Lidiane Paula Ardisson

Influência da taurina na remodelação ventricular após o infarto do miocárdio

BOTUCATU
2012

Lidiane Paula Ardisson

INFLUÊNCIA DA TAURINA NA REMODELAÇÃO VENTRICULAR APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para a obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

BOTUCATU
2012

A Felicidade está naquilo que conquistamos!

Dedicatória

Aos meus pais *Virgínia, Marcos, Paulo e Clarice*, por serem meus exemplos de vida, caráter, dedicação, humildade, amor, incentivo, perdão e auxílio ao próximo.

Aos meus irmãos *Flaviane, Junior e Daiane* pelo incentivo e carinho de sempre. À *Juliana* nunca me esquecerei dos nossos momentos e por se fazer presente apesar de ter ido morar com Deus.

Ao meu marido *Gustavo* pelo incentivo diário na minha vida profissional e por fazer meus dias melhores nesses dois anos que estamos juntos.

Ao meu filho *Miguel* que ilumina meus dias, que com suas surpresas diárias não me deixa cair na rotina e me ensinou o significado de amor infinito.

A toda minha família pelo apoio.

Agradecimento Especial

Ao professor Leonardo Antonio Mamede Zornoff pelos valiosos ensinamentos, paciência, dedicação e generosidade. Meu exemplo de ótimo orientador e de caráter que vou levar por toda minha carreira.

Ao professor Sérgio Alberto Rupp de Paiva pela dedicação e ensinamentos e por participar da coautoria desse projeto.

À Dr. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla e ao Dr. Marcos Ferreria Minicucci obrigada pelos ensinamentos e auxílio no mestrado e doutorado. Toda a minha admiração.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

À Deus por me iluminar, guiar e abençoar em todas as horas da minha vida e pelas oportunidades proporcionadas.

À Fabiana Denipote, Francieli Vaninni e Bruna Rafacho minhas grandes amigas e irmãs de coração. Sem vocês tudo seria muito difícil.

Ao Renato e Débora Miranda pelo constante incentivo.

Aos meus amigos de laboratório Priscila, Heloísa, Ricardo, Renata, André, Dijon, Ana Paula e André Leopoldo grandes companheiros de trabalho. Adoro vocês!

Ao Prof. Dr Katashi Okoshi pela realização do estudo ecocardiográfico e por ter auxiliado na prova de qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcos Ferreira Miniccci pelas sugestões na prova de qualificação.

À Dra. Bertha Furlan Polegato pela realização do estudo do coração isolado.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini e ao químico Gilberto João Padovan da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo espaço concedido e auxílio na realização de análises.

Ao prof. Dr. Luis Barbisan do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP por ter aberto seu laboratório para realização de análises.

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental de Clínica Médica, Mário Bruno, José Carlos Georgete, Sandra Fábio, Sueli Clara, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Aparecido de Souza, Elizangela Silva, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Andrade Câmara, Mario Augusto Dallaqua e Ana Mengue. Obrigada pelo auxílio e simpatia.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, Regina Spadin, Lílian Nunes, Andréa Devidé, Janete Nunes Silva e Nathanael Salles pela disposição em sempre ajudar.

À bibliotecária Meire e Élida, pelo auxílio na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo. À FAPESP pelo auxílio para realização do projeto.

Sumário

Resumo 1

Abstract 4

1. Introdução 7

2. Hipótese 13

3. Objetivo 15

4. Material e Métodos 17

5. Resultados 35

6. Discussão 54

7. Conclusão 66

8. Referências Bibliográficas 68

Lista de Abreviações

IAM-T – grupo infartado suplementado com taurina

ASM – área seccional do miócito

AE – átrio esquerdo

C – grupo controle

MMP – metaloprotease

EDSIV – espessura diastólica do septo interventricular

A- diastólica – área diastólica do VE no eixo menor paraesternal

A – sistólica – área sistólica do VE no eixo menor paraesternal

TDE – tempo de desaceleração da onda E

FAC – fração de variação da área

VEPP – velocidade de encurtamento da parede posterior do VE

PS – pressão sistólica

-dp/dt – derivada negativa de pressão

+dp/dt – derivada positiva de pressão

IC – índice de colágeno

GSH-Px – glutationa peroxidase

SOD – superóxido dismutase

NRF2 – fator nuclear eritóide

β-OH - β hidroxiacil coenzima A desidrogenase

LDH – lactato desidrogenase

CS – citrato sintase

ERO – espécies reativas de oxigênio

Cx43 – conexina 43

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

EDPP – espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo

FC – frequência cardíaca

FAV – fração de variação de área do ventrículo esquerdo

HE – hematoxilina-eosina

IAM – infarto agudo do miocárdio

PC – peso do rato

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

TRIV – tempo de relaxamento isovolumétrico

TRIV/RR^{0,5} – tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado FC

Resumo

O objetivo do nosso estudo foi de avaliar a influência da administração de taurina sobre a remodelação após o infarto em ratos, por meio de análise de sobrevida e de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas, celulares e intersticiais cardíacas. **Métodos:** foram utilizados ratos wistar, machos, entre 200 - 250g foram submetidos ao infarto experimental. Após 48hs do procedimento, os animais sobreviventes foram alocados em dois grupos aleatoriamente: grupo IAM (n=31), o qual recebeu água potável e grupo IAM-T (n=30), que recebeu 3% de taurina diluída na água. O grupo controle (n=10) foi composto por animais não infartados e recebeu água potável. Após 3 meses de acompanhamento foi realizado estudo morfológico e funcional pelos seguintes métodos: coração isolado, ecocardiograma, morfometria e histologia. O estudo bioquímico foi realizado por HPLC (para determinar as concentrações e taurina no plasma e no tecido cardíaco). A imunohistoquímica foi utilizada para avaliar a conexina 43 e apoptose. Por meio da zimografia avaliou-se as metaloproteases, por espectrofotometria foram avaliados estresse oxidativo e metabolismo energético e por western blot avaliou-se a resposta antioxidante. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de uma via, t de Student, curva de Kaplan Méier e long - rank. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** a concentração de taurina plasmática (C = 49 (38 - 54,2) (µmol/L); IAM = 74,6 (58,7 - 83) (µmol/L); IAM-T = 363 (157 - 477,4) (µmol/L); p = 0,004) e no tecido cardíaco (C = 0,100 ± 0,04 (µmol/g); IAM = 0,175 ± 0,07 (µmol/g); IAM-T = 0,419± 0,187 (µmol/g); p = 0,022) foi maior no grupo IAM-T quando comparado com controle e IAM. Com relação ao estudo ecocardiográfico, o grupo IAM-T apresentou valores intermediários, quando comparado com os grupos C e IAM, nas variáveis AE (C = 5,3 ± 0,7 mm; IAM = 6,8 ± 1,0 mm; IAM-T = 6,1 ± 0,8 mm; p = <0,001), AE/tíbia (C = 1,29 ± 0,18 mm/cm; IAM = 1,64 ± 0,25 mm/cm; IAM-T = 1,47 ± 0,04 mm/cm; p = <0,001), massa VE (C = 0,78 ± 0,1 g; IAM = 1,4 ± 0,3 g; IAM-T = 1,2 ± 0,2 g; p = <0,001), EDPP (C = 1,4 (1,31 - 1,46) mm; IAM = 1,59 (1,53 - 1,7) mm; IAM-T = 1,49 (1,4 - 1,59) mm; p = <0,001); TRIV (C = 24 (22 - 26) ms; IAM = 28 (27,5 - 31) ms; IAM-T = 26 (26 - 31) ms; p = 0,003) e TRIV/$RR^{0,5}$ (C = 0,07 ± 0,02; IAM = 0,1 ± 0,02; IAM-T = 0,09 ± 0,01; p = 0,014). A EDSIV foi menor no grupo IAM-T quando comparado com o grupo

IAM (C = 1,4 ± 0,1 mm; IAM = 1,6 ± 0,2 mm; IAM-T = 1,5 ± 0,1 mm; p = <0,001). O grupo IAM-T apresentou menor número de células apoptóticas (C = 0,0259 ± 0,0172 (unidade/cm^2); IAM = 0,472 ± 0,354 (unidade/cm^2); IAMT = 0,115 ± 0,121(unidade/cm^2); p = 0,016) do que o grupo IAM. Em relação às metaloproteases, o grupo IAM-T apresentou valores intermediários da MMP 2 ativa (C = 5420 (3557-7227) (DO); IAM = 12500 (11800-12700) (DO); IAM-T = 6225 (3430-10645) (DO) ; p = 0,047) e da MMP 9 ativa (C = 9912 (8356-10650) (DO); IAM = 31500 (20100-37350) (DO); IAM-T = 11900 (10550-15050) (DO); p = 0,043) quando comparado com os grupos IAM e controle. Considerando o estresse oxidativo, o grupo IAM-T apresentou menores valores de glutationa peroxidase quando comparado com o IAM e níveis intermediários de GSH-px (C = 624 ± 165 (nmol/mg proteína); IAM = 821 ± 203 (nmol/mg proteína); IAM-T = 494 ± 74 (nmol/mg proteína); p <0,001) e Nrf-2 (C = 0,63 ± 0,21; IAM = 0,25 ± 0,16; IAM-T = 0,42 ± 0,14; p< 0,022), respectivamente. Em relação às variáveis do metabolismo energético, os animais do grupo IAM-T apresentaram aumento dos níveis da CS (C = 384 (336- 408) (nmol/mg proteína); IAM = 508 (422 - 563) (nmol/ mg proteína); IAM-T = 669 (542 - 768) ; p < 0,001), β-OH (C = 82 (80 - 91,3) (nmol/mg proteína); IAM = 182 (129 - 232) (nmol/mg proteína); IAM-T = 341 (250 - 419) (nmol/ mgproteína) p <0,001), e LDH (C = 618 ± 128 (nmol/mg proteína); IAM = 943 ± 167 (nmol/mg proteína); IAM-T = 1283 ± 236 (nmol/mg proteína); p<0,001) comparado com o controle. **Conclusões**: nosso trabalho evidenciou que a suplementação de taurina em animais infartados diminuiu a hipertrofia e melhorou a função diastólica cardíaca, com atenuação do estresse oxidativo, da apoptose e da atividade de metaloproteases, associada ao aumento do substrato energético cardíaco. Assim, nossos achados sugerem que a taurina resulta em efeitos benéficos em relação ao processo de remodelação ventricular cardíaca induzida pelo infarto experimental em ratos.

Abstract

The aim of our study was to evaluate the influence of taurine administration on cardiac remodeling after myocardial infarction in rats by survival analysis and morphological, functional, biochemical, cellular and interstitial evalluation. Methods: Wistar male rats, weighting 200 - 250g were subjected to experimental myocardial infarction. 48 hours after the procedure, the surviving animals were randomly allocated into two groups: IAM group (n = 31), who received drinking tap water and T-IAM group (n = 30), who received 3% of taurine diluted in tap water. The control group (n = 10) was composed of non infarcted animals, who received drinking tap water. After 3 months of follow-up, morphological and functional study was conducted by the following methods: isolated heart, echocardiography, histology and morphometry. Biochemical analysis was performed by HPLC (to determine the concentrations of taurine in plasma and heart tissue). Immunohistochemistry was used to evaluate connexin 43 and apoptosis. Metalloproteases was evaluated by zymography, oxidative stress and energy metabolism were evaluated by spectrophotometry and the antioxidant response, by western blot. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, Student t test, Kaplan Meier and long - rank tests. The level of significance was set at 5%. Results: Concentration of taurine in plasma (C = 49 (38 - 54.2) (mmol / L), IAM = 74.6 (58.7 - 83) (mmol / L), T-IAM = 363 (157 - 477.4) (mmol / L), p = 0.004) and in heart tissue (C = 0.100 ± 0.04 (mmol / g), AMI = 0.175 ± 0.07 (mmol / g), T-IAM = 0.419 ± 0.187 (mol / g), p = 0.022) were higher in the T-IAM group compared with control and IAM groups. Regarding the echocardiographic study, the T-IAM group showed intermediate values when compared with C and IAM groups, variables LA (C = 5.3 ± 0.7 mm; IAM = 6.8 ± 1.0 mm; T-IAM = 6.1 ± 0.8 mm, p = <0.001), LA / tibia (C = 1.29 ± 0.18 mm / cm; IAM = 1.64 ± 0.25 mm / cm; T-IAM= 1.47 ± 0.04 mm / cm, p = <0.001), LV mass (C = 0.78 ± 0.1 g, IAM = 1.4 ± 0.3 g, T = 1 IAM-, 2 ± 0.2 g, p = <0.001) LVPWT (C = 1.4 (1.31 - 1.46) mm = 1.59 IAM (1.53 to 1.7) mm; T-IAM = 1.49 (1.4 to 1.59) mm, p = <0.001), IVRT (C = 24 (22 - 26) ms, IAM = 28 (27.5 - 31) ms; T-IAM = 26 (26 - 31) ms, p = 0.003) and IVRT/RR0, 5 (C = 0.07 ± 0.02, IAM = 0.1 ± 0.02; T-IAM = 0.09 ± 0.01 p = 0.014). The IVSd was lower in T-IAM when compared with IAM group (C = 1.4 ± 0.1 mm, IAM = 1.6 ± 0.2 mm, T-IAM =

1.5 ± 0.1 mm p = <0.001). The T-IAM group showed fewer apoptotic cells (C = 0.0259 ± 0.0172 (un/cm2); IAM = 0.472 ± 0.354 (un/cm2); t-IAM = 0.115 ± 0.121 (un/cm2); p = 0.016) than the group IAM. Regarding to the metalloproteases, T-IAM group showed intermediate values of active MMP-2 (DO) (C = 5420 (3557-7227); IAM = 12500 (11800-12700); IAM-T = 6225 (3430 - 10 645), p = 0.047) and active MMP 9 (DO) (C = 9912 (8356-10650); IAM = 31500 (20100-37350); T-IAM-11900 = (10550-15050), p = 0.043) compared to IAM and control groups. Considering oxidative stress, the T-IAM group showed lower glutathione peroxidase compared with IAM and intermediate levels of GSH-px (C = 624 ± 165 (nmol / mg protein), IAM = 821 ± 203 (nmol / mg protein), T-IAM = 494 ± 74 (nmol / mg protein), P <0.001) and Nrf-2 (C = 0.63 ± 0.21, IAM = 0.25 ± 0.16, T-IAM = 0.42 ± 0.14, p <0.022), respectively. Regarding the variables of energy metabolism, the animals in group T-IAM showed increased levels of CS (C = 384 (336-408) (nmol / mg protein), IAM = 508 (422-563) (nmol / mg protein); T-IAM = 669 (542-768), p <0.001), β-OH (C = 82 (80 - 91.3) (nmol / mg protein); IAM = 182 (129 - 232) (nmol / mg protein), T-IAM = 341 (250 - 419) (nmol / mgproteína) p <0.001), and LDH (C = 618 ± 128 (nmol / mg protein); IAM = 943 ± 167 (nmol / mg protein) ; T-IAM = 1283 ± 236 (nmol / mg protein), p <0.001) compared with control. Conclusions: Our study showed that taurine supplementation in infarcted rats decreased hypertrophy and improved cardiac diastolic function, with attenuation of oxidative stress, apoptosis and metalloprotease activity, associated with increased cardiac energy substrate. Thus, our findings suggest that taurine results in beneficial effects on the process of ventricular remodeling induced by cardiac infarction in rats.

