

Plano de trabalho do bolsista



Universidade Federal do Cariri

**Título do Projeto :**

Avaliação da Proteção Cardíaca contra Isquemia e Reperusão por Restrição Calórica  
em Ratos

## **1.Objetivos Gerais**

Construção do aparelho de perfusão cardíaca para ser usado na graduação do curso de medicina.

## **2.Objetivos específicos**

- Determinar a proteção de corações submetidos a isquemia e reperfusão com e sem restrição calórica através dos níveis de lactato desidrogenase e creatina kinase;
- Determinar o impacto do fechamento do canal mitocondrial de potássio na viabilidade dos corações em restrição calórica submetidos ao pré-condicionamento;
- Avaliar os níveis de glutathione, proteínas sulfidrilas e proteínas carbonilas em corações submetidos ao pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão em corações de ratos que foram submetidos a restrição calórica;
- Investigar a atividade das enzimas antioxidantes após a reperfusão em corações de ratos que foram submetidos a restrição calórica;
  - Avaliar a produção de EROs por corações em restrição calórica antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão com ou sem tratamento com inibidores do mitoKATP;
  - Avaliar a atividade do mitoKATP em corações de ratos em restrição calórica antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão;
  - Estudar o impacto da restrição calórica sobre a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzido por cálcio antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão.
- Criação de um aparelho de perfusão cardíaca para uso em pesquisa e na graduação de medicina.

## **3.Metodologia**

### **3.1 Indução de Restrição Calórica**

Ratos Wistar machos (12 semanas de idade) serão alimentados com uma dieta padrão de roedores ad libitum durante 2 semanas. A ingestão calórica média será calculada a partir da ingestão diária destas 2 semanas. Em seguida, esses ratos (com 8 semanas de idade) serão divididos aleatoriamente em grupos: (1) Grupo com ingestão

ad libitum (Grupo AL), Grupo alimentado com 60% do consumo médio de calorias (calculadas a partir das 2 primeiras semanas) durante as 4 semanas adicionais do experimento (Grupo RC) .

### **3.2 Indução do pré-condicionamento, isquemia e reperfusão**

Os ratos serão sacrificados após anestesia com 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Subsequentemente, o coração será removido e a aorta será rapidamente canulada para iniciar a perfusão usando o sistema de perfusão cardíaca isolada de Langendorff. Os corações serão perfundidos com tampão Krebs-Henseleit gaseificado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> contendo (em mM): NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,25, glicose 10, and HEPES 10, pH 7,4, a 37°C. Os corações isquêmicos serão submetidos a 35 minutos de perfusão antes da isquemia longa de 40 minutos, enquanto corações preconditionados serão submetidos a 15 minutos de perfusão e dois ciclos de 5 minutos de isquemia global separados cada um por 5 minutos de reperfusão. Um balão conectado a um transdutor de pressão será inserido no ventrículo esquerdo através da remoção do átrio esquerdo e inflado com água destilada com a finalidade de monitorar a função hemodinâmica dos corações de rato.

### **3.3 Avaliação da Atividade de lactato desidrogenase e creatina kinase**

A avaliação dessas duas enzimas durante o pré-condicionamento, isquemia e reperfusão será conduzido usando kits disponíveis comercialmente.

### **3.4 Isolamento de Mitocôndrias**

O tecido cardíaco será submetido a ruptura física com homogeneizador para provocar a lise celular em tampão contendo: 300 mM sacarose, 10 mM de tampão Hepes, pH 7.2, and 1 mM EGTA. A precipitação do núcleo e resíduos celulares será promovida através de uma centrifugação com baixa rotação ( $\gg$  600 g). Após esta primeira centrifugação o sobrenadante é congelado em alíquotas e servirá para dosagens enzimáticas, por outro lado o pellet será ressuspensionado em 1 mL do tampão de homogeneização e servirá para dosagens de proteínas carboniladas. As mitocôndrias serão então separadas do sobrenadante através de centrifugações com maior rotação ( $\gg$

10 000 x g), e lavadas até a obtenção de uma suspensão homogênea. As mitocôndrias serão ressuspensas no tampão de isolamento em quantidade mínima (~100 uL) usada imediatamente (dentro de 1 hora) para experimentos de avaliação da abertura do mitoKATP ou estocada em -20 °C para posterior análise da susceptibilidade à oxidação com  $\text{Fe}^{2+}$  e dosagem de proteínas.

