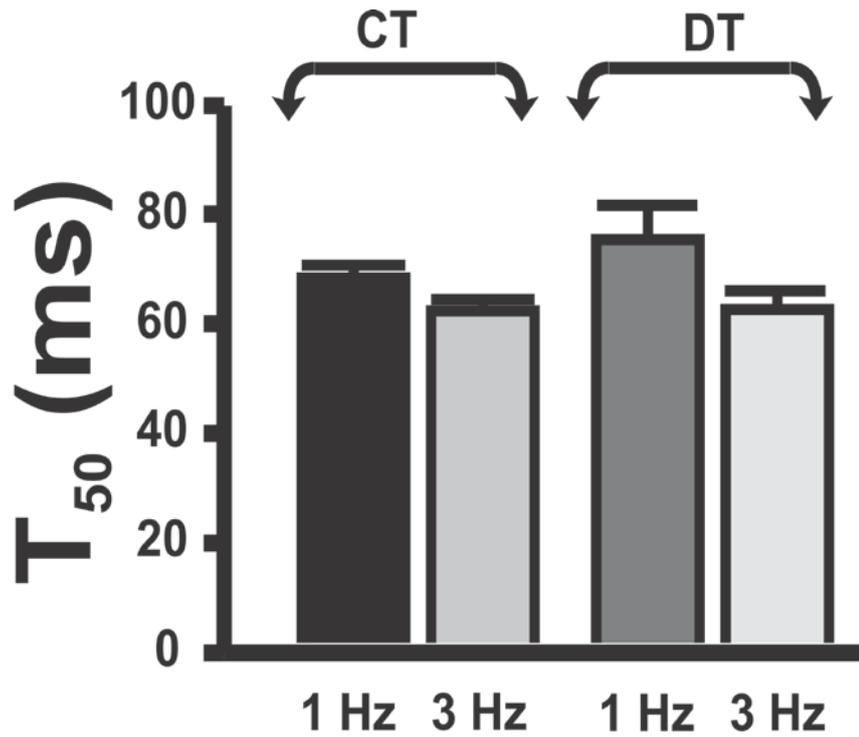


Figura 21- Tempo para 50% do relaxamento em cardiomiócitos (ambos ventrículos) em ratos controle (CT) e deficientes em tiamina (DT) estimulados a frequências de 1 e 3 Hz. A comparação dos dados foi realizada entre 1Hz DT vs 3Hz DT e 1Hz DT vs 1 Hz CT e 3Hz DT vs 3Hz CT.

Neste estudo também foi analisado a velocidade máxima de contração e relaxamento. A velocidade máxima de contração foi menor nas células dos ratos deficientes em tiamina, quando estas foram estimuladas a frequência de 1 Hz (figura 22) comparadas com o grupo estimulado a 3Hz. Esta diminuição também foi verificada

quando estas células foram comparadas ao grupo controle estimuladas na mesma frequência.

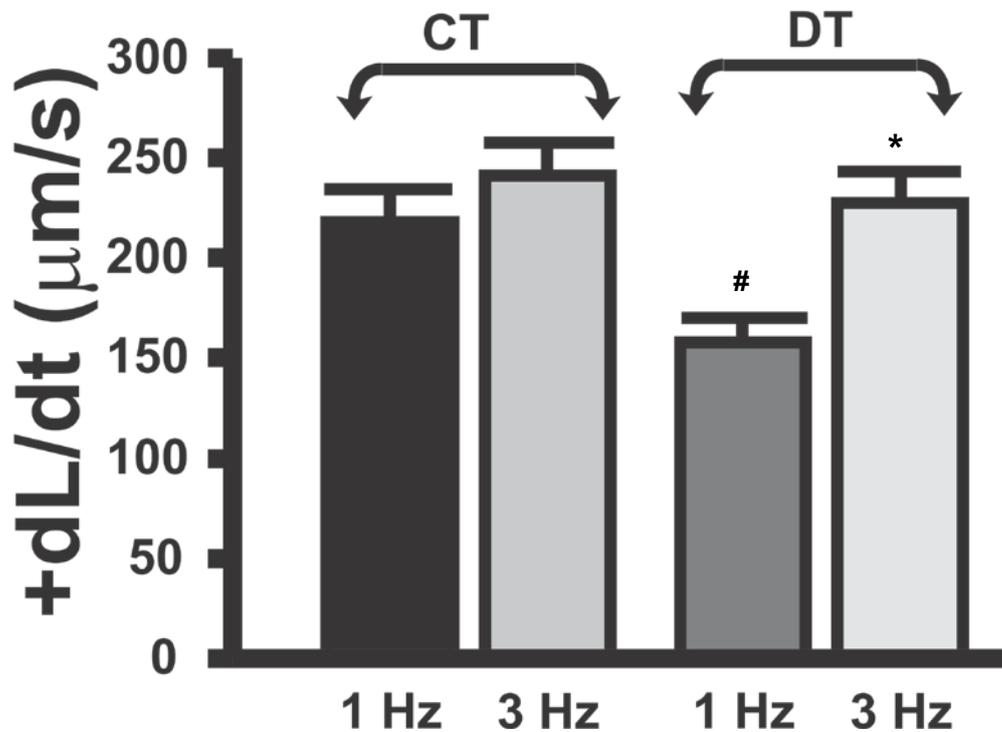


Figura 22- Velocidade máxima de contração (+dL/dt,  $\mu\text{m/s}$ ) em cardiomiócitos de ratos controle (CT) e deficientes em tiamina (DT) estimulados a frequências de 1 e 3 Hz. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0.05$ . A comparação dos dados foi realizada entre \* 1Hz DT vs 3Hz DT e # 1Hz CT vs 1 Hz DT

Na velocidade máxima de relaxamento (figura 23) as células dos ratos deficientes em tiamina estimuladas a frequência de 1Hz demonstraram uma menor velocidade de relaxamento quando comparados as células estimuladas a frequência de 3Hz.

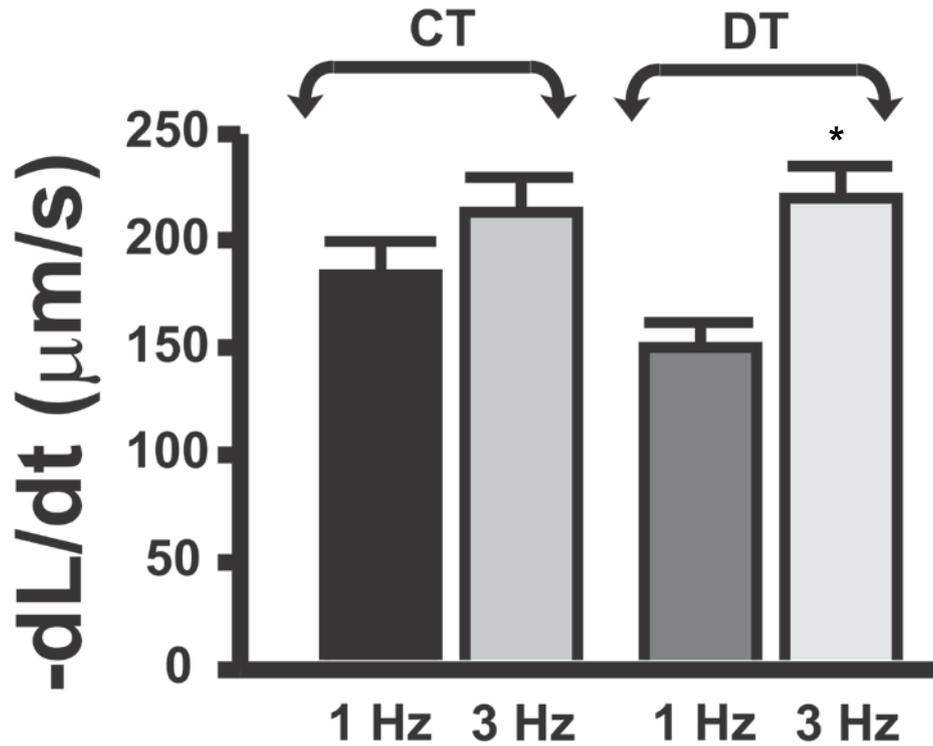


Figura 23- Velocidade máxima de relaxamento ( $-dL/dt$ ,  $\mu\text{m/s}$ ) em cardiomiócitos de ratos controle (CT) e deficientes em tiamina (DT) estimulados a frequência de 1 e 3 Hz. Os dados representam a média  $\pm$  EPM , \*  $P < 0.05$ . A comparação dos dados foi realizada entre 1Hz DT vs 3Hz DT.

A próxima análise realizada neste estudo foi a verificação do consumo de oxigênio em ratos mantidos em repouso, já que é conhecido que a deficiência em tiamina leva a uma menor atividade de importantes enzimas envolvidas no metabolismo energético. Nesta análise verificamos um menor consumo de oxigênio nos ratos tratados com a dieta

deficiente em tiamina quando comparados ao grupo controle (figura 24). Esta diferença foi estatisticamente significativa em todos os pontos para os ratos DT. O experimento foi realizado durante 30 minutos sendo as leituras realizadas de minuto em minuto.

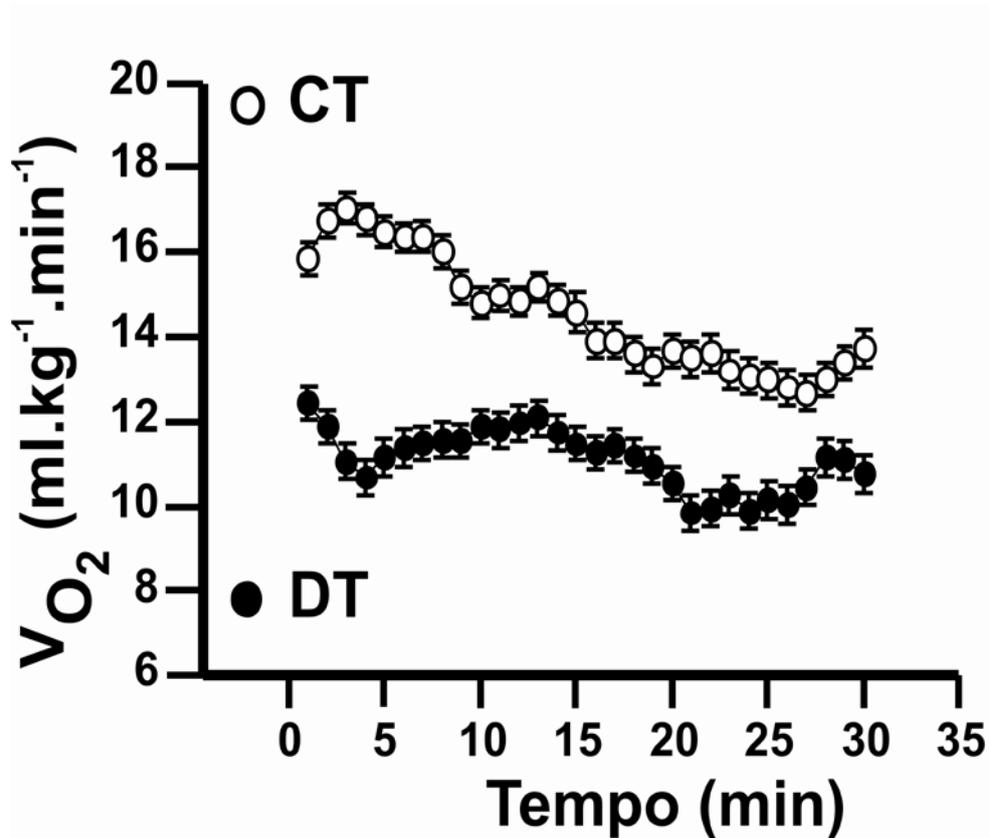


Figura 24 - Mensuração do consumo de oxigênio. Consumo de oxigênio no decorrer do tempo (30 minutos) em ratos controle (CT) (círculos abertos, n=5) e deficientes em tiamina (DT) (círculos fechados, n=5). Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*P<0,05.

Depois de realizado o experimento do consumo de oxigênio onde se verificou um menor consumo do mesmo nos ratos DT, fomos analisar a utilização da via anaeróbica através da formação de lactato.