1. Introdução

As pesquisas que direcionam as recomendações dietéticas são muito importantes, pois têm o objetivo de adequar as quantidades de nutrientes que devem ser ingeridos para manter a estabilidade fisiológica. Desse modo, as recomendações dietéticas não devem e não são as mesmas nas situações de doença, pois as anormalidades metabólicas e o estresse alteram a absorção, transporte e consumo dos nutrientes, assim como as necessidades para manter suas funções.

Nesse sentido, a correção tanto da ingestão calórica quanto do consumo de micronutrientes em situação de doenças se faz necessária. Assim, diversos fatores nutricionais são objetos de estudo. Nos últimos vinte anos, a relação doença cardiovascular e taurina tem sido muito estudada[1].

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é o aminoácido livre mais abundante no meio intracelular. Não é utilizado para síntese protéica, possui grupo amino no carbono β e grupo sulfônico. Em consequência, tem comportamento mais ácido que os outros aminoácidos[2,3]. Altas concentrações de taurina são encontradas no coração e retina, e menores valores foram identificados no cérebro, rim, intestino e músculo esquelético[2].

Em relação ao metabolismo, a taurina pode ser sintetizada a partir da metionina e cisteína na presença de vitamina B6 como cofator[2,4]. O fígado e o cérebro são os principais locais de síntese, com destaque para o fígado como órgão produtor e liberador de taurina no sangue, de onde é captada por outros tecidos[5-7]. A taurina é denominada como aminoácido condicionalmente essencial para os humanos, pois nas situações de estresse metabólico, sepse, trauma e cirurgias, suas concentrações plasmáticas diminuem[3]. Além disso, os recém-nascidos não são capazes de manter concentrações normais de taurina plasmática[2].

Os alimentos fonte desse aminoácido são: leite materno e produtos de origem animal, principalmente peixes e frutos do mar e, em menor quantidade, carne branca e vermelha[8,9].

A taurina está envolvida em muitas funções biológicas e fisiológicas[4,10]. Por exemplo, ela participa na formação de sais biliares e digestão das gorduras, assim como na manutenção da homeostase das concentrações do

Na^+ e Ca^{2+} intracelular e no balanço de neurotransmissores[11-13]. A deficiência de taurina está associada com ansiedade, epilepsia, hiperatividade e depressão. Assim, sua suplementação pode aliviar esses sintomas[14]. Recentemente, a taurina foi identificada como agente efetivo no tratamento do alcoolismo, fadiga e miotonia[15,16]. A taurina também protege a visão nos casos de diabetes[17] e aumenta a imunocompetência[18]. Ademais, a taurina e seus análogos exercem efeito anti-neurotóxico, antioxidante e anti-inflamatório e podem inibir a proliferação de células tumorais[17-21].

Em relação à sua ação no coração, diversas evidências clínicas e experimentais sugerem que em situações de deficiência, a taurina se relaciona com efeitos deletérios na morfologia e na função cardíaca. Do mesmo modo, a suplementação parece atenuar o dano cardíaco induzido por alguns modelos de agressão[22].

Os efeitos da taurina no coração podem ser explicados por quatro mecanismos: efeito natriurético, devido à sua atividade de osmorregulação renal; efeito modulador de íons relevantes para o funcionamento das células cardíacas, principalmente o sódio e cálcio; efeito antioxidante, protegendo as membranas lipossômicas contra danos causados por radicais livres; efeito antagonista da angiotensina II[22].

Portanto, a taurina pode ter ação no processo de remodelação ventricular, o qual é definido como variações moleculares, celulares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por meio de alterações no tamanho, massa, geometria e na função do coração em reposta a determinada agressão[23-25].

Um dos principais modelos de agressão utilizados no estudo do processo de remodelação ventricular é o infarto agudo do miocárdio (IAM). Clinicamente, a remodelação é caracterizada por aumento da cavidade ventricular, que pode ocorrer na fase aguda ou crônica do infarto[26].

Na fase aguda do IAM, pode ocorrer o afilamento e aumento da extensão da parede infartada, caracterizando o processo de expansão do infarto[27]. Esse fenômeno predispõe à ruptura ventricular, bem como representa substrato anatômico para a posterior formação de aneurismas [24,25,28].

Na fase crônica, o processo de remodelação ventricular se caracteriza pela hipertrofia da região não infartada e desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular, após o IAM[24,25].

Apesar de prevalecer o conceito de que a remodelação resulte em deterioração progressiva da função ventricular, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não estão totalmente esclarecidos. Independente do estímulo, uma das características mais marcantes da remodelação é a modificação do padrão de expressão de diversas proteínas, com o aumento ou a reexpressão de genes do período fetal. As causas e as possíveis vantagens ou desvantagens desse comportamento ainda não estão suficientemente esclarecidas. Aceita-se, entretanto, que a expressão genética fetal seja um marcador e que possa estar relacionada aos mecanismos propriamente envolvidos na progressão do processo de remodelação, até o aparecimento da disfunção ventricular[29].

Entre os diversos fatores que, potencialmente, podem ter papel fisiopatológico na progressão da disfunção ventricular no coração remodelado destacam-se:

- Morte Celular - é caracterizada como perda progressiva de miócitos e pode participar da deterioração da função ventricular. Podemos identificar três mecanismos de morte dos miócitos: autofagia, necrose e apoptose. Após o infarto, se aceita que a apoptose seja o mecanismo mais relevante nas alterações cardíacas associadas ao processo de remodelação[30].
- Alterações das Proteínas Contráteis - o processo de remodelação ventricular caracteriza-se por alterações da miosina, a principal proteína contrátil composta de um par de cadeias pesadas (α e β) e dois pares de cadeias leves. A capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativados localizados nas cadeias pesadas, possuindo a fração α a maior capacidade ATPásica, a qual determina a capacidade contrátil dos miócitos. Durante a remodelação, há predomínio da forma fetal das cadeias leves de miosina. Além disso, ocorre aumento da forma β e diminuição da fração α, o que poderia justificar a depressão funcional que acompanha a remodelação[31].
- Fibrose - o colágeno é uma das formas celulares presentes no miocárdio e possui várias funções como: regular a apoptose, resistir às deformações

patológicas, manter o alinhamento das estruturas, regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento das fibras cardíacas. Portanto, o tecido colágeno é importante modulador da função cardíaca sistólica e diastólica. Já está bem documentado que há acumulo de colágeno (fibrose) em diversas situações patológicas, como por exemplo, no infarto agudo do miocárdio. Nessas condições, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular[32-34].

- Alterações das Metaloproteases - as fibras colágenas são resistentes à degradação causada pela maioria das proteases, entretanto, algumas enzimas possuem atividade colagenolítica, entre as quais se destacam as metaloproteases. Essas enzimas encontram-se na forma inativada, podendo ser ativada por uma série de estímulos, como mecânicos, isquêmico, entre outros. Sendo assim, quando ativadas, ocorre quebra da rede de colágeno interfibrilar podendo haver inúmeras conseqüências, tanto na arquitetura como na função ventricular[35].
- Alterações das Junções Comunicantes Intercelulares - em diferentes modelos de agressão, podem ocorrer alterações da conexina 43, a principal proteína das junções intercelulares do coração. Além de participar da propagação do estímulo elétrico, essa proteína pode permitir a passagem de moléculas que ativam vias de sinalização intracelulares. Portanto, alterações nessa proteína podem desempenhar papel fisiopatológico na deterioração da função cardíaca no coração remodelado[36].
- Estresse Oxidativo - o IAM resulta em aumento de estresse oxidativo. São várias as procedências das espécies reativas de oxigênio, dentre as quais destacam-se: transportadores de elétrons mitocondriais, sistema NADPH oxidase, atividade da cicloxigenase, citocromo P450, glicose oxidase, xantina oxidase, lipoxigenase e degradação das catecolaminas. As espécies reativas ativariam diversos sinalizadores celulares que, na fase aguda, participariam do processo inflamatório e da cicatrização da região infartada. Cronicamente, entretanto, as espécies reativas de oxigênio induziriam remodelação por resultar em disfunção mitocondrial, ativação das metaloproteases, fibrose, hipertrofia e morte celular[37].

- Déficit Energético - a remodelação se caracteriza por alterações nas vias responsáveis pela oferta de substrato energético ao coração. Em consequência, todas as proteínas miocárdicas com capacidade ATPásica, como as de cadeia da miosina e as responsáveis pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, podem apresentar déficits em suas funções, com deterioração da função cardíaca sistólica e diastólica[38].
- Hipertrofia e Alterações Geométricas - um dos principais mecanismos pelos quais o miócito se adapta a um determinado estímulo é o processo de hipertrofia. Atualmente, aceita-se que mudanças geométricas poderiam mudar as condições de carga a que o coração é submetido e comprometer a função global do coração[39].

Assim, do ponto de vista clínico, a remodelação está associada à pior prognóstico. Dessa forma, pacientes com remodelação já diagnosticada, ou com alto risco de desenvolvê-la, devem ser tratados de forma agressiva, com a intenção de prevenir, atenuar ou mesmo reverter esse processo. Portanto, é de suma importância identificar fatores que modulem o processo de remodelação ventricular após o IAM.

Pelo exposto, a taurina pode ter papel nos mecanismos fisiopatológicos associados ao processo de remodelação ventricular. Contudo, os efeitos da taurina no coração de ratos infartados ainda não são conhecidos.

2. Hipótese

A suplementação de taurina atenua a remodelação ventricular após o infarto do miocárdio.

3. Objetivo

Avaliar a influência da administração de taurina sobre a remodelação após o infarto em ratos, por meio de análise de sobrevida e de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas, celulares e intersticiais cardíacas.

4. Material e Métodos

4.1 Protocolo Experimetal

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp (protocolo 692), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para este estudo foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, provenientes do Biotério da Unicamp. Com 200 - 250g, 120 animais foram submetidos ao infarto experimental e, após 48hs, os sobreviventes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: infartados suplementados com taurina na água de beber (IAM-T = 30) e infartados que receberam água potável (IAM = 31). O grupo controle (C) não infartado foi composto por 10 animais. O grupo controle suplementado com taurina não foi avaliado neste protocolo pelo fato de estudo prévio de nosso laboratório ter mostrado que a taurina não teve efeito em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas em ratos normais[70]. Após 3 meses do infarto, foi realizado o ecocardiograma para avaliação morfológica e funcional cardíaca. Após o ecocardiograma, 7 animais de cada grupo foram submetidos ao estudo do coração isolado. Em seguida, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para coleta do material para o estudo morfométrico, bioquímico, celular e molecular.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno individuais forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, com tampa de arame cromado, ambiente com temperatura (22 - 26°C) e luminosidade (ciclo claro e escuro - 12h) controlados.

A mortalidade dos animais foi observada diariamente desde o início do tratamento até o momento do sacrifício. O consumo de ração e o peso corporal dos ratos foram aferidos semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2.

O controle de água consumida foi realizado três vezes por semana, sendo sempre ofertada a mesma quantidade para todos os animais. Os ratos do grupo IAM e C receberam água potável, enquanto os grupo IAM-T receberam

água suplementada com o aminoácido taurina, dissolvida na concentração de 3%, definido em estudos prévios [40-42]. A taurina utilizada foi a da marca Sigma®.

4.2 Infarto do Miocárdio Experimental

O infarto do miocárdio foi produzido de acordo com método descrito previamente [43-46]. O procedimento foi feito pelo mesmo pesquisador. Os ratos, pesando entre 200-250g, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (1mg/kg), por via intramuscular, e submetidos à toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mononaylon 5.00 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi reposicionado no tórax, os pulmões inflados com pressão positiva e o tórax fechado por suturas com linha de algodão 10.

4.3 Avaliação Estrutural e Funcional pelo Ecocardiograma

Após três meses do infarto, os animais sobreviventes foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg), por via intramuscular. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo, para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento da Philips (HDI 5000) dotado de transdutor eletrônico de 12 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz.

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor, com o cursor do

modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. A espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) também foi avaliada pelo modo-M. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography/ European Association of Echocardiography[47] e já validadas no modelo de ratos infartados[48]. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas (AD) e sistólicas (AS) foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos para-esternais: eixo maior e eixo menor. A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a fração de variação de área (FVA=AD-AS/AD x 100) [48], e velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). O volume sistólico (VS) e o débito cardíaco (DC) foram calculados, segundo a fórmula: $VS = VTI \times \pi (VSVE/2)^2$ e $DC = VS \times FC$, onde VTI = integral da velocidade no tempo, VSVE diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo e FC = freqüência cardíaca.[49]. A VSVE foi medida imediatamente abaixo das cúspides da valva aórtica na posição paraesternal eixo maior. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras.

4.4 Estudo do Coração Isolado

Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff

Após o estudo ecocardiográfico, 7 animais de cada grupo receberam tiopental sódico (50 mg/kg) e heparina (1000 UI), por via intraperitoneal, e ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir foi efetuada a esternotomia mediana, e dissecada a aorta ascendente. A aorta foi cateterizada com cânula de metal número 15 e iniciada a perfusão retrógrada com solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mMol/l: 115 NaCl, 5,4 KCl, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgPO_4$, 1,15 NaH_2PO_4, 1,2 Na_2SO_4, 25 $NaHCO_3$ e 11 glicose. Antes de sua utilização essa solução foi filtrada com filtro de acetato de celulose com poro de 5 micrometros. A solução acima foi acrescida de insulina 10 UI/l e manitol, na concentração de 8 mMol, para assegurar maior preservação miocárdica[50].

Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sachs Elektronik-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg. A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO_2, à temperatura de 37 °C, pH entre 7,3 e 7,4. O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do ventrículo esquerdo puncionado com agulha, para drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de látex, atado ao tubo de polietileno PE 90, foi colocado na cavidade ventricular. A outra extremidade do tubo de polietileno foi conectada a uma torneira de 3 vias, sendo uma das vias acoplada a um transdutor de pressão (Stathan P23 XL) e a outra, a uma seringa de 1 ml, que permite a variação do volume do balão intracavitário. A musculatura atrial direita, compreendendo o nódulo sinoatrial foi extirpada e um eletrodo de marcapasso artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca de 250 bpm.

