

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

TESE DE DOUTORADO

**“ASPECTOS DA MORFOFUNCIONALIDADE CARDIOVASCULAR, VARIABILIDADE
CARDÍACA E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA”**

ROBERTA HACK MENDES

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

**“ASPECTOS DA MORFOFUNCIONALIDADE CARDIOVASCULAR, VARIABILIDADE
CARDÍACA E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA”**

ROBERTA HACK MENDES

ORIENTADORA: DRA. MARIA CLÁUDIA IRIGOYEN

CO-ORIENTADORA: DRA. KATYA VIANNA RIGATTO

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -FISILOGIA, DO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA.

PORTO ALEGRE, 2009.

***“... NÃO ME CURVARIA DIANTE DE NENHUMA AUTORIDADE POLÍTICA E DE
NENHUMA CELEBRIDADE, MAS ME CURVARIA DIANTE DE TODOS OS
PROFESSORES E ALUNOS DO MUNDO. SÃO ELES QUE PODEM MUDAR O TEATRO
SOCIAL. SÃO ATORES INSUBSTITUÍVEIS...”***

(MODIFICADO DE AUGUSTO CURY-O CÓDIGO DA INTELIGÊNCIA)

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar ao maior mestre... Deus, por me oportunizar realizar todos os encontros que contribuíram para que eu me tornasse o que sou hoje, fossem eles agradáveis ou sofríveis foram fundamentais para me acrescentar os traços da minha personalidade.

A minha orientadora Prof^a Dra Maria Cláudia Irigoyen que em sua vasta sabedoria e experiência me conduziu sempre com carinho e dedicação nesse caminho às vezes tortuoso da vida científica. Obrigada por todas as oportunidades!

A Prof^a Dra Katya Rigatto que esteve disponível para me ensinar, orientar e discutir durante todos os momentos. Muito obrigada!

A Prof^a Dra Adriane Belló-Klein que desde o início da minha vida acadêmica esteve presente, me ensinando, orientando e estimulando a continuar caminhando. Hoje, mais uma vez presente, ajudando e contribuindo para a conclusão da tese. Obrigada!

Ao Prof^o Dr. Álvaro Oliveira que sempre me incentivou e acreditou no meu trabalho, além de um grande mestre, um dos grandes amigos que fiz durante a trajetória científica. Obrigada!

Aos meus colegas do laboratório de fisiologia cardiovascular: Cristina, Mariane, Karina, Maristela, Jorge, Signorá, Ubirajara, Rafael Oliveira, Rafael Colombo, Martine, Maristela, Francisca, Bruno, Gustavo, Cristiano, Rafaela Siqueira, Paulo, e todos que passaram pelo laboratório 1 nesses últimos anos foi um prazer conviver com vocês !
Obrigada!

Ao Alex, a Maria Helena e a Jaqueline Barp amigos e colegas importantes na vida e também grandes colaboradores desse e de vários outros projetos. Muito obrigada!

Aos queridos amigos e colegas do INCOR: Georgia, Raquel Sirvente, Cristiano, Raquel Fuente, Luciana Jorge, Leandro, Edison, Vera Longo (*in memorian*) vocês merecem o meu sincero agradecimento e todo respeito, pois a colaboração todos vocês foi determinante para a realização desse trabalho.

As amigas paulistanas com quem “dividi” uma casa e muitas histórias em SP: Ivana, Tatiana e Suellen. Obrigada! Aos queridos amigos gaúchos-paulistanos dos poucos momentos de folga em SP: Eduardo Pitta, Paulinho Silva, Diego e Carolina.

A minha mãe por ser um modelo de perseverança! Obrigada!

Ao meu pai (*in memorian*) que foi o meu melhor amigo e me ensinou à importância do bem viver. Obrigada!

Ao meu querido irmão Edison (*in memorian*) por ter sido um grande incentivador para que eu fosse sempre melhor.

Ao tio Renato (*in memorian*) um dos meus maiores modelos de professor e pessoa que tive para seguir, obrigada pelo carinho e por todos os conhecimentos divididos.

Aos queridos tios Rafael e Lúcia por serem sempre um porto seguro, verdadeiros pais “reservas”. A presença de vocês sempre é e será fundamental sempre.

Ao Filipe Moreira que esteve comigo em diferentes fases dessa história e sempre com palavras ou canções que deixaram meus dias mais coloridos, me ensinando alguma coisa valiosa na simplicidade dos seus atos! Obrigada!

Aos amigos Paula Netto, Bibiana, Clarice, Fernanda, Adriana Leal, Sabrina, Tiaguinho, Ana Paula, Marília, Tadeu, Marlise, Luciana e Carina por seguirem acreditando que eu

existia e me convidando para fazerem parte de suas vidas depois de tantas ausências.

Obrigada!

As melhores amigas, colegas e chefes: Márcia, Cileide e Ingrid, vocês me ajudarem na arte de difundir conhecimento, sempre acreditando no meu trabalho e me ensinando a ser cada vez melhor. Além disso, valorizando todos os períodos fundamentais a minha formação! Muito obrigada!

A todas as minhas alunas, em especial a Gabriela e Soraia (minhas primeiras orientadas), que tiveram em alguns momentos meia professora em função de experimentos ou da tese, e compreenderam isso. Sempre minhas fontes de inspiração para continuar quando o cansaço estava dominante.

Aos colaboradores maiores desse projeto, os que deram sua vida pela ciência: os ratos.

SUMÁRIO:

Índice de Reações:	10
Índice de figuras:	11
Índice de tabelas:.....	12
lista de abreviaturas.....	14
Resumo	16
Abstract.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 HOMOCISTEÍNA:.....	20
1.1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR E HOMOCISTEÍNA	24
1.1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SINALIZAÇÃO CELULAR.....	27
2 HIPÓTESE.....	37
3 OBJETIVO GERAL	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	40
4.2. EXPERIMENTOS.....	40
4.3. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	42
4.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	45
4.4.1. INDUÇÃO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA	45
4.4.2. SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA B6	45
4.4.3 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HOMOCISTEÍNA	45
4.4.4 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL:.....	45
4.4.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	46
4.4.4.1 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL.....	46
4.4.4.2 REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL.....	48
4.4.4.3 AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO	50
4.4.4.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO INTERVALO DE PULSO E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA NO DOMÍNIO DO TEMPO E DA FREQUÊNCIA.....	51
4.5 ECODOPPLERCARDIOGRAMA: AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E FUNÇÃO CARDIACAS.....	52
4.6. MEDIDAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES.....	56
4.6.1 COLETA DE SANGUE	56
4.6.2 PREPARO DO SANGUE PARA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO:.....	56
4.6.3 PREPARO DO HOMOGENEIZADO:.....	57
4.6.4 MEDIDAS DE DANO OXIDATIVO:.....	57
4.6.5 DOSAGENS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	58
4.6.5.1 CATALASE (CAT).....	58
4.6.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	59
4.6.5.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	60
4.6.5.4 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	61

4.6.5.5 TIOREDOXINA REDUTASE (TrxR).....	61
4.6.5.6 CONCENTRAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	62
4.6.5.7 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA	62
4.6.5.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	63
4.6.5.9 ANÁLISE POR WESTERN BLOT:	63
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5. RESULTADOS.....	65
5.1.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E METÁBOLICOS	65
5.1.2 MORFOMETRIA CARDÍACA	67
5.1.3. FUNÇÃO CARDÍACA	69
5.1.4. FUNÇÃO DIASTÓLICA	70
5.1.5. DANÓ OXIDATIVO A LIPÍDIOS NO MIOCÁRDIO	71
5.1.6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MIOCÁRDIO	72
5.1.7 IMUNOCONTEÚDO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO CARDÍACO.....	73
5.1.7.1 SOD	73
5.1.7.2 CAT	75
5.1.7.3 GST.....	76
5.1.8 ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE FUNÇÃO CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO:	77
5.2 PROTOCOLO 2	80
5.2.1 AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS	80
5.2.2 PA E IP E VARIABILIDADE DA PA E DO IP	80
5.2.3 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA	81
5.2.4 VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA	82
5.2.5 SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	83
5.2.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CARBONILAS OXIDADAS	85
5.2.7 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ERITRÓCITOS	86
5.2.8 ESTUDO DE CORRELAÇÕES DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO	87
5.3 EXPERIMENTO 2: Efeito do tratamento com vitamina B6 sobre as alterações induzidas pela hiper-homocisteinemia provocada por administração crônica de Homocisteína tiolactona	88
5.3.1 PARÂMETROS METÁBOLICOS.....	88
5.3.2 MORFOMETRIA CARDÍACA	89
5.3.3 FUNÇÃO CARDÍACA	91
5.3.4 FUNÇÃO DIASTÓLICA	92
5.3.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS.....	93
5.3.5 CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO MIOCÁRDIO	94
5.3.6 IMUNOCONTEÚDO DO NRF ₂ NO MIOCÁRDIO.....	95
5.3.7. IMUNOCONTEÚDO DA GST NO MIOCÁRDIO	96
6. DISCUSSÃO.....	97
7. CONCLUSÕES.....	112

8. PERSPECTIVAS FUTURAS	113
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXO 1	124

ÍNDICE DE REAÇÕES:

Reação 1: Rota de metabolismo da homocisteína.....	22
Reação 2: (a) Reação de Fenton (b) Reação de Haber-Weiss.....	28
Reação 3: (a) Dismutação do radical superóxido da SOD; (b) Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT; (c) Redução de hidroperóxidos pela GPx e (d) regeneração da glutathione pela glutathione redutase(GR).	33
Reação 4: Exemplo de reação de redução de dissulfetos de glutathione e peróxido de hidrogênio através do sistema tiorredoxina TrxS-tiorredoxina oxidada, Trx(SH ₂)-Tiorredoxina reduzida, Tiorredoxina redutase.	34

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Sítio de dissecação para cateterização da artéria femoral.	47
Figura 2: Isolamento da artéria femoral e inserção do cáteter	47
Figura 3: Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial	49
Figura4: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.	51
Figura 5: Imunoconteúdo da SOD no miocárdio avaliado por western blot após o protocolo experimental.....	73
Figura 6: Imunoconteúdo da CAT no miocárdio avaliado por western blot.	75
Figura 7: Imunoconteúdo da GST no miocárdio avaliado por western blot.....	76
Figura 8: Correlação entre o imunoconteúdo da CuZnSOD e o IDM	77
Figura 9: Correlação entre a atividade da enzima CAT e a relação E/A	78
Figura 10: Correlação entre a lipoperoxidação.	79
Figura 11A: Valores de taquicardia reflexa nos animais.....	83
Figura 11B: Valores de Bradicardia reflexa nos animais.....	83
Figura 12: Concentração plasmática de carbonilas oxidadas ao final do protocolo experimental	85
Figura 13: Correlação entre a atividade da SOD e o componente de AF	87
Figura 14: Imunoconteúdo do Nrf2 no tecido cardíaco após o tratamento com vitamina B6.)	95
Figura 15: Imunoconteúdo da GST no tecido cardíaco avaliado por western blot após o tratamento com vitamina B6.	96
Figura 16: Concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco	94

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1: Parâmetros morfométricos e metabólicos dos diferentes grupos experimentais após o tratamento:.....	65
Tabela 2: Parâmetros ecocardiográficos de morfometria cardíaca nos diferentes grupos experimentais após tratamento:.....	67
Tabela 3: Parâmetros ecocardiográficos de função cardíaca dos grupos experimentais após tratamento:.....	69
Tabela 4: Parâmetros ecocardiográficos de função diastólica nos grupos experimentais após o tratamento:.....	70
Tabela 5: Dano oxidativo cardíaco ao final do protocolo experimental:.....	71
Tabela 6: Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio ao final do protocolo experimental:.....	72
Tabela 7: Medidas hemodinâmicas ao final do protocolo experimental:.....	80
Tabela 8: Análise da variabilidade da FC ao final do protocolo experimental:.....	81
Tabela 9: Análise da variabilidade da PAS ao final do protocolo experimental:.....	82
Tabela 10: Perfil antioxidante nos eritrócitos ao final do protocolo experimental:.....	86
Tabela 11: Dosagem de homocisteína e cisteína plasmática após o tratamento com vitamina B6.....	88
Tabela 12: Parâmetros ecocardiográficos de morfometria cardíaca após o tratamento com vitamina B6:.....	89
Tabela 13: Parâmetros ecocardiográficos de função cardíaca após o tratamento com vitamina B6:.....	91
Tabela 14: Parâmetros ecocardiográficos de função diastólica após o tratamento com vitamina B6:.....	92
Tabela 15: Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos após o tratamento com vitamina B6:.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AF: Alta frequência

BF: baixa frequência

CAT: Catalase

C β S: Cistationina beta sintase

cGMP: monofosfato de guanosina cíclico

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ECA: Enzima conversora da Angiotensina

EO: Estresse Oxidativo

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Frequência Cardíaca

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSH: Glutathione reduzida

GST: Glutathione S-Transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO \cdot : radical hidroxila

Hcy: Homocisteína

HcyT: Homocisteína Tiolactona

HDL: lipoproteínas de alta densidade

Hhe: Hiper-homocisteinemia

LPO: Lipoperoxidação

MET: grupo metionina

MMP: matriz metaloproteinases

MS: metionina sintase

MTHFR: metileno tetra-hidrofolato redutase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Nrf2: fator de transcrição nuclear 2

$O_2^{\bullet-}$: ânion superóxido

O_2 : oxigênio molecular

PA: pressão arterial

PAM: pressão arterial média

PAS: Pressão Arterial Sistólica

QL: quimiluminescência

SAH: S-adenosil homocisteína

SAM: S-adenosil metionina

SNS: Sistema nervoso simpático

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TrxR: Tioredoxina redutase

U: Unidade

VFC: variabilidade da frequência cardíaca

VPAS: variabilidade da pressão arterial sistólica

RESUMO

Com base na relevância das doenças cardiovasculares para a saúde pública mundial, buscamos entender as associações entre o metabolismo da homocisteína (Hcy) e este sistema, o estresse oxidativo (EO) e a possível influência da modulação do sistema nervoso simpático (SNS) sobre esta associação. Além disso, testamos o efeito da vitamina B6 sobre a função cardíaca e o EO. Para isso foram realizados dois experimentos: no primeiro testamos dois modelos de hiper-homocisteinemia (Hhe): o tratamento com metionina e homocisteína tiolactona em dois diferentes protocolos experimentais. No primeiro protocolo foram avaliados parâmetros morfofuncionais cardíacos e associações com o balanço redox no miocárdio. Já no segundo protocolo foi avaliada a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (VPAS) e suas associações com o estresse oxidativo (EO) nos eritrócitos. Como resultados, observamos que os dois tratamentos resultam em igual aumento na concentração plasmática de Hcy, piora na função cardíaca e aumento no EO cardíaco. Além disso, foram encontradas fortes correlações entre as variáveis que sugerem piora da função cardíaca e desbalanço redox. O segundo protocolo demonstrou redução da VFC, com aumento do componente de baixa frequência (BF), associado ao SNS, e redução da modulação do sistema nervoso parasimpático ou de alta frequência (AF), em valores normalizados. Quanto à VPAS foi demonstrado um aumento somente no componente de AF em ambos os tratamentos. Comparados ao grupo controle, a sensibilidade barorreflexa estava reduzida nos dois tratamentos (MET e HcyT), provavelmente devido ao aumento da modulação simpática vascular. Foi observado também um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos eritrócitos e redução na concentração das carbonilas. Esses resultados sugerem alteração no controle autonômico em favor da modulação simpática cardíaca e vascular, com piora na sensibilidade barorreflexa após o tratamento com HcyT. Além disso, estão associadas a uma maior mobilização das defesas enzimáticas resultando em

redução do dano oxidativo. O segundo experimento consistiu do estabelecimento da Hhe após tratamento com HcyT, seguido por adição de vitamina B6 a água de beber como proposta terapêutica. Neste experimento avaliamos a concentração de Hcy e cisteína, parâmetros morfofuncionais cardíacos, atividade das enzimas antioxidantes sistêmicas, a concentração cardíaca de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), imunoconteúdo da glutathione S-transferase (GST) e do fator de transcrição nuclear (Nrf2). O tratamento com vitamina B6 demonstrou redução na Hcy plasmática. Por outro lado, o tratamento com HcyT e vitamina B6 provocou aumento significativo da espessura da parede posterior cardíaca e da massa do ventrículo, todos corrigidos pelo peso corporal. Esses resultados sugerem uma hipertrofia ventricular compensatória. Além disso, o mesmo tratamento melhorou a função global miocárdica e a fração de ejeção. A atividade da SOD e CAT nos eritrócitos estava diminuída após o tratamento com vitamina B6, o que pode ocorrer devido às propriedades antioxidantes conhecidas da vitamina. Tanto a GST, quanto o Nrf2 apresentam aumento após o tratamento com HcyT, o que pode ser uma resposta adaptativa ao aumento de cisteína. O mesmo aumento foi observado no H_2O_2 após o tratamento com HcyT, sugerindo sinalização para o aumento do EO. A vitamina B6 possui propriedades que lhe conferem ação antioxidante, o que pode estar auxiliando no seu papel protetor no miocárdio e na condição de Hhe. Com esse trabalho, sugere-se que a Hhe seja vista de uma forma mais ampla que o simples aumento da Hcy no plasma, pois o seu metabolismo no organismo pode ter efeitos tóxicos, com repercussão na função cardíaca e modulação do SNS associados ao EO. Além disso, a vitamina B6 pode ser avaliada com proposta terapêutica isolada, pois atua reduzindo a concentração de Hcy e beneficiando o equilíbrio redox.

Palavras-chave: homocisteína, função cardíaca, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Based on the relevance of cardiovascular diseases to public health worldwide, we seek to understand its association to the homocysteine (Hcy) metabolism, the oxidative stress (OS) and the possible influence of the sympathetic nervous system (SNS) modulation. In addition, we tested the effect of vitamin B6 on cardiac function and OS. For this purpose two experiments were conducted: in the first experiment we tested two different hiperhomocysteinemia experimental models: methionine and homocysteine thiolactone, this experiment was divided into two protocols. At the first protocol to evaluate morpho-functional cardiac and associations to redox balance in the heart. Already at the other protocol was studied heart rate variability (HRV) and blood pressure (VPAS), and their associations with OS. The first experiment showed the effect of methionine (MET) and homocysteine thiolactone (HcyT) treatment on cardiac function and their associations with the OS. We found that both treatments result in equal increases in plasma Hcy, poor cardiac function and increase in cardiac OE. Furthermore, we found strong correlation between the variables that suggest worsening of cardiac function and increase in the OE. The toxicity of the thiolactone metabolite is known mainly in the nervous system, and the proposed mechanism for their deleterious effects on cardiac function is probably associated with a higher OE. The second protocol showed that HRV was reduced probably due to the increase in low-

frequency (LF), associated with the SNS, and a reduction in parasympathetic nervous system modulation or high-frequency (HF), in normalized values. The systolic blood pressure variability was demonstrated due to an increase in the HF component. Compared to the control group, baroreflex sensitivity was reduced in both treatments (MET and HcyT), probably due to the increase in sympathetic modulation. We also observed an increase in superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in erythrocytes, and also a reduced carbonyl concentration. These results suggest changes in cardiovascular autonomic control in favor to sympathetic modulation, with worsening in baroreflex sensitivity after HcyT treatment. They are also associated with greater enzymatic defenses mobilization resulting in reduced oxidative damage. The second experiment aim was study the effects of B6 treatment after Hhe, and we evaluated the Hcy and cysteine plasma concentration, the morphofunctional cardiac transcription factor of the antioxidant enzymes (Nrf2), glutathione S-transferase (GST), the hydrogen peroxide (H_2O_2) cardiac concentration and the enzymatic antioxidant activity. Vitamin B6 treatment reduced plasma homocysteine concentration. Furthermore, vitamin B6 and HcyT treatment caused a significant increase in posterior wall thickness and cardiac ventricular mass, all adjusted to body weight. These results suggest a compensatory ventricular hypertrophy. Moreover, the same treatment improved global myocardial function and ejection fraction. Both, Nrf2 and GST, have increased after HcyT treatment, which may be an adaptive response to increased cysteine. The same increase was observed in H_2O_2 after HcyT treatment, suggesting an increase in the OE. These results are confirmed by the increased SOD and CAT activity in erythrocytes. Vitamin B6 has antioxidant properties which may be aiding in its protective role in the myocardium and provided Hhe. Our results suggest that Hhe is seen in a broader than the simple increase of plasma Hcy, because their metabolism in the body can have toxic effects, with impact on cardiac function and SNS modulation associated with OE. In addition, vitamin B6 could be evaluated with therapeutic purposes by reducing the Hcy concentration and benefiting the redox balance.