### **3.5 Avaliação da Atividade do mitoKATP**

A atividade do mitoKATP será quantificada pela medida do espalhamento de luz devido à absorção de  $\text{K}^+$  em suspensões mitocondriais. A entrada de  $\text{K}^+$  causa inchamento que diminui o espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial e será acompanhado ao longo do tempo em 520 nm usando-se um espectrofotômetro, em temperatura ambiente, com agitação suave.

### **3.6 Avaliação da Abertura do Poro de Transição de Permeabilidade.**

Alterações de volume mitocondrial serão acompanhadas através da quantificação do espalhamento de luz da suspensão a 520 nm usando espectrofotômetro. A indução da abertura do poro de transição de permeabilidade será por adição de cálcio (200 micromolar/mg de proteína).

### **3.7 Quantificação das Espécies Reativas de Oxigênio**

Fragmentos de ventrículo esquerdo (50 mg) serão incubados em tampão krebs contendo em mM: NaCl 118,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2, KCl 4.7,  $\text{MgSO}_4$  1,2,  $\text{CaCl}_2$  1,25, glicose 10, e HEPES 10, pH 7,4 a 37°C. Ao tampão serão adicionados peroxidase de raiz forte (2 U/mL) e amplex red (100 micromolar final). Ao fim de incubação em 37°C por 30 minutos a mistura é centrifugada em 12000 x g por 3 minutos e o sobrenadante é lido em uma cubeta de vidro em 560 nm. O cálculo da concentração é feito através da construção de uma curva padrão usando concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

### **3.8 Quantificação da atividade de glutational peroxidase**

A atividade de glutathione peroxidase será acompanhada pelo desaparecimento do NADPH. Esta enzima utiliza glutathione reduzida (GSH) para degradar um peróxido orgânico, peróxido de cumeno, gerando glutathione oxidada (GSSG). A reação acoplada a atividade de glutathione reductase consome NADPH (Ext. Molar=  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm. Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático será realizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/ml de GR purificada de levedura. A reação é iniciada pela adição de 1 mM de hidróxido de cumeno.

### **3.9 Quantificação da atividade de superóxido dismutase total e mitocondrial**

O homogenato de tecido é adicionado a um meio de reação contendo 0.1 mM EDTA, 13 mM L-metionina, e 75 mM e nitro azul de tetrazólio (NBT) em tampão fosfato pH 7.8. A reação é iniciada pela adição de 2  $\mu\text{M}$  de riboflavina e depois é exposta uniformemente a luz por 10 minutos. Uma cor azul é desenvolvida devido a oxidação do NBT e medida em 560 nm. A atividade de superóxido dismutase é expressa em U/mg de proteína. A atividade de superóxido dismutase mitocondrial será medida na presença de cianeto que inibe a cobre-zinco superóxido dismutase. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir a redução de NBT por 50%.

### **3.10 Quantificação da Atividade de Catalase**

A atividade antioxidante da catalase será conduzida no sobrenadante dos homogenatos em tampão fosfato (pH = 7,4) contendo 50 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As mudanças na absorbância em 240 nm serão acompanhadas por 10 minutos. A atividade de catalase foi calculada em miliunidades de catalase por miligrama de proteína.

### **3.11 Determinação dos níveis de proteínas tiol**

O dano oxidativo às proteínas é inversamente correlacionado com o teor de tiol de proteína. Os tióis nas proteínas serão medidos através da redução de DTNB, gerando um produto amarelo (TNB) medido a 412 nm. Após homogenização do tecido com tampão de isolamento de mitocôndrias o sobrenadante será incubado no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente com DTNB 0,2 mM (preparado em PBS mais EDTA 1 mM). O teor de tiol proteico será calculado com base no coeficiente de

extinção molar de TNB ( $14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e expresso como micromoles de TNB por miligrama de proteína. O branco da reação é feito após a precipitação das proteínas.

### **3.12 Quantificação dos níveis de Glutathiona**

Os níveis de glutathiona serão determinados utilizando um método baseado numa reação do DTNB . Esta reação produz um produto de cor amarela que será detectado em 412 nm. Uma alíquota do homogenato de coração será adicionada ao ácido sulfosalicílico (4%), para precipitação das proteínas. Após homogeneização, a mistura será centrifugada a  $1600 \times g$  durante 15 minutos. O sobrenadante resultante será adicionado ao DTNB (2 mM). Após 10 minutos a absorbância é medida em 412 nm. A glutathiona total será calculada utilizando-se uma curva padrão com glutathiona purificada. O teor total de GSH será expresso em microgramas por mg de proteína.