Por meio da preparação descrita, foram obtidas curvas de Starling com infusão de líquido no balão, variando a pressão diastólica no ventrículo

esquerdo de 0 a 25 mmHg, através de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se a pressão sistólica correspondente a cada variação de volume. Foram registradas, também, a primeira derivada positiva de pressão (+d*P*/d*t*) e a derivada negativa de pressão (-d*P*/d*t*). Esses índices são, respectivamente, utilizados como parâmetros de função contrátil e relaxamento do ventrículo esquerdo. A complacência do ventrículo esquerdo foi calculada a partir da variação no volume requerida para aumentar a pressão diastólica de zero para a 25 mmHg (Δ_{25}, mL)[51] . A razão V0/PC (mL/g) foi utilizada como parâmetro de normalização do tamanho da câmara, onde V0 é o volume correspondente a pressão ventricular diastólica de zero e PC é peso corporal[51].

O estudo funcional consistiu dos seguintes passos:

- Determinação do volume para obtenção de pressão ventricular diastólica de zero (V0);
- A partir do V0 foram acrescidos, sucessivamente, 20 microlitros de água ao volume do balão até obter-se pressão diastólica de 25 mmHg. A cada acréscimo, foram registradas as curvas de pressão do VE e das derivadas positiva e negativa da pressão, utilizando-se um polígrafo da GOULD, modelo Windowgraf;
- A calibração dos traçados permitiu a aferição das pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo correspondentes aos diferentes volumes.
- Terminado o experimento, o coração foi retirado do aparato de perfusão e os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados.

4.5 Coleta de Material Biológico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de pentobarbital sódico e, posteriormente, foram retirados sangue, coração, pulmão e fígado. O sangue contido no ventrículo foi removido por punção e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, e a 4ºC para extração do soro e, em seguida, congelado a -80ºC. O fígado, pulmão e coração

foram imersos em soro fisiológico para retirada do sangue. Os ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e o átrio esquerdo (AE) foram dissecados e pesados.

Em seguida, foi realizado corte transversal entre 5 a 6 mm do ápice para a base do VE, pelo fato do tamanho do infarto dessa região refletir a média da área do infarto de todos os cortes[52]. Um fragmento de 3 mm foi colocado em formol tamponado a 10%, por 24 horas, posteriormente foram lavados em água corrente por mais 24hs e em seguida, colocados em álcool 70% antes de serem colocados no bloco de parafina.

Os pesos úmidos do VD, pulmão, fígado e AE foram aferidos e posteriormente colocados em estufa a 65ºC por 48hs. Em seguida, os pesos secos foram aferidos. A relação entre peso seco e úmido foi utilizada para caracterizar a porcentagem de líquidos nesses tecidos.

A base do VE foi dividida em 2 segmentos longitudinais e o ápice em corte transversal. Esses fragmentos e amostras de fígado foram congelados a -80ºC.

A tíbia direita foi dissecada e colocada em estufa a 65ºC por 48hs posteriormente seu comprimento foi aferido e utilizado para normalizar variáveis morfológicas cardíacas.

4.6 Estudo Morfométrico

Após ser inserido no bloco de parafina, o fragmento do VE foi seccionado em cortes de 5 micrômetros de espessura. Em seguida, foram corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para medida da área seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado pela objetiva 40X. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localizados na camada subendocárdica da parede muscular do ventrículo

esquerdo. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas coradas pela técnica picrosirius red (sirius red F3BA em solução aquosa ácido pícrico) específico para visualização de colágeno foram analisadas. Foram visualizados aproximadamente 20 campos por ventrículo utilizando objetiva de 40X. Os campos escolhidos estavam localizados longe da área infartada e afastados da região perivascular[53,54].

As circunferências endocárdicas e epicárdicas da região infartada e não infartada foram determinadas por planimetria. O tamanho do infarto foi calculado pela divisão das circunferências ventriculares endocárdicas e epicárdica da região infartada pelas circunferências endocárdica e epicárdica totais.

4.7 Determinação das concentrações de taurina no plasma e no tecido cardíaco

Homogeneização

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a - 80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenados em freezer -80°C.

Desproteinização

Foram colocados 20 µl de plasma e de tecido homogeneizado em *eppendorfs* com 200 µl de metanol, sendo agitados em vortex e centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tudo de *eppendorf*, evaporado o metanol em speed-vac, por 25 minutos e, em seguida, foi adicionado 100 µl de fase A (fosfato de sódio 25 mM/l, pH 6,6, 2% acetonitrila, 2% de metanol e 2% tetrahidrofurano).

Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

Para a quantificação do aminoácido taurina, utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). O cromatógrafo utilizado foi o da marca SHIMADZU Corporation, modelo LC-10AD, com unidade para gradiente linear SCL10A VP, injetor automático modelo SIL10A, constando de 2 bombas de fluxo contínuo, modelo LC-10A, um forno de aquecimento da coluna modelo CTO-10A e detector de fluorescência modelo RF535, tudo comandado pelo software LC solution. Foi realizado o método de derivatização pós-coluna (Coluna Phenomenex C18 150 X 4.6mm, 5 µm tamanho da partícula), sendo a temperatura da coluna 45°C. A detecção foi realizada em fluorescência com excitação em 330 nm e emissão em 450 nm. Na análise cromatógrafa o reagente utilizado na derivatização foi o ortophtaldialdeído (OPA).

Após o processo de desproteinização, já descrito anteriormente, iniciou-se a análise das amostras colocando-se 20 µl deste material diluído em 16 µl de água destilada em tubos próprios. O injetor automático adicionava à amostra 20 µl de uma solução de carboxi-metil-cisteína (CMCys), que funcionava como padrão interno e 40 µl de solução OPA (5 mg OPA + 125 µl de metanol + 1,20 ml de tampão borato de sódio 0,40 M/l, pH 9,50 + 10 µl de mercaptoetanol + 10 µl de solução de Brij 35). O injetor automático homogeneizava a amostra por duas vezes. O padrão de aminoácidos, com o qual a amostra seria comparada, foi preparado a partir de uma solução de aminoácidos contendo 2,5 µmoles/ml (Pierce), diluído em água destilada e com concentração de 375 pmol/30 µl. À esta

solução foi acrescido 6 µl de taurina, já que este aminoácido não é presente no padrão de aminoácidos Pierce.

A separação dos aminoácidos requer 2 fases móveis. A fase móvel utilizada era composta por um gradiente binário com fase A (Fosfato de Sódio 25 mM/l, pH 6,60, (Na_2HPO_4), 2% de Acetonitrila(ACN), 2% de Metanol(MeOH) e 2% de Tetrahidrofurano(THF)), e fase B (Metanol a 65%, com 5% da fase A).

O fluxo das fases foi de 1,70 ml por minuto. As alterações de gradiente ocorreram de forma linear:

Tempo (minutos)	% fase B
0,01	19% fase B
0,04	Forno desligado
26,0	Forno ligado, 45°C
30	100%
38	100%
38,1	19%
47	Fim

4.8 Determinação das Metaloproteases 2 e 9

As metaloproteases (MMP) foram determinadas por zimografia. Para a determinação da atividade das MMP 2 e 9 no tecido cardíaco, os corações foram inicialmente descongelados em gelo e, a seguir, triturados e incubados em solução tampão (50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton - X; 10 mM $CaCl_2$ e inibidor de protease) na proporção de 30mg de tecido para 200µl de tampão. Os tecidos foram mantidos a 4°C durante 2 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteína determinada pelo método de Bradford[55]. A concentração final de proteínas foi ajustada para 5mg/ml, e o extrato foi armazenado a -80°C.

A atividade colagenolítica do extrato de tecido cardíaco foi determinada por meio da capacidade de digestão de gelatina presente em gel de poliacrilamida. O gel de poliacrilamida a 8% foi preparado com gelatina na proporção de 1mg/ml, em equipamento Mini - gel da Bio -Rad. O gel, devidamente

polimerizado, foi montado em cuba de eletroforese Mini - Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA), contendo tampão Tris -Glicina - SDS, pH 8,3. Trinta microgramas de proteína do extrato de tecido acrescido de tampão de amostra (0,5 M Tris; 2% SDS, 10% glicerol; 0,025% azul de bromofenol; pH 6,8) na proporção 2:1 foram aplicados em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada com voltagem contínua de 100 V, durante aproximadamente 2 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em 2,5% de Triton X - 100, e em seguida, lavado duas vezes por 10 minutos em 50 mM de Tris pH 8,4. O gel foi então incubado a 37ºC por 18 horas em solução de ativação contendo 50 mM Tris pH 8,4 e 5 mM $CaCl_2$. Terminada a incubação, o gel foi corado em solução de *Comassie Blue*, por 30 minutos, e em seguida descorado em solução de ácido acético, metanol e água (10: 30: 60) até permitir a visualização das bandas claras. Os géis foram então fotografados e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) foi analisada por densitometria, em analisador de imagens White Darkhon.

4.9 Determinação do Estresse Oxidativo Cardíaco

O estresse oxidativo cardíaco foi avaliado por meio das atividades das enzimas glutationa peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) e superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) e da dosagem do fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2).

4.9.1 Espectrofotometria para avaliação da GSH-Px e SOD

A atividade da glutationa peroxidase foi determinada segundo Nakamura e colaboradores (1974)[56] na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH2, azida sódica, EDTA, glutationa reduzida (GSH) e glutationa redutase. Através da oxidação do NADPH2 a 340nm na presença da glutationa redutase, que catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH - Px.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch e colaboradores (1981), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue -tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10) [57]. A hidroxilamina gera fluxo de O2- do NBT para *blue - forazana*, em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida proporcionalmente à atividade da SOD presente na amostra. . As leituras espectofotométricas foram realizadas a 240nm [58].

4.9.2 Western blotting para a proteína Nrf - 2

O Nrf - 2 é uma proteína cuja principal função é ativar a resposta antioxidante, induzindo a transcrição de uma ampla gama de genes relacionados ao combate de efeitos deletérios do estresse oxidativo e à restauração da homeostase intracelular.

O Nrf - 2 é uma proteína altamente instável e é rapidamente degradada pelo sistema proteossomal da ubiquitina [59].

Extração das proteínas com Kit NE - PER®

A extração de proteínas das amostras de VE foi realizada com o *Kit NE - PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Pierce Biotechnology), que permite a extração separadamente das proteínas citoplasmáticas e nucleares. A amostra congelada foi homogeneizada em tubo de Dunce com o tampão CER I do kit, de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. O CER I torna a célula túrgida, e causa estresse na membrana celular. Após incubação em gelo por 10 minutos, foi adicionado o tampão CER II, que atua promovendo a lise celular, e o produto dessa homogeneização foi centrifugado a 16.000 rpm por 7 minutos a 4ºC. O sobrenadante, que corresponde ao extrato citoplasmático, foi transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -80ºC.

Os *pellets* que permaneceram nos *eppendorfs* foram re-suspensos com o tampão NER, agitados e incubados em gelo por 10 min. Após 4 ciclos de agitação e

incubação, os *eppendorfs* foram centrifugados a 16.000 rpm por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante, que corresponde ao extrato nuclear, foi transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína dos extratos citoplasmático e nuclear foi analisada pelo método de Bradford[55], utilizando as curvas de *BSA Protein Standard* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

Protocolo para *Western Blot*

A expressão da proteína relacionada com a ativação do sistema antioxidante, Nrf - 2 foi analisada por *Western Blot*. O extrato nuclear foi utilizado para esta análise.

As proteínas presentes no extrato nuclear foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCl 240mM, SDS 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β - mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini -Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCl 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCl 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, foi de 10%. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA), por 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Neste momento a membrana foi cortada de acordo com o peso

molecular das proteínas de interesse do estudo para incubação do anticorpo primário do nrf - 2 e GAPDH. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, sob agitação constante por 12 horas. O anticorpo primário utilizado foi o *Nrf - 2 (C-20), rabbit IgG* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1:400. O anticorpo primário utilizado foi o *GAPDH (6C5), mouse monoclonal IgG1* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), (gliceraldeído 3 - fosfato desidrogenase; EC(1.2.1.12) na diluição de 1:5000. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 2 horas sob agitação constante. O anticorpo secundário utilizado foi o *IgG anti - rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1:8000 e o *Goat anti - mouse IgG - HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1:10000. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imuno-detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X - Omat AR (Eastman Kodak Co., USA), nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

As análises quantitativas dos *blots* foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço http://www.scioncorp.com/.

4.10 Metabolismo Energético Cardíaco

O metabolismo energético cardíaco foi determinado por espectrofotometria. Assim, avaliamos a atividade das enzimas β-hidroxiacil coenzima A desidrogenase (β-OH, E.C. 1.1.1.35) que participa do metabolismo dos ácidos graxos, lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) que participa do metabolismo da glicose e da citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) que participa na entrada da acetil coenzima A no ciclo do citrato. Para essas análises, 200mg de

ventrículos esquerdos foram homogeneizados sob gelo em 5ml de solução de tampão fosfato (0,1M, pH=7,4), contendo 1 mM de etileno diamino ácido tetra-acético (EDTA) [60-62].

A atividade da β-OH foi determinada no coração em meio contendo acetilcoenzima A 0,05 mM e dinucleotídeo adenina nicotinamida, na forma reduzida (NADH) 0,1 mM. A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato. A atividade da CS foi determinada em meio contendo acetilcoenzima A 0,1 mM e oxaloacetato 0,5 mM. Nesse estudo também foi determinada a concentração de proteínas totais. As análises foram feitas por meio de espectrofotômetro e o padrão utilizado foi a solução de albumina sérica bovina [60].

4.11 Determinação da Apoptose e da Conexina 43

Protocolo para imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica os fragmentos do coração foram cortados transversalmente e fixados, sucessivamente, em formaldeído a 10% por 24 horas, água corrente por 24 horas e álcool 70° por 24 horas. Após fixação, os fragmentos foram emblocados em parafina e em seguida, feitos cortes histológicos de 3 µm, dispostos em lâminas previamente tratadas com solução aderente de poli-d-lisina (Fluka), que permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas, para melhor fixação.