Keywords: homocysteine, cardiac function, antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

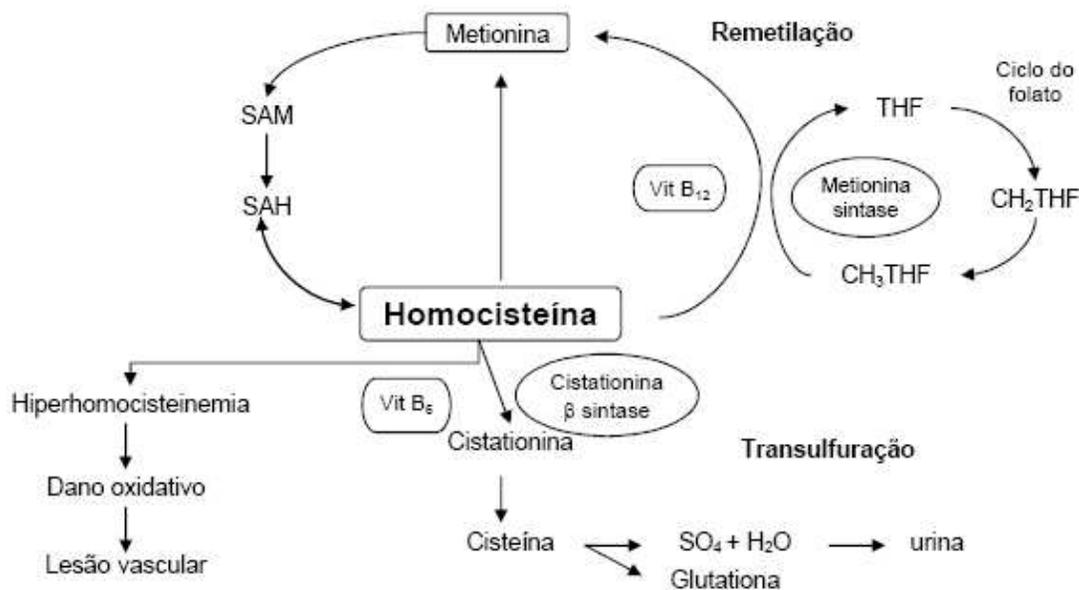
1.1 HOMOCISTEÍNA:

1.1.1. METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA:

A Homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, produto do catabolismo do aminoácido essencial metionina, obtido com base na proteína ingerida na dieta. O ciclo do metabolismo da metionina inicia com a produção da S-adenosilmetionina (SAM), catalisada pela enzima metionina adenosil transferase. Após as reações de transferências do radical metil é produzida a S-adenosil homocisteína (SAH) posteriormente hidrolisada produzindo a adenosina e Hcy (Selhub, 1999).

Após sua formação, a Hcy pode ser remetilada a metionina por duas rotas alternativas. A primeira delas é catalisada pela enzima metionina sintase (MS) dependente de dois cofatores: 1) a cianocobalamina (vitamina B₁₂) e 2) o folato. A outra rota de remetilação ocorre no fígado e utiliza a metiltransferase e a betaína como doadores do grupo metil na conversão da Hcy a metionina (Finkelstein 1990).

Outra possível alternativa metabólica para a Hcy é a rota de transsulfuração, na qual a Hcy é condensada com a serina resultando ao final da rota na formação de glutathiona (GSH). Essa rota é catalisada pela enzima cistationina beta sintase (CβS) e requer piridoxal 5 fosfato (vitamina B₆) como cofator (Figura 1). A transsulfuração é um processo irreversível que ocorre apenas no fígado, nos rins, no pâncreas e no intestino delgado (Brosnan, 2004). Essa rota metabólica contribui efetivamente para manutenção do “pool” intracelular de GSH, que participa da regulação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) (Dimitrova e cols., 2002; Andersson e cols., 2000).



Reação 1: Rota de metabolismo da homocisteína. Adaptado de Jacobsen, 1998.

O metabolismo da Hcy é determinado por diversos fatores, como por exemplo, os nutricionais (deficiências de vitaminas- B₆, B₁₂ e ácido fólico- e/ou aumentada ingestão protéica), fatores fisiológicos (idade, sexo e função renal, entre outros) e o uso de medicamentos (Perry 1999). A Hcy é encontrada no plasma predominantemente na forma oxidada (98-99%), e 80-90% desse percentual circula ligada a proteínas (Papatheodorou, 2007).

De acordo com a definição da *American Heart Association* (Maron, 2008) a concentração plasmática de Hcy considerada dentro da normalidade varia entre 5-15 μmol/L. Entretanto, 5-7% da população mundial apresenta hiperhomocisteinemia (Hhe) moderada, com concentração plasmática oscilando entre 15-25 μmol/L (Wierzbicki, 2007). Além disso, em casos específicos, a presença de

mutações genéticas na C β S pode estar associada com concentrações plasmáticas de Hcy maiores que 100 μ mol/L, quadro esse definido como homocistinúria.

A homocistinúria pertence a um grupo de distúrbios denominados erros inatos do metabolismo, que podem ser definidos como distúrbios bioquímicos determinados geneticamente na estrutura e/ou função das moléculas protéicas (Saínez e cols, 2002). A homocistinúria tem sido detectada com uma freqüência de 1:200 000 a 1: 335 000, ocorre devido a um defeito na enzima C β S que resulta no acúmulo de Hcy e metionina nos tecidos e no plasma, além de excreção urinária de Hcy, com redução na concentração plasmática de cisteína (Mudd, Levy, Kraus 2001). As manifestações clínicas da doença incluem principalmente quatro sistemas: ocular, vascular, nervoso central e ósseo. Os pacientes não- tratados com homocistinúria podem desenvolver osteoporose até o fim da segunda década de vida (Mudd e cols., 1985).

Nesses indivíduos, portadores de Hhe por deficiência genética das enzimas C β S ou MTHFR, podem ser encontrados também aumento significativo nas concentrações plasmáticas de homocisteína tiolactona (HcyT). Evidências experimentais sugerem que a forma tiolactona é a mais perigosa forma metabólica da Hcy por provocar a incorporação da Hcy ao metionil – t- RNA em lugar da metionina. Sendo assim, HcyT provoca modificações na estrutura química das proteínas, como reações de troca de dissulfetos com resíduos de cisteína (Jakubowski, 2007). Uma das conseqüências patofisiológicas dessa modificação é o estresse de retículo (ER), processo que resultada em aumento de apoptose celular e da expressão das proteínas chaperonas (Lentz 2005)

A HcyT é hidrolisada a Hcy no organismo por uma enzima do tipo estearase, cálcio-dependente que circula no plasma associada às lipoproteínas de alta densidade (HDL), essa enzima é denominada paraoxanase. O mecanismo proposto para a ação da enzima é a proteção das proteínas contra as modificações e danos causados pela HcyT ocorre pela capacidade antioxidante da enzima (Kerkeni, 2006).

O estudo do metabolismo da Hcy é realizado com a utilização de modelos experimentais diversos. Dentre os modelos desenvolvidos, as modificações genéticas vêm sendo utilizadas na tentativa de suprir as limitações dos modelos envolvendo as alterações nutricionais. No entanto, animais *Knockouts* para os genes C β S, metileno tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) e MS apresentam o aumento desejado na concentração da Hcy plasmática, porém tem uma sobrevivência diminuída devido aos efeitos colaterais indesejados associados a outros metabólitos da Hcy (Dayal & Lentz, 2008). Já modelos que utilizam Hcy ou metabólitos da Hcy oferecem a possibilidade de avaliar com o tratamento crônico seus efeitos tóxicos e o seu metabolismo no organismo.

Como exemplo de modelo dietético, podemos citar a suplementação de L-metionina ou D, L-HcyT, ou ainda homocistina. O uso de sobrecarga de metionina como modelo dietético de Hhe tem como objetivo principal avaliar a capacidade do organismo em realizar o catabolismo da Hcy (Yen, 2002 & Bonaventura, 2002).

1.1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR E HOMOCISTEÍNA

A Hhe é associada às doenças cardiovasculares e ateroscleróticas, principalmente por sua ação sobre os vasos e endotélio. Entretanto ainda é

amplamente discutido na literatura científica se o aumento da Hcy pode ser definido como fator de risco modificável ou é apenas um marcador de risco cardiovascular (Potter, 2008; Moat, 2008).

Os primeiros estudos correlacionando a Hcy com aterosclerose são de McCully, 1969, quando foi demonstrada aterosclerose precoce na autópsia de crianças com concentrações plasmáticas de Hcy elevadas e homocistinúria (McCully, 1969). A teoria de McCully foi pela primeira vez comprovada na prática clínica por Wilcken e Wilcken em 1976, que compararam concentrações de Hcy em pacientes com doença vascular aterosclerótica com indivíduos controles (Wilcken & Wilcken, 1976).

Posteriormente, concentrações elevadas de Hcy foram encontradas em 30-40% dos pacientes com doença arterial coronariana (Nygard e cols., 1997). O acúmulo de Hcy e o desenvolvimento das doenças vasculares parece relacionado ao metabolismo de oxidação da LDL, proliferação das células musculares lisas, ativação de plaquetas e fatores de coagulação, repercutindo na disfunção endotelial. O mecanismo proposto para tal fato seria a ausência da expressão da enzima CBS e assim a Hcy não seria catabolizada e o seu acúmulo irá ativar a proteína C e o fator de coagulação V (Karolczak, 2008).

Por outro lado, existem interações entre o metabolismo do colesterol e o da Hcy. O consumo aumentado de ácidos graxos saturados tem como consequência a produção de fosfatidilcolina que tem como um de seus produtos três moléculas de SAH que serão hidrolisadas a Hcy. Os alimentos fontes de ácidos graxos saturados são ricos em colesterol, porém também são ricos em metionina (Obeid

e cols., 2009). Ainda vale a pena ressaltar que o aumento de 5 $\mu\text{mol/L}$ de Hcy equivale à elevação de risco cardiovascular provocada pelo aumento de 20 mg/dL de aumento na concentração de colesterol total (Antoniades e cols. 2009).

A pressão arterial (PA), principalmente a sistólica, tem sido relacionada a Hhe, no entanto os resultados ainda são controversos. Resstel e cols. 2008 mostraram aumento da PA e da FC, além de aumento na resposta barorreflexa em ratos tratados com HcyT por 15 dias. Em contraste, existem evidências opostas obtidas em estudo experimental no qual animais espontaneamente hipertensos (SHR) receberam dieta com metionina e apresentaram redução da PA. Essa redução foi atribuída ao aumento na produção de GSH que parece ter sido estimulado pelo aumento do estresse oxidativo hepático existente nesses animais (Robin, 2004).

Um dos mecanismos propostos para o aumento da pressão arterial durante Hhe é que com o crescimento das células musculares lisas do endotélio, haveria inibição dos fatores reguladores do endotélio provocando aumento da resistência periférica e consequente aumento da PA (Robin e cols., 2003).

Sugere-se ainda a existência de relação entre o controle neural da função cardíaca e a Hhe. É importante lembrar o papel do controle neural da função cardíaca exercido sobre o coração por meio da integração entre o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (Montano e cols., 2009).

A Hhe tem sido relacionada também a efeitos diretos no miocárdio, entretanto o mecanismo para tal relação ainda não é totalmente claro. Evidências sugerem que animais geneticamente hipertensos com Hhe apresentam fibrose do

miocárdio e disfunção diastólica. Em animais normotensos com Hhe resultados semelhantes são encontrados com adição de remodelamento cardíaco (Devi e cols. 2006; Joseph e cols., 2003).

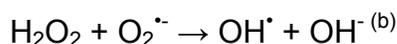
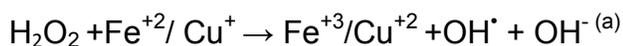
Diversos estudos epidemiológicos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da redução da concentração da Hcy sobre o sistema cardiovascular. O primeiro deles, o denominado *VISP (Vitamin Intervention for Stroke Prevention)* observou que pacientes de ambos os sexos, com acidente vascular cerebral recente, recebendo tratamento com ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ em doses altas e baixas não apresentaram nenhum tipo de melhora vascular com a redução da Hcy (Toole, 2004). Os dois estudos seguintes *NORVIT (Norwegian Vitamin)* e *HOPE2 (Heart Outcomes Prevention Evaluation 2)* evidenciaram que há um efeito pequeno na suplementação vitamínica sobre os eventos cardiovasculares e/ou infarto do miocárdio, podendo ser benéfico para prevenção de acidente vascular cerebral. No entanto, em todos os estudos é importante destacar que se tratou de prevenção secundária, ou seja, os pacientes já apresentavam Hhe moderada (Wierzbicki, 2007; Maron & Loscalzo, 2008).

Os principais mecanismos propostos para a associação entre Hhe e doenças cardiovasculares são: trombose, estresse oxidativo, apoptose e proliferação celular (Maron & Loscalzo, 2008)

1.1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SINALIZAÇÃO CELULAR

A geração das espécies reativas de oxigênio (EROS) ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais se pode citar a respiração

celular acoplada à fosforilação oxidativa para formação de ATP na mitocôndria. Existe, porém um sistema enzimático redutor que impede a formação das EROS: o sistema Citocromo C oxidase. Esse é o sistema redutor mais eficiente do organismo, pois promove a redução do oxigênio à água em apenas uma etapa, quando o O_2 recebe quatro elétrons de uma só vez sem a formação de EROS. Cerca de 95% do oxigênio (O_2) que o organismo necessita para a vida é reduzido à água pelo sistema citocromo oxidase. Porém os 5% restantes de O_2 são reduzidos de forma monovalente por outros sistemas não-enzimáticos. Nesse caso, o O_2 tende a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente deletérios como visto na figura 3 (Castro e cols., 1990). As principais EROS são: ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A reação do H_2O_2 com o íon ferroso ou cúprico é chamada reação de Fenton, levando a produção do radical hidroxil. O radical OH^{\bullet} também pode ser formado da reação do $O_2^{\bullet-}$ com H_2O_2 em presença de íons divalentes de transição, reação esta descrita por Haber-Weiss.



Reação 2: (a) Reação de Fenton (b) Reação de Haber-Weiss

Conceitualmente, radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell & Gutteridge, 1999). Ainda deve ser relatado o estado excitado do

oxigênio denominado estado “singlet” do oxigênio que também pode causar danos à célula (Halliwell, 2000).

A toxicidade do estresse oxidativo sobre as células pode se dar de diferentes maneiras: por lipoperoxidação das membranas celulares ou intracelulares, por oxidação de proteínas, por dano ao DNA e por inativação enzimática.

Recentemente, no entanto, tem se tornado evidente que o estresse oxidativo e as EROS possam atuar de forma altamente específica na modulação de vias de sinalização intracelular na determinação do fenótipo resultante dos efeitos tóxicos do oxigênio. Esses efeitos são de grande relevância não somente na insuficiência cardíaca, mas nos eventos precedentes envolvidos no remodelamento ventricular (Seddon e cols., 2007).

Paradoxalmente, apesar das EROS serem predominantemente associadas ao dano celular, tem um papel fisiológico maior em diferentes aspectos da sinalização e regulação intracelular. Mittal & Murard (1977) proveram as primeiras evidências sugerindo efeitos biológicos favoráveis mediados pelas EROS. Em seus estudos relataram a ativação da guanilato ciclase e formação do segundo mensageiro cGMP, sendo estimulada por meio do ânion superóxido pelo seu derivado, o radical hidroxil. Efeitos similares também foram encontrados para o derivado peróxido de hidrogênio (White e cols., 1976; Mittal & Murad, 1977). Diferentes tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos, têm se mostrado capazes de produzir EROS incluindo radicais livres como o ânion superóxido, e radical

hidroxil e compostos como peróxido de hidrogênio que pode ser convertido a radicais, participando tanto de processos fisiológicos quanto patológicos. O ânion superóxido é originado de forma intracelular pela NADP(H) e xantina oxidase, desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase e cadeia de transporte de elétrons, dando origem ao peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) e este, por sua vez, ao radical hidroxil pela reação de Fenton.

Diante as situações onde o estresse esta estimulado, recentemente foi proposto que fatores de transcrição responsivos a estimulação do estresse podem estar presentes. O sistema Nrf2/Keap1, um desses fatores, promotor dos genes que codificam para a fase II da detoxificação das enzimas antioxidantes (Umemura e cols, 2008). As duas proteínas (Nrf2/Keap) estão associadas no citoplasma para facilitar o *turnover* do Nrf2 (Zhang and Hannink, 2003). Após a oxidação do *Keap 1*, a associação se rompe e o Nrf2 vai para o núcleo regulando a transcrição dos genes das enzimas antioxidantes (Wakabayashi e cols., 2004 ; Kim e cols.,2003). O aumento do fator de transcrição Nrf2 tem sido considerado um marcador farmacológico da redução do dano oxidativo. A expressão do Nrf2 induz a expressão de enzimas citoprotetoras antioxidantes e detoxificadoras, tais como as glutationas, tiorredoxinas e peroxirredoxinas (Cuadrado e cols. 2009)

1.1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com aquelas do substrato passível de ser oxidado, retarda ou evita de forma significativa a oxidação desse substrato (Halliwell, 1992).

Os antioxidantes atuam prevenindo a formação dessas espécies reativas ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (Repetto & Llesuy, 2002). Essas substâncias minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular, além de estarem estrategicamente situadas nas organelas celulares para que assim possam proteger a célula.

As defesas antioxidantes compreendem: 1) os agentes catalisadores da remoção das EROS, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases; 2) proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons ferro e cobre) ou substâncias como as transferrinas e hepatoglobinas; 3) proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como as proteínas de choque térmico; e 4) substâncias de baixo peso molecular que combatem as EROS e as espécies ativas de nitrogênio, como a glutatona, α -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros. Alguns antioxidantes de baixo peso molecular provêm da dieta, especialmente o ácido ascórbico e o α -tocoferol. Existe aí uma relação íntima entre nutrição e defesa antioxidante.

A importância da atividade antioxidante na efetividade em neutralizar o EO depende de qual espécie ativa foi gerada, como é gerada, onde é gerada e qual o alvo de dano que é medido (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular e possivelmente em diferentes células do mesmo tecido. Fluidos extracelulares têm

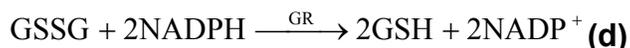
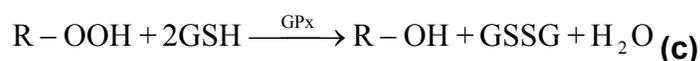
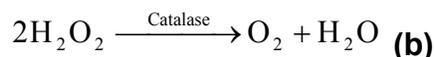
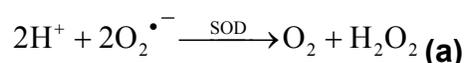
diferentes mecanismos protetores comparados aos intracelulares (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Uma substância antioxidante que na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação age formando um composto menos reativo é chamado de “*scavenger*”. Se a substância antioxidante absorver energia de excitação dos radicais neutralizando-os, é chamada de “*quencher*” (Sies, 1991; Halliwell, 1992). Habitualmente, o sistema antioxidante é dividido em sistema enzimático e não-enzimático.

Entre as defesas enzimáticas encontram-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Repetto & Llesuy, 2002; Sies, 1994). Essas enzimas evitam o acúmulo de radical superóxido e H_2O_2 para que não haja produção do radical hidroxil, que é altamente reativo e para o qual não existe um sistema enzimático de defesa (Castro e cols., 1990).

A superóxido dismutase, nas suas diferentes isoformas, eficazmente dismuta dois íons superóxido formando H_2O_2 e oxigênio (figura 4). Essa reação pode ocorrer em pH fisiológico, porém, na presença de SOD, a velocidade é 10^4 vezes maior (Halliwell & Gutteridge, 1999). A catalase é uma enzima presente em todos os tipos de células de mamíferos e altamente específica, pois possui atividade apenas contra peróxidos de hidrogênio de etila e metila (CHANCE e cols., 1979). A glutathiona peroxidase (GPx), a mais importante das enzimas peroxidases reage com uma grande variedade de peróxidos, principalmente H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos. Para redução dos peróxidos, utiliza o grupamento sulfidril da glutathiona reduzida, que pode ser regenerada pela interação da forma

oxidada com NADPH por meio da glutathione redutase (GR). Os grupamentos sulfidril doam hidrogênios formando uma ligação dissulfeto que pode transformar a molécula do peróxido em álcool ou, no caso do H_2O_2 , em água, figura 6 (Del Maestro, 1980; Halliwell & Gutteridge, 1999).

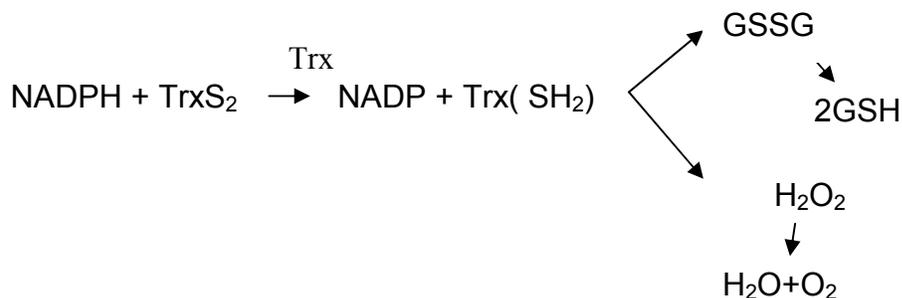


Reação 3: (a) Dismutação do radical superóxido da SOD; (b) Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT; (c) Redução de hidroperóxidos pela GPx e (d) regeneração da glutathione pela glutathione redutase (GR).

Outra classe de enzimas com importante papel fisiológico na detoxificação são as glutathione S- transferases (GSTs). Essas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos ativos como: herbicidas, pesticidas e xenobióticos (Habig, 1974)

Mais recentemente foi descrito outro sistema enzimático importante na defesa antioxidante, o sistema tioredoxina. As tioredoxinas doam equivalentes redutores para proteínas, dissulfetos de glutathione, peróxido de hidrogênio, entre

outros. Tornam-se oxidadas e são reduzidas pela tiorredoxina redutase (TrxR) (Nordberg & Arner, 2001).



Reação 4: Exemplo de reação de redução de dissulfetos de glutathiona e peróxido de hidrogênio através do sistema tiorredoxina TrxS-tiorredoxina oxidada, Trx(SH₂)- Tiorredoxina reduzida, Tiorredoxina redutase (adaptado Kuntz, 2007).

Em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de EROS, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes pró-oxidantes. Nessa situação, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo com potenciais danos (Halliwell, 1992 & Barp, 2002).

Dentro do sistema não-enzimático de defesa estão os antioxidantes lipofílicos, como os tocoferóis, carotenóides, bioflavonóides, e os antioxidantes hidrofílicos, como o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathiona e outros.