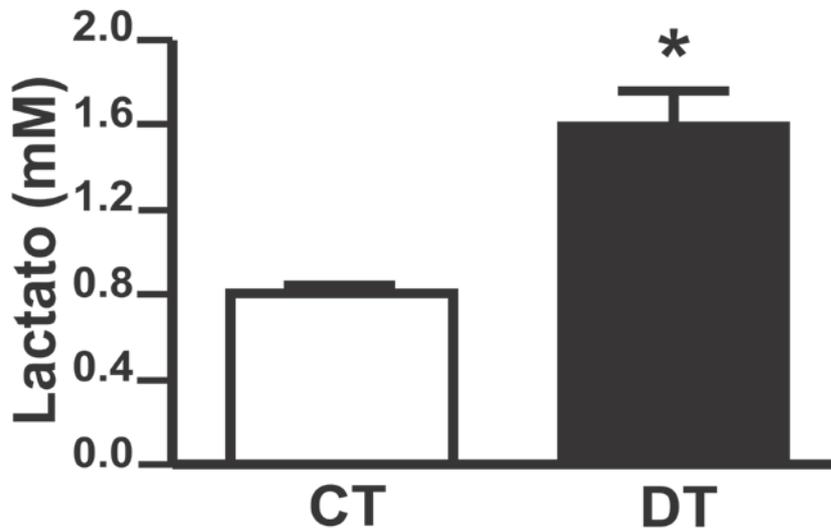


Figura 25- Concentração de lactato (mM) plasmático em ratos controle (CT; n=5) e em ratos deficientes em tiamina (DT; n=5). Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM. \*P<0.05

Observando a figura 25 podemos observar um significativo aumento do lactato plasmático em torno de 2x maior nos ratos DT ( $1,59 \pm 0,17$  mM) quando comparados aos ratos CT ( $0,78 \pm 0,03$  mM).

O próximo parâmetro analisado foi a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que foi mensurado pela variação do sinal de fluorescência de duas sondas, DCFH e DHE, através de microscopia confocal. A investigação destas espécies foi realizada

devido ao fato de nosso grupo ter verificado em experimentos anteriores ausência de arritmias de reperfusão nos ratos DT depois de 30 minutos de isquemia (Oliveira, 2007b), sendo que as arritmias foram observadas no grupo controle.

Este resultado nos levou a pensar que pudesse estar havendo uma adaptação dos sistemas antioxidantes como um mecanismo cardioprotetor para este modelo. Além disso, o estudo de ROS e dos sistemas antioxidantes se torna interessante, já que, foi a primeira vez que estas análises foram realizadas na deficiência em tiamina no coração.

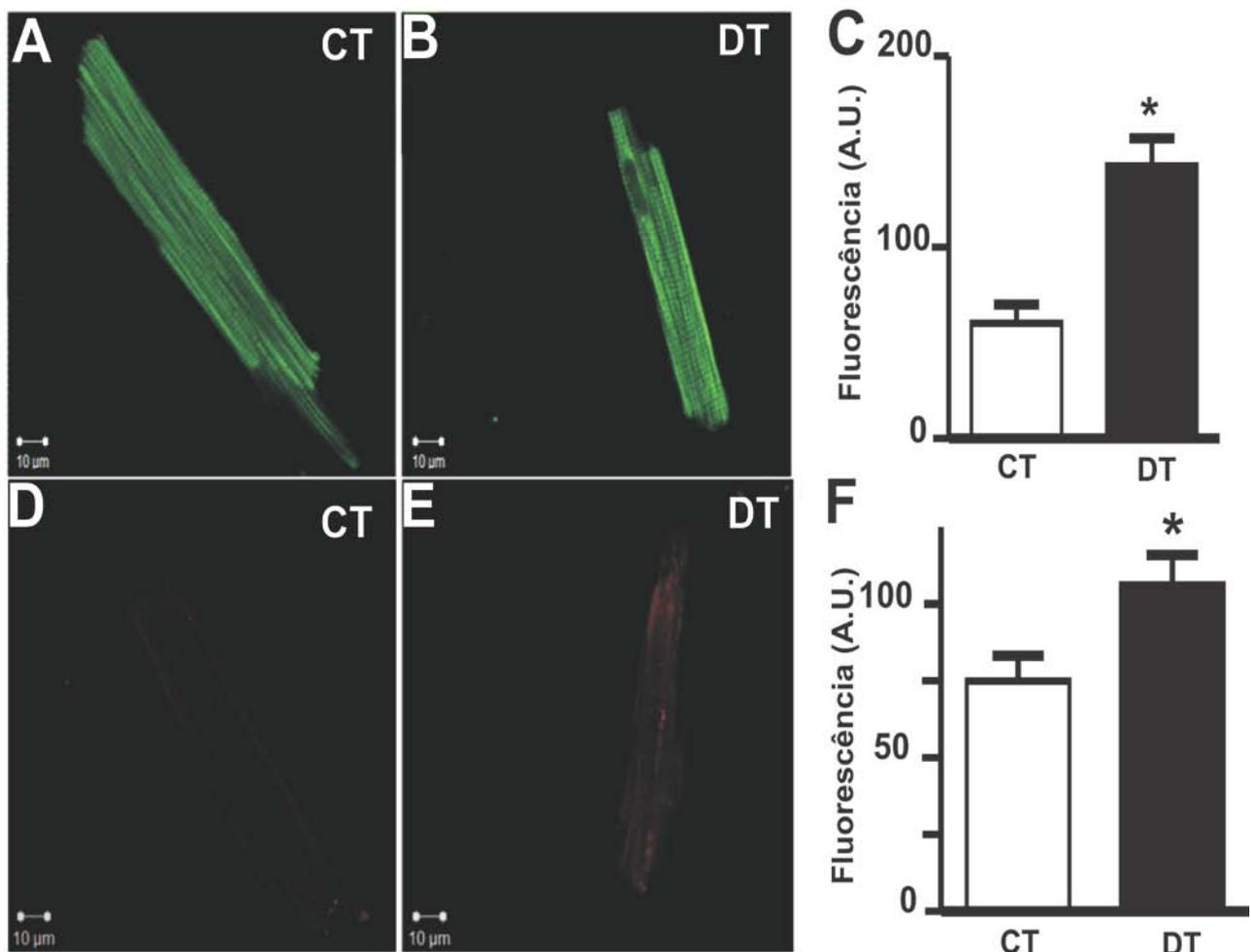


Figura 26- Produção de peróxido de hidrogênio e superóxido em cardiomiócitos. (A e B) Imagens de microscopia confocal mostrando as células incubadas com DCFHDA em ratos controle (CT) (A, figura superior à esquerda) e deficientes em tiamina (DT) (B, figura superior à direita). (C) Variação da fluorescência (CT: n=53 e DT: n=51). (D e E) Imagens de microscopia confocal mostrando as células incubadas com DHE em ratos controles (CT) (D, figura inferior à esquerda) e deficiente em tiamina (DT) (E,

figura inferior à direita). (F) Variação de fluorescência (CT: n=41 e DT: n=56). Dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*P<0.05

Na figura 26 mostramos a produção de ROS, através da incubação de cardiomiócitos com sondas para peróxido de hidrogênio e superóxido. Nesta figura podemos observar a produção de peróxido de hidrogênio em ratos controle (figura 26A) e ratos deficientes em tiamina figura 26B. A quantificação do sinal de fluorescência está representada na figura 26C, sendo que a produção de peróxido de hidrogênio foi significativamente maior nos ratos DT quando comparados ao controle. Acrescenta-se ainda, que os cardiomiócitos de ratos controle figura 26D apresentaram uma menor produção de superóxido quando comparados aos ratos DT como mostrado nas figuras 26E, 26 F.

Depois de investigar a produção de ROS e verificar um aumento dessas espécies no coração de ratos deficientes em tiamina, fomos verificar como se encontravam os sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos, já que estes são uma importante via de defesa, na tentativa de eliminação de ROS. A primeira enzima analisada foi a superóxido dismutase que transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio. Na figura 27A está demonstrada a atividade da SOD total e podemos observar que a mesma não teve diferença entre ratos controles e DT (CT:  $0,16 \pm 0,003$  U.mg proteína<sup>-1</sup> (n=5) vs DT:  $0,15 \pm 0,006$  U.mg proteína<sup>-1</sup> (n=6)). A partir daí fomos quantificar a expressão dessa proteína através da técnica de western blot onde verificamos uma aumento da expressão da CuZn-SOD (figura 27B) e também da MnSOD (figura 27C) nos ratos DT quando comparado aos controles.

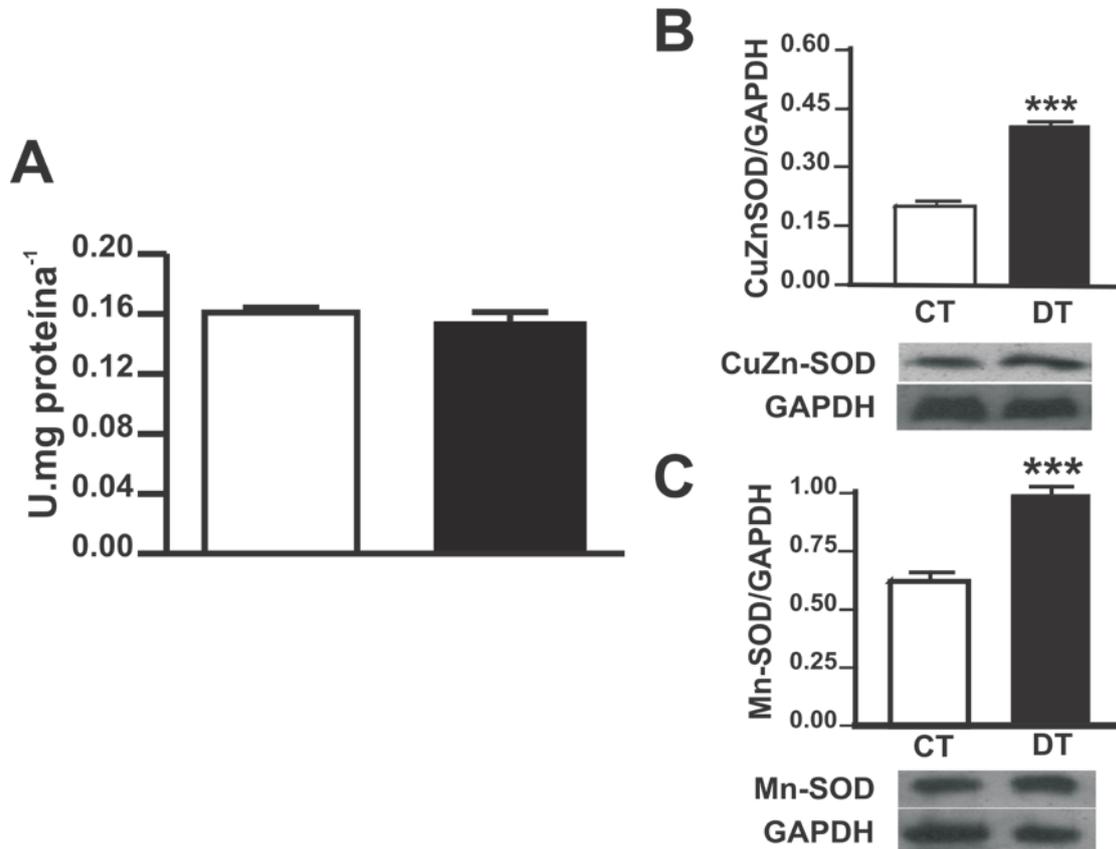


Figura 27- Atividade da enzima superóxido dismutase (total) e a expressão das proteínas CuZn-SOD e Mn-SOD no miocárdio (ventrículos) de ratos controle (CT) e deficientes em tiamina (DT). (A) Gráficos de barras mostrando a atividade da enzima superóxido dismutase total nos ratos controles (n=5) e DT (n=6). (B e C) Gráficos de barra mostrando a expressão protéica da CuZn-SOD e Mn-SOD e abaixo as imagens representativas de western blot. Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis protéicos de GAPDH nos ratos CT e DT. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*\*\*P<0.001.

O produto da SOD é o peróxido de hidrogênio, uma ROS que é detoxificada por enzimas como a glutathiona peroxidase e catalase. Devido ao aumento de peróxido de hidrogênio em cardiomiócitos fomos verificar a atividade e a expressão de ambas as enzimas. A glutathiona peroxidase possui uma alta atividade no coração desempenhando um papel muito significativo neste tecido. Além disso, a investigação desta enzima torna-se importante, pois a GPX tem como um de seus cofatores a glutathiona (GSH) que é reduzida pela glutathiona redutase através da utilização do NADPH, produzido na via das pentoses. Como sabemos a tiamina atua como coenzima da transcetolase, uma enzima

presente na via das pentoses. Na figura 28A verificamos uma menor atividade da glutathione peroxidase nos ratos DT ( $199.4 \pm 30.2$  nmol NADPH.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>) que foi estatisticamente diferente do grupo controle ( $435.3 \pm 28.6$  nmol NADPH.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>). Quando verificado por western blot a expressão dessa enzima, observamos uma significativa redução de sua expressão da GPx nos ratos DT quando comparado ao grupo controle como mostrado na figura 28B.