No início do processamento das lâminas, foi realizada a desparafinização do corte histológico em banhos sucessivos de xilol, álcool 100°, álcool 95° e álcool 70°, seguidos de hidratação em água destilada. Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica, em que os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0,1 M e submetidos à ambiente de microondas na potência de 700 watts, por 3 ciclos de 5 minutos cada. Após descanso (resfriamento) de 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,2 e incubadas por 10 minutos em solução de água oxigenada a 0,3%, em ambiente escuro. A seguir, os cortes foram lavados em

PBS e incubados por uma hora em solução de 1% de leite desnatado em PBS, para bloqueio de reações inespecíficas. Após os 60 minutos, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida com anticorpo primário para a proteína analisada, na diluição de 1:100.

Após esse período, foi feita lavagem das lâminas em PBS, e a incubação com o anticorpo secundário, na diluição de 1:200, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, e tratadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase, por 30 minutos, e em seguida com a solução do DAB (diaminobenzidino) por aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e contra-coradas com hematoxilina. Em seguida, foi realizada a desidratação dos cortes em banhos sucessivos de álcool 70°, álcool 95°, álcool 100° e xilol e a montagem das lâminas com a colocação das lamínulas.
A leitura das lâminas foi feita utilizando-se microscópio equipado com unidade de epifluorescênica (Carl-Zeiss, Inc. USA) acoplado a câmera de vídeo (AxioPlan 4.1; Carl-Zess Inc.) em aumento de 40X. O filtro verde (WG) foi utilizado e o comprimento de onda de excitação a 550 nm e emissão a 650nm.

Conexina 43

As reações de imunohistoquímica foram analisadas quanto à localização da conexina 43 no miócito (no disco intercalar ou fora do disco intercalar) e quanto à intensidade de marcação (no disco intercalar e fora do disco intercalar) de acordo com escores pré-estabelecidos.

Localização:

4+ Totalmente no disco intercalar
3+ Maioria no disco intercalar
2+ Metade no disco intercalar e metade fora do disco
1+ Minoria no disco intercalar
- Nenhuma marcação no disco intercalar

Intensidade de Marcação:

3+ Fortemente marcado

2+ Moderadamente marcado

1+ Fracamente marcado

O anticorpo primário utilizado foi o *Rabbit policlonal to connexin 43* (Abcam) e o anticorpo secundário utilizado foi o *Texas Red anti-rabbit IgG* (Vector).

Caspase 3

Para quantificação da apoptose pela marcação imunohistoquímica da caspase 3 clivada, foram contados, por toda extensão dos fragmentos, os miócitos com forte marcação nuclear e/ou citoplasmática. As áreas dos fragmentos de coração foram determinadas utilizando-se o programa de imagens KS300 (Carl Zeiss, Alemanha). O número de miócitos marcados foi dividido pela área do fragmento analisado, estimando-se o número de miócitos marcados pela caspase 3 por cm^2 de coração.

O anticorpo primário utilizado foi o *cleaved caspase - 3 (Asp175) (5A1) rabbit mAb*, e o anticorpo secundário foi o *anti - rabbit IgG, HRP - linked antibody*.

4.13 Análise Estatística

As comparações entre os grupos com variáveis contínuas e paramétricas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via. Os resultados obtidos foram apresentados em média ± desvio padrão e a avaliação foi complementada pelo teste de Tukey. As variáveis não paramétricas são apresentadas por mediana e intervalo interquartil e avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar os tamanhos do IAM. A mortalidade foi avaliada pela curva de Kaplan Meier e as diferenças entre as curvas pelo teste de Log-rank. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico Sigma Stat for Windows v 2.03 da SPSS.

5. Resultados

Consumo de água e ração

Os animais não apresentaram diferença estatística em relação à ingestão média diária de consumo de ração e no peso corporal final. O consumo médio de água semanal foi maior no grupo IAM-T quando comparado com o controle (C = 115 (102 - 144) ml; IAM = 147 (124 - 163) ml; IAM-T = 153 (138 - 176) ml; p = 0,016) (figura 1 e tabela 1). O consumo médio semanal de taurina por animal durante todo o experimento está representado na figura 2. Cabe destacar que o consumo diário por animal foi de 0,7g de taurina/d.

Tabela 1: Dados de consumo de ração, água e peso corpóreo.

	C (n=15)	IAM (n=21)	IAM-T (n=22)
PC (g)	426 ± 66,5[a]	424 ± 52,4[a]	416 ± 33,3[a]
Consumo de água (ml/semana)	115 (102 – 144)[a]	147 (124 – 163)[ab]	153 (138 – 176)[b]
Consumo de ração (g/d)	26,5 ± 3,0[a]	24,9 ± 4,2[a]	27,7 ± 6,2[a]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupos de animais infartados suplementados com taurina. PC: peso corpóreo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significa que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

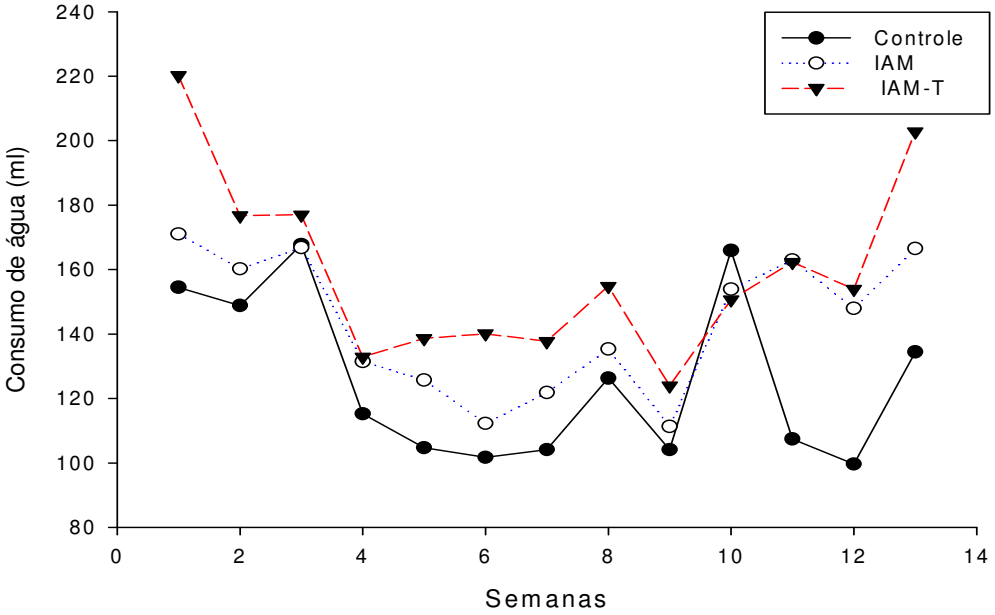


Figura 1 – Consumo médio semanal de água durante todo período do experimento dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina).

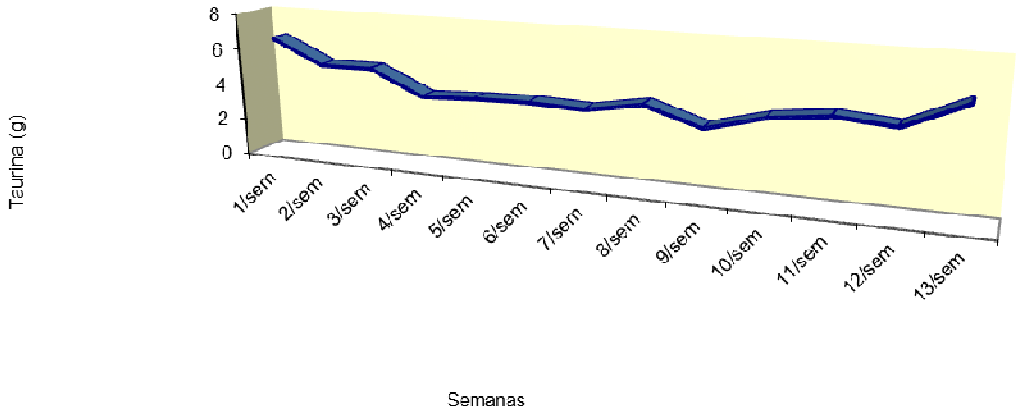


Figura 2 – Consumo médio semanal de taurina durante todo período do experimento do grupo infarto e suplementado com taurina.

Mortalidade

Considerando a mortalidade observada durante todo período do experimento não houve diferença estatística entre os grupos controle (0%), IAM (8%) e IAMT (12%); p = 0,86.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados obtidos na avaliação feita pelo ecocardiograma estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Os resultados morfológicos avaliados pelo ecocardiograma mostram que os animais do grupo IAM-T obtiveram valores intermediários, quando comparado com os grupos C e IAM, nas variáveis AE (C = 5,3 ± 0,7 mm; IAM = 6,8 ± 1,0 mm; IAM-T = 6,1 ± 0,8 mm; p = <0,001) (figura 3), AE/tíbia (C = 1,29 ± 0,18 mm/cm; IAM = 1,64 ± 0,25 mm/cm; IAM-T = 1,47 ± 0,04 mm/cm; p = <0,001) (figura 4), massa VE (C = 0,78 ± 0,1 g; IAM = 1,4 ± 0,3 g; IAM-T = 1,2 ± 0,2 g; p = <0,001) (figura 5) e EDPP (C = 1,4 (1,31 - 1,46) mm; IAM = 1,59 (1,53 - 1,7) mm; IAM-T = 1,49 (1,4 - 1,59) mm; p = <0,001) (figura 6). Adicionalmente, o grupo IAM-T apresentou menor EDSIV comparado com o grupo IAM (C = 1,4 ± 0,1 mm; IAM = 1,6 ± 0,2 mm; IAM-T = 1,5 ± 0,1 mm; p = <0,001) (figura 7).

Em relação às variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma, o grupo IAM-T apresentou valores intermediários, quando comparado com C e IAM, nas variáveis TRIV (C = 24 (22 - 26) ms; IAM = 28 (27,5 - 31) ms; IAM-T = 26 (26 - 31) ms; p = 0,003) (figura 8) e TRIV/$RR^{0,5}$ (C = 0,07 ± 0,02; IAM = 0,1 ± 0,02; IAM-T = 0,09 ± 0,01; p = 0,014) (figura 9). Por outro lado, a taurina não interferiu nas demais variáveis avaliadas.

Tabela 2: Dados morfológicos do ecocardiograma 3 meses após o infarto

	C (n=10)	**IAM** (n=21)	**IAM-T** (n=22)
AE (mm)	5,3 ± 0,7[a]	6,8 ± 1,0[b]	6,1 ± 0,8[c]
AE/Tíbia (mm/cm)	1,29 ± 0,18[a]	1,64 ± 0,25[b]	1,47 ± 0,21[c]
DDVE (mm)	7,9 ± 0,5[a]	10 ± 0,9[b]	9,8 ± 0,9[b]
DSVE (mm)	3,4 (3 – 3,6)[a]	7,5 (6,9 – 8,1)[b]	7,2 (6,3 – 7,9)[b]
Massa VE (g)	0,78 ± 0,1[a]	1,4 ± 0,3[b]	1,2 ± 0,2[c]
EDSIV (mm)	1,4 ± 0,1[a]	1,6 ± 0,2[b]	1,5 ± 0,1[a]
EDPP (mm)	1,4 (1,31 – 1,46)[a]	1,59 (1,53 – 1,7)[b]	1,49 (1,4 – 1,59)[c]
A-diastólica (cm^2)	0,45 (0,38 – 0,47)[a]	0,84 (0,7 – 0,91)[b]	0,71 (0,64 – 0,88)[b]
A-sistólica (cm^2)	0,12 (0,1 – 0,13)[a]	0,58 (0,46 – 0,63)[b]	0,41 (0,35 – 0,54)[b]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupos de animais infartados suplementados com taurina; PC: peso corpóreo: AE: átrio esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; A-diastólica: área diastólica do VE no eixo menor paraesternal; A-sístólica: área sistólica do VE em eixo menor paraesternal; Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Tabela 3: Dados funcionais do ecocardiograma 3 meses após o infarto

	C (n=10)	**IAM** (n=21)	**IAM-T** (n=22)
Onda E (cm/s)	78 (75 – 75,2)[a]	79 (65,2 – 92,5)[a]	80 (71 – 89)[a]
Onda A (cm/s)	51 (41,5 – 55,7)[a]	47 (35,2 – 60,5)[a]	48 (43 – 55)[a]
TDE (ms)	41,7 ± 6,8[a]	40,1 ± 8,4[a]	39,3 ± 5,4[a]
TRIV (ms)	24 (22 – 26)[a]	28 (27,5 – 31)[b]	26 (26 – 31)[ab]
TRIV/RR ^{0,5}	78,5 ± 21,6[a]	100 ± 21,3[b]	91,1 ± 19,7[ab]
VEPP (mm/s)	37,5 ± 4,1[a]	28,8 ± 8,3[b]	30,7 ± 4,2[b]
FAV	71,4 ± 6,1[a]	35,5 ± 10,2[b]	40,4 ± 11,3[b]
FC (bpm)	308 ± 43,7[a]	293 ± 39,5[a]	302 ± 32,1[a]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupos de animais infartados suplementados com taurina. E/A: relação entre as ondas E e A avaliadas pelo fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/RR^{0,5}: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela freqüência cardíaca; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE. FAV: porcentagem de variação de área; FC: frequência cardíaca; Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana e percentis 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significa que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

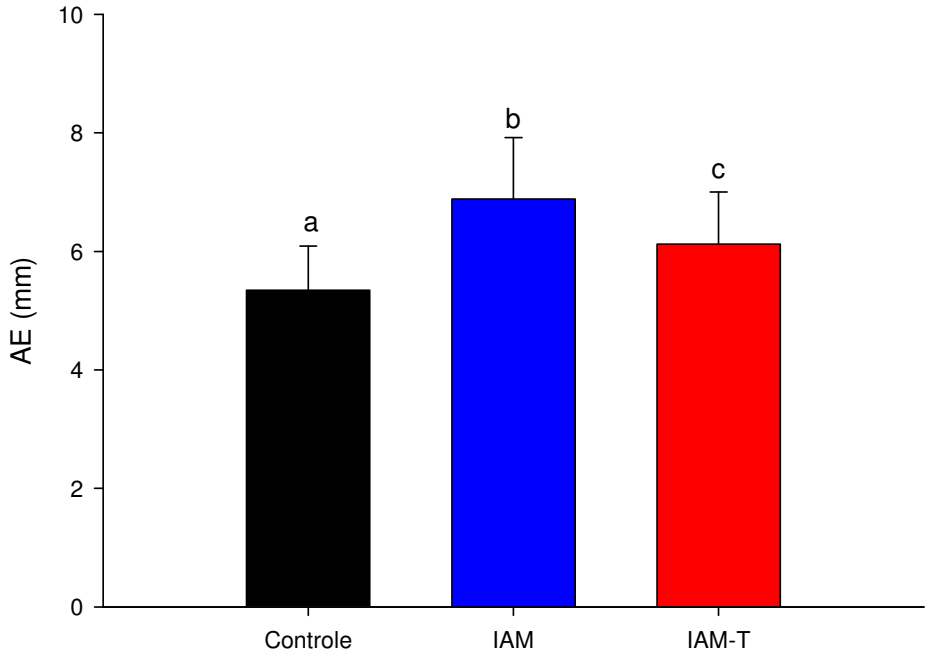


Figura 3 – Átrio esquerdo (AE) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