A vitamina E - α -tocoferol, é o principal antioxidante lipossolúvel responsável pela proteção dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares contra o ataque das ERO. Por ser lipossolúvel, a vitamina E aloja-se nas membranas celulares e nas lipoproteínas de baixa densidade. A perda de um elétron pela vitamina E transforma-a em radical livre – tocoferil, que reage com a

vitamina C (ascorbato), regenerando-se à tocoferol. Por ser hidrossolúvel o ascorbato transformado em ascorbil pela reação com o tocoferil pode ser facilmente eliminado pelo organismo ou pode também ser regenerado a ascorbato utilizando GSH e NADPH. Por esse feito cooperativo com a vitamina E, protegendo as membranas celulares da toxicidade do oxigênio, aconselha-se que as duas vitaminas sejam ingeridas conjuntamente.

A glutathiona, além de ser um importante antioxidante não-enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a GPx e a GST. Sua ação antioxidante se deve à presença de um grupamento sulfidrílica, que atua como doador de elétrons (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.1.5 HOMOCISTEÍNA E ESTRESSE OXIDATIVO

A participação do EO como mecanismo de lesão durante a Hhe em animais é evidenciada em modelos farmacológicos e genéticos (Lentz 2005). A Hcy pode causar EO pela inibição da expressão das enzimas antioxidantes ou pela produção aumentada de compostos citotóxicos durante a Hhe (Lubos, 2007).

O processo da auto-oxidação de Hcy para homocistina, assim como a formação da HcyT também participa da geração de ERO como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), que irão resultar no aumento da lipoperoxidação (Lubos, 2007) e favorecer a disfunção endotelial.

Além disso, o NO que é um potente vasodilatador produzido pela NO sintase em condições normais tem sua biodisponibilidade modificada quando há Hcy em excesso no plasma. Dessa forma, pode ocorrer maior produção de peroxinitrito, pela reação de NO com $O_2^{\cdot -}$ prejudicando o relaxamento dos vasos (Vathsala,

2007; Zou, 2005). Um dos mecanismos propostos para a redução do NO é a relação diretamente proporcional entre a Hhe e o acúmulo da dimetilarginina assimétrica (DMAA), um inibidor endógeno da NO sintase. O aumento da DMAA durante a Hhe pode ocorrer por aumento da SAM, incapacidade de excreção renal DMAA ou redução da atividade da enzima responsável pelo seu metabolismo (Papatheodorou, 2007; Lentz, 2005).

Por outro lado, a Hcy pode exercer efeitos específicos nas células endoteliais, dentre eles a geração de peróxido de hidrogênio quando combinada ao cobre (Perna e cols, 2003).

2 HIPÓTESE

H₁: A Hhe moderada tem efeito no metabolismo da Hcy *per se*, que por sua vez modifica a função cardíaca e o balanço oxidativo do tecido cardíaco;

H₂: Os diferentes modelos experimentais de Hhe moderada provocam alterações no metabolismo da Hcy, que modulam o controle autonômico da frequência cardíaca e da pressão arterial por meio de alterações no estresse oxidativo sistêmico;

H₃: O tratamento com vitamina B6 é eficiente para melhorar a Hhe, a disfunção cardíaca e modular o estresse oxidativo no modelo de Hhe por HcyT.

3 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos da hiper-homocisteinemia induzida com dois diferentes modelos experimentais em variáveis hemodinâmicas, morfofuncionais cardíacas e oxidativas. Em adição avaliar o efeito do tratamento com vitamina B₆ sobre algumas dessas variáveis.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Função cardíaca e associações com o balanço redox no miocárdio :
 - a) Verificar variáveis morfofuncionais através de ecocardiografia;
 - b) Analisar variáveis bioquímicas: homocisteína e cisteína plasmáticas, medidas de lipoperoxidação e perfil antioxidante enzimático miocárdico, colesterol;
 - c) Estudar variáveis moleculares: imunoc concentração de enzimas antioxidantes;
- 2) Variabilidade Cardiovascular e associações com o equilíbrio redox nos eritrócitos :
 - a) Analisar as medidas hemodinâmicas;
 - b) Estudar a variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial;
 - c) Avaliar o perfil antioxidante e dano oxidativo as proteínas sistêmico;
- 3) Efeitos na função cardíaca e perfil oxidativo do tratamento com vitamina B6 na hiperhomocisteinemia experimental:
 - a) Analisar a concentração de Hcy e cisteína plasmática total
 - b) Estudar as alterações morfofuncionais cardíacas;
 - c) Analisar o perfil das enzimas antioxidantes sistêmico;
 - d) Verificar a concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco;
 - e) Avaliar as variáveis moleculares, pela quantificação do imunoc conteúdo de Nrf2 e da GST.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistars machos, pesando entre 250 e 300g fornecidos pelo biotério da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto do Coração (InCor)-USP, alojados em caixas plásticas (4-5 animais por caixa) em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 h invertido (luzes acendendo às 06h). Receberam, durante todo o período, água e ração para ratos padrão “*ad libitum*”.

4.2. EXPERIMENTOS

Experimento1: Efeitos da hiper-homocisteinemia induzida por dois diferentes tratamentos sobre variáveis hemodinâmicas, morfofuncionais cardíacas, bioquímicas e moleculares.

Grupos e seqüência experimental

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, com n=18.

- 1) Controle (CO)
- 2) Metionina (MET)
- 3) Homocisteína tiolactona (HcyT)

Os grupos experimentais receberam tratamento com metionina ou D-L HcyT por sonda intragástrica (0.1g/kg diluída em 2,5ml de água) por 8 semanas a partir dos 60 dias de vida.

Protocolo1: Os animais foram submetidos ao ecocardiograma no 57° dia de tratamento. Foram depois mortos para coleta de tecidos e material para medida bioquímicas e moleculares.

Protocolo 2: No 57° dia de protocolo experimental foi realizada a cirurgia de cateterização e 24 hs depois, no animal acordado, o registro da PA e da FC, teste do barorrreflexo. A seguir os animais foram mortos para coleta de material para medidas bioquímicas.

Experimento2: Efeito do tratamento com vitamina B6 sobre as alterações induzidas pela homocisteinemia provocada por administração crônica de Homocisteína tiolactona.

Os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais, com n=15.

1) Controle+B6 (COB6)

2) HcyT

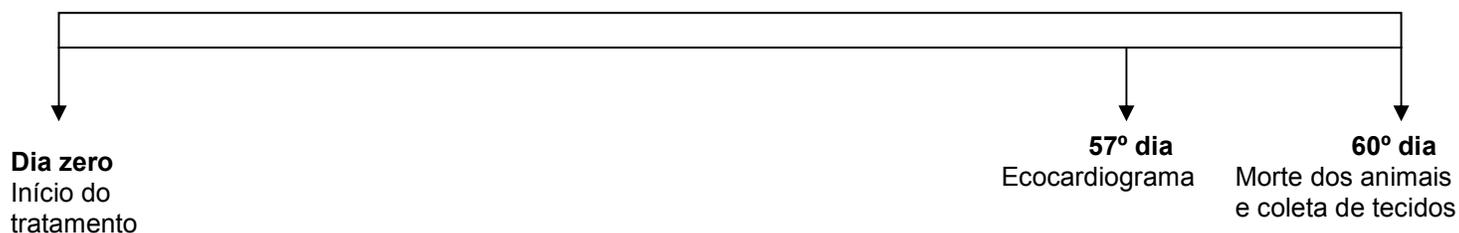
3) Homocisteína tiolactona+B6 (HcyTB6)

Os animais receberam D-L-Homocisteína Thiolactona (Acros) (0,1g/ Kg diluída em 2,5 ml de água destilada) ou água com dose calculada de acordo com peso corporal por sonda intragástrica durante 8 semanas. Nas duas últimas semanas receberam vitamina B6 na água de beber (60mg/kg). Os animais foram submetidos ao ecocardiograma final de 8 semanas do protocolo experimental

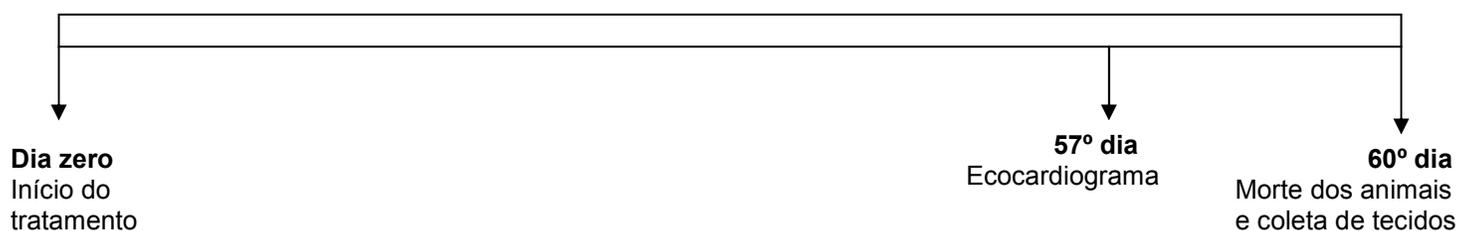
4.3. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO 1- Protocolo 1

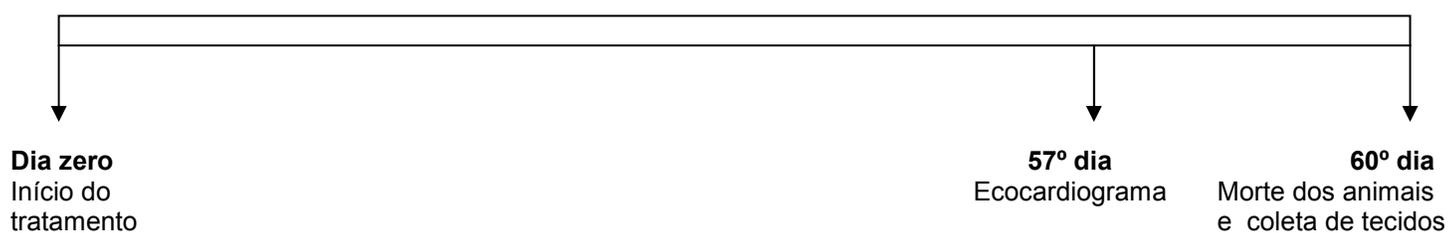
CO= água/ sonda intragástrica

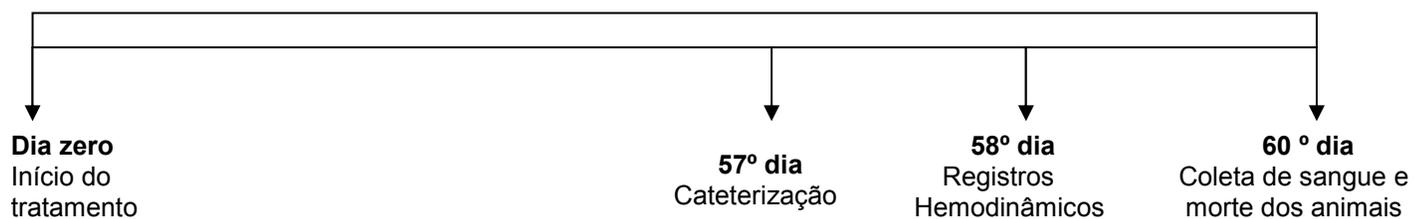
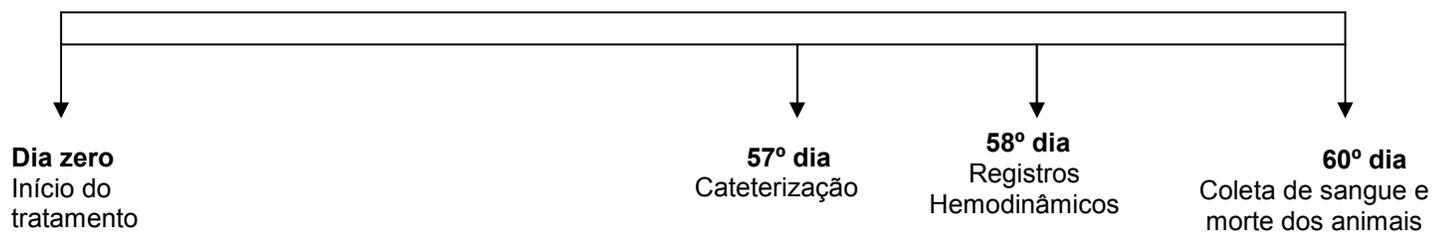
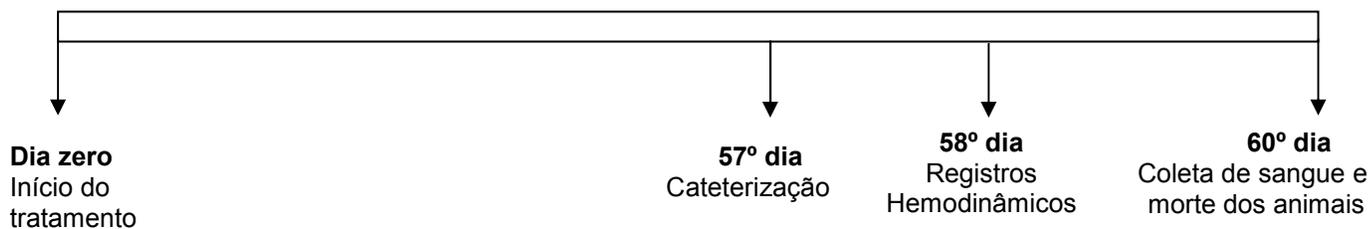


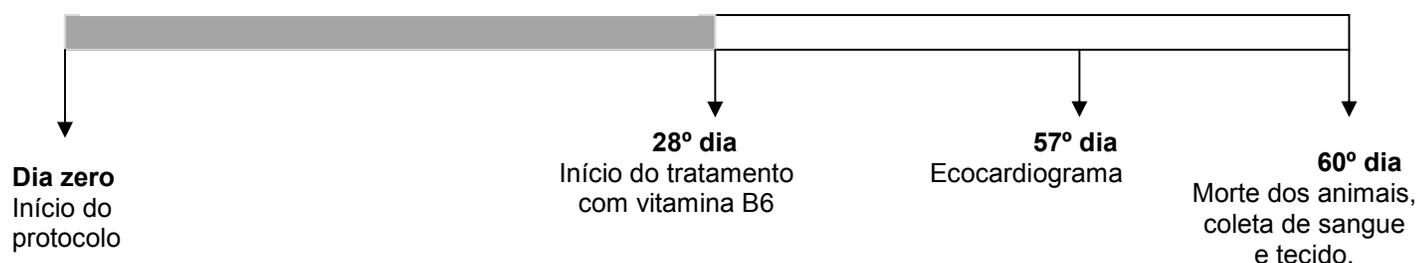
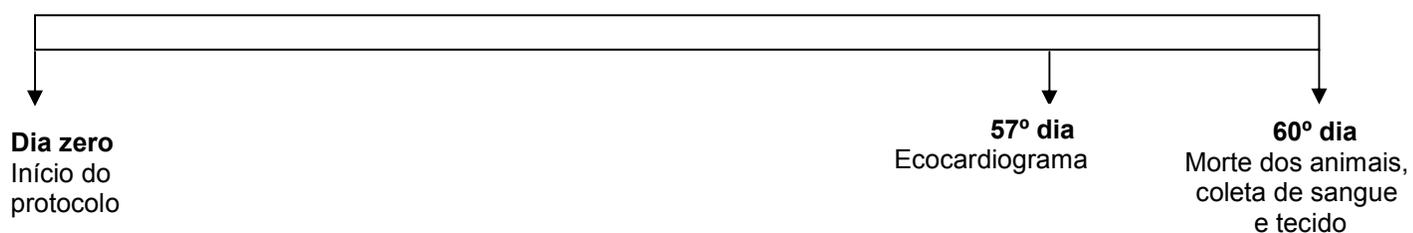
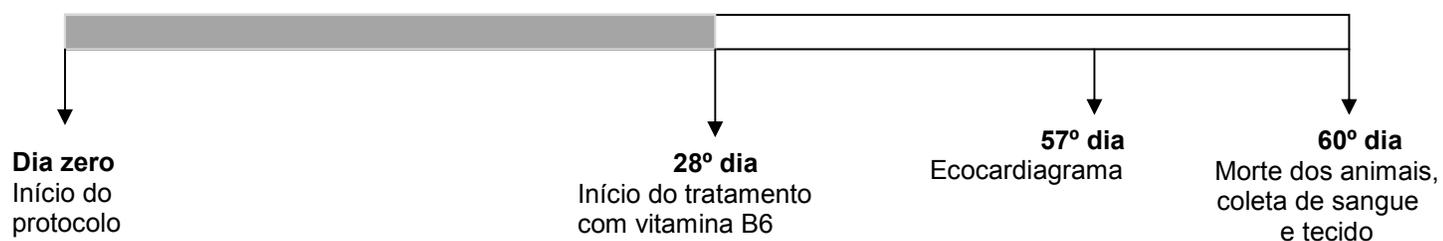
MET= 0.1g/kg/ sonda intragástrica



HcyT= 0.1g/kg/sonda intragástrica



Protocolo 2**CO= água/ sonda intragástrica****MET= 0.1g/kg/ sonda intragástrica****HcyT= 0.1g/kg/ sonda intragástrica**

EXPERIMENTO 2**COB6 = água/ sonda intragástrica****HcyT = 0.1g/kg/ sonda intragástrica****HcyTB6= 0.1g/kg/ sonda intragástrica**

4.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.4.1. INDUÇÃO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA

Os animais receberam administração D, L hidrocloreto de homocisteína thiolactona (Acros, Organics) (100 mg/kg diluída em 2,5 ml de água) ou L- metionina (100 mg diluída em 2,5 ml de água) por única gavagem diária ao final do dia (entre 17-18 horas) por 8 semanas.

4.4.2. SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA B6

Foi oferecido aos animais fosfato de piridoxina em pó diluído na água de beber dos animais por 30 dias na dose de 60 mg/kg/dia com consumo livre, conforme demonstrado na seqüência experimental.

4.4.3 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HOMOCISTEÍNA

Após trinta dias do início do tratamento foram realizadas dosagens de concentração de Hcy e cisteína total no plasma dos animais de sangue previamente coletado em tubos heparinizados. O plasma foi obtido após centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada. As análises foram realizadas por HPLC com detecção de fluorescência conforme técnica descrita por De Oliveira e cols, 2002. No experimento 2, a dosagem foi realizada apenas ao final do experimento, após 60 dias de tratamento.

4.4.4 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL:

Ao término do protocolo experimental foi realizada dosagem de colesterol total plasmático por meio método colorimétrico utilizando *kit Labtest*. As análises foram realizadas com espectrofotômetro conforme metodologia específica para o uso do kit.

4.4.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

4.4.4.1 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

No dia anterior aos registros diretos de pressão arterial e frequência cardíaca, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50mg/Kg, i.p., Ketalar, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, i.p., Rompum, Bayer) e colocados em decúbito dorsal. Foi realizada uma pequena incisão no terço inferior da região inguinal anterior e implantada uma cânula na artéria femoral em direção a aorta abdominal, para registro direto da pressão arterial e outra na veia femoral, para administração das drogas (Figuras 4 e 5). Após a correta e firme implantação das cânulas na artéria e veia femoral, elas foram exteriorizadas no dorso do animal na região cervical e fixadas com fio de algodão.

As cânulas foram confeccionadas com tubos de Policloreto de Vinila (Abbott) equivalente ao polietileno PE10 e PE50. Estes foram soldados por aquecimento e logo após, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e pinos de aço inoxidável.

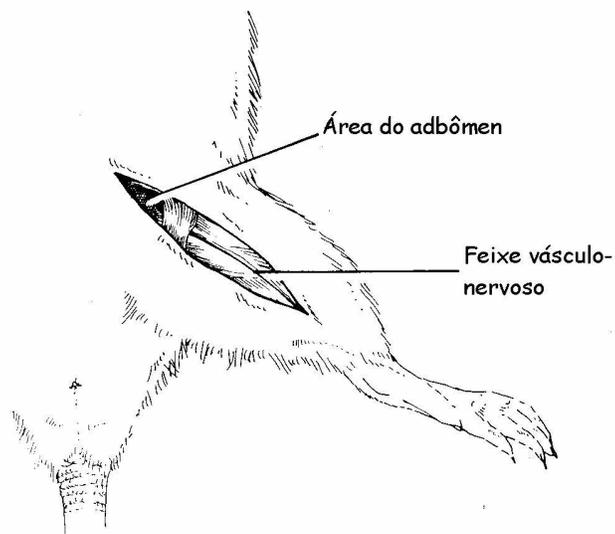


Figura 1: Sítio de dissecação para cateterização da artéria femoral (Desenho S. Lacchini).