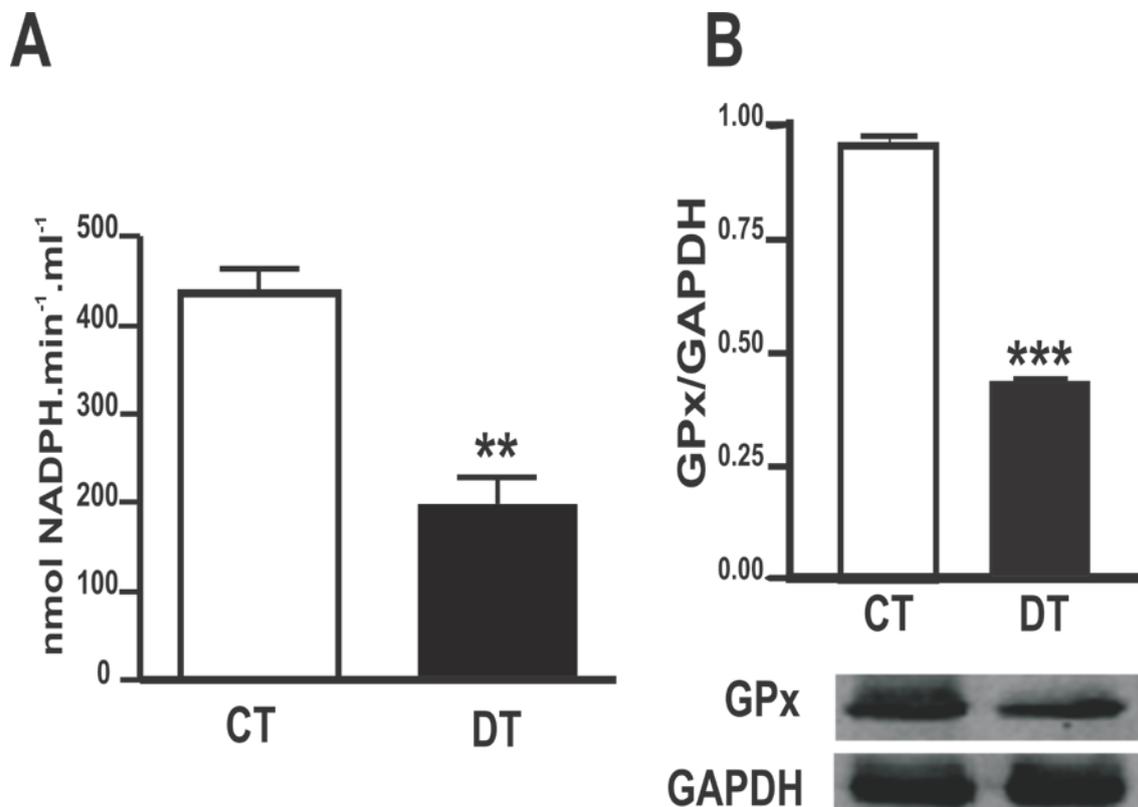


Figura 28 - Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) e sua expressão protéica no miocárdio de ratos controle (CT) e deficiente em tiamina (DT). (A) Gráfico de barras mostrando a atividade da enzima GPx no coração de ratos CT (n=5) e DT (n=5). (B) Gráfico de barras mostrando a expressão protéica da GPx e abaixo as imagens representativas de western blot. Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis protéicos de GAPDH nos ratos CT e TD. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*\*\*P<0.001.

Na figura 29A podemos observar a atividade da catalase no coração de ratos controles e DT. Nesta figura podemos observar um significativo aumento da atividade desta enzima

nos ratos DT (2.1x maior) quando comparados ao controle. Quando realizada a expressão protéica desta enzima (figura 29B) observamos também um significativo aumento de sua expressão nos ratos DT.

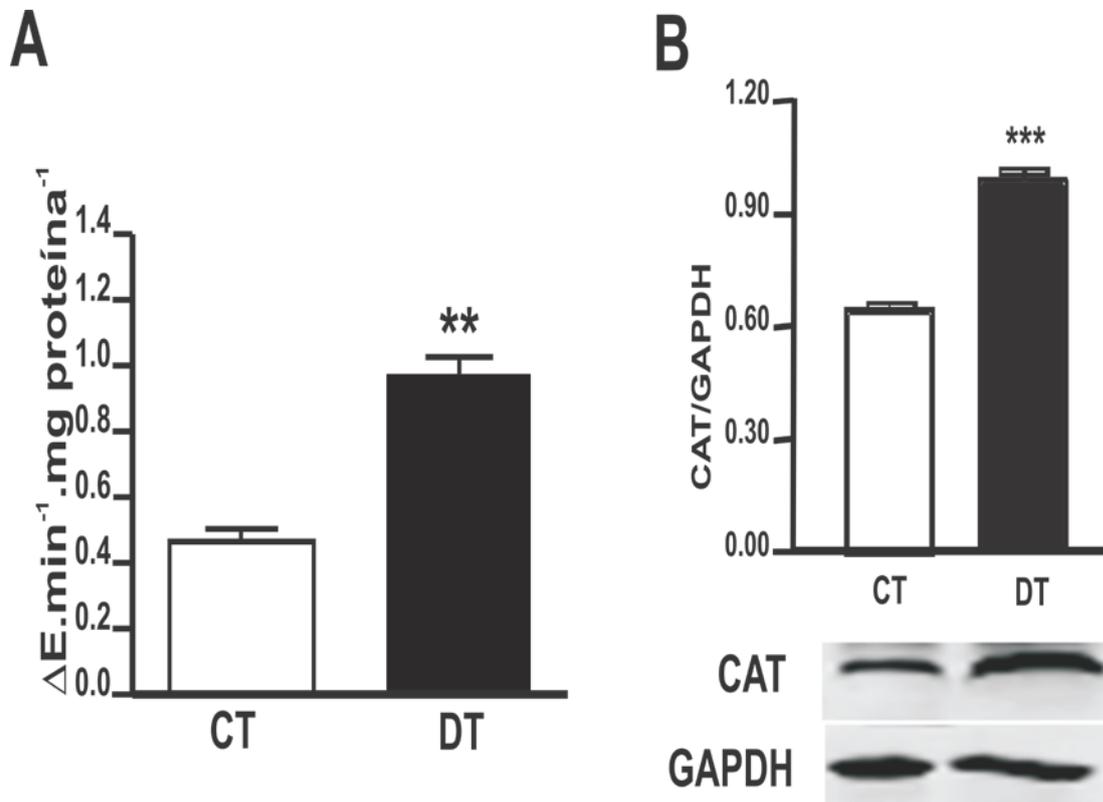


Figura 29- Atividade da enzima catalase e a expressão protéica no miocárdio de ratos CT e DT. (A) Gráficos de barra mostram a atividade da enzima catalase no coração de ratos controle (CT; n=5) e deficiente em tiamina (DT; n=6). (B) Gráficos de barra mostrando a expressão protéica da catalase e abaixo as imagens por western blot. Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis protéicos de GAPDH nos ratos CT e DT. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*\*\*P<0.001

A peroxidação lipídica também tem sido um parâmetro comumente utilizado com um indicativo de danos a lipídios de membrana por ROS. Neste estudo verificamos os níveis

de lipoperoxidação através da quantificação dos níveis de MDA pela técnica de TBARS. A análise desse parâmetro demonstrou um significativo aumento nos níveis de TBARS nos ratos DT (46.7%) (figura 30). Este resultado demonstra que nos animais submetidos a dieta privada de tiamina sofrem danos a lipídios de membrana por ROS, um indicativo de estresse oxidativo e desbalanço entre a produção de ROS e sistemas antioxidantes.

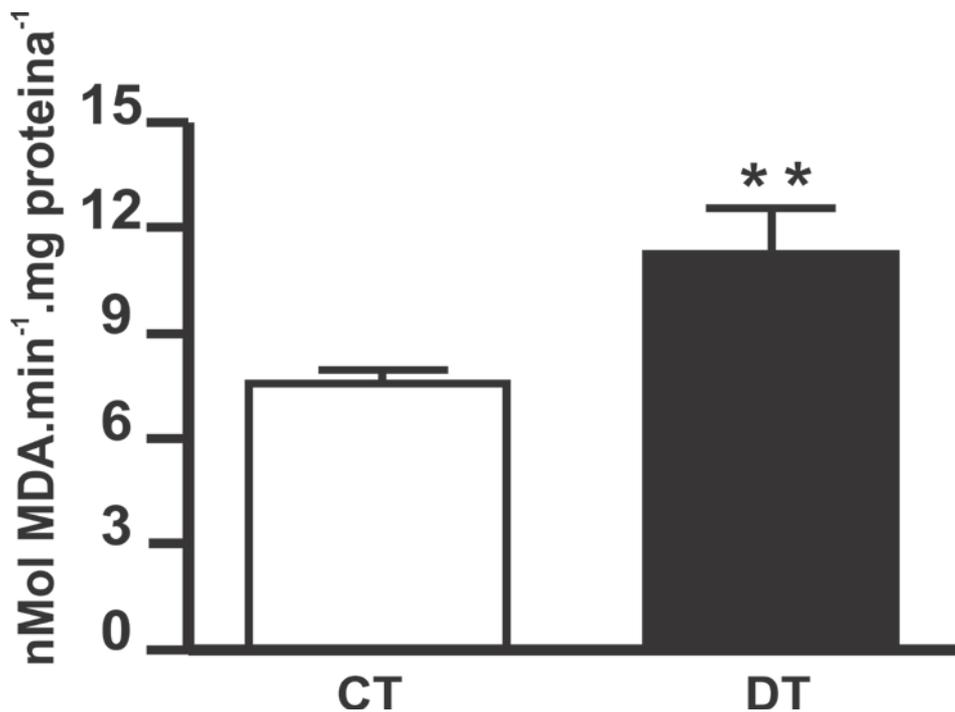


Figura 30- Níveis de TBARS no miocárdio de ratos controle (CT; n=5) e deficientes em tiamina (DT; n=5).

Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*P<0.05.

Pelo fato de termos uma diminuição da espessura e número de células no ventrículo esquerdo como demonstrado pela figura 16 e um aumento da produção de ROS como demonstrado pela figura 26 somado a um aumento da acidemia, alterações dos sistemas

antioxidantes e aumento dos níveis de TBARS como mostrado nas figuras (25,27,29,30) fomos verificar a presença de apoptose no tecido cardíaco. Através de lâminas histológicas do coração desses animais realizou-se a técnica de TUNEL para quantificar a presença de apoptose.