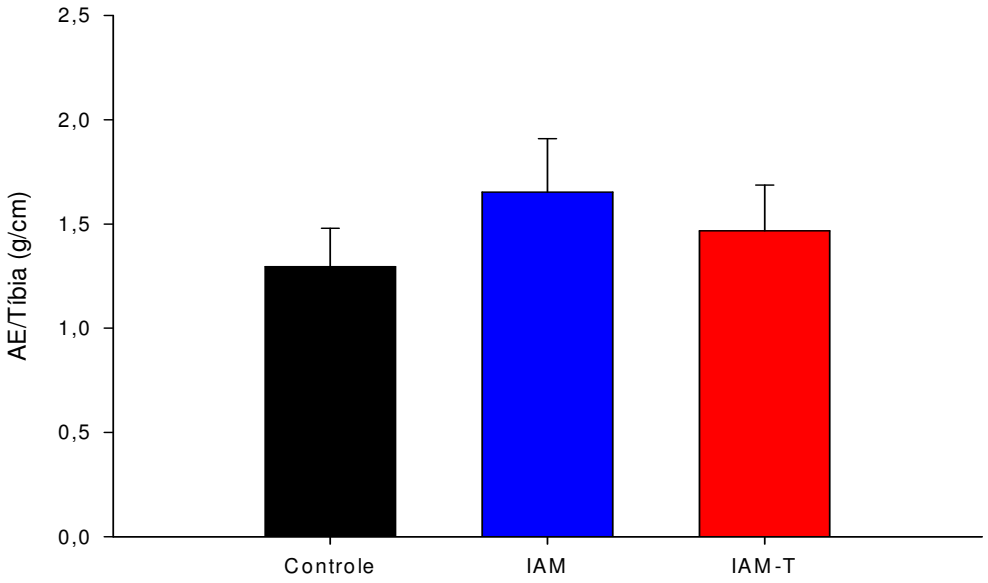


Figura 4 – Átrio esquerdo corrigido pela tíbia (AE/tíbia) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

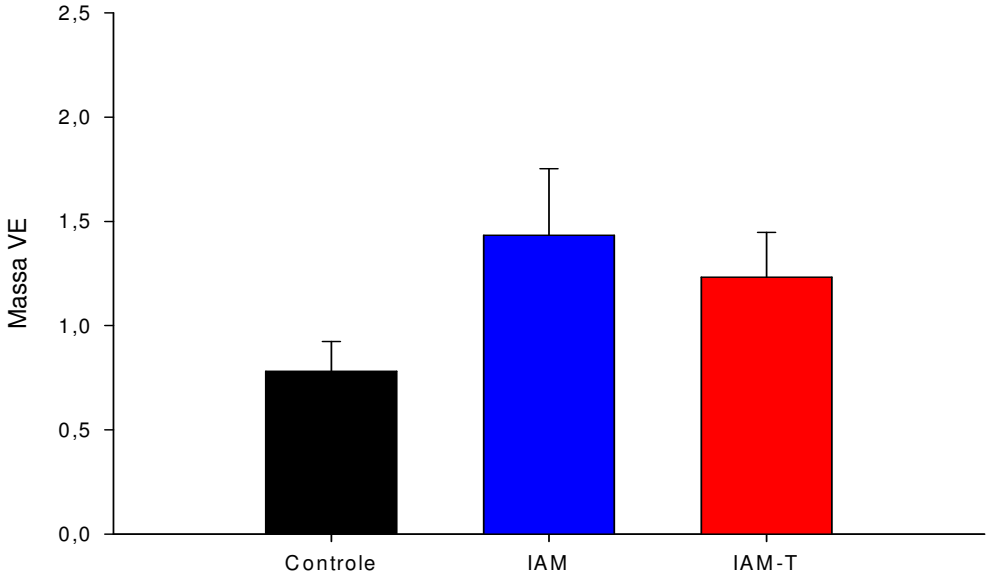


Figura 5 – Massa do ventrículo esquerdo (massa VE) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

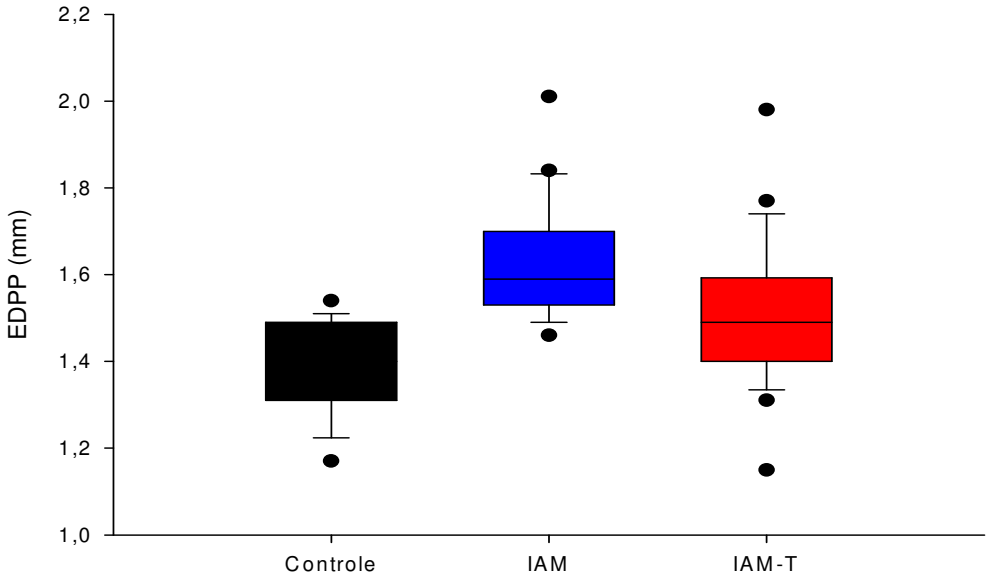


Figura 6 – Espessura diastólica da parede posterior (EDPP) dos grupos controle , IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

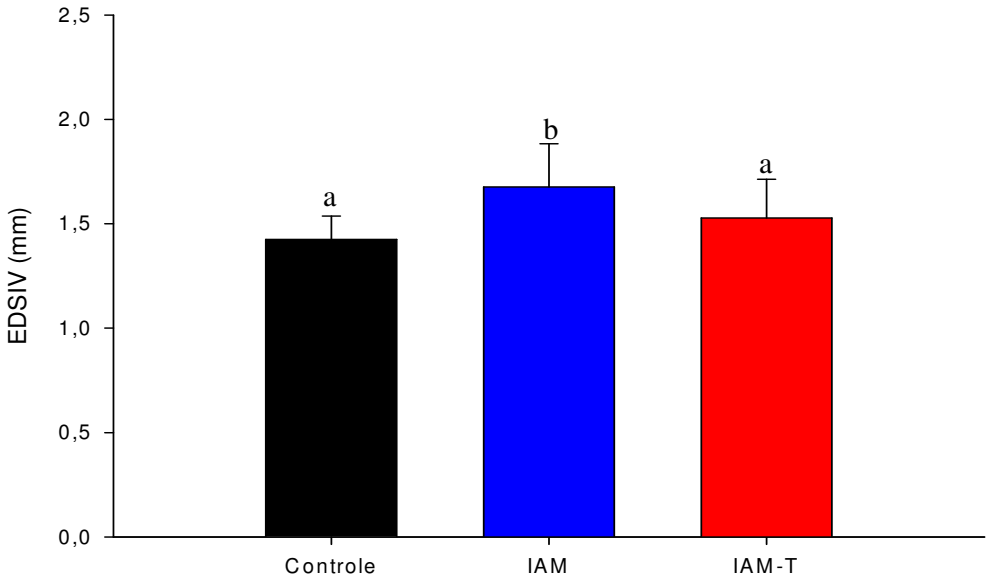


Figura 7 – Espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

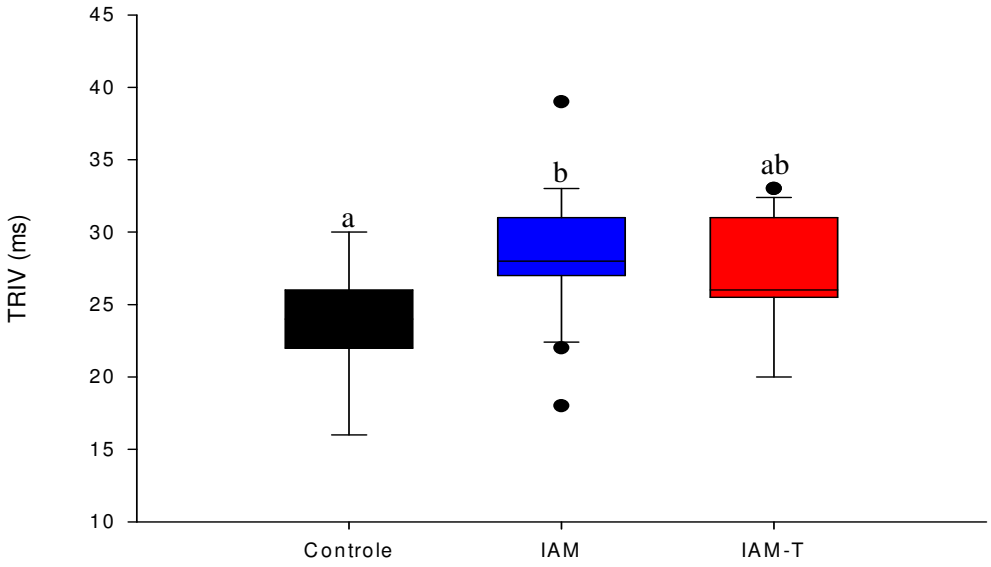


Figura 8 – Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

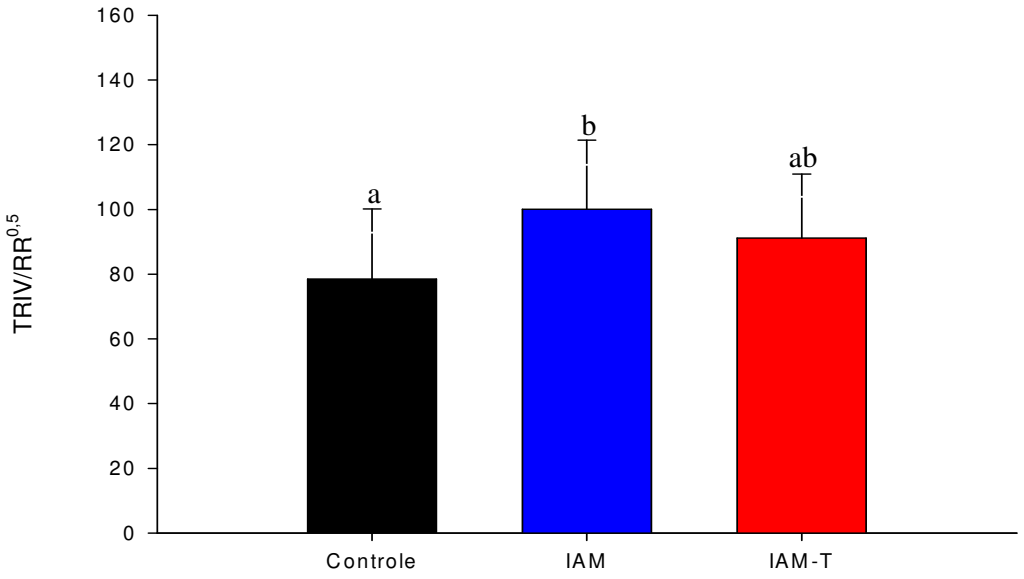


Figura 9 – Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV/$RR^{0,5}$) corrigido pela frequência cardíaca dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Estudo do Coração Isolado

Os resultados referentes ao estudo do coração isolado estão na tabela 4. Variando-se a pressão diastólica de 0 a 25 mmHg, o grupo C apresentou maiores valores de pressão sistólica máxima, derivada positiva máxima de pressão e derivada negativa máxima de pressão que os grupos infartados. Por outro lado, não houve diferenças em todas as variáveis entre os grupos IAM e IAM-T.

Tabela 4: Dados do coração isolado 3 meses após o infarto.

	C (n=7)	IAM (n=7)	IAM-T (n=7)
PS (mmHg)	183 ± 39[a]	125 ± 13[b]	111 ± 27[b]
– dP/dt (mmHg/s)	2375 ± 515[a]	1725 ± 136[b]	1517 ± 398[b]
+ dP/dt (mmHg/s)	5150 ± 1387[a]	2900 ± 681[b]	2267 ± 1107[b]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupos de animais infartados suplementados com taurina. PS: pressão sistólica; +dp/dt: derivada positiva de pressão; -dp/dt: derivada negativa de pressão. Os números referem-se aos valores máximos obtidos variando-se a pressão diastólica de 0 a 25 mmHg.Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Estudo morfológico

Em relação ao estudo morfológico avaliado após a eutanásia, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (tabela 5).

Estudo histológico

Em relação ao tamanho do infarto, não foram encontradas diferenças entre os animais dos dois grupos infartados. Em relação à área seccional e diâmetro dos miócitos, o grupo C apresentou menores valores que os grupos infartados. Não foram encontradas diferenças entre os três grupos em relação ao índice de colágeno (tabela 6).