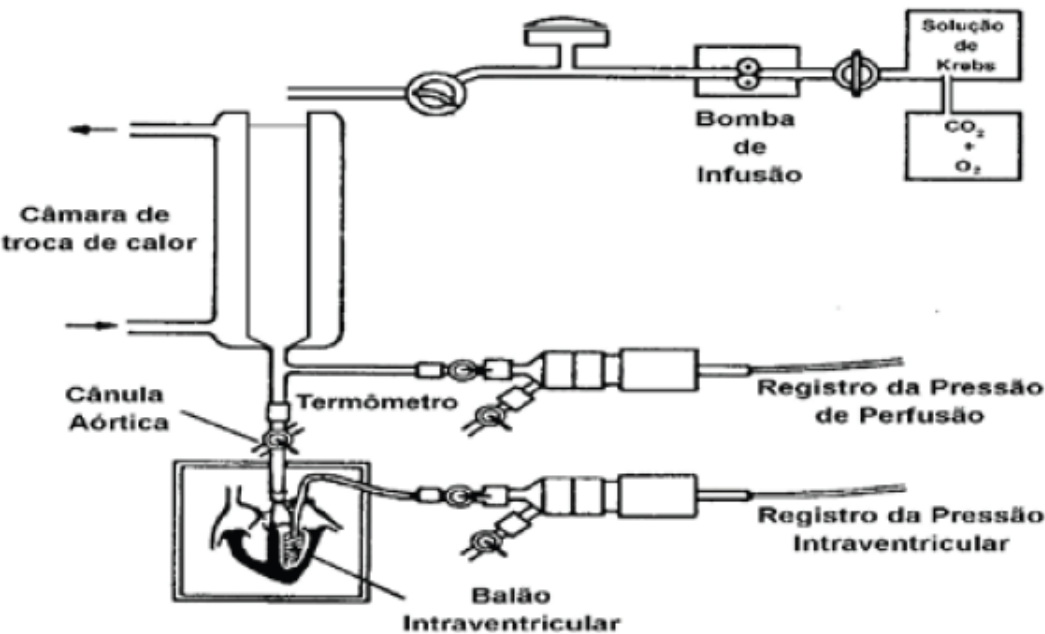
### **3.13 Quantificação de Proteínas Carbonilas**

O teor de proteína carbonil (PC) do coração será medido usando-se o método de Reznick e Packer . Em resumo, o homogenato do tecido será adicionado em 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM (DNPH) em HCl 2 N e incubados por 1 h em temperatura ambiente, com agitação a cada 15 min. Em seguida, adiciona-se ácido tricloroacético (TCA, 20%) e incuba no gelo durante 5 min. Após centrifugação por 10 minutos  $12000 \times g$  os precipitados serão lavados duas vezes com etanol-acetato de etila (v / v). O precipitado final é dissolvido em solução de cloridrato de guanidina 6 M e incubado por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . A absorbância da amostra é medida em 370 nm. O teor de carbonila é calculado usando-se o coeficiente de extinção molar de DNPH ( $2.2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) e expressos como nanomoles/mg de proteína.

### **3.14. Criação de aparelho de perfusão cardíaca.**

É sempre uma deficiência em aulas práticas para o curso médico a demonstração do funcionamento do coração. Mesmo com o advento de softwares de alta resolução que permitem visualização do funcionamento cardíaco e do efeito de drogas ou patologias sobre este órgão é extremamente necessário que o estudante visualize ( ou assista uma demonstração) ou manipule um órgão vivo. Dentro deste contexto nós propomos a criação de um aparelho de perfusão cardíaca simples, barato e que aproveite vários aparelhos que estão no nosso laboratório. O aparelho será criado usando-se uma bomba peristáltica para bombeamento da solução que perfundirá o

coração, um banho maria para controle de temperatura, uma canula com balão de latex para registro de pressão em papel fixado em um suporte. O equipamento será calibrado para um volume de perfusão constante de 8 mLs de minuto em corações de rato. Um modelo do equipamento está desenhado na Figura 01.



(Figura 01)

4.Cronograma de atividade

Atividades	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Indução de restrição calórica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Construção do aparelho de perfusão cardíaca	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Testes com animais e ajustes finos do sistema de perfusão			X	X	X	X						
Testes do sistema de registro de pressão							X	X	X	X	X	

[illegible]