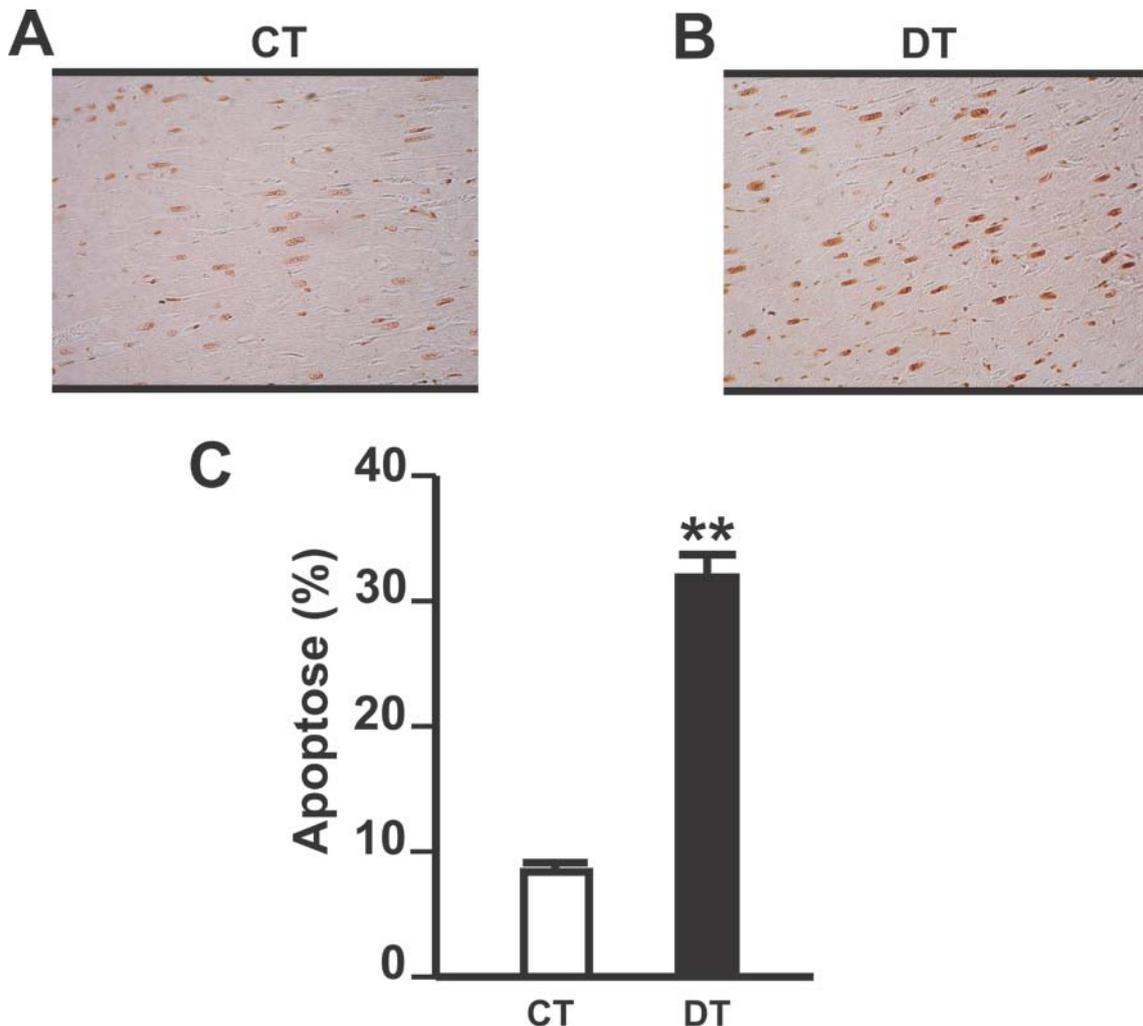


Figure 31 – Verificação da presença de apoptose em corte histológico de coração. Figura representativa da presença de apoptose em ratos controles(CT; 31<sup>a</sup>) e deficientes em tiamina (DT; 31B) realizadas pelo método de TUNEL a partir de 2 grupos de animais (n=20). (31C) Gráficos de barra mostrando a variação do índice apoptótico entre cortes histológicos de células controle e DT. Os dados são representados como média ± EPM, \*\*P<0,001.

A figura 31 demonstra nitidamente a presença de apoptose nos ratos DT (32.2 ± 1.5% n=20, P<0.05) quando comparados ao grupo controle (8.3 ± 0.8% n=20). Este parâmetro

foi quantificado através da porcentagem (%) de apoptose como demonstrado na figura 31C.

Devido a deficiência em tiamina comprometer o metabolismo energético, avaliamos as correntes do  $K_{ATP}$  para verificar se esse canal se encontrava mais ativo, já que a depleção de ATP intracelular causa sua ativação. Para a realização deste experimento utilizamos a glibenclamida (100  $\mu$ M) que é uma droga conhecida por exercer um efeito inibidor sobre este canal (Sang-qing et al., 2006). Na figura 32 podemos verificar uma curva corrente vs. voltagem (I-V) de -120 mV a +50 mV. Nos painéis A e C estão mostradas as I-Vs para as correntes de  $K^+$  medidas nas células dos ratos controle e dos deficientes em tiamina respectivamente, demonstrando uma inibição maior das corrente nos canais  $K_{ATP}$  dos ratos deficientes em tiamina em relação ao controle quando perfundesse glibenclamida. Nos painéis B e D está representado a I-V resultante da subtração digital ponto a ponto das I-Vs controle e na presença de glibenclamida. No painel E está mostrado a fração da corrente que foi inibida pela glibenclamida demonstrando que os cardiomiócitos dos ratos deficientes apresentaram uma maior fração inibida da corrente de  $K^+$  atribuída aos  $K_{ATP}$  ( $p < 0,05$ ).

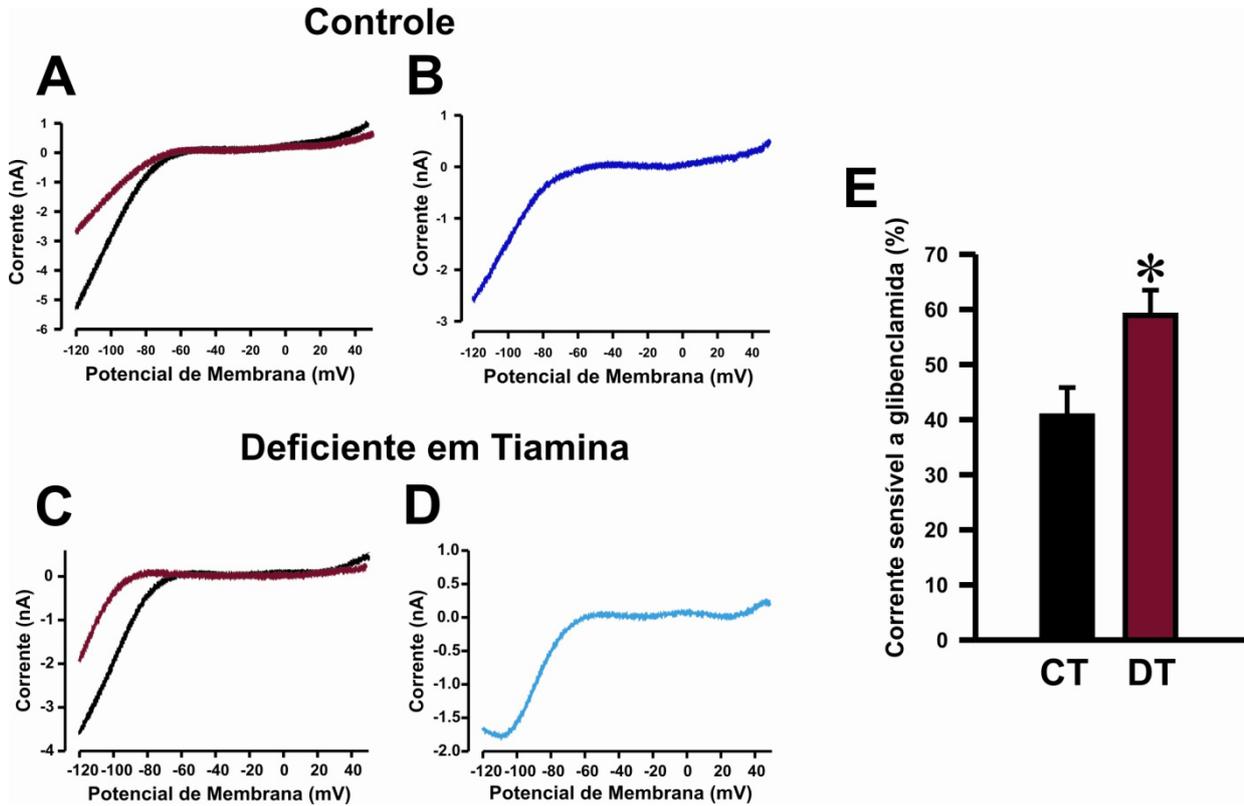


Figura 32- Efeito da glibenclamide sobre as correntes de  $K^+$ . (–) Relação corrente-voltagem (I-V) antes da aplicação de glibenclamide (preto) e durante a aplicação de 100  $\mu$ M de glibenclamide (vermelho). A) I-V representativa para os cardiomiócitos controle com (vermelho) e sem (preto) adição de glibenclamide (n=8). B) I-V representativa da subtração digital entre as I-Vs mostradas em A. C) I-V representativa para os cardiomiócitos, deficientes em tiamina, com (vermelho) e sem (preto) adição de glibenclamide. D) I-V representativa da subtração digital entre as I-Vs mostradas em C. E) Fração da corrente de  $K^+$  sensível à glibenclamide em +50 mV. \*  $p < 0,05$ .

## **V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

## 11. DISCUSSÃO

Sabe-se que a deficiência em tiamina causa disfunções no organismo, por ser a tiamina uma coenzima que está presente na estrutura de enzimas centrais do metabolismo energético. Devido a isso, esse trabalho visou verificar as disfunções que acontecem no miocárdio, já que esta deficiência leva a uma disfunção cardíaca conhecida como beribéri úmido. Diversos trabalhos demonstram que a deficiência em tiamina é caracterizada por uma pronunciada hipertrofia o que caracterizaria um estado de insuficiência cardíaca no estágio final da doença (Aldinger 1965; Cappelli et al. 1990; Ozawa et al. 2001). Ao contrário dos achados na literatura, nossos resultados sugerem uma hipotrofia que se caracteriza por uma menor espessura e um menor número de células do ventrículo esquerdo nos ratos deficientes em tiamina quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi verificado um menor comprimento e largura dos cardiomiócitos nos ratos DT. Provavelmente, os resultados encontrados através da análise histológica são resultantes de uma adaptação encontrada pelo organismo proveniente de vários processos que estão acontecendo intracelularmente neste modelo. Além disso, pode ser um mecanismo encontrado a fim de reduzir o gasto energético pelas células cardíacas, já que uma menor ingestão de alimentos foi verificada no decorrer do período experimental. Nesse modelo foi observada uma menor ingestão de alimentos que começou por volta do 17º dia quando observamos, a partir deste período, uma pronunciada perda de peso comparada ao grupo controle (dados não mostrados). Diversos trabalhos com deficiência em tiamina mostram a diminuição da ingestão de comida a partir da terceira semana, bem como, a perda de peso a partir deste período (Cappelli et al., 1990; da Cunha et al., 2007). Trabalhos da literatura mostram que ratos deficientes em tiamina morrem espontaneamente depois de um período de cinco semanas, quando o tratamento é iniciado ainda jovem ou depois de oito semanas quando

o tratamento é iniciado na fase adulta (Cappeli et al., 1990). Além das alterações morfológicas verificadas em nosso estudo, os ratos deficientes também apresentaram morte celular por apoptose. Vários modelos de insuficiência cardíaca têm verificado apoptose no tecido cardíaco e muitos consideram a morte celular por apoptose como um agravante de doenças cardíacas (McConkey, 1998; Kumar & Jugdutt, 2003).

Depois de verificado a disfunção morfológica em ratos deficientes em tiamina foi investigado se haveria alguma disfunção contrátil nos cardiomiócitos. A análise da contratilidade cardíaca a nível celular demonstrou disfunções na contratilidade de cardiomiócitos na frequência de 1Hz onde verificamos uma redução na capacidade contrátil, dada em porcentagem de encurtamento celular, com uma menor velocidade máxima de contração e relaxamento e um aumento no tempo para 50% da contração. A diminuição da maioria dos parâmetros contráteis na frequência de 1Hz e não na de 3Hz pode ser explicado em parte, conforme Bers 2001, que demonstra que em ventrículos de ratos o conteúdo de cálcio no retículo sarcoplasmático é frequentemente alto mesmo quando estas células são estimuladas em baixas frequências onde, um aumento da frequência causaria pouco ou nenhum aumento na concentração de cálcio no retículo. Experimentos realizados por Oliveira et al., 2007b com corações isolados de ratos deficientes em tiamina demonstraram que ocorre uma menor liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático quando os cardiomiócitos são estimulados a frequência de 1Hz, devido à menor recaptura de cálcio para o interior dessa organela. Provavelmente, a menor força contrátil encontrada nos ratos DT em nosso estudo se deva ao fato de que, nesse modelo, os ratos DT não se encontram com o retículo cheio como nos ratos CT e que a estimulação a frequência de 3Hz conduziria a um aumento da concentração do cálcio no retículo fazendo com que a resposta contrátil e, conseqüentemente, a força de contração dos ratos DT a 3Hz se equivalassem às do controle.

Nossos resultados estão de acordo com registros da literatura onde Cappelli et al., 1990 observaram em um estudo com ratos submetidos a uma dieta deficiente em Tiamina alterações nas propriedades contráteis cardíacas. Neste trabalho, eles verificaram bradicardia, uma menor pressão sistólica, sendo que a pressão diastólica não foi alterada, porém, ao contrário de nossos resultados, eles observaram uma hipertrofia nos ratos deficientes. Neste estudo, eles justificam que tais alterações não parecem ser sinais de insuficiência cardíaca, mas sim, de um mecanismo adaptativo. Além disso, foi verificada uma redução na atividade da miosina ATPase e este resultado foi justificado por ser este um mecanismo que usaria o ATP de forma mais econômica e eficiente devido ao menor consumo calórico. Aldinger 1965 mostrou uma diminuição na força de contração cardíaca em ratos deficientes em tiamina e este resultado foi atribuído parcialmente a um déficit na produção de energia pelo miocárdio. Diversos estudos mostram pronunciada bradicardia e arritmias fatais que foram consideradas a causa da morte em ratos deficientes em tiamina (Otsuka & Gurtner 1957; Rindi & Rapuzzi 1966). Por outro lado, Oliveira et al. 2007 encontraram que a deficiência em tiamina diminui a liberação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático devido a uma menor carga de cálcio no RS o que poderia ser responsável pela falta de arritmias de reperfusão que foi descrita neste modelo.