Tabela 5: Dados morfológicos dos ratos 3 meses após o infarto

	C (n=11)	IAM (n=14)	IAM-T (n=15)
VD (g)	0,21 ± 0,05[a]	0,24 ± 0,09[a]	0,22 ± 0,07[a]
VE (g)	0,79 ± 0,07[a]	0,84 ± 0,12[a]	0,84 ± 0,09[a]
VD/Tíbia (g/cm)	0,05 ± 0,01[a]	0,058 ± 0,02[a]	0,052 ± 0,01[a]
VE/Tíbia (g/cm)	0,18 ± 0,01[a]	0,2 ± 0,02[a]	0,20 ± 0,02[a]
Teor de água pulmão (%)	76,4 (71,9–78,5)[a]	74,5 (69,4–76,5)[a]	75,6 (73,3–80,7)[a]
Teor de água fígado (%)	67,6 (67–68,8)[a]	67,7 (66,2–68,1)[a]	67,6 (65,5–68,9)[a]
Teor de água coração (%)	75,3 (73–75,7)[a]	75,1 (74,5–76,8)[a]	75,4 (74–76,8)[a]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Tabela 6: Dados histológicos dos ratos 3 meses após o infarto

	C (n=15)	IAM (n=21)	IAM-T (n=22)
% Infarto	-	31,3 ± 11,5[a]	31,7 ± 10,4[a]
ASM (µm)	274 (245 – 324)[a]	541 (435 – 589)[b]	457 (362 – 577)[b]
Diâmetro do miócito (µm)	16,8 (15,2–18,7)[a]	22,4 (20,2– 23,3)[b]	21,5 (18,9– 22,9)[b]
IC (%)	4,1 ± 1,5[a]	4,3 ± 1,6[a]	5,2 ± 2,2[a]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina; ASM: área seccional do miócito; IC: índice de colágeno.Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Estudo Bioquímico, Imunohistoquímico e Molecular

Primeiramente, a suplementação com taurina foi eficiente, pois aumentou estatisticamente os valores plasmáticos e teciduais cardíacos do grupo IAM-T em relação ao controle e IAM (tabela 7). Taurina plasmática (C = 49 (38 - 54,2) (µmol/L); IAM = 74,6 (58,7 - 83) (µmol/L); IAM-T = 363 (157 - 477,4) (µmol/L); p = 0,004) (figura 10) e Taurina tecido cardíaco (C = 0,100 ± 0,04

(µmol/g); IAM = 0,175 ± 0,07 (µmol/g); IAM-T = 0,419± 0,187 (µmol/g); p = 0,022) (figura 11).

Em relação à análise da conexina 43, a suplementação com taurina não causou interferência nessa variável. Por outro lado, os grupos infartados apresentaram menor marcação e intensidade da conexina 43 no disco intercalar (tabela 7).

Considerando os valores da caspase 3, o grupo infartado e suplementado com taurina apresentou estatisticamente menor número de células apoptóticas do que o grupo infartado (tabela 7) (C = 0,0259 ± 0,0172 (unidade/cm^2); IAM = 0,472 ± 0,354 (unidade/cm^2); IAMT = 0,115 ± 0,121(unidade/cm^2); p = 0,016) (figura 12).

Em relação às metaloproteases, o grupo IAM-T apresentou valores intermediários da MMP 2 e 9 ativas comparado com os grupos IAM e controle (tabela 7). MMP 2 ativa (C = 5420 (3557-7227) (DO); IAM = 12500 (11800-12700) (DO); IAM-T = 6225 (3430-10645) (DO) ; p = 0,047) (figura 13) e MMP 9 ativa (C = 9912 (8356-10650) (DO); IAM = 31500 (20100-37350) (DO); IAM-T = 11900 (10550-15050) (DO); p = 0,043) (figura 14).

Considerando as variáveis do estresse oxidativo, o tratamento com taurina não interferiu nos níveis aumentados de superóxido dismutase dos animais infartados. Por outro lado, os animais suplementados com taurina apresentaram menores valores de glutationa peroxidase quando comparado com animais infartados sem tratamento e níveis intermediários da proteína Nrf-2, sugerindo menor estímulo oxidante (tabela 8). GSH-px (C = 624 ± 165 (nmol/mg proteína); IAM = 821 ± 203 (nmol/mg proteína); IAM-T = 494 ± 74 (nmol/mg proteína); p <0,001) (figura 15) e Nrf-2 (C = 0,63 ± 0,21; IAM = 0,25 ± 0,16; IAM-T = 0,42 ± 0,14; p< 0,022) (figura 16).

Em relação às variáveis do metabolismo energético, os animais do grupo IAM-T apresentaram aumento dos níveis da CS, β-OH, e LDH comparado com o controle, sugerindo aumento da oferta dos substratos para o metabolismo energético cardíaco (tabela 8). CS (C = 384 (336- 408) (nmol/mg proteína); IAM = 508 (422 - 563) (nmol/ mg proteína); IAM-T = 669 (542 - 768) ; p < 0,001) (figura 17); β-OH (C = 82 (80 - 91,3) (nmol/mg proteína); IAM = 182 (129 -

232) (nmol/mg proteína); IAM-T = 341 (250 - 419) (nmol/ mgproteína) p <0,001) (figura 18); LDH (C = 618 ± 128 (nmol/mg proteína); IAM = 943 ± 167 (nmol/mg proteína); IAM-T = 1283 ± 236 (nmol/mg proteína); p<0,001) (figura 19). Em contrapartida, os animais do grupo IAM tiveram aumento dos níveis da LDH, sugerindo aumento da via glicolítica.

Tabela 7: Níveis de taurina, conexina 43, apoptose e mataloproteases 2 e 9 após 3 meses de infarto

	C (n=6)	**IAM** (n=6)	**IAM-T** (n=6)
Taurina plasmática (µmol/L)	49 (38–54,2)[a]	74,6 (58,7–83)[b]	363 (157–477,4)[c]
Taurina tecido cardíaco (µmol/g)	0,276±0,104[a]	0,376±0,175[a]	0,8± 0,419[b]
I-Cx43	2,77 (2,7–2,8)[a]	1,8 (1,5–2,5)[b]	1,77 (1,6–1,9)[b]
D-Cx43	3,1±0,3[a]	1,6±0,5[b]	1,3±0,3[b]
Caspase 3 (unidade/cm²x10^8)	0,0259±0,0172[a]	0,472±0,354[b]	0,115±0,121[a]
MMP 2 ativa	5420 (3557–7227)[a]	12500 (11800–12700)[b]	6225 (3430–10645)[ab]
MMP 9 ativa	9912 (8356–10650)[a]	31500 (20100–37350)[b]	11900 (10550–15050)[ab]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupos de animais infartados suplementados com taurina; I-Cx43:intensidade de marcação da conexina 43 no disco intercalar; D-Cx43: distribuição da conexina 43 no disco intercalar; MMP: metaloprotease. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Para a caspase 3, utilizamos 4 animais em cada grupo. Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

Tabela 8: Estresse oxidativo e metabolismo energético cardíacos após 3 meses de infarto

	C (n=6)	**IAM** (n=6)	**IAM-T** (n=6)
GSH-px (nmol/mgproteína)	624 ± 165[a]	821 ± 203[b]	494 ± 74[a]
SOD (nmol/mgproteína)	20,7 (20 – 21)[a]	24,1 (22,9 – 25,3)[b]	24 (23,6 – 24,2)[b]
Nrf -2	0,63 ± 0,21[a]	0,25 ± 0,16[b]	0,42 ± 0,14[ab]
CS (nmol/mgproteína)	384 (336– 408)[a]	508 (422 – 563)[ab]	669 (542 – 768)[b]
β-OH (nmol/mgproteína)	82 (80 – 91,3)[a]	182 (129 – 232)[ab]	341 (250 – 419)[b]
LDH (nmol/mgproteína)	618 ± 128[a]	943 ± 167[b]	1283 ± 236[c]

C: grupo de animais não infartados; IAM: grupo de animais infartados; IAM-T: grupo de animais infartados suplementados com taurina; GSH-px: glutationa peroxidase; SOD superóxido desmutase; Nrf 2 : fator nuclear eritóide 2; CS: citrato cintase; β-OH: β- hidroxiacilcoenzima A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase; Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

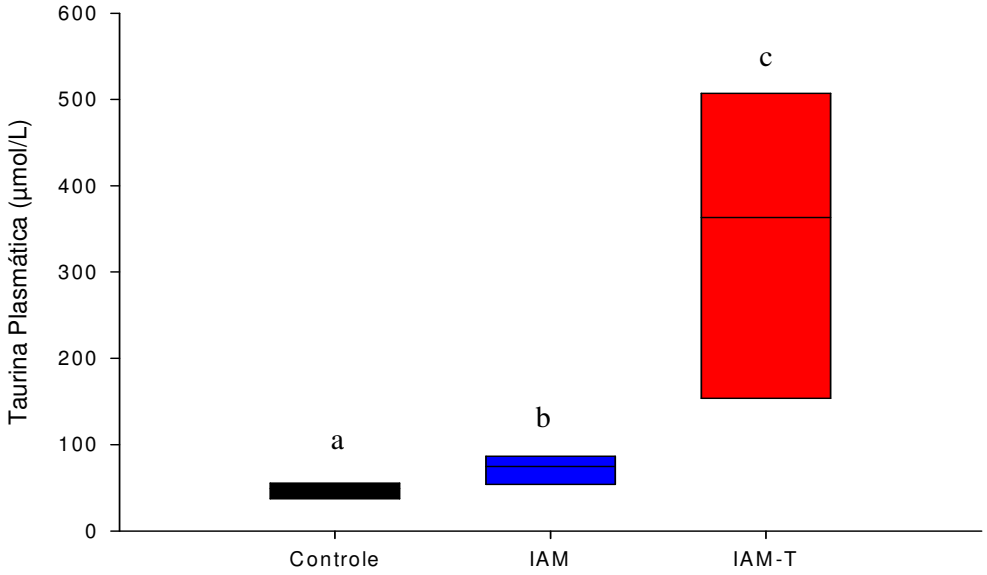


Figura 10 – Concentração de taurina plasmática dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

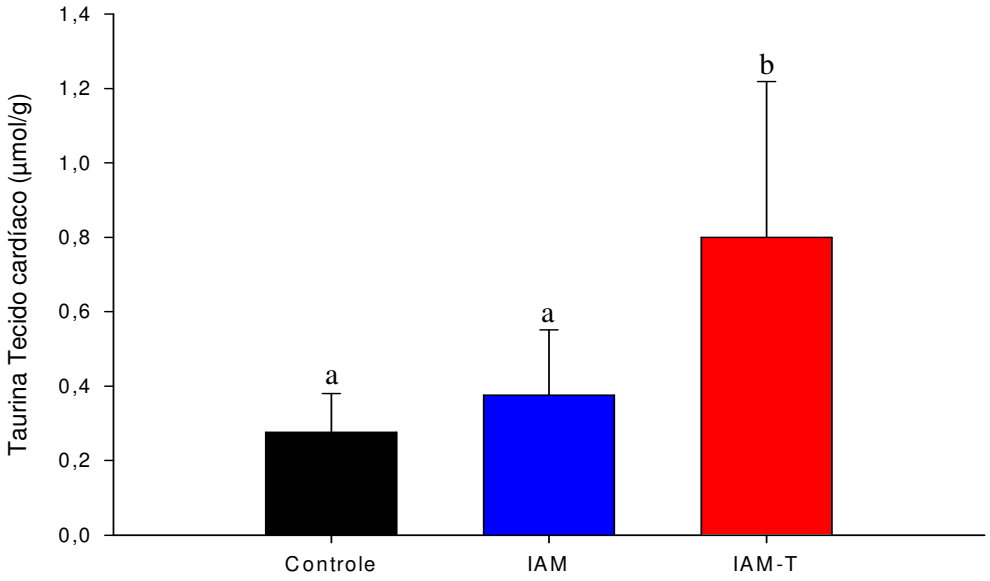


Figura 11 – Concentração de taurina no tecido cardíaco dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

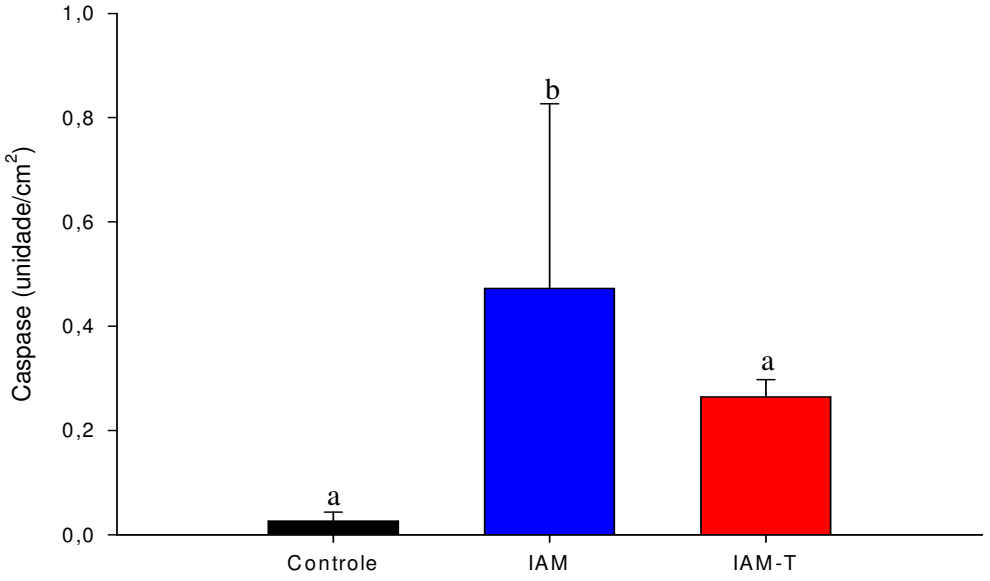


Figura 12 – Células apoptóticas (caspase 3) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

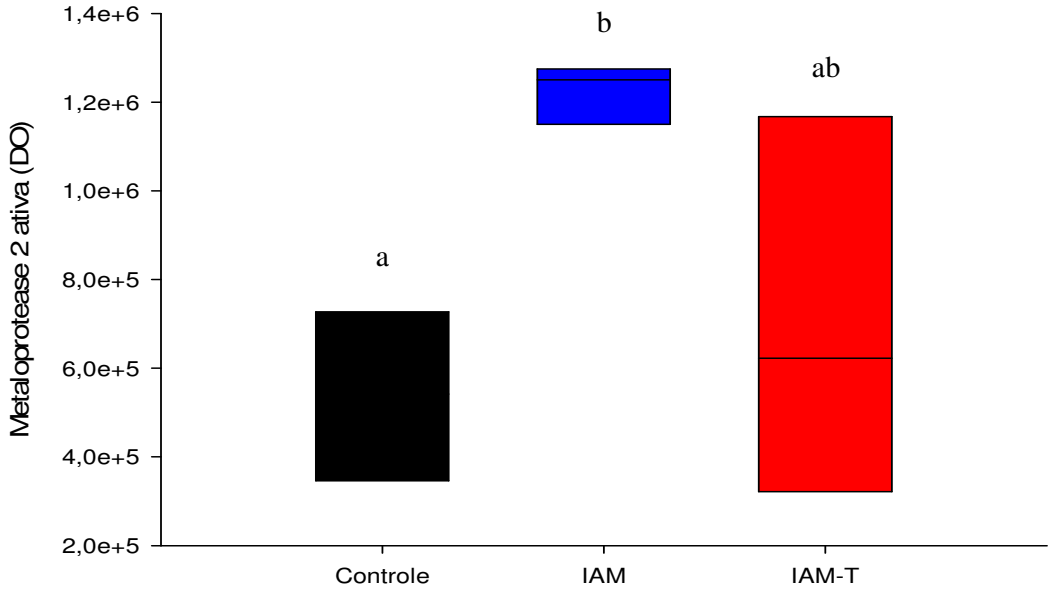


Figura 13 – Atividade da metaloprotease 2 dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