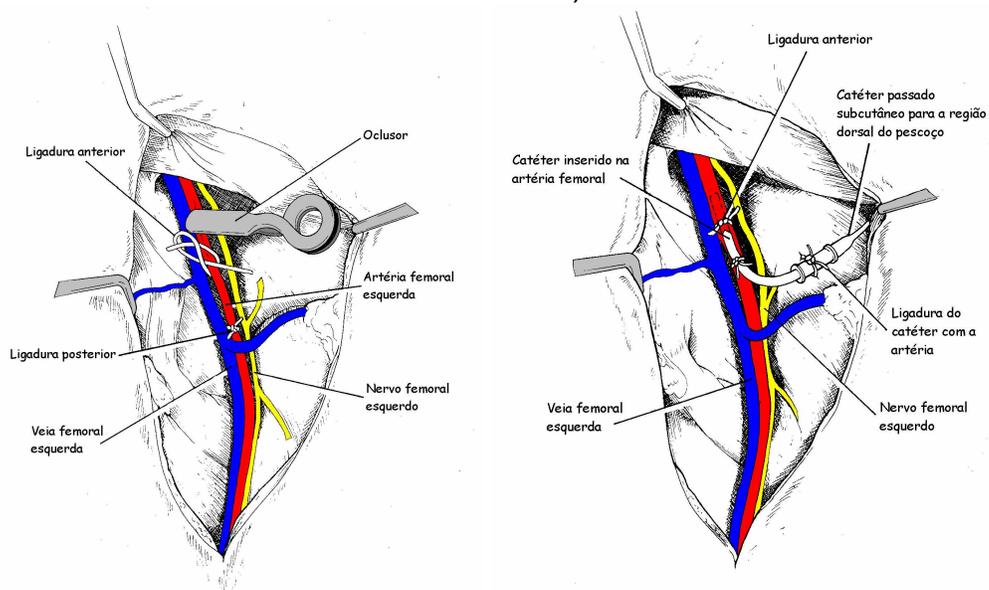


Figura 2: Isolamento da artéria femoral e inserção do catéter (Desenho S. Lacchini)

4.4.4.2 REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL

Vinte e quatro horas após a canulação e estando o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período experimental. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético que, por sua vez, estava conectado a um amplificador. O sinal analógico da pressão arterial pulsátil foi convertido para digital e, em seguida, gravado em um computador (Figura 3). Os sinais de pressão arterial (PA) foram gravados durante um período de 30 minutos. A frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial foram analisadas batimento a batimento no programa AT/WINDAQ, numa frequência de amostragem de 2000Hz por canal. Este programa permite a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de PAS e PAD. A PAM foi obtida da integração dos valores de pressão entre duas detecções consecutivas

de PAD. A FC foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos.

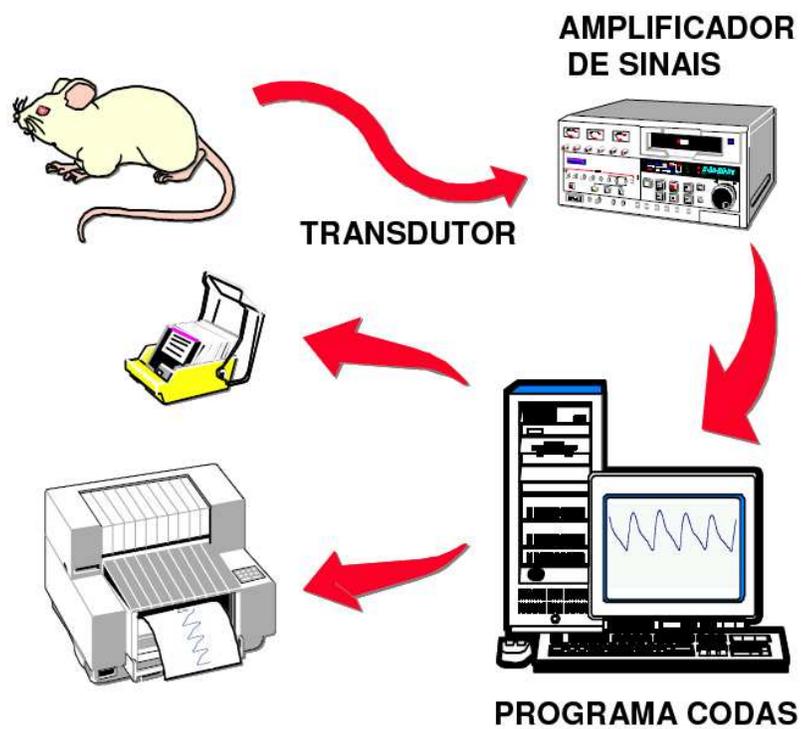


Figura 3: Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial (Desenho de S. Lacchini)

4.4.4.3 AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

A Fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, será usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores (Figura. 4).

O Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores (Figura. 4).

Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, o reflexo pressorreceptor foi estimulado pela injeção endovenosa (0,1 ml) de diferentes concentrações de Fenilefrina e de Nitroprussiato de Sódio, alcançando variações pressóricas de 10 a 40 mmHg. Os valores controle e as alterações máximas de pressão arterial e frequência cardíaca foram determinados para cada concentração administrada. As injeções subseqüentes somente foram realizadas após o retorno dos parâmetros analisados aos valores de controle pré-injeção.

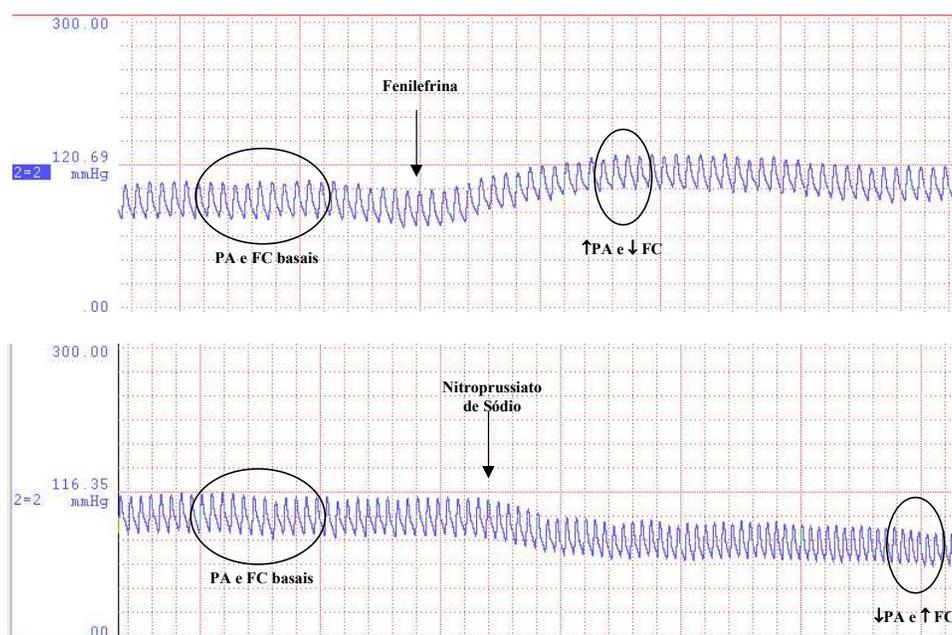


Figura 4: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas. Observe a resposta reflexa dos pressoreceptores.

4.4.4.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO INTERVALO DE PULSO E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA NO DOMÍNIO DO TEMPO E DA FREQUÊNCIA

Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios do intervalo de pulso, frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica e as variabilidades dos intervalos de pulso, da pressão arterial sistólica e diastólica foram quantificadas pelo desvio padrão (IP.dp, FC.dp, PAS.dp e PAD.dp, respectivamente). Para a análise no domínio da frequência, foi utilizado o método de Fourier (FFT - Fast Fourier Transform). A potência foi obtida usando-se o Método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimais de

intervalo de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (MATLAB 6.0, Mathworks, Inc). As potências para as bandas de muito baixas (VLF, 0,0-0,20 Hz; modulação humoral), baixa (LF, 0,20-0,75 Hz; modulação simpática) e alta (HF, 0,75-4, 035Hz; modulação parassimpática) frequências foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de LF e HF foram divididas pela variância subtraída da potência na banda VLF (Pagani e cols. 1986). O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica é estimado pela função de coerência. Um valor de coerência maior que 0,5 foi considerado significativo. A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma com base no registro da PAS, em que a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. (Ishise, Asanoi e cols. 1998).

4.5 ECODOPPLERCARDIOGRAMA: AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA E FUNÇÃO CARDIACAS

A imagem ultrassonográfica das estruturas cardíacas e velocidade do fluxo sanguíneo pelo ecodopplercardiograma é largamente reconhecida por proporcionar uma das mais acuradas medidas não invasiva para caracterização da massa ventricular e análise das funções sistólica e diastólica em humanos (Devereux, 1987; Devereux e cols., 1986; Devereux e Reichek, 1977). Em animais de experimentação, o uso do ecocardiograma como metodologia não invasiva da análise da função e estrutura cardíacas, também vem se tornando rotina graças ao avanço tecnológico e

desenvolvimento de transdutores ultrassonográficos com frequências maiores, que proporcionam uma resolução adequada a pequenas estruturas (Pawlsh e cols., 1993).

O ecodopplercardiograma foi realizado nos grupos estudados conforme protocolo experimental, enfocando-se a avaliação dos seguintes parâmetros:

Morfologia

- cavidade diastólica do VE corrigida pelo peso coporal (VEDIAcorr);
- parede posterior do VE corrigida pelo peso corporal (PARcorr);
- espessura relativa da parede (ERP);
- massa ventricular esquerda corrigida pelo peso corporal (MVEcorr).

Função Sistólica

- fração de ejeção do VE (FE%);

Função Diastólica:

- relação dos picos E e A do fluxo transmitral (E/A);
- tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV);
- tempo de desaceleração do pico E corrigido pela frequência cardíaca (TDEcorr);

Função Cardíaca Global:

- índice de desempenho miocárdico (IDM).

Protocolo experimental e obtenção dos parâmetros morfofuncionais:

Após anestesia com uma solução intraperitoneal de ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame no aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Corporation, Mountain View, CA-EUA), com transdutor linear multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensional e monodimensional

simultâneas. O estudo do Doppler tecidual para análise da velocidade diastólica das paredes do VE também foi realizado, pela colocação do volume-amostra no nível do anel mitral das paredes septal e lateral do VE. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2 cm. As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme Schiller e cols., (1979), com as seguintes medidas: espessura diastólica do septo-interventricular (SIVDIA), diâmetro do VE ao final da diástole (VEDIA) e ao final da sístole, espessura diastólica da parede posterior (PARDIA). A massa ventricular esquerda foi então, obtida a partir da fórmula: $1,047 \times [(SIVDIA+VEDIA+PARDIA)^3 - VEDIA^3] \times 0,8 + 0,6$ onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos (Fard e cols., 2000) e os índices 0,8 e 0,6, fatores de correção (Watson e cols., 2004). Após a obtenção dessas medidas, obtivemos os valores corrigidos pelo peso corporal (valor absoluto/peso corporal do animal).

A função sistólica foi avaliada pelas frações de ejeção (FE%), cuja fórmula está a seguir: $FE = (VDF)-(VSF)/(VDF) \times 100\%$, onde: VDF= Volume Diastólico Final; VSF= Volume Sistólico Final, o volume foi obtido da seguinte fórmula: $V = [7/(2.4+D)] \times D^3$ (Teichholz e cols., 1974) $DD\% = (VEDIA-VESIS/VEDIA) \times 100\%$ $VEC = (VEDIA-VESIS)/(VEDIA \times TE)$, onde TE = tempo de ejeção A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do ventrículo esquerdo obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. Foram determinadas: a) onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) onda A – maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral (correspondente à contração atrial); c) relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A; d)

tempo de desaceleração da onda E (TDE) –tempo, em milissegundos (ms) entre o pico da onda E. É o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral. A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo. Foi determinado o TRIV (ms), entre o final do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo e o início do fluxo diastólico mitral. O TDE e o TRIV, posteriormente, foram corrigidos pela frequência cardíaca (TDEcorr e TRIVcorr), dividindo-se seus valores pela raiz quadrada dos respectivos intervalos R-R. A avaliação do Doppler tecidual foi realizada com o posicionamento do volume-amostra no nível do anel mitral no corte apical quatro câmaras, para a obtenção dos picos de velocidade diastólica máxima rápida (E') e lenta (A') das paredes septal e lateral do VE. Em seguida, obtivemos as razões dos picos E' e A', tanto para a parede septal (E'/A's) quanto para a parede lateral do VE (E'/A'p). Após a aquisição dessas medidas, também obtivemos a razão do pico E do fluxo transmitral pelo pico E's do doppler tecidual no nível do anel mitral da parede septal do VE.

Entretanto, além das avaliações das funções sistólicas e diastólicas em separado, foi utilizado outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IDM), derivado de intervalos obtidos pelo Doppler pulsátil. Validado em camundongos por (Broberg e cols., 2003), entre as vantagens do seu uso, está a de não depender da geometria ventricular, podendo, portanto, ser bem utilizado em modelos que causem alterações na forma e função cardíacas, como nos estágios avançados de sobrecarga pressórica (Salemi e cols., 2004). Todas as medidas

seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn e cols., 1978)

4.6. MEDIDAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

4.6.1 COLETA DE SANGUE

No experimento 1 e 2 a coleta de sangue foi realizada no momento da morte dos animais, durante a decapitação.

4.6.2 PREPARO DO SANGUE PARA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO:

O preparo do sangue para avaliação do estresse oxidativo foi realizado em um período máximo de 48 horas após a coleta.

Após a coleta, o sangue armazenado em tubos tipo *ependorff* com anticoagulante heparina, foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24). O plasma foi retirado, aliquotado em *ependorffs* de 2,0 mL e armazenado à temperatura de -80°C . O plasma foi utilizado para as análises de colesterol total, Hcy e cisteína totais. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), por três vezes, colocando-se uma quantidade de glóbulos vermelhos em *ependorffs* e acrescentando-se a mesma quantidade de soro fisiológico. Em seguida, centrifugou-se a 3000 rpm por cinco minutos e retirou-se o sobrenadante descartando-o. Repetiu-se o procedimento três vezes.

Os eritrócitos foram aliquotados da seguinte forma: 50 μL de glóbulos vermelhos lavados acrescentados de 500 μL de solução de ácido acético 1mM e sulfato de

magnésio 4 mM. Essas amostras foram utilizadas para análise de proteínas e atividade das enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase.

4.6.3 PREPARO DO HOMOGENEIZADO:

Os animais foram decapitados e tiveram os corações retirados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido para posterior homogeneização.

Os órgãos foram descongelados e homogeneizados durante 40 segundos em ultra-turrax, na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de coração) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para evitar a degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5 B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80° C para dosagens posteriores (Llesuy e cols., 1985)

4.6.4 MEDIDAS DE DANO OXIDATIVO:

O dano oxidativo a lipídios (lipoperoxidação) foi avaliado pela quimiluminescência, iniciada pelo hidroperóxido de tert-butil (QL), e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer). As condições gerais do ensaio foram meio de reação consistindo numa solução reguladora de KCl 120 mM, fosfatos 40 mM, pH 7,4, concentração de tBOOH 3mM. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps)/ miligrama de proteína (Gonzalez-Flecha e cols. 1991). A técnica de TBARS consiste na reação de produtos da lipoperoxidação com o ácido tiobarbitúrico, para medir espectrofotometricamente a formação de um produto de coloração rósea.

Utiliza-se como padrão o tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em nmoles de malondealdeído (MDA) por mg de proteína (Buege & Aust, 1978)

A avaliação das proteínas modificadas por oxidação (carbonilas) foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer, 1994. O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que após sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos, incubação com guanidina podem ser lidas espectrofotometricamente. A absorvância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary, a 360nm. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína.

4.6.5 DOSAGENS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.6.5.1 CATALASE (CAT)

A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H_2O_2 . Dessa forma a atividade da CAT pode ser medida pela avaliação do consumo de H_2O_2 . O ensaio consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, pois neste comprimento há maior absorção pelo H_2O_2 .

Para realização do ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: tampão fosfato de sódio (50mM, pH 7,4) e H_2O_2 0,3M. Em cubeta de quartzo foram adicionados: 955 μ L do Tampão fosfato, 30 μ L de amostra de eritrócitos lavados, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após foram adicionados 15 μ L de H_2O_2 e foi então feito monitoramento da diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado. A concentração foi expressa em pmoles/mg de proteína (Aebi,1984).

4.6.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A enzima antioxidante SOD, catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em H_2O_2 . A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada para determinação da SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor será a auto-oxidação do pirogalol.

Como, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, utiliza-se a quantidade em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, 1985).

Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base 50 mM; EDTA 1 Mm, pH 8,2), pirogalol 24 mM (em ácido clorídrico a 10 mM), e catalase a 30 μ M. Para se obter o resultado em unidades de SOD, necessita-se um fator de calibração, por isso construiu-se uma curva padrão com uma solução de SOD comercialmente disponível, em concentrações conhecidas. Assim, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da auto-oxidação em unidades de enzima.

O ensaio foi realizado da seguinte maneira: colocou-se em uma cubeta 988 μL de tampão Tris, 4 μL de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 8 μL de pirogalol à cubeta, realizando a leitura. Dessa forma, obteve-se o máximo de oxidação dessa substância. Essa medida é muito importante para posterior cálculo da percentagem de inibição causada pela SOD presente na amostra. Com a amostra procedeu-se da mesma forma, apenas com reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada, tendo sempre um volume final de 1mL. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

4.6.5.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Como a GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro de marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm. Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μL de tampão, 50 μL do homogeneizado ou glóbulos lavados (amostra), 500 μL de NADPH, 10 μL de azida sódica, 50 μL de GSH e 10 μL de GR. Foi registrada a absorvância por um período de aproximadamente 2 minutos, para obtenção da linha de base. Após esse momento, foram adicionados 50 μL de hidroperóxido de tert-butila e a diminuição da absorvância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por mais 3 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (Flohé & Gunzler, 1984).

4.6.5.4 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

As glutionas transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutationa com vários substratos, tendo papel importante na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com composto cloro-dinitro-benzeno (CDNB). A GST vai catalisar a reação de conjugação da glutationa reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutationa que foram exportados para fora da célula. Desse modo, essa enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

Este ensaio está baseado na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4 dinitro-fenil-glutaciona (DNP-SG), que é um composto corado. A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes: tampão fosfato de sódio (0,2M pH 6,5); GSH 20mM e CDNB 20 mM.

Na cubeta de 1mL foram adicionados 850 μ L de tampão, 50 μ L de amostra, mais 50 μ L de GSH (de concentração final de 1mM) zerou-se o espectrofotômetro a 340nm, e por fim, adicionou-se 50 μ L de CNDB e observou-se a formação de DNP-SG. O resultado foi dado em μ moles/minuto/mg de proteína ou em nmoles/minuto/mg de proteína.(Mannervik & Gluthenberg, 1981).

4.6.5.5 TIOREDOXINA REDUTASE (TrxR)

A determinação da atividade dessa enzima ocorre da redução do DTNB em TNB, um composto amarelo, que absorve em 412 nm. Para realização do ensaio

foi preparada solução com 50 μ L NADPH, 500 μ L de EDTA, 1mL Buffer, 800 μ L de DTNB e 100 μ L de albumina. A essa solução foram acrescentados 7,55mL de água destilada para um volume final de 10mL.

Para determinação da atividade, coloca-se 500 μ L da mistura em duas cubetas, a qual corresponde à amostra, coloca-se 40 μ L da amostra e 160 μ L do buffer. Mede-se a reação no espectrofotômetro a 412nm por 1 minuto. Uma unidade de TrxR é definida com 1 μ mol de TNB formado por minuto ($1U = \Delta Abs / 27,2$) (Holmegren & Bjornstedt, 1995).

4.6.5.6 CONCENTRAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂ mediada pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. Fatias de tecido cardíaco foram incubadas por 30 minutos em tampão de fosfato de potássio 10 mmol (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L) O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0.28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8.5 U/mL. Após intervalo de 5 minutos foi adicionado NaOH 1 mol e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de proteína (Pick & Keisari, 1980).

4.6.5.7 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A concentração de hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas com soro fisiológico, utilizadas para expressão dos resultados da atividade das enzimas antioxidantes. Para análise utilizou-se uma mistura de cianetos, o reagente de Drabkin, que interage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, medida em espectrofotômetro, conforme descrito por Drabkin & Austin, 1935..

Para as dosagens, colocaram-se, em um tubo de ensaio, 5 mL da solução de Drabkin e 20 μL de amostra; deixou-se reagir por cinco minutos, e a absorbância foi lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 546 nm. Os resultados foram expressos em miligramas por mililitro ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.6.5.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para quantificar a proteína dos tecidos foi utilizado o método de Lowry e cols. 1951. Foi construída uma curva de calibração da albumina (proteína bovina), utilizando três concentrações 50, 100 e 150mg/ml.

Em cada tubo foram colocados 800 μL de água, 20 μL de amostra e para a curva de calibração foram colocados, em T1, 50 μL ; em T2, 100 μL ; e, em T3, 50 μL . Após foram adicionados 2ml do reativo C e esperou-se dez minutos para acrescentar 200 μL de Folin. Esperou-se trinta minutos para fazer a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda a 625 nm. A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL.

4.6.5.9 ANÁLISE POR WESTERN BLOT:

O tecido a ser analisado foi imerso imediatamente após a extração, em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C .. Para o isolamento de proteína as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mM, EDTA 5mM, pH=7.4) e homogeneizadas usando um homogenizador Politron Foi adicionado ao tampão, aprotinina ($10\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$), leupepsina ($10\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$), pepstatina A ($10\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (20 μM), para prevenir a degradação protéica. As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar o quantidade de proteína. Quarenta microgramas de proteína foram expostos à eletroforese de gel

monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (p/v) de gel separador e 5% (w/v) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas por meio de eletroforese para membranas usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH= 8,3) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados por 1h de incubação em solução bloqueadora (5% (p/v) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando-se os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-GST de coelho, anticorpo anti-MnSOD de coelho, anticorpo policlonal anti-CAT de coelho e anticorpo monoclonal anti-Nrf2 de coelho. Como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias (MD) e os desvios padrões (DP) para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Como os dados apresentaram uma distribuição normal foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado com o teste de Tukey e cols. quando necessário. A correlação entre as variáveis foi analisada pela correlação de Pearson (Graph Pad Instat, versão 3.0)

As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado pelo Computer Programs for Epidemiologic Analyses (PEPI, versão 4.0).

5. RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1- Protocolo 1 – Efeitos da Hiper-Homocisteinemia Induzida Por dois diferentes tratamentos sobre variáveis hemodinâmicas, morfofuncionais cardíacas, bioquímicas e moleculares.