Além disso, encontramos um aumento de ROS neste modelo e registros da literatura mostram que o aumento destas espécies pode levar a modificações do estado redox de proteínas, inclusive naquelas envolvidas na homeostase do cálcio (Zima & Blatter, 2006) podendo trazer disfunções aos processos contráteis. Luo et al. 2006, em um estudo com cardiomiócitos, demonstrou que a exposição dos mesmos ao  $H_2O_2$  conduzia a uma diminuição do encurtamento celular sem mudanças nos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular, indicando uma redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$ . Acrescenta-se ainda que, de acordo com concentração do peróxido de hidrogênio, pode haver perda da função da SERCA2 e do transporte de  $Ca^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático (Kaneko et al.,

1989). Tsutsui et al. 2001 estudaram a suscetibilidade de miócitos cardíacos intactos aos efeitos do radical hidroxil em corações de cachorros com insuficiência cardíaca. Eles verificaram que o radical hidroxil induzia de uma maneira tempo dependente uma diminuição no comprimento do miócito (hipercontratura) e que esta hipercontratura era mais rápida nas células dos corações com insuficiência cardíaca. Eles atribuíram essa rápida hipercontratura a diminuições dos níveis de ATP. Neste estudo foi verificado que a atividade da CAT, SOD, GPx não foram diminuídas nos corações com insuficiência cardíaca e que os miócitos com insuficiência cardíaca foram mais suscetíveis à injúria celular induzida por estresse. Este processo não foi atribuído à diminuição das defesas antioxidantes e sim a propriedades intrínsecas da célula.

As mudanças morfológicas, a acidemia, o desenvolvimento do processo apoptótico e o aumento de ROS podem estar contribuindo no modelo utilizado no presente trabalho para justificar as disfunções contráteis encontradas em cardiomiócitos isolados de ratos deficientes em tiamina quando comparados aos controles.

Além dessas alterações, verificamos um menor consumo de oxigênio nos ratos DT que provavelmente se deve a um menor metabolismo basal devido a uma menor atividade das enzimas do metabolismo das quais a tiamina é cofator, como verificado em outros trabalhos (Gabrielli & Caruso, 2001; Bubber et al. 2004). Conseqüentemente, o menor consumo de oxigênio pode estar contribuindo para as disfunções contráteis encontradas no músculo cardíaco, já que o processo de acoplamento excitação/contração requer energia e conseqüentemente oxigênio para que possa acontecer (McCandless et al., 1970). Por outro lado, Arcos et al. (1964) em um estudo com mitocôndrias isoladas de ratos deficientes em tiamina não observaram nenhuma diferença no consumo de oxigênio e na razão P:O destes ratos, quando comparados ao grupo controle.

Além disso, nossos resultados verificaram que a redução no consumo de oxigênio foi acompanhada por um aumento dos níveis de lactato, demonstrando a utilização da via

anaeróbica para obtenção de energia. Provavelmente, uma menor atividade da PDHC deva estar levando à utilização da via anaeróbica e conseqüentemente à oxidação incompleta da glicose e à formação de lactato. Talvez também pelo fato de a KGDH estar com sua atividade diminuída, poderia estar havendo um maior consumo de hexoses pelo metabolismo anaeróbico como alternativa para a obtenção de energia. O aumento nos níveis de lactato é comumente verificado como forma de diagnóstico da deficiência de tiamina em animais e humanos (Naito et al., 2002; Bubber et al., 2004). Gabrielli & Caruso, 2001 verificaram uma grave acidemia e um baixo consumo de oxigênio em um paciente que estava sofrendo de beribéri cardiovascular. Um dos principais efeitos tóxicos da acidose láctica é a estimulação da formação de radicais livres e da lipoperoxidação (Barc et al., 2004). Primeiramente um baixo pH libera reservas de ferro de proteínas iniciando reações de Fenton e produzindo radical hidroxil. Segundo é que a presença de prótons no meio intracelular pode levar o NO a interagir com ânions superóxido produzindo peroxinitrito que se decompõe em radical hidroxil e dióxido de nitrogênio (Barc et al., 2004). Conseqüentemente, a diminuição do pH aumenta a produção de MDA, pelo processo de lipoperoxidação, que é iniciado pelo aumento de ROS (Barc et al., 2004). Na deficiência de tiamina uma das maiores conseqüências dos danos ao metabolismo oxidativo é o acúmulo de ácido láctico. Estudos com cérebro demonstraram acidificação celular e tecidual em vivo e a exposição dos astrócitos ao ácido láctico resultou em dano do transporte do glutamato sendo verificado, através de análises histológicas, danos nessas regiões (Hazell & Butterworth, 2009).

Devido às disfunções cardíacas observadas com estes resultados fomos avaliar se ocorria aumento de ROS, bem como alterações nos sistemas antioxidantes e se haveria danos celulares devido ao estresse oxidativo. Sabe-se que o músculo cardíaco é um tecido altamente oxidativo que produz mais de 90% de sua energia a partir da respiração mitocondrial. A disponibilidade de oxigênio, a limitação de substrato, ATP, ADP, fosfato

inorgânico,  $\text{Ca}^{2+}$  e o estado redox celular exercem importantes funções no funcionamento cardíaco (Ventura Clapier et al., 2003). Na deficiência de tiamina nenhum trabalho até hoje verificou disfunções nesse modelo associando-as com aumento de ROS.

Apesar de o consumo de oxigênio estar menor nos ratos deficientes, o que nos levaria a pensar em uma diminuição na formação de ROS já que a cadeia transportadora de elétrons estaria com menor atividade, foi verificado em nossos resultados um aumento do superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil nos ratos deficientes em tiamina. Este resultado foi acompanhado por mudanças na atividade e expressão dos sistemas antioxidantes. Sabe-se que a mitocôndria é considerada o principal local de formação de ROS nos organismos sendo que os complexos mitocondriais I, II e III são capazes de reduzir parcialmente o oxigênio molecular para produzir superóxido (St-Pierre et al., 2002). Além disso, o complexo II pode também produzir superóxido através da palmitoil carnitina no lado da matriz (St-Pierre et al., 2002). Porém, existem outros locais no qual essas espécies podem ser produzidas como nas flavoproteínas mitocondriais como o complexo da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ou a flavoproteína que faz a transferência de elétrons pela  $\beta$  oxidação (Kudin et al., 2005; Chandel & Budinger, 2007; Valko et al., 2006).

Além disso, a via da  $\beta$  oxidação que pode ocorrer em parte nos peroxissomos, pode estar sendo acentuada nestes animais, levando à formação de peróxido de hidrogênio nesta organela. Acrescenta-se ainda que o superóxido gerado pode danificar proteínas contendo heme liberando o ferro para o citosol. O ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pode vir a gerar ROS através de reações de Fenton (Kehrer et al., 2000) que podem também contribuir para o desbalanço redox. Acrescenta-se ainda, como já mencionado acima, que a acidemia metabólica pode estar contribuindo significativamente para o aumento de radicais neste modelo.

Apesar do aumento de superóxido, a atividade da SOD total não se alterou quando comparamos os ratos DT e CT, porém, houve um aumento da expressão da Cu/Zn e MnSOD. Apesar do aumento da expressão da MnSOD e da SODCu/Zn, esta não exerceu um efeito cardioprotetor como demonstrado por Shen et al, 2001. Neste estudo foram utilizados camundongos que apresentavam diabetes do tipo 1 e camundongos transgênicos que super expressavam MnSOD e tinham diabetes do tipo 1, os resultados obtidos demonstraram que a expressão aumentada desta enzima protegia a mitocôndria cardíaca de danos oxidativos. Os camundongos diabéticos transgênicos que super expressavam MnSOD apresentaram um aumento da expressão da catalase demonstrando morfologia, a contratilidade e as mitocôndrias normais no miocárdio. Provavelmente em nosso estudo, o aumento de superóxido, substrato da SOD, tenha levado a um mecanismo adaptacional celular com aumento da expressão, tanto da CuZn quanto da MnSOD, aumento este que foi desvinculado do aumento na atividade da enzima. Além disso, o peróxido de hidrogênio é conhecido por lesar a SOD, então o aumento da expressão da SOD seria uma forma de compensar o menor tempo de vida da enzima, já que esta ROS se encontra aumentada.

Conforme já mencionado, houve um aumento do  $H_2O_2$  nos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina que pode ser atribuído ao aumento do superóxido e provavelmente à incapacidade da CAT e GPx em detoxificar esta espécie. Sabe-se que a atividade e expressão de ambas enzimas diferem nos diversos tecidos, como demonstrado por Antunes et al., 2002. Neste estudo, foi avaliada a contribuição da glutathiona peroxidase e catalase na detoxificação do  $H_2O_2$  sobre estresse oxidativo em mitocôndrias de coração de ratos. Os resultados demonstram uma maior contribuição da GPx na detoxificação do  $H_2O_2$  mitocondrial quando comparada a catalase. A menor atividade e expressão da GPx encontrada em nossos resultados foi compensada por um aumento da atividade e expressão da catalase na tentativa de combater o  $H_2O_2$  produzido, afim de evitar danos

celulares por ROS. Provavelmente, uma das justificativas para a menor atividade da GPx seja que a glicose-6-fosfato, formada na via glicolítica esteja sendo utilizada em sua maior parte para a formação de piruvato pela via anaeróbica. Com isso, uma menor quantidade de glicose 6 fosfato estaria sendo direcionada para a via das pentoses fosfato e consequentemente uma menor produção de NADPH estaria sendo produzida.

Apesar da CAT não ter um papel tão significativo no coração quando comparado com a GPx (Molina & Garcia,1997; Antunes et al., 2002) sob condições patológicas ou de estresse, a célula pode passar por um mecanismo adaptativo e aumentar a atividade e expressão de enzimas na tentativa de combater estas espécies (Liu et al., 2005). Provavelmente o aumento da atividade e expressão da CAT neste trabalho foi um mecanismo adaptativo encontrado pela célula, na tentativa de combater o aumento do peróxido de hidrogênio, e também compensar a menor atividade e expressão da GPX. Em nosso estudo, apesar do aumento da atividade e expressão da CAT, esta não conseguiu combater por completo a formação de radical hidroxil e nem atenuar os danos oxidativos, já que nossos resultados mostraram um aumento deste radical livre, assim como danos lipídicos que foram demonstrados pelo aumento nos níveis de TBARS.

Nossos resultados estão de acordo com os de Molina & Garcia (1997) apresentados em um estudo com selênio, um cofator da GPx, e com um inibidor de catalase (fluoreto de sódio) sobre a importância destas enzimas para evitar a peroxidação lipídica no coração e qual delas contribuía mais na defesa do tecido cardíaco contra este processo. O tratamento foi realizado em ratos Wistar durante dois meses sendo o selênio administrado na dieta e o fluoreto de sódio administrado na água de beber. A ausência de selênio na dieta provocou uma diminuição em 87% da atividade da GPx e isto foi acompanhado por um aumento no processo de peroxidação. Além disso, foi observado que a peroxidação não ocorreu nos ratos tratados com o inibidor da catalase, apesar de sua atividade no citosol ter sido reduzida em 70%. Os resultados demonstraram que a GPx exerce uma

maior contribuição na detoxificação do  $H_2O_2$  que a catalase no coração, evitando, assim, a peroxidação. Acrescenta-se ainda, que o acentuamento da peroxidação ocorreu quando a atividade de ambas GPx (mitocondrial e citosólica) são reduzidas independentemente das alterações da catalase intracelular. Em um estudo com humanos em estágio final de insuficiência cardíaca, Dieterich et al. (2000) demonstraram que houve um aumento na expressão e atividade da catalase no miocárdio e que este resultado poderia ser uma resposta compensatória ao estresse oxidativo, embora outras enzimas antioxidantes como GPx e SOD não tivessem sua atividade e expressão modificada. Sam et al. 2005 em um estudo com corações humanos hipotetizaram que existiria um déficit antioxidante enzimático em pacientes que sofriam de insuficiência cardíaca. Eles verificaram a produção de ROS nestes doadores mostrando um aumento destas espécies no estágio final da insuficiência cardíaca acompanhada por mudanças na expressão e atividade de enzimas. Neste estudo, foi observado que o RNAm de diversos sistemas antioxidantes estava aumentado (MnSOD, Cu/ZnSOD e catalase). A atividade da Cu/Zn SOD estava aumentada, da Mn SOD estava diminuída e da catalase não se alterou. Este resultado demonstra que parece haver uma dissociação entre a expressão do RNAm e a atividade da proteína, já que a expressão maior do RNAm não foi acompanhada pela atividade de todos os sistemas antioxidantes. O aumento da produção de ROS tem sido verificado em cérebros deficientes em tiamina e o estresse oxidativo é relacionado a patologia humana de Wernick (Hazell & Butterworth, 2009).