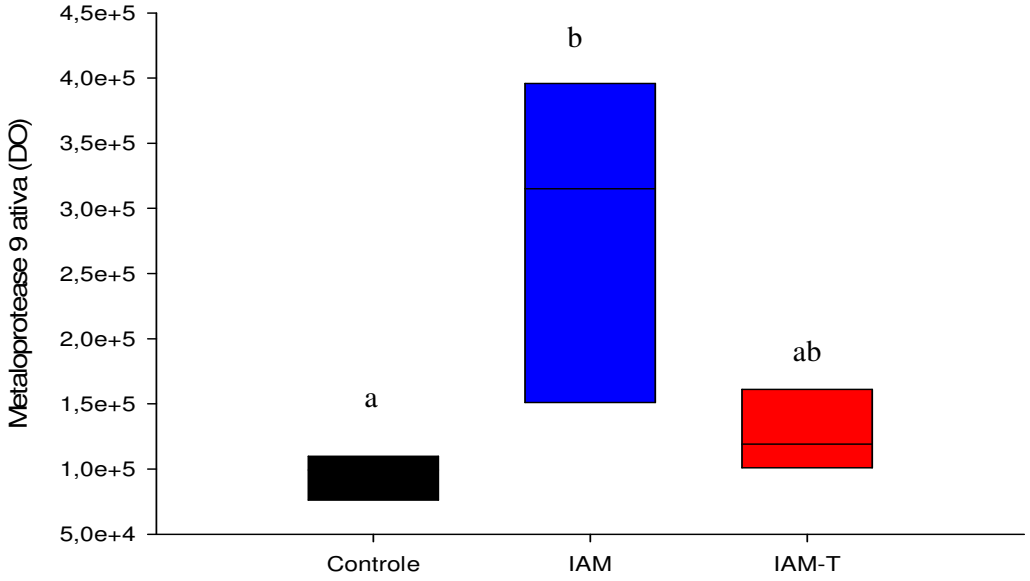


Figura 14 – Atividade da metaloprotease 9 dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

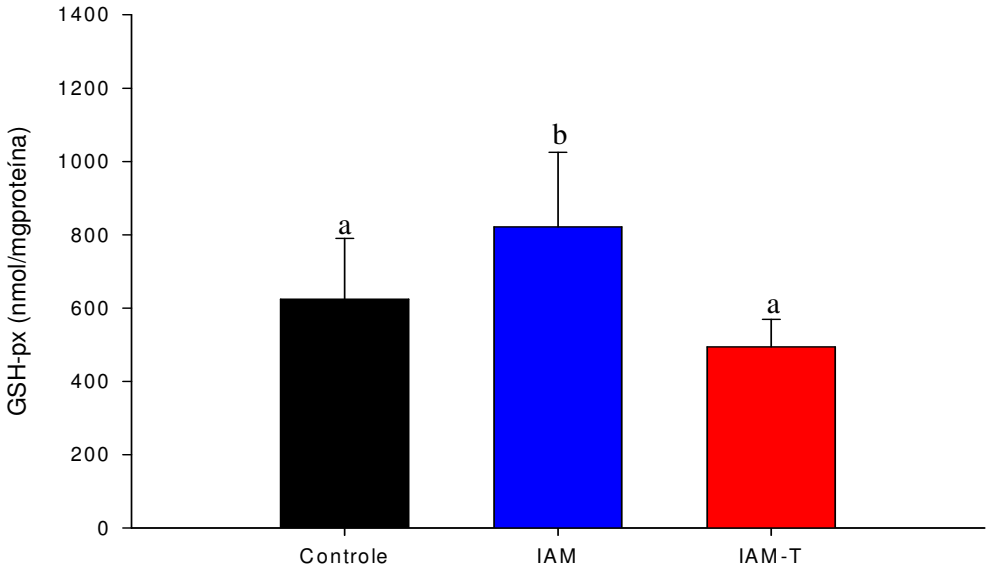


Figura 15 – Glutationa peroxidase (GSH-px) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

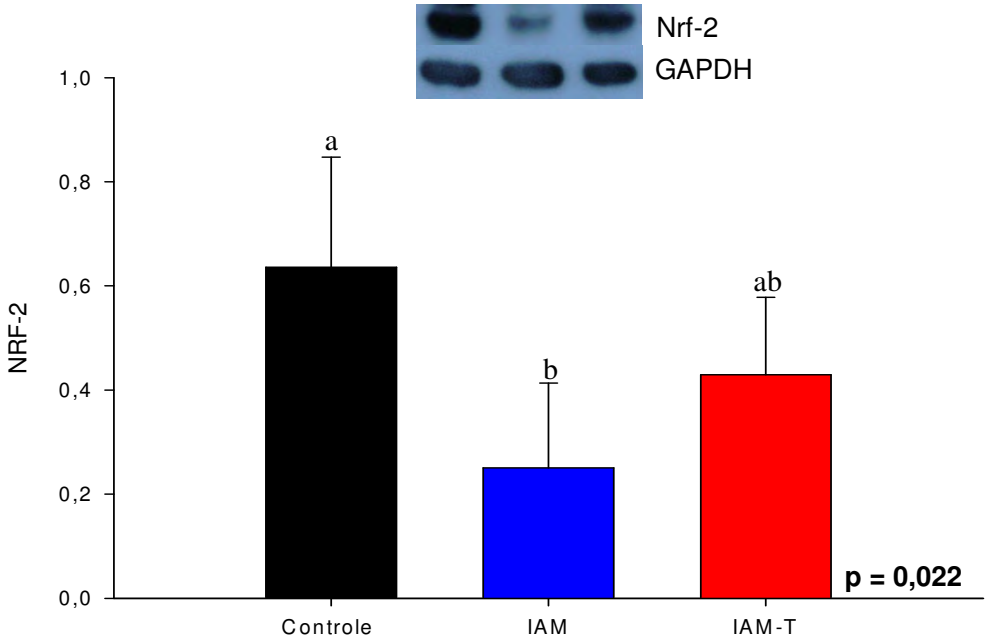


Figura 16 - Fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

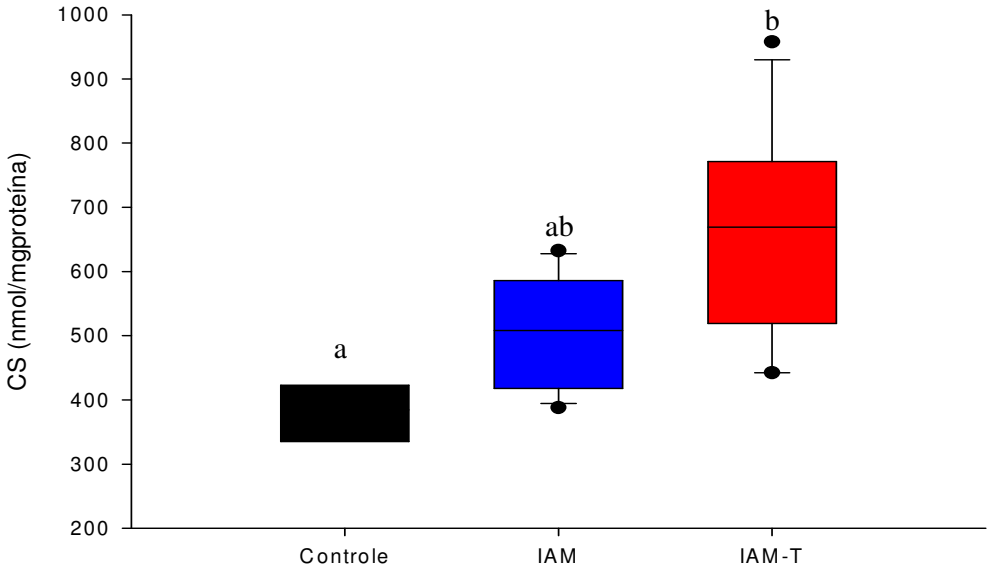


Figura 17 - Citrato Sintase (CS) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

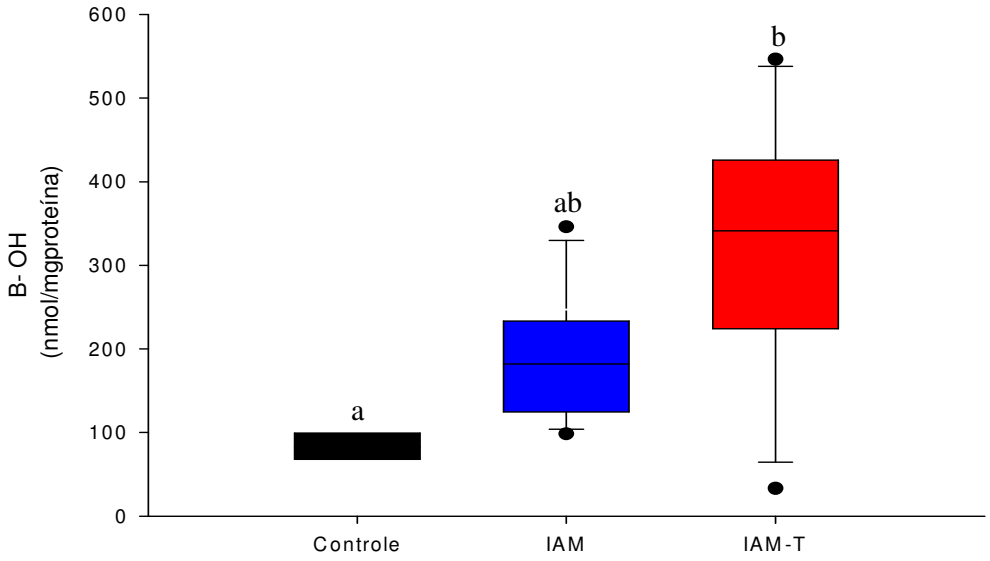


Figura 18 – β- hidroxiacilcoenzima A desidrogenase (β-OH) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

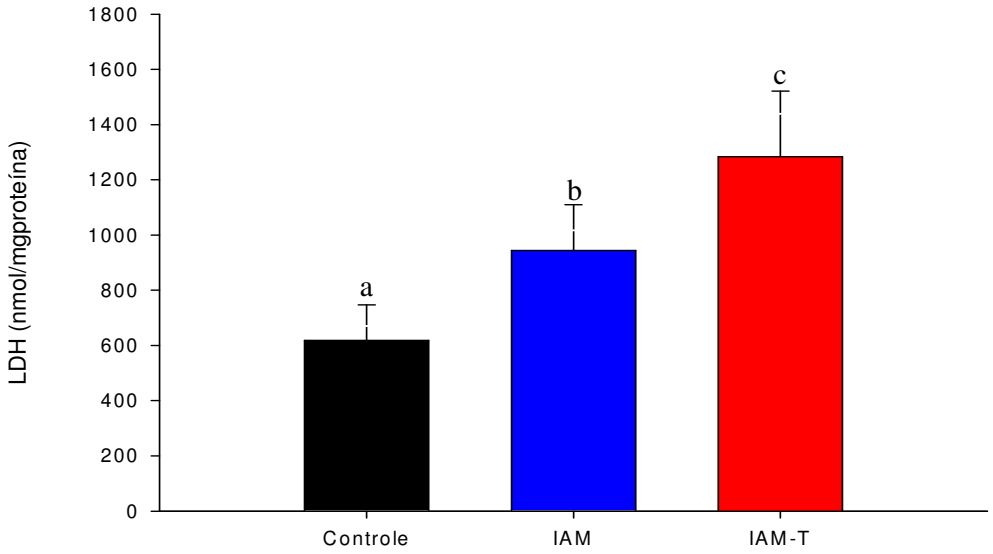


Figura 19 - Lactato desidrogenase (LDH) dos grupos controle, IAM e IAM-T (IAM: grupo de animais infartados; IAMT: grupo de animais infartados suplementados com taurina). Letras iguais significam que não existe diferença estatística, enquanto letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si.

6. Discussão

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da administração de taurina sobre a remodelação ventricular após o infarto do miocárdio em ratos, por meio de análise de sobrevida e de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas, moleculares e intersticiais.

O primeiro aspecto a ser ressaltado em nossos resultados refere-se à suplementação de taurina. Nosso estudo utilizou protocolo já validado na literatura, com a utilização da suplementação de taurina na forma de 3% diluída na água de beber. Nossos resultados reforçam o acerto na metodologia escolhida[40-42]. Essa inferência se baseia no fato de que a quantidade do aminoácido detectada no soro e no tecido dos animais suplementados foi significativamente maior em comparação com as quantidades de taurina sérica e cardíaca encontradas nos animais não suplementados. Portanto, podemos deduzir que nosso protocolo de suplementação foi eficiente.

Devemos ressaltar, também, que a remodelação ventricular é caracterizada por variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão[23-25]. Desse modo, o estudo de estratégias que interferem com a remodelação após o infarto envolve a análise de diferentes variáveis.

Em relação aos aspectos morfológicos, o IAM leva a alterações complexas na arquitetura do coração. A dilatação do ventrículo esquerdo e o afilamento da parede, em consequência do processo de expansão[27], são características da região infartada. Adicionalmente, na região não infartada também ocorre aumento da cavidade, em consequência da hipertrofia dos miócitos. Ademais, observa-se que a relação raio da espessura/cavidade da parede aumenta, caracterizando hipertrofia ventricular do tipo excêntrica. Por essa razão, esse fenômeno, clinicamente, é diagnosticado por alterações do diâmetro da cavidade, da massa ou da espessura ventricular esquerda[26,63].

Em nosso trabalho, considerando os efeitos da taurina nas variáveis morfológicas, os animais infartados suplementados com taurina não apresentaram diferenças no diâmetro da cavidade ventricular esquerda. No entanto, o grupo tratado apresentou menores valores de massa a das espessuras

da parede do VE comparado com o grupo infartado e não tratado. Assim, podemos concluir que a suplementação com taurina atenuou algumas das variáveis que caracterizam a remodelação após o IAM.

Outro aspecto relevante da remodelação ventricular após o IAM é que esse processo está associado à disfunção ventricular progressiva, arritmias complexas e maior mortalidade[24-28]. Em nosso estudo, conforme esperado, podemos verificar que o infarto do miocárdio resultou em comprometimento da função diastólica e sistólica.