5.1.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E METÁBOLICOS

Não foi encontrada diferença significativa no peso corporal médio e no peso do coração dos animais. (tabela 1)

A concentração de Hcy plasmática apresentou-se significativamente aumentada nos grupos HcyT e MET comparados ao grupo CO .No entanto, a concentração de cisteína plasmática não foi diferente entre os grupos experimentais. Já a concentração plasmática do colesterol total do grupo HcyT apresentou redução significativa em relação ao grupo MET.

Tabela 1: Parâmetros morfoométricos e metabólicos dos diferentes grupos experimentais após o experimento:

Parâmetros	CO	MET	HcyT
Peso corporal (g)	427,0±23,5	430,0±30,6	395,0±24,0
Peso coração (g)	1,4±0,2	1,5±0,1	1,4±0,1
Hcy plasmática 30 dias (µmol/L)	12,0±3,0	17,0±2,4*	17,0±1,3*
Cisteína plasmática 30 dias (µmol/L)	329,0±42,0	381,0±36,0	333,0±17,0
Colesterol total plasmático (mg/dL)	75,0±10,0	78,0±6,0	62,0±11,0 [#]

CO = controle, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. Valores expressos em MD \pm DP de 6 animais/grupo. * vs CO, # vs MET (p<0.05).

5.1.2 MORFOMETRIA CARDÍACA

No dia da avaliação da estrutura cardíaca pelo ecocardiograma, o peso corporal médio dos animais do grupo CO foi de 456 ± 19 , do MET foi de 430 ± 17 , enquanto do HcyT foi de 440 ± 33 g. Não houve diferença na comparação de peso entre os grupos.

A morfometria cardíaca foi avaliada pelos seguintes parâmetros: parede posterior do VE corrigida pelo peso do animal (PARcorr), dimensão diastólica da cavidade do VE corrigida pelo peso do animal (VEDIACorr), espessura relativa da parede (ERP) massa ventricular esquerda corrigida pelo peso do animal (MVEcorr).

Os valores encontrados no grupo controle foram semelhantes aos valores ecocardiográficos basais encontrados por Watson e cols., 2004.

Não foram observadas diferenças nos parâmetros morfométricos nos diferentes grupos experimentais, conforme pode ser observado na tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros de morfometria cardíaca nos diferentes grupos experimentais após o experimento:

Parâmetros	CO	MET	HcyT
PAR corr (cm/kg)	$0,36 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,04$
VEDIA corr (cm/kg)	$1,68 \pm 0,21$	$1,72 \pm 0,14$	$1,68 \pm 0,18$
ERP	$0,43 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,04$
MVE corr (g/kg)	$2,94 \pm 0,25$	$3,09 \pm 0,3$	$2,78 \pm 0,26$

CO = controle, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. PARcorr = parede posterior do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso do animal, VEDIACorr= dimensão diastólica da cavidade do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso do animal, ERP=

espessura relativa da parede; MVEcorr= massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso do animal. Valores expressos em MD \pm DP de 6 animais * vs CO, # vs MET.

5.1.3. FUNÇÃO CARDÍACA

A tabela 3 mostra a avaliação da função sistólica do VE, obtida pela FE. Na mesma tabela, pode-se observar o índice de desempenho miocárdico (IDM), que avalia a função global do VE.

O grupo HcyT apresentou uma redução na FE(%) em relação ao grupo CO (10%). O IDM apresentou aumento significativo no grupo HcyT em relação ao grupo CO (200%), conforme podemos observar na tabela 3:

Tabela 3: Parâmetros de função cardíaca dos diferentes grupos experimentais após o experimento:

Parâmetros	CO	MET	HcyT
FE (%)	81,0±4,00	76,0±4,00	71,0±7,00*
IDM	0,13±0,06	0,25±0,15	0,39±0,09*

CO = controle, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. FE = fração de ejeção, IDM= índice de desempenho miocárdico. Valores expressos em MD ±DP de 6 animais por grupo * vs CO, # vs MET.

5.1.4. FUNÇÃO DIASTÓLICA

A função diastólica foi avaliada pela razão entre a onda E e a onda A (razão E/A), o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo de desaceleração do fluxo da mitral da onda E (TDE).

O grupo HcyT apresentou aumento na razão E/A de aproximadamente (24 e 26%) comparado ao grupo CO e ao grupo MET. O TRIV foi aproximadamente (23%) menor no grupo HcyT comparado ao grupo MET. O TDE apresentou uma redução significativa (30 e 24%) no grupo HcyT comparada ao CO e ao MET, respectivamente (tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros de função diastólica nos diferentes grupos experimentais após o experimento:

Parâmetros	CO	MET	HcyT
Razão E/A	1,74 ±0,26	1,72±0,15	2,30±0,40 ^{*,#}
TRIV (ms)	31,00±4,30	33,00±4,15	25,50±1,38 [#]
TDE (ms)	49,00±4,80	50,00±5,90	38,00±4,07 ^{*,#}

CO = controle, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. Razão E/A = relação entre picos E, A; TRIV= tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE= tempo de desaceleração. Valores expressos em MD ±DP de 6 animais por grupo * vs CO, # vs MET.

5.1.5. DANO OXIDATIVO A LIPÍDIOS NO MIOCÁRDIO

O dano oxidativo avaliado pela LPO iniciada por tbooH (QL) apresentou significativo aumento no grupo tratado com HcyT em relação ao grupo CO (155%) ($p < 0.05$).

Já a concentração do TBARS demonstrou um aumento no grupo HcyT em relação ao grupo CO (257%) e ao grupo MET (312%) . (tabela 5).

Tabela 5: Dano oxidativo a lipídios nos diferentes grupos experimentais:

Dano Oxidativo	CO	MET	HCY
QL (cps/mg prot)	12221 ± 2677	13453 ± 3021	19000 ± 4798 *
TBARS (nmol/mg prot)	1,87 ± 0,90	1,54 ± 0,50	4,80 ± 2,00 *,#

CO= controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. QL= quimiluminescência; TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os resultados são apresentados em MD ± DP, de 6 animais por grupo.* vs CO, # vs MET ($p < 0.05$).

5.1.6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MIOCÁRDIO

As defesas antioxidantes foram avaliadas pela dosagem espectrofotométrica da atividade das enzimas antioxidantes em tecido miocárdico homogeneizado. A atividade da GPx não mostrou diferença significativa. A atividade SOD, CAT e GST aumentou significativamente no grupo HcyT quando comparada aos grupos CO e MET.

Já a atividade da enzima TrxR apresentou apenas aumento significativo no grupo HcyT em relação ao grupo CO.

Tabela 6: Atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio ao final do protocolo experimental:

Parâmetro	CO	MET	HcyT
SOD (U/mg prot)	8.0 ± 0.9	7.5 ± 1.1	10.5 ± 0.6 ^{*,#}
CAT (nmol/mg prot)	110.0 ± 16.5	94.0 ± 17.0	198.0 ± 71.0 ^{*,#}
GST (nmol/mg prot)	14.0 ± 2.4	17.0 ± 4.9	23 ± 2.4 ^{*,#}
GPx (nmol/min/mg prot)	23 ± 3	25 ± 6	24 ± 8
TrxR (nmol/mg prot)	13.0 ± 3.8	13.5 ± 2.3	18.0 ± 2.3 [*]

CO= controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. SOD = superóxido dismutase, CAT = catalase, GST = glutathione S- transferase, GPx = glutathione peroxidase, TrxR= tioredoxina redutase. Os resultados são apresentados em MD ± DP, de 6 animais por grupo.* vs CO, # vs MET

5.1.7 IMUNOCONTEÚDO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO CARDÍACO

5.1.7.1 SOD

O imunoconteúdo da enzima SOD foi avaliado em tecido miocárdico homogeneizado por *western blot*. O grupo MET apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CO (10%). Já o grupo HcyT demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo CO (36%) e MET (15%). Os resultados são apresentados na figura 5:

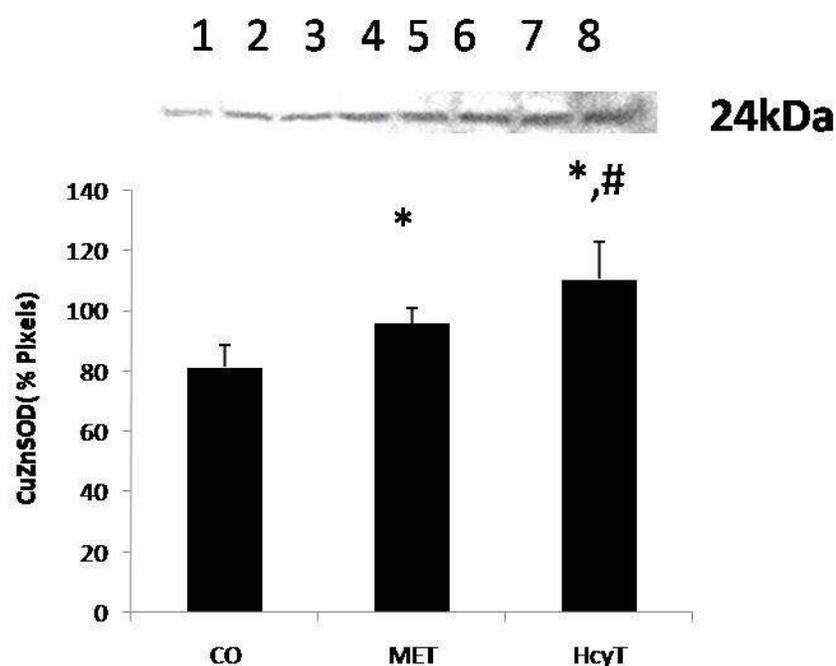


Figura 4: Imunoconteúdo da SOD no miocárdio avaliado por western blot após o protocolo experimental. CO=Controle. MET=Metionina. HcyT= Homocisteína tiolactona.

Valores são expressos em MD \pm DP, de 5 animais por grupo. (um gel representativo mostrando CO=1 e 2, MET= 3,4 e 5 e HcyT= 6,7 e 8). * vs CO , # vs MET

5.1.7.2 CAT

O imunoconteúdo da enzima CAT avaliado em homogeneizado de tecido miocárdico não apresentou diferença entre os grupos experimentais. Os resultados estão demonstrados na figura 6:

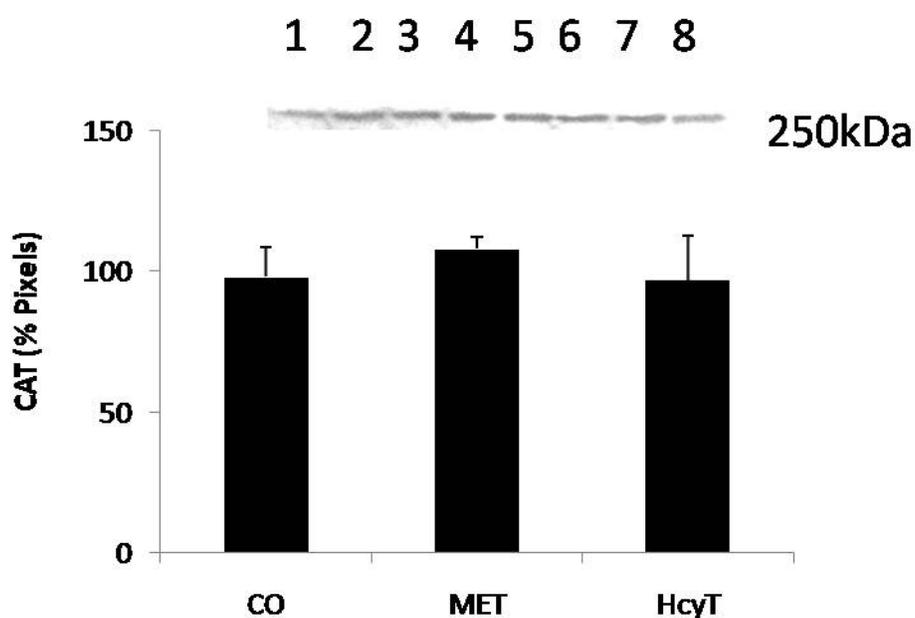


Figura 5: Imunoconteúdo da CAT no miocárdio avaliado por western blot. CO=Controle. MET=Metionina. HcyT= Homocisteína tiolactona Imunoconteúdo da CAT (%Pixels) avaliado por Western blot. Valores são expressos em MD \pm DP, de 5 animais por grupo. (um gel representativo mostrando CO= 1 e 2, MET= 3, 4 e 5 e HcyT= 6, 7 e 8).

5.1.7.3 GST

O imunoconteúdo da enzima GST avaliado em homogeneizado de tecido miocárdico não apresentou diferença entre os grupos experimentais. Os resultados são apresentados na figura 7:

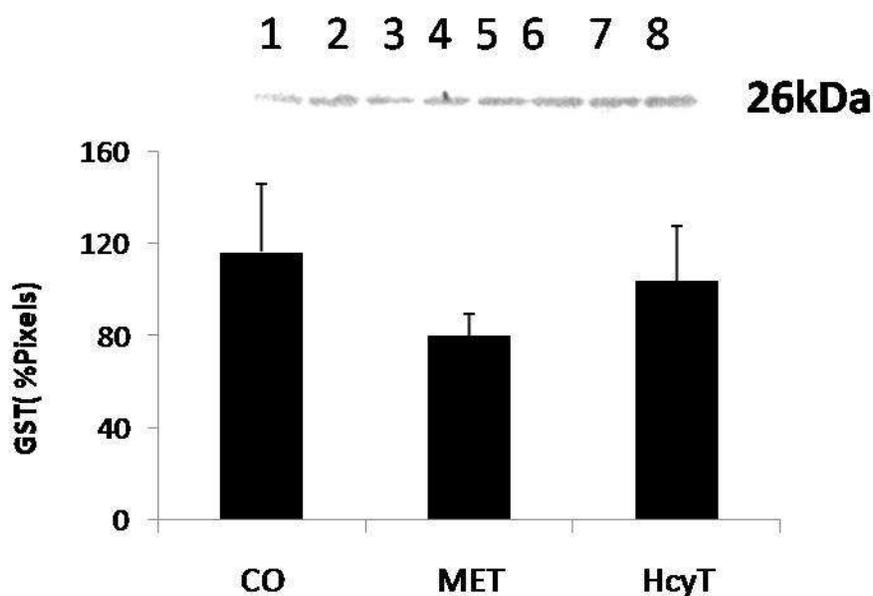


Figura 6: Imunoconteúdo da GST no miocárdio avaliado por western blot. CO=Controle, MET=Metionina, HcyT= Homocisteína tiolactona. Imunoconteúdo da GST (% Pixels) avaliado por Western blot. Valores são expressos em MD \pm DP, de 5 animais por grupo. (um gel representativo mostrando CO=1 e 2, MET=3,4 e 5 e HcyT= 6, 7 e 8).

5.1.8 ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE FUNÇÃO CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO:

Avaliando a participação da enzima antioxidante SOD no desenvolvimento da disfunção global miocárdica, notamos uma correlação positiva entre essas variáveis. Para tanto, usamos o imunoconteúdo da CuZnSOD (%Pixels) e o índice de desempenho do miocárdio (IDM). Quanto maior o imunoconteúdo da CuZnSOD, maior o IDM, sugerindo um possível aumento da produção do ânion superóxido já que essa enzima é específica para a decomposição dessa ERO.

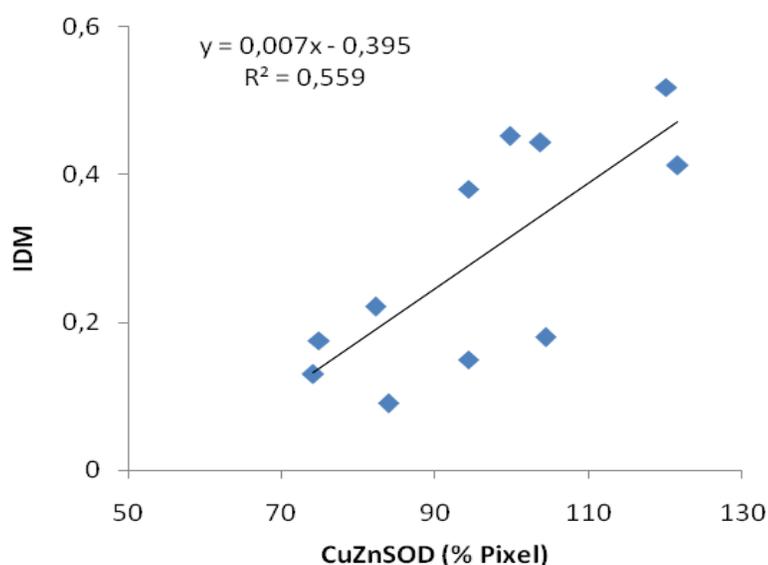


Figura 7: Correlação entre o imunoconteúdo da CuZnSOD e o IDM entre os grupos CO, MET e HcyT ($r=0,75$, $p<0,01$).

A razão E/A aumentada é um índice utilizado para avaliação da redução da função diastólica por meio de ecocardiograma por dopler. Em nossos resultados apresentou-se positivamente correlacionada a atividade da enzima CAT no músculo cardíaco, com $r = 0.78$, $p < 0.004$. Nessa correlação quanto maior o aumento da atividade da CAT, maior o aumento da razão E/A., sugerindo uma provável associação do aumento do H_2O_2 com a disfunção diastólica, pois a CAT é a enzima específica para a decomposição dessa ERO.

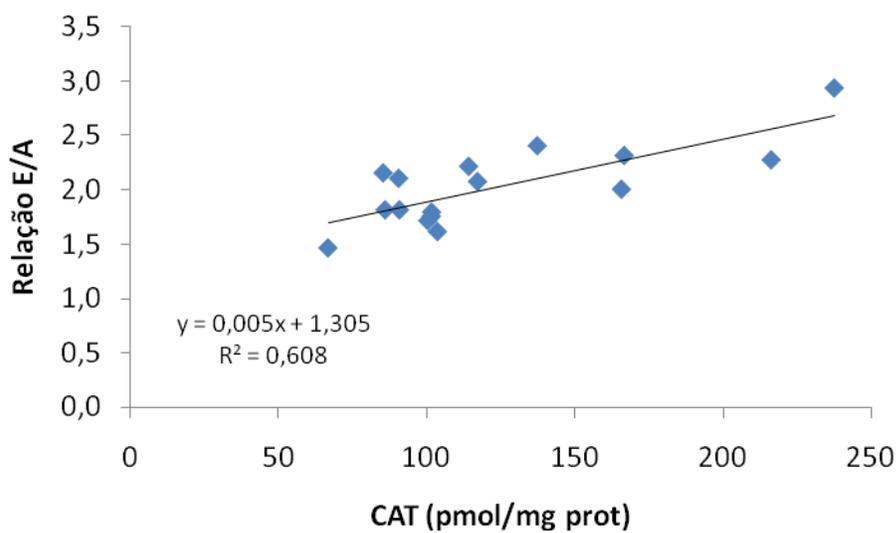


Figura 8: Correlação entre a atividade da enzima CAT e a relação E/A entre os grupos CO, MET e HcyT ($r=0,78$, $p<0,004$).

Avaliando o dano oxidativo a lipídios pelo método de quimiluminescência (QL) e a FE, encontramos uma correlação negativa, com $r = 0.74$, $p < 0.003$ entre as duas variáveis. Esse resultado é sugestivo de que quanto maior a lipoperoxidação, menor a FE, demonstrando uma associação entre o prejuízo da função sistólica e o aumento da lipoperoxidação.

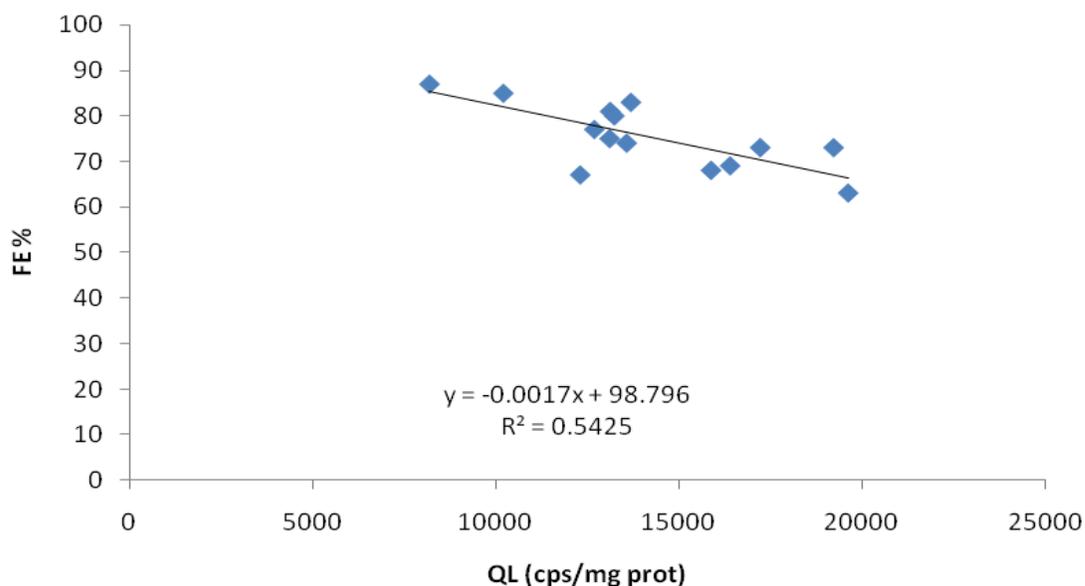


Figura 9: Correlação entre a lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência (QL) e a fração de ejeção (FE%) entre os grupos CO, MET e HcyT ($r=0.74$, $p < 0.003$).