A verificação do aumento de ROS e as alterações dos sistemas antioxidantes foram acompanhados de processo apoptótico. Muitos estímulos apoptóticos têm sido reconhecidos no coração, incluindo o estresse oxidativo. As ROS têm sido implicadas na patofisiologia cardíaca podendo causar apoptose dos miócitos por um aumento na expressão e atividade de proteínas proapoptóticas tais como Bax e caspase (Kumar & Jugdutt, 2005). O desbalanço entre a produção de ROS e sistema antioxidantes, bem

como o aumento do cálcio intracelular são fatores responsáveis por desencadear o processo apoptótico (Skulachev, 1999; Kumar & Jugdutt, 2003). Sabe-se que os cardiomiócitos na vida adulta têm pequena capacidade de se proliferar e que a apoptose não é observada com frequência no coração adulto (Kunnapuli et al., 2006). Porém, a apoptose tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares sendo detectada em um número de patologias cardíacas, incluindo hipóxia, isquemia, infarto do miocárdio, hipertrofia e insuficiência cardíaca (Garg et al., 2005; Kunnapuli et al., 2006). A apoptose tem sido detectada no coração durante todos os estágios do infarto do miocárdio, sugerindo que a mesma pode ser responsável por uma significativa morte dos cardiomiócitos durante um estágio agudo de isquemia, bem como pelo remodelamento cardíaco (Takemura & Fujiwara, 2004; Abbate et al., 2008).

A perda de cardiomiócitos durante o estágio agudo do infarto do miocárdio diretamente contribui para a disfunção contrátil (Takemura, & Fujiwara, 2004). Múltiplas proteases da cascata apoptótica podem clivar proteínas contráteis incluindo actina, miosina e troponinas e sabe-se que a inibição de caspases melhora a função contrátil através da redução da perda das proteínas contráteis (Garg et al., 2005). Em nossos resultados, podemos observar um menor número de células e uma menor espessura do ventrículo esquerdo que podem ter sido originadas devido ao processo apoptótico observado nos ratos deficientes em tiamina. Isto pode ser consequência da acidemia, aumento de ROS e disfunção dos sistemas antioxidantes. Estas disfunções morfológicas foram acompanhadas por disfunções contráteis verificadas neste estudo. Abbate et al., 2008 mostrou a ocorrência de células apoptóticas no ventrículo de pacientes que apresentavam um remodelamento cardíaco depois de sofrerem infarto do miocárdio, além disso, verificaram a ativação da caspase 3. Acrescenta-se ainda que estudos com insuficiência cardíaca têm mostrado que a apoptose em cardiomiócitos é uma característica comum no estágio final desta patologia e que a perda de cardiomiócitos

pela apoptose ajuda no desenvolvimento da mesma (Ibe et al., 2007). Estudos têm mostrado que, durante a isquemia, miócitos cardíacos fazem um enorme esforço para manter os seus níveis de ATP através da glicólise anaeróbica devido à diminuição da atividade da fosforilação oxidativa e este processo faz com que ocorra um aumento dos níveis de ácido láctico e uma diminuição do pH intracelular (Thatte et al., 2004). Nossos resultados demonstraram um aumento de lactato e a presença de apoptose, estando de acordo com Thatte et al. (2004) que, em um estudo com corações humanos e de porcos demonstraram uma relação direta entre acidose e apoptose evidenciando que o aumento da apoptose era proporcional ao grau de acidose no tecido cardíaco. Provavelmente a acidemia encontrada em nosso modelo, que é um dos parâmetros utilizados para o diagnóstico da deficiência em tiamina, pode contribuir também para o aumento de ROS e desenvolvimento do processo apoptótico (Skulachev, 1999; Farré & Casado, 2001). Acrescenta-se ainda que da Cunha et al. (2007) em um estudo com ratos deficientes em tiamina, observaram anormalidades mitocondriais, como formato alterado das mitocôndrias, inchaço e desintegração das cristas. Em um estudo com neurônios realizado por Chorny et al. (2007) onde foi induzida a deficiência de tiamina através do uso de antagonistas desta vitamina, observou-se um aumento do processo apoptótico nestas células.

Devido ao fato de o canal para potássio sensível ao ATP ( $K_{ATP}$ ) acoplar a atividade elétrica celular ao metabolismo energético, o modelo de deficiência em tiamina se torna interessante para o estudo deste canal, já que ocorre uma depleção de energia no organismo devido à tiamina ser cofator de várias enzimas do metabolismo. Nossos resultados sugerem que uma maior fração de corrente de potássio medida nas células deficientes em tiamina foi inibida pela glibenclamida. Este resultado demonstra que a depleção de ATP intracelular pode estar ocasionando uma maior atividade do canal (corrente de efluxo), já que o mesmo é inibido por ATP. O componente de efluxo

aumentado pode causar uma redução da duração do potencial de ação, diminuindo o influxo de cálcio, a força de contração e a demanda por ATP (Poitry et al., 2003). Este resultado pode ajudar a explicar a menor contratilidade dos cardiomiócitos encontrada nos ratos deficientes em tiamina neste estudo, ajudando também a justificar, pelo menos em parte, os resultados encontrados por Oliveira et al. 2007b que demonstraram, nesse modelo, uma menor liberação de cálcio no retículo destes ratos e propriedades antiarritmogênicas. Provavelmente, o aumento na atividade do  $K_{ATP}$  pode estar exercendo um efeito cardioprotetor nos ratos deficientes em tiamina, contribuindo também para um menor consumo de ATP para a contração celular. Essa cadeia de eventos poderia ser parte de um pré-condicionamento metabólico que pode estar atenuando a injúria de reperfusão. Através dos resultados obtidos podemos concluir que a deficiência de tiamina altera o balanço redox nos cardiomiócitos conduzindo a um aumento do superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil levando a alterações nos sistemas antioxidantes. Além disso, verificamos inúmeras alterações a nível morfológico que podem ter tido origem em processos desencadeados intracelularmente como a acidemia metabólica, desbalanço redox, bem como, menor produção de energia neste modelo resultando em disfunções contráteis e alterações na atividade do canal  $K_{ATP}$ .

## 12. Conclusões

Com base nos resultados obtidos podemos concluir:

- ♣ O ventrículo esquerdo dos ratos deficientes em tiamina apresentou um menor número de células e uma menor espessura da parede, sendo também verificado uma menor largura e comprimento dos seus cardiomiócitos.

- ♣ A capacidade contrátil é menor nos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina quando estas células são estimulados a frequências de 1Hz;

- ♣ Houve uma diminuição do consumo de  $VO_2$ , bem como, um aumento nos níveis de lactato plasmático nos ratos submetidos à dieta deficiente em tiamina;

- ♣ Os cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina apresentaram um aumento da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio;

- ♣ A atividade da enzima SOD não foi modificada, porém, houve uma diminuição da atividade da GPx e um aumento da atividade da CAT no coração de ratos deficientes em vitamina B1;

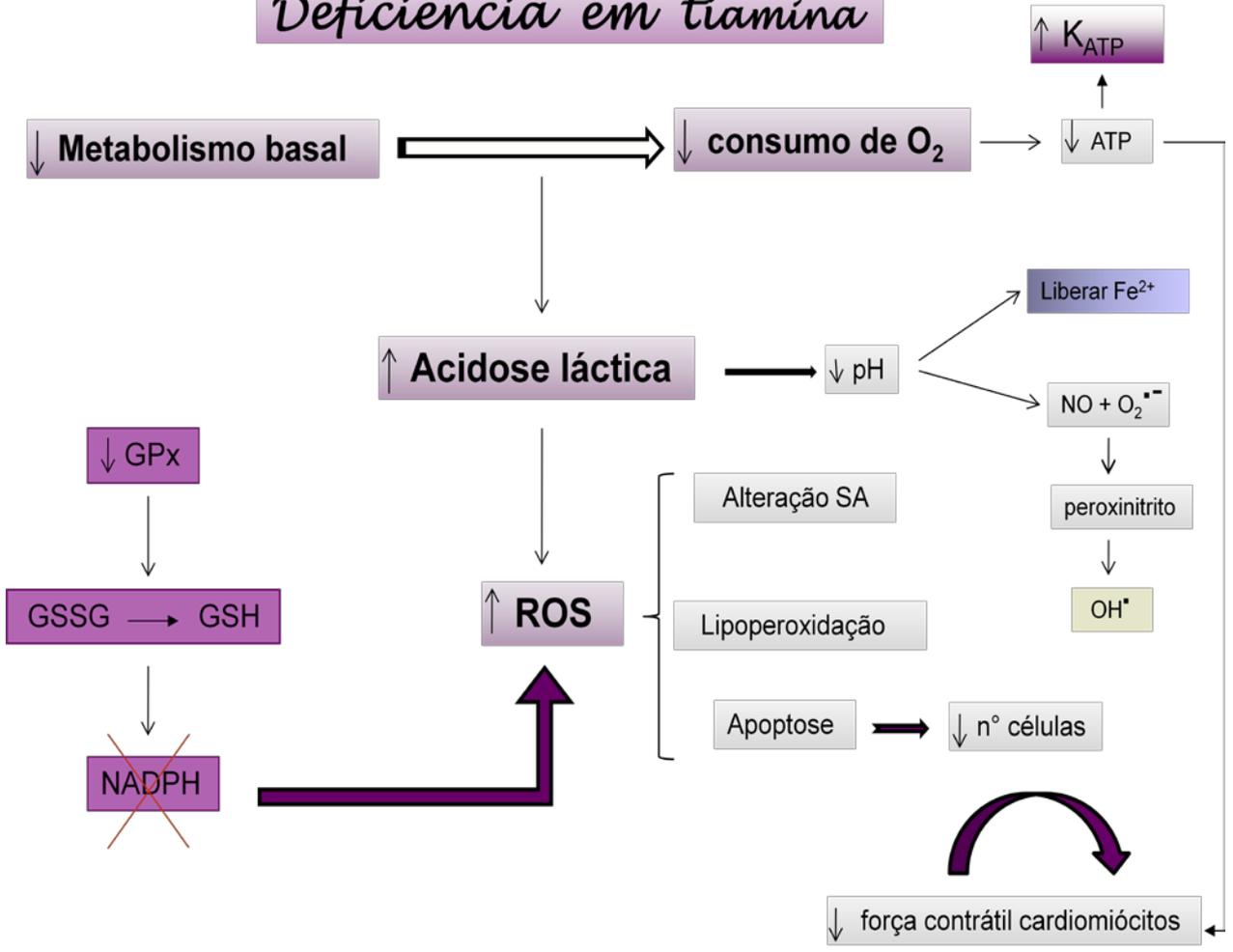
- ♣ A expressão protéica da CuZnSOD, MnSOD e CAT foi aumentada no coração de ratos deficientes em vitamina B1, sendo que, houve uma diminuição da expressão da GPx no coração desses ratos;

- ♣ Houve um aumento da lipoperoxidação no coração de ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina B1;

- ♣ Verificou-se a presença de apoptose no tecido cardíaco de ratos deficientes em vitamina B1;

- ♣ A densidade de corrente dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) foi maior nos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina;

# Deficiência em tiamina



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbate, A., Bussani, R., Sinagra, G., Barresi, E., Pivetta, A., Perkan, A., Hoke, N.H., Salloum, F.N., Kontos, M.C., Biondi-Zoccai, G.G.L., Vetrovec, G.W., Sabbadini, G., Baldi F., Silvestri, F., Kukreja, R.C., Baldi, A. Right ventricular cardiomyocyte apoptosis in patients with acute myocardial infarction of the left ventricular wall. **The American Journal of Cardiology** 102: 658-662, 2008.

Abdelwahid, E., Smith, G. Apoptosis in chronic heart failure. **International Journal of Cardiology** 114: 375, 2007.

Afanas'ev, I.B. Competition between superoxide and hydrogen peroxide signaling in heterolytic enzymatic processes. **Medical Hypotheses** 66: 1125-1128, 2006.

Ahmad, S. **Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology**, New York: Chapman & Hall, 1995.

Aldinger, E.E. Effect of thiamine deficiency on potential myocardial contractility. **Circulation Research**, 16:238-243, 1965.

Alekseev, A.E., Hodgson, D.M., Karger, A.B., Park S., Zingman, L.V., Terzic, A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 38:895-905, 2005.

