

Dados do Plano de Trabalho	
Título do Plano de Trabalho:	Avaliação do impacto da restrição calórica e do canal de K ⁺ mitocondrial sobre antioxidantes mitocondrial durante a hipertrofia cardíaca
Modalidade de bolsa solicitada:	PIBIC
Projeto de Pesquisa vinculado:	Avaliação Dos Efeitos Do Canal Mitocondrial De Potássio Sensível Ao ATP Sobre A Hipertrofia Cardíaca Em Corações De Camundongos Submetidos A Restrição Calórica

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral:

- Avaliar o impacto da restrição calórica com inibição/ativação do Canal Mitocondrial De Potássio Sensível Ao ATP (MitoKATP) sobre o nível de antioxidantes mitocondriais durante a hipertrofia cardíaca.

1.2. Objetivos Específicos

- Induzir hipertrofia cardíaca em camundongos em restrição calórica.
- Estudar os efeitos de inibição/ativação do mitoKATP na proteção contra hipertrofia induzida pela restrição calórica.
- Estudar a atividade da catalase em suspensões mitocondriais em corações hipertróficos submetidos a restrição calórica.
- Avaliar a atividade de glutathione peroxidase mitocondrial em corações hipertróficos submetidos a restrição calórica.
- Avaliar a atividade de superóxido dismutase mitocondrial em corações hipertróficos submetidos a restrição calórica.

2. METODOLOGIA

2.1. Indução de Restrição Calórica.

Camundongos Swiss machos (6 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 camundongos (com 8 semanas de idade) serão divididos aleatoriamente em grupos: (1) Grupo com ingestão ad libitum (Grupo AL), (2) 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) .

2.2. Indução Farmacológica da Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca será induzida farmacologicamente com tratamento intraperitoneal de camundongos com isoproterenol. O isoproterenol (ISO – agonista beta adrenérgico) será diluído em solução salina estéril na concentração de 30 mg/kg/dia e será aplicado em camundongos Swiss machos alimentados ad libitum (Grupo ISO-AL)

e no grupo em restrição calórica (Grupo ISO-RC). Para estudo dos impactos do mitoKATP na hipertrofia cardíaca durante a restrição calórica trataremos o grupo ISO-AL e o grupo ISO-RC com os inibidores do mitoKATP 5-hidroxicanoato (dois grupos 5 e 10 mg/kg/dia, Grupo ISO-RC-5HD) e glibenclamida (3 e 6 mg/kg/dia, Grupo ISO-RC-GLY) por 8 dias. Os grupos serão divididos como abaixo:

1. Grupo AL – ad libitum
2. Grupo RC – Restrição Calórica (4 semanas)
3. Grupo AL-ISO – ad libitum tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia) por 8 dias.
4. Grupo RC-ISO – Restrição calórica (4 semanas) e tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia) por 8 dias.
5. Grupo RC-ISO-5HD – Restrição Calórica (4 semanas) e tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia) e 5-hidroxicanoato (5 ou 10mg/kg/dia) por 8 dias.
6. Grupo RC-ISO-Gli – Restrição calórica (4 semanas) tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia) e Glibenclamida (3 ou 6mg/kg/dia) por 8 dias.
7. Grupo RC-ISO-5HD-DZX – Restrição Calórica (4 semanas) e tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia) e 5-hidroxicanoato (5 ou 10mg/kg/dia) e DZX (5 mg/kg/dia) por 8 dias.
6. Grupo RC-ISO-Gli-DZX – Restrição calórica (4 semanas) tratado com isoproterenol (30mg/kg/dia), Glibenclamida (3 ou 6mg/kg/dia) e DZX (5 mg/kg/dia) por 8 dias.

2.3. Preparação de amostras e Isolamento de Mitocôndrias

Os camundongos serão sacrificados após anestesia com 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Subsequentemente, o coração será removido e seu peso úmido será obtido. O tecido 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, 1mg/mL albumina e 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 uma alíquota do sobrenadante (1 mL) é congelado e servirá para dosagens enzimáticas, por outro lado o pellet será ressuspenso em 1 mL do tampão de homogeneização e servirá para dosagens de proteínas carboniladas. As mitocôndrias serão então separadas do sobrenadante restante através de centrifugações com maior rotação ($\gg 10\,000$ x g), e lavadas até a obtenção de uma suspensão homogênea. As mitocôndrias serão colocadas no tampão de isolamento em quantidade mínima (~100 uL) e usadas imediatamente (dentro de 1 hora) para experimentos de avaliação da abertura do mitoKATP, abertura do poro de permeabilidade e respiração/função mitocondrial ou estocada em -20 °C para posterior uso nos experimentos propostos.

2.4. Quantificação da atividade de glutathione 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 M-1cm-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.

2.5 Quantificação da atividade de superóxido dismutase mitocondrial

O homogenato de tecido é adicionado a um meio de reação contendo 0.1 mM EDTA, 13 mM L-metionina, e 75 mM de nitro azul de tetrazólio (NBT) em tampão fostato pH 7.8. A reação é iniciada pela adição de 2 μ 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%.

2.6. 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 H₂O₂. 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. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

As atividades a serem realizadas pelo estudante são:

- AT1. Indução de restrição calórica/hipertrofia cardíaca.
- AT2. Quantificação da atividade de glutathione peroxidase
- AT3. Quantificação da atividade de superóxido dismutase mitocondrial
- AT4. Quantificação da Atividade de Catalase
- AT5. Preparação de manuscritos e relatórios.

Nº	2019					2020						
	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07
AT1	X	X	X	X								
AT2		X	X	X	X							
AT3					X	X	X					
AT4							X	X	X			
AT5									X	X	X	
AT6												X