5.2 PROTOCOLO 2

5.2.1 AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS

5.2.2 PA E IP E VARIABILIDADE DA PA E DO IP

Na tabela 7 podemos observar que não existem diferenças entre os grupos experimentais referentes às medidas hemodinâmicas.

Tabela 7: Medidas hemodinâmicas nos diferentes grupos experimentais ao final do tratamento:

Variáveis	CO	MET	HcyT
IP	184±4	188±4	178±3
SD IP	10,0±0,7	8,6±0,5	6,0±0,7
PAS (mmHg)	121±5	133±3	132±2
SD PAS	5,3±0,5	5,4±0,7	4,9±0,4

CO= controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. Intervalo de Pulso (IP), Desvio do Intervalo de Pulso (SD IP), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Desvio da Pressão Arterial Sistólica (SD PAS). Valores são expressos em MD ± DP de 6 animais por grupo * vs CO (p<0.01).

5.2.3 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Observamos com a análise da modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência que o componente de baixa frequência (BF) normalizado e a razão entre os componentes baixa e alta frequência (BF/AF) foram maiores no grupo HcyT. Além disso, o componente de alta frequência (AF) normalizado do intervalo de pulso foi menor no grupo HcyT comparado ao grupo controle (Tabela 8):

Tabela 8: Análise da variabilidade da FC ao final do protocolo experimental:

Variáveis	CO	MET	HcyT
BF (%)	19,35±3,54	27,07±4,73	29,33±7,92*
AF (%)	80,65±3,54	72,93±4,73	70,67±7,92*
BF/AF (ms²)	0,24±0,05	0,38±0,09	0,48±0,17*
Var RR (ms²)	99±15	75±9	41±9*

CO = controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. Banda de baixa frequência (BF), banda de alta frequência (AF) do intervalo do pulso, relação entre a baixa e alta frequência (BF/AF) do tacograma Valores são expressos em MD ± DP de 6 animais por grupo * vs CO (p<0.01).

5.2.4 VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Conforme os dados obtidos podemos observar que os grupos MET e HcyT apresentaram aumento no componente de baixa frequência em relação ao grupo CO (tabela 9). Já o componente de alta frequência não apresentou alteração entre os grupos experimentais.

Tabela 9: Análise da variabilidade da PAS ao final do protocolo experimental:

Variáveis	CO	MET	HcyT
V PAS (mmHg²)	29,5±13,0	32,1±20,9	24.7±10.4
BF (mmHg²)	2,0±1,4	6,0±1,2*	5,4±2,6*
AF (mmHg²)	2,7±1,4	2,4±1,5	2,5±1,2

CO = controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. Variância da pressão arterial sistólica (VPAS), banda de baixa frequência (BF), banda de alta frequência (AF) do intervalo do pulso do tacograma. Valores são expressos em MD ± DP de 6 animais por grupo * vs CO (p<0.01)

5.2.5 SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

Os índices de taquicardia e bradicardia reflexa foram comparados separadamente para estudar o reflexo pressceptor. A figura 11A ilustra os valores dos índices taquicardia que após o tratamento crônico com MET ($1,41 \pm 0,64$) ou HcyT ($1,45 \pm 0,27$) foi observada redução da taquicardia em ambos os grupos comparados ao CO ($2,41 \pm 0,46$).

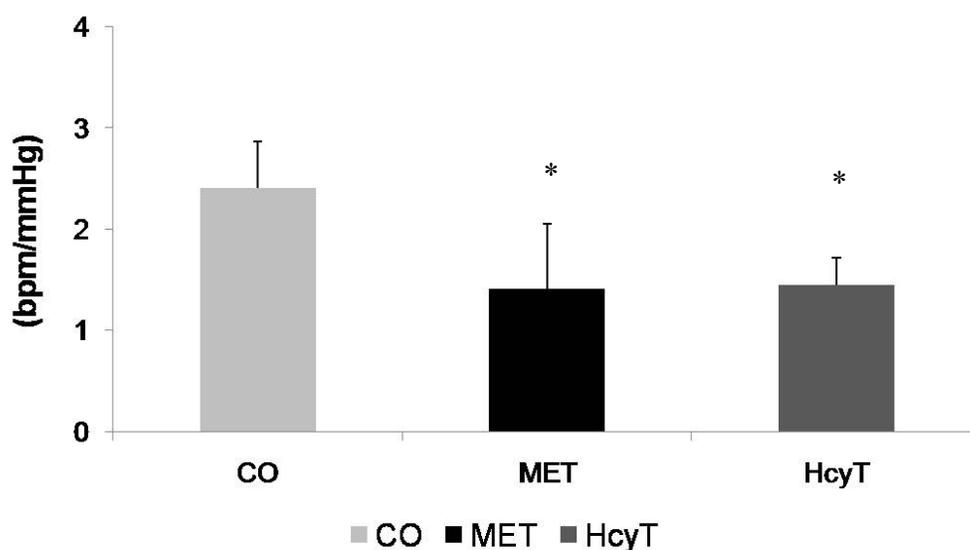


Figura 10A: Valores de taquicardia reflexa nos animais. CO=Controle. MET=Metionina. HcyT= Homocisteína tiolactona. Valores são expressos em MD \pm DP de 6 animais por grupo. * vs CO ($p < 0,01$).

A figura 11B (apresentada abaixo) apresenta os valores obtidos para os índices de bradicardia nos grupos experimentais estudados. Semelhante ao que foi observado para os índices de taquicardia, também ocorre redução da bradicardia reflexa após o tratamento com MET ($-1,3 \pm 0,3$) ou HcyT ($-0,9 \pm 0,4$) em relação ao CO ($-1,9 \pm 0,5$).

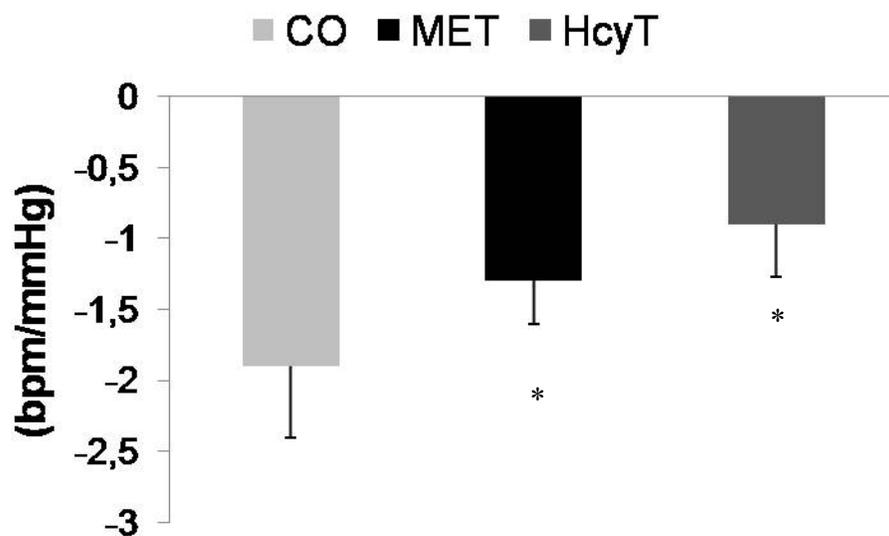


Figura 11B: Valores de bradicardia reflexa nos animais. CO=Controle. MET=Metionina. HcyT= Homocisteína tiolactona. Valores são expressos em MD \pm DP de 6 animais por grupo. * vs CO(p<0,01).

5.2.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CARBONILAS OXIDADAS

A figura 12 apresenta significativa redução do dano às proteínas no grupo HcyT ($5,4 \pm 1,3$), avaliada pela concentração das carbonilas em plasma foi observada quando comparada ao CO ($11,3 \pm 0,6$) e MET ($9,2 \pm 0,8$). O grupo MET apresentou redução significativa comparada ao CO:

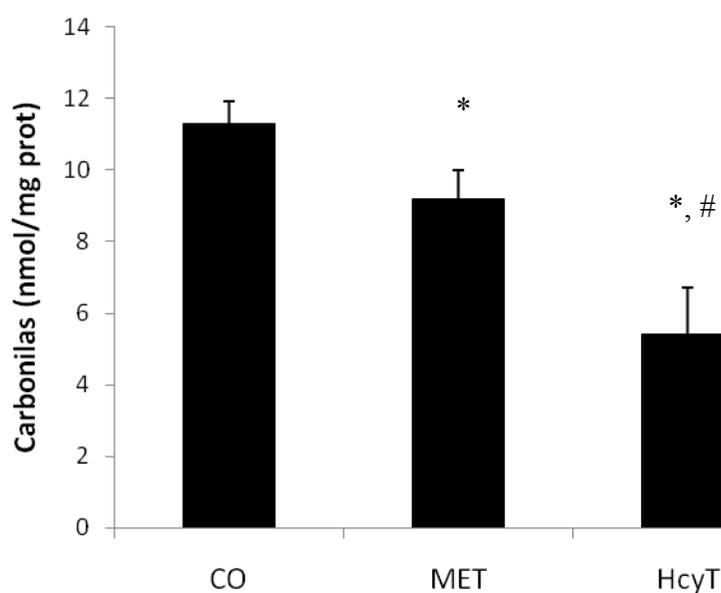


Figura 11: Concentração plasmática de carbonilas oxidadas ao final do protocolo experimental. CO=Controle. MET=Metionina. HcyT= Homocisteína tiolactona. Valores são expressos em MD \pm DP de 6 animais por grupo. * vs CO, # vs MET ($p < 0,01$).

5.2.7 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ERITRÓCITOS

Foram realizadas avaliações das defesas enzimáticas antioxidantes em eritrócitos. Não foram encontradas diferenças significativas na atividade da enzima CAT entre os grupos experimentais. A atividade da enzima antioxidante SOD reduziu no grupo HcyT comparada ao CO e ao MET. Enquanto, a GST teve sua atividade reduzida no grupo HcyT quando comparada ao CO e MET respectivamente (tabela 10).

Tabela 10: Perfil antioxidante nos eritrócitos ao final do protocolo experimental:

Parâmetros	CO	MET	HcyT
SOD (U/mg prot)	13,3±1,3	15,3±1,7	8,9±2,3 ^{*,#}
CAT (pmol/mg prot)	99,4±14,0	100,8±30,6	131,0±19,2
GST (nmol/mg prot)	56±14	63±27	24±6 ^{*,#}

CO= controles, MET= metionina, HcyT= homocisteína tiolactona. SOD = superóxido dismutase, CAT = catalase, GST = glutathione s-transferase. Os resultados são apresentados em MD ± DP, de 6 animais por grupo.* vs CO, # vs ME.

5.2.8 ESTUDO DE CORRELAÇÕES DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO

Avaliando a relação da enzima SOD com o componente de AF da FC, podemos observar uma associação positiva entre essas duas variáveis. Quanto maior a atividade da enzima SOD, maior o componente AF da frequência cardíaca ($r=0,89$, $p<0,0006$, figura 13):

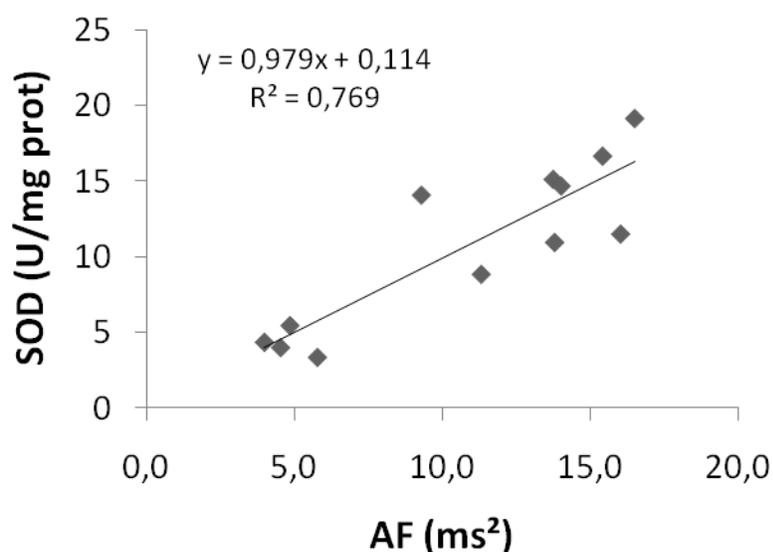


Figura 12: Correlação entre a atividade da SOD e o componente de AF da FC entre os grupos CO, MET e HcyT ($r=0,89$, $p<0,0006$).

5.3 EXPERIMENTO 2: Efeito do tratamento com vitamina B6 sobre as alterações induzidas pela hiper-homocisteinemia provocada por administração crônica de Homocisteína tiolactona

5.3.1 PARÂMETROS METÁBOLICOS

A tabela 11 demonstra que concentração de Hcy plasmática total está significativamente aumentada no grupo HcyT comparada aos grupos COB6 e HcyTB6, observado na tabela 11.

Já o peso corporal dos animais e a concentração de cisteína total não apresentaram alterações significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 11: Dosagem de homocisteína e cisteína plasmática após o tratamento com vitamina B6

Parâmetros	COB6	HcyT	HcyTB6
Peso corporal (g)	444,0±22,6	420,3±35,0	456,0±12,5
Homocisteína plasmática total (µmol/L)	8,6±0,9	17,0±1,4*	9,0±1,0 [#]
Cisteína plasmática total (µmol/L)	294,2±32,5	327,9±26,2	331,5±36,1

COB6 = controle B6, HcyT= homocisteína tiolactona, HcyTB6=homocisteína tiolactona.

Valores expressos em MD ±DP de 5 animais/grupo. *vs COB6, # vs HcyT.

5.3.2 MORFOMETRIA CARDÍACA

A tabela 12 apresenta os parâmetros morfométricos do VE. No grupo HcyT a parede posterior do VE corrigida pelo peso corporal (PAR corr) apresentou aumento significativo quando comparado aos grupos COB6 e HcyTB6. Já a espessura relativa da parede (ERP) apresentou-se diminuída no grupo HcyTB6 quando comparadas ao grupo HcyT. O diâmetro da cavidade do VE na diástole corrigido pelo peso corporal (VEDIACorr) apresentou-se aumentado no grupo HcyTB6 comparado ao HcyT, no entanto entre os grupos HcyTB6 e COB6 também foi observado aumento significativo.

O grupo HcyTB6 apresentou massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso corporal (MVEcorr) aumentada em relação aos grupos COB6 e HcyT.

Tabela 12: Parâmetros ecocardiográficos de morfometria cardíaca após o tratamento com vitamina B6:

Parâmetros	COB6	HcyT	HcyTB6
PAR corr (cm/kg)	0.35±0.02	0.39±0.02*	0.35±0.02 [#]
ERP (cm)	0.40±0.04	0.44±0.02	0.36±0.02 [#]
VEDIA corr (cm/kg)	1.53±0.18	1.56±0.13	1.70±0.13 ^{*,#}
MVE corr (g/kg)	2.60±0.13	2.70±0.45	2.90±0.33 ^{*,#}

COB6 = controle B6, HcyT= homocisteína tiolactona, HcyTB6=homocisteína tiolactona B6. PARcorr = parede posterior do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso do animal, VEDIAcorr= dimensão diastólica da cavidade do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso do animal, ERP= espessura relativa da parede; MVEcorr= massa do ventrículo

esquerdo corrigida pelo peso do animal. Valores expressos em MD \pm DP de 5 animais.

*vs COB6, # vs HcyT, Ψ vs HcyTB6.

5.3.3 FUNÇÃO CARDÍACA

A função sistólica após o tratamento com vitamina B6 foi avaliada pela FE (%). A FE (%) apresentou-se reduzida no grupo HcyT em relação ao grupo COB6 (18%). Já o grupo HcyTB6 apresentou redução de aproximadamente 10% na FE (%) em relação ao grupo COB6, porém um aumento de igual percentual em relação ao grupo HcyT.

O IDM, um índice que avalia a função global do miocárdio, demonstrou importante redução em ambos os grupos que receberam tratamento com vitamina B6 (COB6 e HcyTB6) em relação ao grupo HcyT.

Tabela 13: Parâmetros ecocardiográficos de função cardíaca após o tratamento com vitamina B6:

Parâmetros	COB6	HcyT	HcyTB6
FE (%)	84,00±0,07	69,00±0,04*	76,00±0,04* [#]
IDM	0,31±0,16	0,44±0,11*	0,30±0,11 [#]

COB6 = controle B6, HcyT= homocisteína tiolactona e HcyTB6= homocisteína tiolactona B6 . FE = fração de ejeção, IDM= índice de desempenho miocárdico. Valores expressos em MD ±DP de 5 animais. * vs COB6, Ψ vs HcyT,

5.3.4 FUNÇÃO DIASTÓLICA

A tabela 14 apresenta os parâmetros que avaliam a função diastólica. O tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pelo peso corporal (TRIVcorr) não apresentou alteração significativa entre os grupos experimentais.

A razão E/A apresentou aumento significativo de 30% no grupo HcyT comparado ao COB6, conforme observado na tabela 14:

Tabela 14: Parâmetros ecocardiográficos de função diastólica após o tratamento com vitamina B6:

Parâmetros	COB6	HcyT	HcyTB6
Razão E/A	1.75±0.25	2.16±0.22*	1.99±0.10
TRIV	25±1,46	25.50±1.40	21.70±1.75* [#]

COB6 = controle B6, HcyT= homocisteína tiolactona, HcyTB6= homocisteína tiolactona B6. TRIV= tempo de relaxamento isovolumétrico, Razão E/A= relação dos picos E, A. Valores expressos em MD ±DP de 5 animais. * vs COB6, # vs HcyT.

5.3.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS

A atividade das enzimas antioxidantes foi avaliada em eritrócitos. A atividade da SOD no grupo COB6 apresentou aumento de 40% comparada ao grupo HcyTB6. Porém, a atividade da CAT diminuiu em 50% no grupo COB6 comparada ao HcyT.

O grupo COB6 apresentou um aumento de 38% na atividade da GST comparada ao HcyTB6. Além disso, foi observado um aumento de 75 e 60% nos grupos COB6 e HcyTB6, respectivamente, comparados ao grupo HcyT (tabela 15).

Tabela 15: Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos após o tratamento com vitamina B6:

Parâmetros	COB6	HcyT	HcyTB6
SOD (U/mg prot)	13.88±2.79	8.17±1.14*	11.51±2.14
CAT (pmol/mg prot)	89±17	131±19*	72±15 [#]
GST (nmol/mg prot)	98±19	24±4*	61±17 ^{*.#}

COB6 = controle B6, HcyT= homocisteína tiolactona, HcyTB6= homocisteína tiolactona B6. SOD = superóxido dismutase, CAT = catalase, GST = glutathione s-transferase. Valores expressos em MD±DP de 5 animais. *vs COB6, # vs HcyT.

5.3.5 CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO MIOCÁRDIO

A concentração de H_2O_2 foi avaliada no tecido miocárdico e os resultados podem ser observados na figura 14. O grupo HcyT (0.93 ± 0.14) apresentou um aumento significativo de 62 e 67% comparado aos grupos COB6 (0.36 ± 0.06) e HcyTB6 (0.31 ± 0.06) respectivamente.

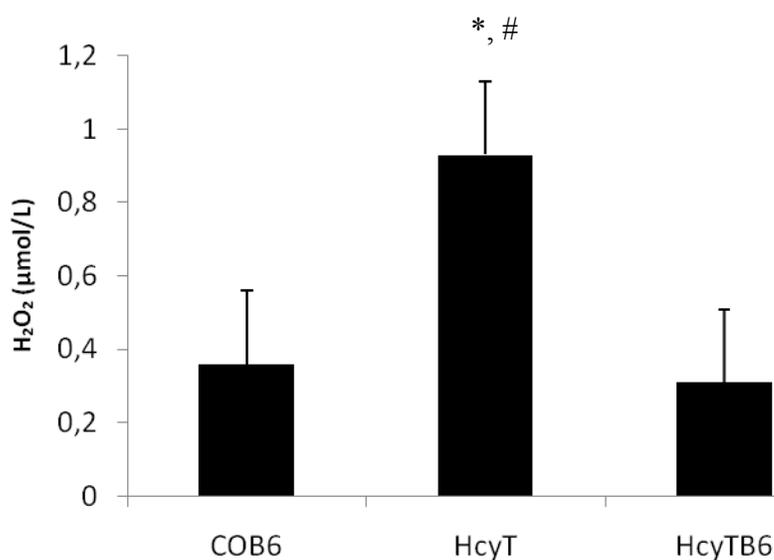


Figura 13: Concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco COB6= Controle B6, HcyT= Homocisteína tiolactona, HcyTB6= Homocisteína tiolactona B6. Valores são expressos em MD \pm DP de 4-5 animais por grupo. *vs COB6, # vs Hcy ($p < 0.05$).