Andrukhiv, A., Costa, A.D., West, I.C., Garlid, K.D. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology** 291: 2067-2074, 2006.

Anker, S.D., Rauchhaus, M. Heart failure as a metabolic problem **European Journal of Heart Failure** 1(2): 127-131, 1999.

Antunes, F., Han, D., Cadenas, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in vivo conditions. **Free Radical Biology & Medicine** 33(9): 1260-1267, 2002.

Arcos J.C., Argus M.F., Sardesai, V.M., Stacey, R.E. Effect of thiamine deficiency on the swelling, electron transport, and oxidative phosphorylation of rat heart sarcosomes. **Biochemistry** 3(12):2041-2045, 1964.

Ardehali, H., O'Rourke, B. Mitochondrial KATP channels in cell survival and death. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 39: 7-16, 2005.

Baker, K.G., Harding, A.J., Halliday, G.M., Kril, J.J., Harper, C.G. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. **Neuroscience** 91(2): 429-438, 1999.

Barc, S., Ingrand, S.S., Fauconneau, B., Page, G., Piriou, A., Barrier, L. Effect of ischemia on TBARS and lactate production in several cerebral regions of anaesthetised and awake rats. **Life Sciences** 74: 3103-3113, 2004.

Barja, G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. **Free Radical Biology & Medicine** 33 (9): 1167-1172, 2002.

Batifoulier, F., Vernya, M.A., Chanliaud, E., Remesya, C., Demigne, C. Effect of different breadmaking methods on thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread. **Journal of Cereal Science** 42: 101-108, 2005.

Bers, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature** 415:198-204, 2002.

Bichet, D., Haass, F.A., Jan, L.Y. Merging functional studies with structures of inward rectifier k<sup>+</sup> channels. **Nature Reviews Neuroscience** 4(12):957-967, 2003.

Bubber, P., Zun-Ji, K., Gibson, G.E. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. **Neurochemistry International** 45: 1021-1028, 2004.

Butterworth, R.F. Thiamin deficiency and brain disorders. **Nutritional Research Review** 16(2): 277-283, 2003.

Bykova, I.A., Solovjeva, O.N., Meshalkina, L.E., Kovina, M.V., Kochetov, G.A. One-Substrate Transketolase-Catalyzed Reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 280(3): 845-847, 2001.

Calaghan, S.C., White, E. The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch. **Progress in Biophysics & Molecular Biology** 71: 59-90, 1999.

Cappelli, V., Bottinelli, R., Polla, B., Reggiani, C. Altered contractile properties of rat cardiac muscle during experimental thiamine deficiency and food deprivation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 22(10): 1095-1106, 1990.

Carrasco, R., Morgenstern-Badarau, I., Cano, J. Two proton-one electron coupled transfer in iron and manganese superoxide dismutases: A density functional study. **Inorganica Chimica Acta** 360: 91-101, 2007.

Cazorla, O., Guennec, J. L., White, E. Length-Tension relationships of subepicardial and sub-endocardial single ventricular myocytes from rat and ferret hearts. **Journal Molecular Cellular Cardiology** 32: 735-744, 2000.

Cens T., Rousset M., Leyris J.P., Fesquet P., Charnet P. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 90: 104-117, 2006.

Chandel, N.S., Budinger, G.R.S. Serial Review: Redox signaling in immune function and cellular responses in lung injury and diseases. The cellular basis for diverse responses to oxygen. **Free Radical Biology & Medicine** 42:165-174, 2007.

Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant Defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 10: 141-152, 2001.

Cohen, E.M., Abelmann, W.H., Messer, J.V., Bing, H.L. Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental thiamine deficiency. **American Journal Physiology** 231:1390-1394, 1976.

- Cruz, J.S., Matsuda, H. Depressive effects of arenobufagin on the delayed rectifier K<sup>+</sup> current of guinea-pig cardiac myocytes. **European Journal Pharmacology** 266(3): 317-325, 1994.
- Da Cunha, S., Cunha Bastos, J., Salles, J.B., Silva, M.C., Cunha Bastos, V.L., Mandarim-de-Lacerda, C.A. Cardiac alterations in furosemide-treated thiamine-deprived rats. **Journal of Cardiac Failure** 13(9): 774-784, 2007.
- Day, B.J. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. **Drug Discovery Today** 9(13):557-566, 2004.
- De Lira, P.I.C., de Andrade, S.L.L. Beriberi epidemic in Maranhão State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública** 24(6):1202-1203, 2008.
- Dent, M.R., Das, S., Dhalla, N.S. Alterations in both death and survival signals for apoptosis in heart failure due to volume overload. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 43: 726-732, 2007.
- Díaz, A., Muñoz-Clares, R.A, Rangel, P., Valdés, V.J., Hansberg, W. Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. **Biochimie** 87: 205-214, 2005.
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failure heart. **Circulation** 101: 33-39, 2000.
- Du, J., Gebicki, J.M. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. **The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology** 36: 2334-2343, 2004.
- Édes, I.F., Czuriga, D., Csanyi, G., Chłopicki, S., Recchia, F.A., Borbely, A., Galajda, Z., Edes, I., Velden, J.V., Stienen, G.J.M., Papp, Z. Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. **American Journal of Physiology- Regulatory Integrative Comparative Physiology** 293: 20-29, 2007.
- Elinder, F., Nilsson, J., Arhem, P. On the opening of voltage-gated ion channels. **Physiology & Behavior** 92: 1-7, 2007.
- Fang, F., Wang, L., Qi, X., Yan, X., Ding, L., Zhao, D., Ni, J. Human catalytic antibodies with glutathione peroxidase activity. **Journal of Inorganic Biochemistry** 85: 301-307, 2001.
- Farré, A.L., Casado, S. Heart Failure, Redox Alterations, and Endothelial Dysfunction. **Hypertension** 38:1400-1405, 2001.
- Fellgiebel, A., Scheurich, A., Siessmeier, T., Schmidt, L.G., Bartenstein, P. Persistence of disturbed thalamic glucose metabolism in a case of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Psychiatry Research: Neuroimaging** 124: 105-112, 2003.
- Fernandes, A.S., Gaspar, J., Cabral, M. F., Caneiras, C., Guedes, R., Rueff, J., Castro, M., Costa, J., Oliveira, N. G. Macrocyclic copper(II) complexes: Superoxide scavenging

- activity, structural studies and cytotoxicity evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101: 849-858, 2007.
- Flagg, T.P., Kurata, H.T., Masia, R., Caputa, G., Magnuson, M.A., Lefer, D. J., Coetzee W.A., Nichols, C.G. Differential structure of atrial and ventricular katp: atrial katp channels require SUR1. **Circulation Research** 103:1458-1465, 2008.
- Forman, H.J. Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine** 42: 926-932, 2007.
- Fukuhara, R., Kageyama, T. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** 141: 428-436, 2005.
- Fujii, H. Electronic structure and reactivity of high-valent oxo iron porphyrins **Coordination Chemistry Reviews** 226: 51-60, 2002.
- Gabrielli, A., Caruso, L. Early recognition of acute cardiovascular beriberi by interpretation of hemodynamics. **Journal of Clinical Anesthesia** 13:230 -238, 2001.
- Garg, S., Narula, J., Chandrashekhar, Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 38: 73-79, 2005.
- Gibson, G.E., Zhang, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochemistry International** 40: 493-504, 2002.
- Giles, G.I., Tasker, K.M., Jacob, C. Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine** 31(10): 1279-1283, 2001.
- Gribble, F.M., Reimann, F. KATP channel pharmacology in the pancreas and the cardiovascular system. **International Congress Series** 1253: 279-287, 2003.
- Guerrini, I., Thomson, A.D., Gurling, H.D. The importance of alcohol misuse, malnutrition and genetic susceptibility on brain growth and plasticity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 31: 212-220, 2007.
- Hahn, J.S., Berquist, W., Alcorn, D.M., Chamberlain, L., Bass, D. Wernicke Encephalopathy and Beriberi During Total Parenteral Nutrition Attributable to Multivitamin Infusion Shortage. **Pediatrics** 101(1): 1-4, 1998.
- Harms, P.G., Ojeda, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology** 36(3): 391-392, 1974.
- Hazell A.S., Butterworth R.F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. **Alcohol & Alcoholism** 44(2): 141-147, 2009.
- Hille, B. **Ion channels of excitable membranes**. Third edition, 2001.

Homewood, J., Bond, N.W. Thiamin Deficiency and Korsakoff's Syndrome: Failure to find memory impairments following nonalcoholic Wernicke's encephalopathy. **Alcohol** 19(1):75-84, 1999.

Honda, H.M., Korge, P., Weiss, J.N. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. **Annals of the New York Academy Sciences** 1047:248-258, 2005.

Hool, L.C., Di Maria, C.A., Viola, H.M., Arthur, P.G. Role of NAD(P)H oxidase in the regulation of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel function during acute hypoxia. **Cardiovascular Research** 67: 624-635, 2005.

Ibe, W., Saraste, A., Lindemann, S., Bruder, S., Buerke, M., Darius, H., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L. Cardiomyocyte apoptosis is related to left ventricular dysfunction and remodelling in dilated cardiomyopathy, but is not affected by growth hormone treatment. **European Journal of Heart Failure** 9: 160-167, 2007.

Ikebuchi, M., Takeuchi, K., Yamane, T., Ogikubo, O., Maeda, T., Kimura, H., Ohkubo, I. Primary structure and properties of Mn-superoxide dismutase from scallop adductor muscle. **The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology** 38: 521-532, 2006.

Iribe, G., Kohl, P. Axial stretch enhances sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak and cellular  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake in guinea pig ventricular myocytes: Experiments and models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 97:298-311, 2008.

Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine** 9(6): 515-540, 1990.

Jiang, W., Han, Y., Pan, Q., Shen, T., Liu, C. Roles of exogenous divalent metals in the nucleolytic activity of Cu,Zn superoxide dismutase. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101: 667-677, 2007.

Johnson, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 133: 493-505, 2002.

Kabir, A.M., Clark, J.E., Tanno, M., Cao, X., Hothersall, J.S., Dashnyam, S., Gorog, D.A. Bellahcene, M., Shattock, M.J., Marber, M.S. Cardioprotection initiated by reactive oxygen species is dependent on activation of PKC. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology** 291: 1893-1899, 2006.

Kaneko, M., Beamish, R.E., Dhala, N.S. Depression of heart sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity by oxygen free radicals. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology** 256: 368-374, 1989.

Kehrer, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology** 149: 43-50, 2000.

King, J.F., Easton, R., Dunn, M. Acute Pernicious Beriberi. **CHEST** 61(5):512-514, 1972.

- Kira, Y., Sato, E.F., Inoue, M. Association of cu,zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 399 (1): 96-102, 2002.
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences** 32(1): 44-50, 2006.
- Klein, M., Weksler, N., Gurman, G.M. Fatal metabolic acidosis caused by thiamine deficiency. **The Journal of Emergency Medicine** 26(3): 301-303, 2004.
- Koike, H., Watanabe, H., Inukai, A., Lijima, M., Mori, k., Hattori, N., Sobue, G. Myopathy in thiamine deficiency: Analysis of a case. **Journal of the Neurological Sciences** 249: 175-179, 2006.
- Kudin, A.P., Debska-Vielhaber, G., Kunz, W.S. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 59(4): 163-168, 2005.
- Kumar, D., Jugdutt, B.I. Apoptosis and oxidants in the heart. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 142(5): 288-297, 2003.
- Kunapuli, S., Rosanio, S., Schwarz, E.R. How do cardiomyocytes die? Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. **Journal of Cardiac Failure** 12(5): 381-391, 2006.
- Landis, G.N., Tower, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of Ageing and Development** 126: 365-379, 2005.
- Lauton-Santos S., Guatimosin S., Castro C.H., Oliveira F.A., Almeida A.P., Dias-Peixoto M.F., Gomes M.A., Pessoa P., Pesquero J.L., Pesquero J.B., Bader M., Cruz J.S. Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. **Life Science** 81(10): 814-822, 2007.
- Leite, L.H., Lacerda, A.C., Balthazar, C.H., Marubayashi, U., Coimbra, C.C. Central AT(1) receptor blockade increases metabolic cost during exercise reducing mechanical efficiency and running performance in rats. **Neuropeptides** 41(3): 189-194, 2007.
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I.I., Finkel, T. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research** 97: 967-974, 2005.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farra, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193(1): 265-275, 1951.
- Luna, L.G. In: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology., McGraw Hill, New York; 1968.
- Luo, J., Xuan, Y., Gu Y., Prabhu, S.D. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force–frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 40: 64-75; 2006.

Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta** 380: 50-58, 2007.