5.3.6 IMUNOCONTEÚDO DO NRF₂ NO MIOCÁRDIO

O imunoconteúdo do NRF₂ foi avaliado pelo *western blot*. Foi observado aumento significativo de 54% no grupo COB6 comparado ao grupo HcyT. Não foram encontradas diferenças significativas entre os demais grupos experimentais. Os resultados são apresentados na figura 14:

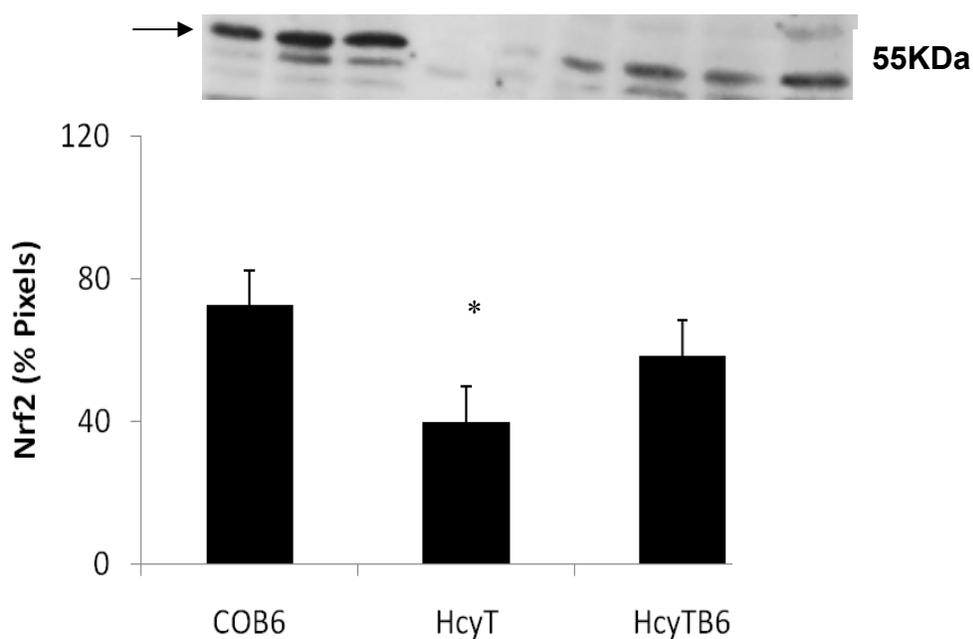


Figura 14: Imunoconteúdo do Nrf2 no tecido cardíaco após o tratamento com vitamina B6. COB6= Controle B6, HcyT= Homocisteína tiolactona, HcyTB6= Homocisteína tiolactona B6. Valores são expressos em MD \pm DP de 4- 5 animais por grupo (um gel representativo mostrando 3 bandas de cada grupo experimental). * vs COB6 (p<0,05).

5.3.7. IMUNOCONTEÚDO DA GST NO MIOCÁRDIO

O imunoconteúdo da GST foi avaliado no tecido cardíaco após o término do protocolo experimental pelo *western blot*. O grupo HcyTB6 apresentou um aumento de 51% no imunoconteúdo da GST comparado ao grupo HcyT. Não foram encontradas diferenças significativas entre os demais grupos experimentais. Os resultados são apresentados na figura 15:

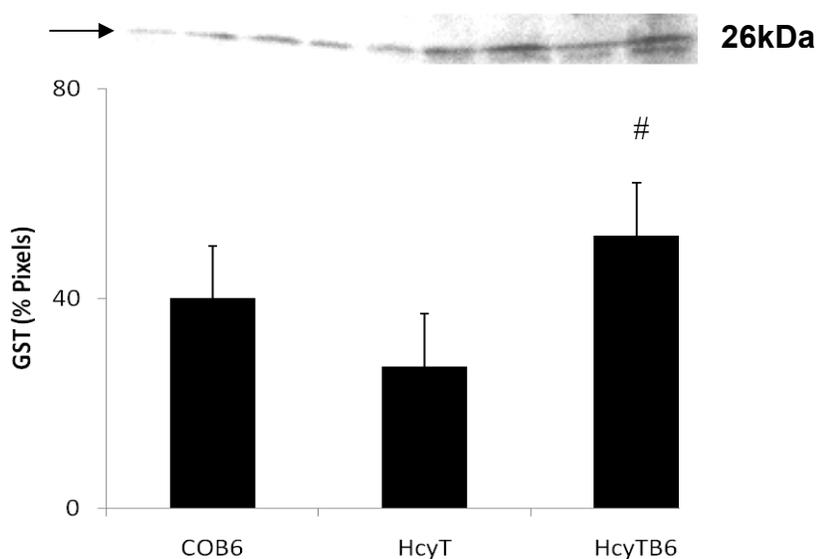


Figura 15: Imunoconteúdo da GST no tecido cardíaco avaliado por western blot após o tratamento com vitamina B6. COB6= Controle B6, HcyT= Homocisteína tiolactona, HcyTB6= Homocisteína tiolactona B6. Valores são expressos em MD \pm DP de 4- 5 animais por grupo (um gel representativo mostrando 3 bandas de cada grupo experimental). # vs HcyT. ($p < 0,05$)

6. DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1

6.1 PROTOCOLO 1

Sabemos que a Hhe moderada ($>15-30\mu\text{mol/L}$) é mais comumente encontrada na população em geral, podendo ser provocada por doenças renais, deficiências nutricionais ou variações genéticas da enzima MTHFR. Além disso, está fortemente associada às doenças cardiovasculares como: infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e tromboembolismo (Lentz, 2004; Den Heijer, 2005).

Os resultados avaliados no primeiro experimento têm como objetivo de comparar o efeito direto no miocárdio da Hhe moderada induzida por metionina ou HcyT, mediante avaliações morfofuncionais e suas associações com o estresse oxidativo.

Nossos resultados mostraram que, apesar de diferentes os tratamentos com metionina ou HcyT induzem um aumento na concentração de Hcy plasmática de igual magnitude. O tratamento com metionina foi reproduzido com base no modelo experimental de Miller e cols., 1994, utilizando dose (0.1g/kg) e forma de administração, idênticas ao utilizado por ele em seu experimento, porém realizando tratamento crônico o que diferenciou o nosso experimento do realizado pelo autor que optou por tratamento agudo. O aumento da Hcy no plasma provocado por suplementação dietética de metionina pode variar de 2-4 vezes e o tempo para que ele ocorra é a partir de 4 semanas de tratamento (Ungvari e cols., 1999; Balakumar e cols. 2009). Sugere-se que a suplementação crônica de metionina favoreça a conversão da Hcy a metionina

ou cisteína (rota de remetilação), levando assim ao aumento da concentração plasmática da Hcy (Zhang e cols. 2004).

Além disso, o tratamento com HcyT foi realizado como uma outra opção de modelo experimental para Hhe. Porém, a HcyT é um metabólito da Hcy, altamente tóxico e sua concentração plasmática é relacionada às concentrações de ácido fólico e HDL associado à enzima Hcy tiolactonase (Jakubowski,2006). A inclusão de HcyT na água de beber pode provocar aumento na concentração plasmática de Hcy já a partir de 15 dias de tratamento (Resstel e cols., 2008), podendo a severidade da Hhe variar conforme a dose de HcyT administrada.

O objetivo primordial foi avaliar inicialmente os efeitos morfofuncionais por ecocardiograma nos dois modelos experimentais e verificar suas associações com o estresse oxidativo, uma vez que essas informações são ainda esparsas na literatura internacional.

A eficácia dos modelos experimentais foi avaliada após 4 semanas de tratamento com dosagens plasmáticas de Hcy e cisteína totais. Foi observado que ambos os tratamentos propostos provocaram aumento na concentração plasmática de Hcy (>15 $\mu\text{mol/L}$), confirmando a efetividade dos modelos experimentais. Porém, não foram observadas alterações nas concentrações de cisteína plasmática total quando comparados entre si e com o grupo controle. Dessa forma, os resultados sugerem que as prováveis alterações que vierem a serem encontradas neste estudo estejam relacionadas apenas com a Hcy plasmática, já que a cisteína plasmática não demonstrou alteração neste modelo experimental.

Além disso, o tratamento com o HcyT demonstrou reduzir o colesterol plasmático total comparado ao grupo MET. Uma associação possível é com a enzima paraoxonase, enzima responsável pelo metabolismo da HcyT até Hcy no organismo que utiliza como carreador a fração HDL do colesterol (Jakubowski,2006). O tratamento com HcyT realizado no nosso estudo possivelmente possa estar aumentando a atividade dessa enzima, com isso aumentando o recrutamento de HDL e levando por fim a menor concentração de colesterol total circulante.

Em relação à função cardíaca, observamos que a FE, um índice utilizado para avaliação de função sistólica, apresentou redução no grupo HcyT comparado ao grupo CO, porém não foi diferente do grupo ME, que na verdade ficou numa situação intermediária, não sendo diferente nem do grupo CO nem do grupo HcyT. Esse dado indica prejuízo na função sistólica após o tratamento com HcyT. Nosso estudo concorda com o de Cesari e cols. (2005) que associou em pacientes hipertensos a Hhe com a redução da FE independente de histórico de doença cardiovascular. Além disso, nossos dados mostraram que o IDM, que serve como indicador do desempenho miocárdio, aumentou no grupo HcyT comparado ao CO. Tal resultado é indicativo de um maior esforço do miocárdio para realização de suas funções após a Hhe por HcyT, resultado não observado no grupo MET (Salemi, e cols. 2004)

Quanto aos parâmetros de função diastólica foi demonstrado que o TRIV e o TDE apresentaram redução significativa, enquanto a razão E/A aumentou significativamente no grupo HcyT comparado ao CO. Tais resultados sugerem que exista uma disfunção diastólica de padrão restritivo nesses animais, que pode ser resultado de uma diminuída complacência associada ao prejuízo no relaxamento. De

forma similar aos achados anteriores, o grupo MET ficou numa situação intermediária em relação à função diastólica, não sendo diferente dos grupos CO e HcyT. Em estudo anterior ao nosso, a Hhe induzida por homocistina, um dissulfeto de Hcy, aparece associada com a disfunção diastólica por aumento da fibrose e rigidez do miocárdio após avaliação mediante perfusão de coração isolado (Joseph, 2003). Ainda, Nasir e cols (2007) avaliaram em participantes do estudo Multi étnico de Aterosclerose (MESA) por meio de ressonância magnética imagens cardíacas que permitiram associar elevadas concentrações de Hcy plasmática com disfunção do ventrículo esquerdo.

Foi encontrada também associação inversa entre o dano oxidativo avaliado por quimiluminescência induzida por TBOOH e a FE, sugerindo envolvimento do dano oxidativo no prejuízo à função sistólica. Em estudo anterior utilizando animais SHR submetidos à dieta para indução de Hhe observou-se um aumento na produção de colágeno, piora da função sistólica e aumento do dano oxidativo nesses animais (Devi 2006).

Foram observadas ainda associações positivas entre relação E/A e atividade da CAT e IDM e imunoconteúdo da Cu/Zn SOD. Tais associações são sugestivas do envolvimento das EROs: H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ na gênese da disfunção cardíaca durante a Hhe, pois as enzimas antioxidantes citadas estão diretamente envolvidas com a metabolização destas EROS. O aumento da concentração de H_2O_2 no miocárdio foi relacionado em estudo anterior ao nosso com o desenvolvimento de disfunção diastólica (Wang, 2008). Além disso, a terapêutica com antioxidantes mostrou em estudo experimental eficiência para atenuar os efeitos da Hhe na piora da função diastólica e fibrose miocárdica. (Joseph, 2008).

O dano oxidativo ao tecido cardíaco apresentou aumento significativo avaliado por meio de lipoperoxidação em duas diferentes avaliações (quimiluminescência iniciada por tBOOH e TBARS) . Em acordo com nossos resultados, estudo experimental anterior observou aumento no dano oxidativo avaliado por TBARS no miocárdio (Devi 2006).

Considerando a relação da Hcy com o balanço das enzimas antioxidantes foi analisada a atividade das enzimas antioxidantes e o imunoconteúdo da CAT, SOD e GST com o objetivo de avaliar resposta enzimática nos diferentes modelos experimentais estudados.

Em relação a enzima SOD, o seu imunoconteúdo avaliado por *western blot* e atividade da enzima no grupo tratado com HcyT mostraram-se aumentadas. Já o grupo MET apresentou o aumento do imunoconteúdo em relação ao grupo controle. Estudo anterior ao nosso mostrou que no modelo de Hhe por depleção de folato ocorre um aumento da atividade da SOD no rim do grupo Hhe (Au-Yeung e cols., 2006). Sabe-se que durante a Hhe há maior geração do ânion superóxido via ativação da NADPH oxidase (Antoníades e cols., 2009) Dessa forma o aumento da atividade e imunoconteúdo da enzima SOD, que tem ação específica na dismutação sobre o $O_2^{\cdot-}$, sugere aumento na produção do $O_2^{\cdot-}$.

Além disso, o H_2O_2 formado na reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pode ser decomposto pela enzima antioxidante CAT, enzima que também apresentou aumento significativo na sua atividade no grupo HcyT. Geralmente a CAT costuma estar pouco expressa no miocárdio, portanto o seu incremento pode estar sugerindo ainda um provável aumento da concentração de peróxido no miocárdio no grupo HcyT.

Em relação ao metabolismo dos peróxidos/ hidroperóxidos podemos observar que a atividade da GPx se mantém inalterada no miocárdio, o que pode ser sugestivo de uma manutenção dos estoques de glutatona. A glutatona é um tripeptídeo que atua como substrato essencial da neutralização dos efeitos tóxicos do metabólito HcyT feita pela GST na Hhe. Sugere-se então que o aumento da GST observado no grupo HcyT comparado ao grupo CO seja estimulado pelos produtos intermediários formados durante a rota metabólica de produção da Hcy.

O sistema tiorredoxina foi avaliado pela medida da atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) que utiliza NADPH para reduzir as pontes dissulfetos da tiorredoxina, de outras proteínas e de compostos de baixo peso molecular. O sistema tiorredoxina possui função primordial na manutenção do estado redox da célula, sugere-se, então, que a enzima funcione com um sensor redox celular (Sun e cols. apud Ribeiro e cols. 2005). Nossos resultados mostraram um aumento significativo da atividade da enzima TrxR no grupo HcyT em relação ao grupo CO. Esse resultado pode indicar uma participação do sistema tiorredoxina no metabolismo das ERO na tentativa de manter o equilíbrio após o tratamento a base HcyT.

Os resultados encontrados nesse experimento indicam um efeito tóxico da Hhe induzida por HcyT diretamente no miocárdio, levando à disfunção cardíaca e ao conseqüente aumento do dano oxidativo, o que não acontece com o modelo de MET. Além disso, é possível observar um aumento adaptativo da atividade das enzimas antioxidantes. Isso sugere que não apenas a concentração aumentada de Hcy plasmática, o que se repete nos dois modelos, mas também o incremento de metabólitos da Hcy com efeitos tóxicos ao organismo pode determinar a ativação de

diferentes mecanismos de lesão, como o aumento do dano oxidativo seguido das respostas adaptativas das enzimas antioxidantes. .

6.2. Protocolo 2

O segundo experimento teve como objetivo analisar a resposta hemodinâmica, o controle autonômico, a sensibilidade barorreflexa e as associações com o desbalanço redox avaliado em eritrócitos na Hhe induzida por metionina ou HcyT.

Em relação a resposta hemodinâmica, podemos observar que os nossos resultados não demonstraram diferenças entre as avaliações hemodinâmicas em ambos os grupos experimentais. Resstel e cols. (2008) encontraram aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca de ratos (FC) após de 15 dias de tratamento com D,L HcyT (Resstel, 2008).

Apesar de não ter apresentado alteração na FC a análise espectral apontou uma redução significativa na avaliação da variabilidade da FC no grupo HcyT mostrando um prejuízo no controle autonômico sobre o coração. Além da redução da variabilidade total, houve também um aumento significativo da componente BF normalizada, relacionada à modulação simpática cardíaca. Tal alteração expressa um aumento em favor da modulação simpática sobre a vagal, quantificada pela relação BF/AF, que caracteriza o balanço simpato-vagal.

A análise da variabilidade da PAS não mostrou alterações significativas no valor total, mas mostrou o componente de BF aumentado nos grupos MET e HcyT. O componente BF da variabilidade da PAS está relacionado à modulação simpática

vascular. Portanto tais resultados sugerem que o grupo MET apresenta uma alteração na ação do controle autonômico sobre os vasos caracterizado por um aumento da modulação simpática.

O grupo HcyT apresentou alterações tanto na modulação cardíaca quanto vascular. A variabilidade da FC se apresentou reduzida com um deslocamento do balanço simpato-vagal, em favor da modulação simpática sobre o coração. Além disso, o grupo HcyT também apresentou aumento da modulação simpática vascular mostrando que houve uma alteração na regulação neural da função tanto cardíaca quanto sobre os vasos.

Adicionalmente, vale à pena ressaltar que o controle da PA envolve dois mecanismos regulatórios principais: o controle em longo prazo e o controle momento a momento (controle em curto prazo). A sensibilidade baroreflexa é considerada o principal mecanismo para o controle em curto prazo da PA. Ambos os tratamentos utilizados em nosso protocolo provocaram redução da resposta taquicárdica e aumento da resposta bradicárdica comparados ao controle. Estudo anterior com pacientes diabéticos demonstrou que altas concentrações de Hcy estavam relacionadas à resistência a insulina e à redução do barorreflexo (Anan e cols. 2007). O mecanismo proposto para a redução sensibilidade do barorreflexo nos dois protocolos experimentais pode, portanto, ser associada ao aumento da modulação simpática.

Existem dados na literatura mostrando a relação entre as alterações da modulação simpática e a geração das ERO. Bertagnolli e colaboradores (2008) demonstraram uma correlação entre estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca e atividade simpática na condição de hipertrofia fisiológica induzida por exercício. Seus resultados

demonstraram uma correlação entre a peroxidação lipídica, hipertrofia e norepinefrina (NE), provavelmente devido à geração EROS, à ação da NE, ao aumento sistêmico da biodisponibilidade de óxido nítrico e redução da pressão arterial. Além disso, a atividade simpática aumentada, por si só, já está fortemente relacionada ao EO cardíaco (Neri e cols., 2007).

Dessa forma, a determinação de parâmetros de EO sistêmico por meio de metodologias padronizadas, pode contribuir para definir o papel do EO em diferentes patologias, (Repetto, 1999; Gutierrez, 2006), sobretudo aquelas caracterizadas por um aumento da ativação simpática.

A concentração de carbonilas avalia o dano oxidativo às proteínas e é considerado um biomarcador de EO. Nossos resultados mostraram que a concentração plasmática das carbonilas reduziu no grupo HcyT comparado ao CO e ao MET. Porém, no grupo MET, foi observado aumento significativo comparado aos grupos CO e ao HcyT. A menor concentração de carbonilas no grupo HcyT sugere uma capacidade regenerativa das proteínas durante o processo de auto-oxidação da Hcy (Raijmakers, 2003). Outro mecanismo proposto para esse resultado seria a mobilização adequada de antioxidantes de algum outro órgão como uma resposta adaptativa ao possível desbalanço redox. Já o grupo tratado com MET demonstrou aumento da concentração de carbonilas. .o que pode ser efeito direto ou indireto de longo prazo da MET (Dalle-Donne e cols., 2003)

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, observamos uma redução na atividade da GST no grupo HcyT comparado ao CO e ao MET. A redução da atividade da GST pode estar ocorrendo por inibição oxidativa, processo que ocorre quando há

intensa formação de EROS e provável situação de EO. Já está bem definido na literatura que a Hcy tem como órgão alvo principal o vaso, o que poderia desencadear todo esse processo. (Palace e cols., 1999)

Além disso, a atividade da SOD no sangue apresentou redução no grupo HcyT comparado ao MET. Estudo prévio com tratamento crônico utilizando homocisteína como indutor de Hhe mostrou aumento da atividade da SOD, como resposta adaptativa ao estresse provocado pelo modelo experimental (Matté e cols., 2008). Porém, um estudo realizado em pacientes com doença coronariana avaliando a atividade da SOD, encontrou redução na sua atividade e correlação negativa desse valor com a concentração plasmática da Hcy. Além disso, esse resultado foi associado a um mau prognóstico cardiovascular (Kerkeni, 2008). A redução da concentração sistêmica da enzima SOD pode estar associada a uma aumentada produção O_2^- por tratamento crônico com HcyT, pois essa relação entre o aumento da concentração plasmática de Hcy e o aumento da produção do O_2^- já foi vista anteriormente (Vathsala e cols., 2007).

Nós observamos ainda uma associação positiva entre o componente de AF da FC e a atividade da SOD nos eritrócitos, que pode sugerir uma relação direta entre a atividade vagal e a produção de O_2^- , o qual é dismutado pela enzima SOD.

Nossos resultados evidenciam que o tratamento com HcyT atua mais expressivamente sobre a modulação autonômica cardíaca, alterando o balanço simpátovagal sobre o coração em favor do simpático. Tal alteração autonômica acompanha alterações no balanço oxidativo, evidenciadas pela correlação existente entre a atividade das enzimas antioxidantes e a modulação vagal cardíaca. Por outro lado, o tratamento com MET atua diretamente sobre o controle autonômico vascular,

modificando a modulação simpática exercida sobre os vasos. A alteração no perfil oxidativo vista no grupo HcyT não foi reproduzida no grupo MET indicando que, neste modelo, a alteração sobre a modulação simpática sobre os vasos não está relacionada ao desbalanço oxidativo. Provavelmente, a ausência de alterações sistêmicas expressivas justifique o fato de não haver alterações na ação do controle autonômico sobre o coração.

6.3. EXPERIMENTO 2

Alguns componentes dietéticos são de importância fundamental para o metabolismo da Hcy. Dentre eles, pode-se destacar a vitamina B6 (piridoxal fosfato) que participa da rota de transsulfuração da Hcy para cisteína e posteriormente para cistationa, tendo como produto final a glutathiona, um importante antioxidante não enzimático. . Independente disso, a vitamina B6 ainda aparece associada a processos metabólicos dos ácidos graxos poliinsaturados (Mc Nulty, 2008) e a redução da peroxidação lipídica após o tratamento crônico com a vitamina (Kannan, 2003). A vitamina B6 é solúvel em água, participa como cofator em numerosas reações enzimáticas do metabolismo dos aminoácidos. Além disso, sua ação antioxidante é comparada a ação *quencher* semelhante às vitaminas C e E (Endo,2006).

O objetivo com a realização desse experimento foi verificar o efeito da suplementação de vitamina B6 após o estabelecimento da Hhe moderada sobre: concentração plasmática de Hcy e cisteína, parâmetros de morfofuncionalidade cardíaca e associação com o balanço redox.