MacCarthy, P.A., Shah, A.M. Oxidative stress and heart failure. **Coronary Artery Disease** 14(2):109-113, 2003.

Mancinelli, R., Ceccanti, M., Guiduccia, M.S., Sasso, G.F., Sebastiani, G., Attilia, M.L., Allen, J.P. Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics. **Journal of Chromatography B**, 789(2):355-363, 2003.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry** 16(10): 577-586, 2005.

Matés, J.M., Perez-Gomez, C., De castro, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry** 32 (8): 595-603, 1999.

Matés, J.M., Sanchez-Jimenez, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 32:157-170, 2000.

Matsunaga, I., Shiro, Y. Peroxide-utilizing biocatalysts: structural and functional diversity of heme-containing enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology** 8(2):127-132, 2004.

Matsuo, M., Kimura, Y., Ueda, K. KATP channel interaction with adenine nucleotides. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 38(6):907-916, 2005.

McCandless, D.W., Hanson, C., Speeg, K.V., Schenker, S. Cardiac metabolism in thiamin deficiency in rats. **The Journal of Nutrition** 100(8): 991-1002, 1970.

McConkey D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters** 99(3): 157-168, 1998.

McDonald, K.S., Wolff, M.R., Moss, R.L. Force-velocity and power-load curves in rat skinned cardiac myocytes. **Journal of Physiology** 511.2: 519-53, 1998.

Mcintyre, N., Stanley, N.N. Cardiac beriberi: two modes of presentation. **British Medical Journal** 3: 567-569, 1971.

Misawa, H., Nakata k., Matsuura J., Moriwaki Y., Kawashima k., Shimizu, T., Shirasawa T., Takahashid R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. **Neurobiology of Disease** 23: 169-177, 2006.

Molina, H., Garcia, M. Enzymatic defenses of the rat heart against lipid peroxidation. **Mechanisms of Ageing and Development** 97: 1-7, 1997.

Munir, A., Hussain, S.A., Sondhi, D., Ameh, J., Rosner, F. Wernicke's Encephalopathy in a Non-alcoholic Man: Case Report and Brief. **The Mount Sinai Journal of Medicine** 68(3): 216-218, 2001.

Murdoch C.E., Zhang M., Cave A.C., Shah A.M. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovascular Research** 71: 208- 215, 2006.

Naito, E., Ito, M., Yokota, I., Saijo, T., Ogawa, Y., Kuroda, Y. Diagnosis and molecular analysis of three male patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency. **Journal of the Neurological Sciences** 201(2): 33- 37, 2002.

Natali, A.J., Turner, D.L., Harrison, S.M., With, E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocyte. **The Journal of Experimental Biology** 204(4):1191-1199, 2001.

Nelson, D.P., Kiesow, L.A. Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). **Analytical Biochemistry** 49(2): 474-478, 1972.

Nichols, C.G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature** 440(7083): 470-476, 2006.

Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry** 43(7):1209-1214, 1997.

Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A. Extracellular superoxide dismutase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37(12): 2466-2471, 2005.  
Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95: 351-358, 1979.

Oliveira FA, Galan DT, Ribeiro AM, Cruz JD. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. **Brain Research** 1134 (1): 79-86, 2007a.

Oliveira, F.A., Guatimosim, S., Castro, C.H., Galan, D.T., Lauton-Santos, S., Ribeiro, A.M., Almeida, A.P., Cruz, J.S. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. **American Journal of Physiology: Heart Circulation Physiology** 293(1): 394-401, 2007b.

Orhan, H., Gurer-Orhan, H., Vriese, E., Vermeulen, N.P.E., Meerman, J.H.N. Application of lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers for oxidative damage in mammalian cells. A comparison with two fluorescent probes. **Toxicology in Vitro** 20: 1005-1013, 2006.

Ormerod, J.O.M., Ashrafian, H., Frenneaux, M.P. Impaired energetics in heart failure- A new therapeutic target. **Pharmacology & Therapeutics** 119: 264-274, 2008.

Otsuka, M., Gurtner, H.P. Resting potential, threshold potential, and action potential of single myocardial fibers in aneurin deficient rats. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta** 15(4): 73-75, 1957.

Oudot, A., Martin C., Busseuil, D., Vergely, C., Demaison, L., Rochette, L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. **Free Radical Biology & Medicine** 40(12): 2214-2222, 2006.

Ozawa, H., Homma, Y., Arisawa, H., Fukuuchi, F., Handa, S. Severe metabolic acidosis and heart failure due to thiamine deficiency. **Nutrition** 17(4): 351-352, 2001.

Piano, M. R., Bondmass, M., Schwertz, D.W. The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. **Heart & Lung** 27(1): 3-19.

Pires, R.G.W., Pereira, S.R.C., Oliveira-Silva, I.F., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behavioural Brain Research** 162: 11-21, 2005.

Poitry, S., van Bever, I., Coppex, F., Roatti, A., Baertschi, A.J. Differential sensitivity of atrial and ventricular K channels to ATP metabolic inhibition. **Cardiovascular Research** 57: 468-476, 2003.

Proks, P., Ashcroft, F.M. Modeling K(ATP) channel gating and its regulation. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 99(1): 1-13, 2008.

Rady, M., Jafry, S., Rivers, E. Alexander M. Characterization of systemic oxygen transport in end-stage chronic congestive heart failure. **American Heart Journal** 128 (4): 774-781, 1994.

Reimann, F., Dabrowski, M., Jones, P., Gribble, F.M., Ashcroft, F.M. Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of b-cell and cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> (KATP) channels by Mg-nucleotides. **Journal of Physiology** 547.1: 59-168, 2003.

Ren, J., Li, Q., Wu, S., Li, S., Babcock, S.A. Cardiac overexpression of antioxidant catalase attenuates aging-induced cardiomyocyte relaxation dysfunction. **Mechanisms of Ageing and Development** 128(3): 276-285, 2007.

Rindi, G, Rapuzzi, G. The action potential of cardiac ventricular fibre cells during thiamine deficiency. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Science** 51(4): 249-255, 1966.

Roepke, T.K., Abbott, G.W. Pharmacogenetics and cardiac ion channels. **Vascular Pharmacology** 44: 90 -106, 2006.

Sadek, H. A., Humphries, K.M., Szweda, P.A., Szweda, L.I., Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 406(2): 222-228, 2002.

Şahin, E., Gümüşlü, S. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 144(4): 342-347, 2007.

Sam, F., kerstetter, D.I., Pimental, D.R., Mulukutla, S., Tabae, S., Bristow, M.R., Colucci, W.S., Sawyer, D.B. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. **Journal of Cardiac Failure** 11(6): 473-480 2005.

San-qing, J., Li-jun, N., Chun-yu, D., Zhi-bin, Y., Ying-jie, Z. Effect of temperature on the activation of myocardial KATP channel in guinea pig ventricular myocytes: a pilot study by whole cell patch clamp recording. **Chinese Medical Journal** 119(20):1721-1726, 2006.

Sawyer, D.B., Colucci, W.S. Mitochondrial Oxidative Stress in Heart Failure: "Oxygen Wastage" Revisited. **Circulation Research** 86(2):119-120, 2000.

Schafer, F.Q., Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine** 30(11): 1191-1212, 2001.

Seino, S., Miki, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Progress in Biophysics & Molecular Biology** 81(2): 133-176, 2003.

Seiva, F.R., Ebaid, G.M, Castro, A.V, Okoshi, K. , Nascimento, A., Rocha, K.K, Padovani, C.R. , Cicogna, A.C., Novelli, E.L. Growth hormone and heart failure: Oxidative stress and energetic metabolism in rats. **Growth Hormone & IGF Research** 189(4): 275-283, 2008.

Sharikabad, M.N., Ostbye, K.M., Brors, O. Effect of hydrogen peroxide on reoxygenation-induced Ca<sup>2+</sup> accumulation in rat cardiomyocytes. **Free Radical Biology & Medicine** 37 (4): 531- 538, 2004.

Sheeran, F.L., Pepe, S. Energy deficiency in the failing heart: Linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757(6): 543-552, 2006.

Sheline, C.T., Wei, L. Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. **Neuroscience** 1409(1): 235-246, 2006.

Shen, X., Zheng, s., Metreveli, N.S., Epstein, P.N. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes** 55: 798-805, 2006.

Shiomi, T., Tsutsui, H., Matsusaka, H., Murakami, K., Hayashidani, S. Ikeuchi, M. Wen, J., Kubota, T., Utsumi, H., Takeshita A. Overexpression of Glutathione Peroxidase Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. **Circulation** 109: 544-549, 2004.

Singleton, C.K., Martin, P.R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Current Molecular Medicine** 1(2): 197-207, 2001.

Skulachev, V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Molecular Aspects of Medicine** 20: 139-184, 1999.

Sniekers, M., Foulon, V., Mannaerts, G.P., Van Maldergem, L., Mandel, H., Gelb, B.D., Casteels, M., Van Veldhoven, P.P. Thiamine pyrophosphate: an essential cofactor for the alpha-oxidation in mammals-implications for thiamine deficiencies? **Cellular and Molecular Life Science** 63(13): 1553-1563, 2006.

- Srivastava, S., Chandrasekar, B., Gu, Y., Luo, J., Hamid, T., Hill, B.G., Prabhu, S.D. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. **Cardiovascular Research** 74: 445-455, 2007.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., Lopaschuk, G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiology Reviews** 85:1093-1129, 2005.
- Stehbens, W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology** 75: 265-276, 2003.
- Stepuro, I.I. Thiamine and vasculopathies. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 72(15): 115-127, 2005.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **The Journal of Biological Chemistry** 277(47): 44784-44790, 2002.
- Stryer, L., Tymoczko, J.L., Berg, J.M. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, 6° edição, 2008.
- Suter, P.M., Vetter, W. Diuretics and vitamin B1: are diuretics a risk factor for thiamin malnutrition. **Nutrition Reviews** 58(10): 319-323, 2000.
- Szefer, P., Lebiezinska, A. Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. **Food Chemistry** 95:116-122, 2006.
- Szweda, P.A., Friguet, B., Szweda, L.I. **Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease**. Free Radical Biology & Medicine 33(1): 29-36, 2002.
- Takemura, G., Fujiwara, H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. **Pharmacology & Therapeutics** 104: 1-16, 2004.
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C., Delpón, E. Pharmacology of cardiac potassium channels. **Cardiovascular Research** 62: 9 -33, 2004.
- Thatte, H.S., Rhee, J.H., Zagarins, S.E., Treanor, P.R., Birjiniuk, V., Crittenden, M.D., Khuri, S.F. Acidosis-Induced Apoptosis in Human and Porcine Heart. **The Annals of Thoracic Surgery** 77(4):1376-83, 2004.
- Thomson, A.D., Marshall, E.J. The natural history and pathophysiology of wernicke's encephalopathy and korsakoff's psychosis. **Alcohol & Alcoholism** 41(2): 151-158, 2005.
- Todd, K.G., Butterworth, R.F. In Vivo Microdialysis in an Animal Model of Neurological Disease: Thiamine Deficiency (Wernicke) Encephalopathy. **Methods** 23:55-61, 2001.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 57(4): 145-155, 2003.
- Tsutsui, H., Ide, T., Hayashidani, S., Suematsu, N., Utsumi, H., Nakamura R., Egashira K., Takeshita A. Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. **Cardiovascular Research** 49(1): 103-109, 2001.

Urso, M.L., Clarkson, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189(2): 41-54, 2003.

Venetucci L.A., Trafford A.W., Eisner D. A. Increasing Ryanodine Receptor Open Probability Alone Does Not Produce Arrhythmogenic Calcium Waves Threshold Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Is Required. **Circulation Research** 100: 105-111, 2007.

Wang, L., Lopaschuk, G.D., Clanachan, A.S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced left ventricular dysfunction in isolated working rat hearts is independent of calcium accumulation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 45(6): 787-795, 2008.

Wattanapitayakul, S.K., Bauer, J.A. Oxidative pathways in cardiovascular disease. Roles, mechanisms, and therapeutic implications. **Pharmacology & Therapeutics** 89(2):187-206, 2001.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. 160(1): 1-40, 2006.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. Energy metabolism in heart failure. **The Journal Physiology (London)** 555(1):1-13, 2003.

Zangen, A., Shainberg, A. Thiamine Deficiency in Cardiac Cells in Culture. **Biochemical Pharmacology** 54(5): 575-582, 1997.

Zhao, W., Zhao, D., Yan, R., Sun, Y. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Pathology** 317(2):43-50, 2008.

Zima, A.V., Blatter, L.A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular Research** 71(2):310-321, 2006.

**ANEXO**

# 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](#)