De acordo com a recomendação nutricional para dietas experimentais a quantidade de vitamina B6 oferecida pela dieta é de 6mg/kg (Suckow e cols., 2006). Na maioria dos estudos experimentais, em que a suplementação de vitamina B6 é utilizada a dose oscila entre 50-100 mg/kg. Sendo assim, nesse estudo optou-se por testar o efeito de uma dose 10 vezes maior que o requerimento dietético para os animais (60mg/kg), 30 dias após o início tratamento com HcyT e oferecida concomitante ao metabólito indutor de Hhe por igual período.

Nossos resultados evidenciaram uma redução na concentração plasmática da Hcy total no grupo HcyT tratado com a vitamina B6. Um estudo anterior ao nosso comparou o efeito de dietas oferecendo aporte de vitamina B6 adequado e deficiente nesta vitamina sobre a concentração plasmática de Hcy de ratos. Foi observado nesse estudo que o aumento da concentração plasmática de Hcy nos animais deficientes de vitamina B6 era de aproximadamente 10 vezes (Cabrini, 2005). O mecanismo proposto para a vitamina B6 atuar modificando a concentração de Hcy plasmática é mediante sua participação na rota de transsulfuração como cofator da enzima C β S.

Ao avaliarmos a morfometria cardíaca pelo ecocardiograma foi possível observar redução significativa na PARcorr, e ERP no grupo HcyTB6 comparado ao HcyT. Além disso, a MVEcorr e o tamanho da cavidade do VE foi significativamente maior no grupo HcyTB6 quando comparada ao HcyT. Provavelmente esse efeito na morfometria cardíaca esteja relacionado ao fato do tratamento ser iniciado após o estabelecimento da Hhe. Como visto anteriormente, o tratamento com vitaminas é discutível ou até contra-indicado em muitos trials realizados com pacientes com quadro clínico pré-estabelecido (Maron e cols., 2009).

Quanto função sistólica, um dos parâmetros avaliados foi a FE, que após a suplementação com vitamina B6 aumentou 10% no grupo HcyTB6 comparado ao grupo HcyT. Já em relação à função diastólica, a razão E/A apresentou aumento no grupo HcyT em relação ao grupo COB6. No entanto, após o grupo HcyTB6 não demonstrou diferença quando comparado aos demais grupos.

A função global do miocárdio avaliada pelo IDM mostrou significativa redução em ambos os grupos tratados com vitamina B6 (COB6 e HcyTB6) comparado ao HcyT, sugerindo um menor esforço do miocárdio para seu desempenho após o tratamento com vitamina B6. O IDM foi identificado como um índice que reflete a performance do miocárdio em animais pequenos (Salemi e cols., 2004). Tais resultados são sugestivos de o tratamento com vitamina B6, mesmo tendo sido iniciado posterior ao estabelecimento da Hhe, foi eficiente na melhora a função sistólica, diastólica e global cardíaca.

Quanto às defesas antioxidantes enzimáticas nos eritrócitos foram avaliadas as atividades das enzimas SOD, GST e CAT. A atividade da SOD apresentou aumento significativo no grupo HcyT comparado ao COB6, o que sugere uma produção aumentada de ânion superóxido no grupo HcyT. Como já foi discutido nos protocolos anteriores, o tratamento crônico com HcyT resulta em produção aumentada de $O_2^{\cdot-}$, por aumentar a ativação da NADPH oxidase (Vathsala e cols., 2007).

Já a atividade da enzima GST demonstrou um aumento significativo nos grupos COB6 e HcyTB6 em relação ao grupo HcyT. Um estudo anterior demonstrou efeito protetor do pré-tratamento com vitamina B6 como antioxidante hepático após o tratamento com cromo como indutor de EO (Anand, 2005). O resultado demonstrado

nesse estudo reflete a capacidade da vitamina B6 atuar na metabolização dos resíduos de cisteína, minimizando, possivelmente, assim os processos oxidativo.

Os grupos COB6 e HcyTB6 apresentaram redução significativa na atividade da enzima CAT comparada ao grupo HcyT. Esse resultado sugere que a ação antioxidante *scavenger* da vitamina B6 possa estar contribuindo para decomposição do peróxido de hidrogênio, substrato principal da CAT, resultando em menor necessidade de ativação enzimática da CAT.

Além disso, o imunocontéudo do Nrf2, um fator de transcrição que regula a expressão gênica de enzimas antioxidantes foi avaliado em homogenizado de tecido cardíaco. O grupo HcyT apresentou uma redução significativa do imunocontéudo do Nrf2 no grupo COB6 comparado ao grupo HcyT. Nosso resultado indica uma redução do imunocontéudo de Nrf2 no citoplasma após tratamento com HcyT Sabendo-se que trata-se de um fator que quando ativado encontra-se no núcleo, podemos sugerir que essa seja a provável justificativa para a redução citoplasmática.

A enzima GST é conhecida por atuar como um detoxificador quando em presença de compostos xenobióticos. Ao avaliarmos o imunocontéudo da enzima GST no tecido cardíaco, encontramos uma redução significativo no grupo HcyT comparado ao HcyTB6, sugerindo uma depleção da GST após o tratamento com HcyT,. A redução de GST, pode ser explicada pela alta necessidade da enzima para metabolização dos resíduos de cisteína após o tratamento com HcyT.

Foi observado também que a concentração do H₂O₂ no miocárdio aumento significativamente no grupo HcyT em relação aos grupos tratados com vitamina B6 (COB6 e HcyB6). De acordo com Chern e cols., 2001, o modelo de Hhe por deficiência

de folato é responsável pela aceleração da produção de H_2O_2 , sugerindo que a Hcy atua como mediadora na produção aumentada deste. Outro estudo realizado anteriormente, com cultura de monócitos, concluiu que a vitamina B6 atua prevenção do dano oxidativo gerado por H_2O_2 , sugerindo que a vitamina tenha ação como *scavenger* de radicais livres (Kannan, 2004).

É importante citar ainda, que o aumento na concentração de H_2O_2 encontrado no nosso trabalho pode estar relacionado com o aumento da ativação de Nrf₂ (Umemura e cols., 2008). Isso reforça a hipótese que o imunociteúdo do Nrf₂ possa estar reduzido no citoplasma, por já estar ativado e aumentado no núcleo.

O tratamento com vitamina B6 mostrou reduzir a concentração de Hcy no plasma e contribuir para a melhora da função cardíaca de ratos com Hhe. O mecanismo proposto para tais efeitos parece estar relacionado com a participação da vitamina B6 na rota de transsulfuração, metabolizando os resíduos de cisteína circulantes. Além disso, os resultados demonstrados relacionados aos efeitos da vitamina B6 como antioxidante do tipo *scavenger* também podem ser associados aos efeitos observados na função cardiovascular.

Com a realização desses experimentos podemos demonstrar que o efeito deletério da Hcy está relacionado ao seu metabolismo *per se* e a toxicidade dos compostos intermediários desse e não simplesmente a aumento plasmático na sua concentração. Além disso, o efeito antioxidante da vitamina B6 demonstrou ser importante na recuperação dos prejuízos causados pela HcyT no miocárdio.

7. CONCLUSÕES

1) O tratamento com HcyT, assim como o MET mostrou eficiência para induzir o modelo experimental de Hhe. No entanto, apenas o tratamento com HcyT demonstrou efeitos consistentes em parâmetros funcionais cardiovasculares e esses estiveram associados ao desbalanço redox no miocárdio.

2) A administração de HcyT demonstrou ainda piora na variabilidade da FC e na modulação simpática vascular associadas a redução da atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos. Já o modelo com metionina, apesar de provocar igual aumento na concentração de Hcy plasmática demonstrou efeito apenas sobre a modulação simpática vascular. Sendo assim, nossos resultados permitem inferir que o tratamento com HcyT associa-se as alterações no controle autonômico e aumentada produção de ERO.

3) O tratamento com vitamina B6 isolada induz melhora na morfometria e função cardíaca, além disso, o sistema de defesa antioxidante também demonstrou ser beneficiado pelo tratamento com vitamina B6. Esse resultado sugere um efeito cárdio-protetor da vitamina B6 na Hhe.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados encontrados nesse estudo, surgiram novos questionamentos sobre os efeitos da Hhe no sistema cardiovascular. Desse modo sugere-se a continuação do estudo com o modelo experimental de Hhe induzida por HcyT com os seguintes objetivos:

- estudar o efeito do pré-tratamento com vitamina B6 nos parâmetros de morfofuncionalidade cardíaca e balanço redox.

- avaliar o efeito do tratamento com vitamina B6 após o estabelecimento da Hhe na variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial e suas associações com o balanço redox.

- verificar o envolvimento de moléculas relacionadas a apoptose, como fator indutor da disfunção cardíaca observada durante a Hhe.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 1984, 121-126.

ANDERSSON, A.; HULTBERG, B.; LINDGREN, A. Redox status of plasma homocysteine and other plasma thiols in stroke patients. *Atherosclerosis*, 2000, 151:535-539.

ANTONÍADES C, ANTONOPOULOS AS, TOUSOLIS D, MARINOU K, STEFANADIS C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *European Heart Journal*, 2009, Jan 30 (1) 6-15.

BALAKUMAR P., ROHILLA A., SINGH G., SINGH K, SINGH M. Modulation of cardioprotective effect of ischemic pre and postconditioning in the hyperhomocysteinemic rat heart. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009, 31(2): 71-9.

BARP J, ARAÚJO AS, FERNANDES TR, RIGATTO KV, LLESUY S, BELLÓ-KLEIN A, SINGAL P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 2002, Sep (35) 9:1075-81

BOVERIS, A.; LLESUY, S.F. & FRAGA, C.G. *Increased Liver Chemiluminescence in Tumor-Bearing Mice. Free Radical Biology Medicine*, 1985, 1: 131-38.

BROBERG CS, PANTELY GA, BARBER BJ, e cols. Validation of the myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2003; 16:814-823.

BUEGE, J. A. & AUST, S. D. *Microsomal Lipid Peroxidation. Methods Enzymology*, 1978, 52: 302-09.

CASTRO, R., RIVERA, I., BLOM, H.J., JAKOBS, C., TAVARES DE ALMEIDA, I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: An overview. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006, v.29:3-20.

CHERN, C.L., HUANG, R.F., CHEN, Y.H., CHENG, J.T., LIU, T.Z. Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NFkappaB in human Hep G2 cells. *Biomed. Pharmacother.*,2001, 55(8), 434-42.

CUADRADO,A., MORENO-MURCIANO,P., PEDRAZA-CHAVERRI, J. The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(3):319-29.

DALLE-DONE I., GIUSTARINI,D., COLOMBO,R., ROSSI, R., MILZANI, A., Protein carbonylation in human diseases. *Trends Molecular Medicine*, 2003, 9: 169-176.

DAYAL S & LENTZ SR. Murine Models of Hyperhomocysteinemia and their Vascular Phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008, 28, 1596-1605.

DRABKIN DL, AUSTIN J. Spectrophotometric studies: preparation from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulfhaemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 1935, 112, 51-57.

DEVEREUX, R.B. & Reichek, N. Echocardiographic determinations of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation*.1977; 55:613-618.

DEVEREUX, R.B. Detection of left ventricular hypertrophy by M-mode echocardiography. Anatomic validation, standardization and comparison to other methods. *Hypertension*. 1987;9, Suppl.II:II-19-II-26.

DIMITROVA, K.R.; DE GROOT, K.W.; MYERS, A.K.; KIM, Y.D. Estradiol and homocysteine. *Cardiovascular Research*, 2002, 53:577-588.

DEL MAESTRO, R.F.; *An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology*. *Acta Physiology Scand*. 1980, 40:153-68.

DE OLIVEIRA AC, D'ALMEIDA V, HIPÓLIDE DC, NOBREGA JN, TUFIK S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80 (3):193-7

FINKELSTEIN JD. Methionine metabolism in mammals. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 1990, 1, 228-37.

FLOHÉ L, GUNZLER, W A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984,105, 14–121.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S. & BOVERIS, A. Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence: an Assay for Oxidative Stress in Biopsies of Heart, Liver, and Muscle. *Free Radical Biology & Medicine*; 1991, 10: 93-100.

HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBI, W.B. Glutathione S-transferases. *The Journal of Biology Chemistry*, 1974, 249(22): 7130-39.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 1992, 59 (5); 1629-23.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals and Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2007, New York.

HERMANN M, TABAN-SHOMAL O, HUBNER U, BOHM M, HERMANN W. A review of homocysteine heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 2006: 571-576.

HOLMEGREN, A; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and Thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 1995, 252: 199-208.

ISHISE, H., ASANOI, H., ISHIZAKA, S., JOHO, S., KAMEYAMA, T., UMENO, K., INOUE H. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *Journal of Apply Physiology*, 1998, 84: 1234-1241.

JAKUBOWSKI, H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *Journal of Nutrition*, 2006, 136: 1741S-1749S.

JIN L, CALDWELL T, LI-MASTERS T & CALDWELL RW. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J Physiology Pharmacology*. 2007, 58, 2, 191-206.

KANNAN K., JAIN SK. Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential and lipid peroxidation in H₂O₂- treated U-937 monocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 36 (4), 423-8.

KERKENI, M.F., ADDED, F., BEN FARHAT, M., MILED, A., TRIVIN, F., MAAROUFI, K. Hyperhomocysteinaemia and parameters of antioxidative defence in Tunisian patients with coronary heart disease. *Ann Clin Biochem*, 2008, 45 (Pt2): 193-8.

KIM, Y.C., YAMAGUCHI, Y., KONDO, N., MASUTANI, H., YODOI, J. Thioredoxin – dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene*, 2003, 22, 1860-1865.

KLEIN D, KERN RM, SOKOL RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochemistry Mollecular Biology*, 1995, 36, 1.

KUNTZ, A.N.; DAVIOUD-CHARVET, E., SAYED, A.A.; CALIF, L.L.; DESSOLIN J.; ARNER, E.S.; WILLIAN, D.L. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni* an essential parasite enzyme and key drug target. *PLoS Medicine*, 4 (6) e 206, 2007: 1071-1086.

LENTZ, S.R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 2005; 3(8): 1646-54.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L. & RANDALL R. J. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. *Journal of Biology Chemistry*. , 1951, 193: 265-67.

LUBOS E.; LOSCALZO J.; HANDY DE. HOMOCYSTEINE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE-1. *Antioxidant Redox Signalling*, 2007, Nov; 9(11):1923-40.

MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG,C. *Glutathione Transferase*. *Methods in Enzymology*,1981, 77:231-35.

MARON, B.A. & LOSCALZO, J. The treatment of Hyperhomocysteinemia. *Annu Rev Med* 2009, 60: 39-54.

MARKLUND, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Ranton. CRC Press. 1985, 243-47.

MATTÉ,C; MACKEDANZ V.; STEFANELLO, F.M., SCHERER, E.B.S., ANDREAZZA, A.C.; ZANOTTO, C.; MORO, A.M., GARCIA, S.C.; GONÇALVES, C.A.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; WYSE, A.T.S. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increased DNA damage in brain and blood of rats: Protective effects of folic acid. *Neurochemistry International* ,2009, 54(1):7-13.

McCULLY KS. Vascular Pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *American Journal of Pathology*, 56, 111-128, 1969.

MENEGUINI, R. *A Toxicidade do Oxigênio*. *Ciência Hoje*, 1987, 28 (5).

MISRA, H.P. & FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biology Chemistry*, 1972, 247: 3170-75.

MITTAL, C.K., MURAD, F. Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Research.*, 1977, 3(6):381-91.

MITTAL, C.K., MURAD, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3'5' –monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 1977, 74(10): 4360-4.

MONTANO, N.; PORTA, A.; COGLIATI, C., CONSTANTINO, G., TOBALDINI, E.; CASALI, K.R.; IELLAMO, F. Heart rate explored in the frequency domain : A tool to investigate the link between heart and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2008, 33: 71-80.

MUDD SH, SKOVBY F, LEVY HL, PETTIGREW KD, WILCKEN B, PYERITZ RE, ANDRIA G, BOERS GH, BROMBERG IL, CERONE R e cols. The Natural History of Homocystinuria Due to Cystathionine B-Synthase Deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 1985, 37, 1-31.

MUNTZEL, M.S., JOSEPH, T., ONWUMERE, O. Acute homocysteine administration does not elevation sympathetic nerve activity in rats. *Atherosclerosis*, 2006, 184(2):290-4.

NERI, M., CERRETANI, D. FIASCHI AI, LAGHI PF, LAZZERINI PE, MAFFIONE AB, MICHELI L, BRUNI G, NENCINI C, GIORGI G, D'ERRICO S, FIORE C, POMARA C, RIEZZO I, TURILLAZZI E, FINESCHI V. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2007, 11:156-70.

NORDBERG, J & ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biological Medicine*, 2001, 31 (11): 1287-312.

PALACE, V.P., HILL, M.F., FARAHMAND, F., SINGAL, P.K. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. *Circulation*, 1999, 99(1): 121-126.

PAPATHEODOROU L & WEISS N. Vascular Oxidant Stress and Inflammation in Hyperhomocysteinemia. *Antioxidants Redox Signaling*, 2007, 9: 1941-1958.

PERNA, A.F.; INGROSSO, D.& SANTO, N.G.D. Homocysteine and Oxidative Stress. *Amino Acids*, 2003, 25:409-417.

PERRY, D.J. Hyperhomocysteinemia. *Baillière's Best Practice and Research. Clinical Haematology*. 1999, 12, 3: 451-477.

PAWLUSH D.G., MOORE R.L., MUSCH T.I. & DAVIDSON W.R. Jr. Echocardiographic evaluation of size, function and mass of normal and hypertrophied rat ventricles *Journal of Applied Physiology*. 1993; 74(5): 2589-2605.

PICK E, KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, 1980, 38:161-70.

PÉRON, J.M.R.; LÓPEZ, J.R.M. & LÓPEZ, Y.T. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana Medicina Militar*, 2001, 30(1); 36-44.

REPETTO, M.G.; REIDES, C.G.; EVELSON, P.; KOHAN, S.; de LUSTIG, E.S. & LLESUY, S.F. Peripheral Markers of Oxidative Stress in Probable Alzheimer Patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 1999, 29; 643-49.

RESSTEL, L.B.M.; ANDRADE, C.R.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; OLIVEIRA, A.M. & CORRÊA, F.M.A. Hyperhomocysteinaemia-induced cardiovascular changes in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2008, 35:8; 1-8.

REZNICK A Z, PACKER L. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1994, 233: 357-363.

ROBIN S, COURDEROT-MASUYER C, NICOD L, JACQUESON A, RICHERT L, BERTHELOT A. Opposite effect of a methionine – supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal Nutrition Biochemistry*, February, 2004, 15: 80-9.

SALEMI, V.M., PIRES, M.D., CESTARI, I.N., CESTARI, I.A., PICARD, M.H., LEINER, A.A., MADY, C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artif Organs*, 2004, 28 (4):332-7.

SAHN DJ, DEMARIA A, KISSLO J, WEYMAN A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978; 58:1072-1083.

SAÍNZ, C.M., MUÑOZ, C.Z., MONTEAGUDO, G-Q. A. Errores del metabolismo : Enfermedades lisosomales. Revista Cubana de Pediatría, 2002, v.74, 1: 68-72.

SEDDON, M., LOOI, Y.H., SHAH, A.M. Oxidative stress and redox signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart, 2007, 93 (8), 903-7.

SUCKOW M.A., WEISBROTH S.H., FRANKLIN C.L. The laboratory rat. American College of Laboratory, Elsevier, 2006. Second edition.

UMEMURA, K., ITOH, T., HAMADA, N., FUJITA, Y., AKAO, Y., NOZAWA, Y., MATSUURA, N., IINUMA, M., ITO, M. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂- induced Nrf2/ARE activation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 368: 948-954.

UNGVARI Z., PACHER P., RISCHÁK K., SZOLLÁR L., KOLLER A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology, 1999, 19 (8): 1899-904.

WAKABAYASHI N, DINKOVA-KOSTOVA, A.T., HOLTZCLAW, W.D., KANG, M.I., KOBAYASHI, A, YAMAMOTO, M, KENSLER, T.W., TALAY, P. Protection against electrophiles and oxidant stress by induction of phase 2 response : fate of cysteines of the keap1 sensor modified by inducers. Proceeding National Academy Sciences of USA, 2004, 101: 2040-2045.

WATSON LE, SHETH M, DENYER R, DOSTAL DE. Baseline Echocardiographic values for adult male rats. Journal of the American Society of Echocardiography. 2004; 17:161-167.

WHITE, A.A., CRAWFORD, K.M., PATT, C.S., LAD, P.J. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *Journal of Biology and Chemistry*, 1976, 251(23):7304-12.

WIERZBICKI AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes Vascular Disease Research*, 2007, 4: 143-9.

WILCKEN, D.E.L.& WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease a possible role of methionine metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 1976, 57:1979-82.

ZHANG, D.D., HANNINK, M. Distinct cysteine residues in keap1 are required for keap-1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23 (22): 8137-51.

ANEXO 1

Comprovante de submissão do artigo

Dear Dr. Irigoyen,

Your submission to Journal of Cardiovascular Pharmacology entitled "Homocysteine thiolactone induces cardiac dysfunction: role of oxidative stress." has been assigned the following manuscript number: JCVF-09-225.

If you have not already done so, please have all authors sign the journal's copyright transfer form and fax it to 215 521 8488. Please include the manuscript number (JCVF-09-225) on the form. A

copy of the form can be obtained by clicking the link below:

[Copyright Transfer Form\(PDF\)](#)

You may check on the progress of your manuscript at any time by logging on to Editorial Manager as an author.

Thank you for submitting your work to Journal of Cardiovascular Pharmacology.

Kind Regards,

Editorial Office Staff

Journal of Cardiovascular Pharmacology