Em relação aos efeitos do tratamento nas variáveis funcionais, no nosso estudo os animais infartados e suplementados com taurina apresentaram melhor função diastólica em comparação aos animais infartados e não suplementados. Essa conclusão tem embasamento nos efeitos da taurina no diâmetro do átrio esquerdo e no TRIV. Primeiramente, se aceita que a melhora da diástole resulta em menores valores da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Em consequência, a melhor diástole resulta em menores valores de pressão no átrio esquerdo e, por sua vez, menores valores do tamanho do átrio. Em nosso estudo, a suplementação com taurina induziu menores diâmetros do átrio esquerdo, ajustados ou não pelo comprimento da tíbia. Do mesmo modo, o TRIV corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da válvula mitral. De modo bastante simplificado, o TRIV aumenta com a piora do relaxamento e diminui com a melhora da complacência do ventrículo esquerda[64]. Em nosso trabalho, o tratamento com a taurina resultou em valores intermediários entre o grupo não infartado e o grupo infartado sem tratamento. Portanto, a suplementação com taurina atenuou, mas não preveniu, a disfunção diastólica induzida pela oclusão coronariana.

Em relação aos efeitos da taurina em variáveis da função sistólica, devemos considerar que a disfunção sistólica é uma das principais características do processo de remodelação após o IAM[26]. Porém, contrariamente ao esperado, não observamos diferença na FAC e VEPP avaliadas pelo ecocardiograma e na PS, +dP/dT avaliadas pelo coração isolado entre os animais infartados suplementados com o aminoácido em relação aos animais infartados e não suplementados. Portanto, podemos inferir que a atenuação das alterações morfológicas causadas

pela suplementação com taurina foi acompanhada por melhora da função diastólica após o IAM, mas sem interferência na disfunção sistólica.

Analisando os efeitos da taurina no sistema cardiovascular, os estudos mostram que a deficiência pode levar a prejuízo na função cardíaca. Neste sentido, Pion e colaboradores, ao estudarem a deficiência de taurina em gatos, mostraram que animais alimentados com dieta purificada com concentração marginal do aminoácido apresentaram alterações ecocardiográficas compatíveis com insuficiência cardíaca[65]. O mesmo resultado foi encontrado por Fascetti e colaboradores quando estudaram cães[66]. Ito e colaboradores, ao estudarem camundongos geneticamente modificados, não encontraram diferença em relação à cavidade ventricular, entretanto, a função cardíaca mostrou-se comprometida nos animais deficientes em taurina[67]. Ainda em relação à deficiência, os trabalhos clínicos mostram que a concentração de taurina está alterada em pacientes com insuficiência cardíaca[68]. A redução também foi encontrada na isquemia miocárdica[69].

Do mesmo modo, a suplementação com taurina interfere com diversas variáveis cardíacas em diferentes modelos de agressão. Nesse sentido, nosso grupo mostrou, recentemente, que no modelo de ratos fumantes, a suplementação com taurina (3% na água) levou a aumento na espessura da parede do VE e piora da função diastólica[70]. No mesmo modelo animal, Shi e colaboradores mostraram que a administração de isoprotenerol, um indutor de miocardiopatia, resultou em dilatação da câmara ventricular esquerda. Os animais suplementados com taurina (2% na água) apresentaram apenas discretas alterações causadas pelo isoprotenerol[71]. Em relação aos trabalhos clínicos os dados são escassos. Entretanto, Azuma e colaboradores observaram em pacientes com quadro clínico de insuficiência cardíaca que aqueles que mantinham dose oral de 4g de taurina diariamente apresentaram melhora significante nos sintomas de congestão, em relação aos pacientes com baixa ingestão[72]. Portanto, os efeitos da suplementação de taurina são controversos e podem depender do modelo de agressão cardíaca.

Apesar dessas evidências, no entanto, é importante ressaltar que não encontramos na literatura outros trabalhos que avaliem as ações da taurina nas alterações morfofuncionais após o infarto até o presente momento.

Considerando os mecanismos fisiopatológicos que estão envolvidos no processo de remodelação ventricular, eles não estão completamente elucidados. No entanto, diversos fatores são sugeridos como moduladores da remodelação e da disfunção ventricular. Entre eles, destacam-se: estresse oxidativo, morte celular, alterações das metaloproteases, fibrose, alterações das junções comunicantes intercelulares, déficit energético, hipertrofia e alterações geométricas do ventrículo esquerdo[29]. Por essa razão, esses foram os mecanismos escolhidos para serem analisados em nosso modelo.

O estresse oxidativo pode agir tanto na membrana celular causando a lipoperoxidação como no núcleo celular interferindo no DNA e RNA. Consequentemente, atua como indutor de danos celulares que alteram variáveis funcionais e estruturais cardíacas. Por essa razão, o estresse oxidativo é um dos principais moduladores do processo de remodelação cardíaca, pois pode atuar na síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos, ativação das metaloproteases, apoptose, hipertrofia dos miócitos e expressão de genes do período fetal. Deve-se considerar, no entanto, que as fontes produtoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os mecanismos pelos quais ela modula o processo remodelação ventricular ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que proporção significante de ERO são produzidas na fase aguda do IAM a partir de células do infiltrado inflamatório na região infartada. Posteriormente, na fase crônica, as ERO podem ser produzidas também na região não infartada. Nesta fase, durante a progressão da remodelação ventricular, existem evidências que a mitocôndria, a xantina oxidase e a NADPH oxidase são as fontes predominantes de ERO[37,75,76].

A taurina possui ação antioxidante e age por meio da eliminação desses indutores, reforçando tanto as membranas dos miócitos como as terminações nervosas simpáticas do coração[73,74].

No nosso trabalho, a atividade antioxidante da taurina foi avaliada pela expressão do Nrf-2 e pela atividade da SOD e GSH-px. Nos últimos anos, o Nrf-2 emergiu na comunidade científica como a chave reguladora de doenças

mediadas pelo estresse oxidativo, por possuir papel crucial na proteção das células contra as ERO[77-80]. Em condições normais, o Nrf-2 está presente no citoplasma ligado a proteína Keap 1. A dissociação dessa ligação acontece na presença de mudanças no meio celular a partir da presença de ERO e substâncias eletrofílicas. Como consequência, o Nrf-2 é translocado para o núcleo e ativa genes citoprotetores envolvidos na conjugação eletrofílica, excreção de xenobióticos, limpeza das ERO e estabilização do potencial redox celular, agindo assim, como um elemento de resposta antioxidante[81]. Cabe ressaltar, ainda, que o Nrf-2 induz as enzimas fase II de detoxicação e de antioxidantes, que incluem as enzimas para a síntese de glutationa, glutationa peroxidase, glutationa S-transferase, NAD(P)H quinona oxido-redutase-1, heme oxigenase 1, glutationa redutase e tioredoxina[82].

O potencial papel do Nrf-2 no processo de remodelação ventricular permanece pouco explorado na literatura. Li e colaboradores utilizaram, como modelo de agressão cardíaca, animais com constrição aórtica transversa. Adicionalmente, eles eram geneticamente modificados para a expressão do Nrf-2. Os animais com expressão suprimida do Nrf-2 apresentaram aumento do estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca patológica, maiores níveis de fibrose e apoptose, manifestações clínicas de insuficiência cardíaca e aumento da mortalidade[83]. Em nosso estudo, os animais infartados apresentaram níveis diminuídos de Nrf-2 em comparação aos animais controle. Esse fenômeno sugere que o Nrf-2 pode modular a remodelação cardíaca após a oclusão coronariana.

Em relação à ação da taurina, há vários trabalhos na literatura sugerindo ação antioxidante. Nesse sentido, Chahine e colaboradores publicaram que, no modelo de isquemia e reperfusão em ratos, a suplementação de taurina, na concentração de 1mM na água de beber, resultou em diminuição significativa de radicais livres que causam danos ao coração[84]. Ito e colaboradores avaliaram os efeitos da taurina na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. A administração da taurina foi oral na concentração de 3% na água de beber dos animais. Os autores verificaram que a taurina reduziu a geração de ERO devido à ação da glutationa cardíaca[85]. Parildar e colaboradores avaliaram o efeito da depleção (β - alanina 3% na água) e suplementação (taurina 2% na água) de

taurina no coração de ratos idosos (22 meses) comparado com ratos idosos e jovens (5 meses) sem tratamento. Os resultados indicam que mudanças nos níveis da taurina cardíaca podem influenciar na susceptibilidade do tecido cardíaco à peroxidação lipídica em ratos idosos, e que a suplementação de taurina tem efeito protetor dependente da idade no tecido cardíaco e no estresse oxidativo[86].

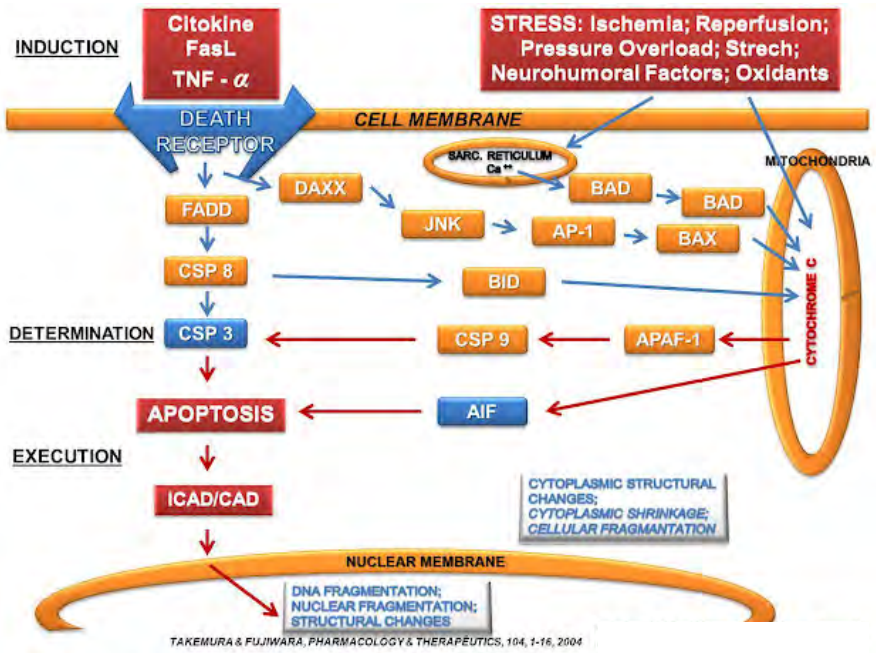
Em relação à ação da taurina na expressão do Nrf -2 em modelos de agressão e remodelação cardíaca, não encontramos trabalhos prévios que tivessem abordado esse tema. Em nosso estudo, observamos que os animais infartados e suplementados com taurina apresentaram níveis intermediários de Nrf-2 quando comparados com os animais infartados não suplementados e os animais controle sem infarto. Adicionalmente, os animais infartados suplementados com taurina apresentaram menores níveis de glutationa peroxidase quando comparado com os animais infartados. Assim, o conjunto de nossos resultados sugere que os efeitos benéficos da taurina após o infarto podem ser resultado de sua ação antioxidante. Adicionalmente, essa ação, pelo menos em parte, parece ser modulada pelo Nrf-2.

Outro aspecto relevante na fisiopatologia da remodelação ventricular envolve a ativação das MMPs. Como explicado anteriormente, logo após o infarto ocorre distorção da cavidade ventricular, secundária a dilatação, associada ao afilamento desproporcional da parede muscular, sem que haja necrose adicional do tecido[26, 27]. Acredita-se que esse processo seja resultado do aumento da atividade das MMPs, que degradam o tecido de sustentação cardíaco. No entanto, essas enzimas proteolíticas participam, também, de alterações que ocorrem na região não infartada. Nessa região, as MMPs induzem a degradação do colágeno normal, associado a aumento anormal do colágeno cardíaco, principalmente o colágeno tipo I. Em consequência, poderia haver predisposição para arritmias complexas, ao mesmo tempo em que o acúmulo de colágeno poderia levar ao aumento da rigidez da parede miocárdica e interferir com a transmissão de força gerada pelo miócito. O resultado final seria o aparecimento de disfunção diastólica e sistólica. Dentre as MMPs, podemos destacar as gelatinases, ou as MMPs 2 e 9[87,88].

Estudos experimentais mostram que o aumento da atividade tecidual das MMPs após o IAM está relacionado com o desenvolvimento de remodelação ventricular. Neste sentido Peterson e colaboradores observaram que ratos infartados possuem níveis teciduais de MMP 2 e 9 aumentadas desde a primeira semana após o IAM e perduram após 12º semana. Associado ao aumento das MMPs, também ocorreram alterações na morfologia e função ventricular esquerda[89]. Rohde e colaboradores avaliaram camundongos infartados tratados com inibidor de MMP (CP-471, 474), por quatro dias e observaram que o inibidor atenua a dilatação ventricular esquerda após o infarto quando comparado com o controle não tratado[90]. Em estudo recente, nosso grupo avaliou se os níveis séricos da MMP 2 e 9 eram fatores preditores de remodelação ventricular em pacientes infartados após 6 meses do evento. Os resultados mostraram que o aumento sérico da MMP 2 foi fator preditivo independente para ocorrência de remodelação ventricular. Por outro lado, o nível sérico aumentado de pró-MMP 9 foi preditor independente de preservação dos volumes sistólico e/ ou diastólico do VE [91]. Quanto à ação da taurina na atividade das MMP, até o momento não encontramos estudos prévios no modelo do infarto do miocárdio.

Nossos resultados mostram que os animais infartados apresentaram aumento da atividade das MMPs 2 e 9 quando comparados com o controle. Entretanto, os animais infartados suplementados com taurina apresentaram níveis intermediários de atividade das MMPs avaliadas. Assim, nossos resultados sugerem que os efeitos da taurina na remodelação após o infarto podem ter sido modulados pela atenuação da atividade das MMPs.

Outro mecanismo de interesse em nosso estudo como modulador do processo de remodelação foi a apoptose. De acordo com a figura abaixo é possível entender os mecanismos que desencadeiam a apoptose dos cardiomiócitos.



O estímulo apoptótico pode ser intrínseco, neste caso as citocinas, FasL e TNFα se ligam a receptores de morte na membrana celular e desencadeiam o processo apoptótico por meio de uma cascata de eventos [92].

Outra forma de estímulo é o extrínseco, exemplos: isquemia aguda, o qual ativa genes pró apoptóticos BAD e BAX. Esses genes atuam no retículo sarcoplasmático, que por sua vez liberam a calcineurina, o qual ativa o BAD que é direcionado à mitocôndria para estimular o citocromo C. O Citocromo C por sua vez, ativa a APAF-1 e inicia um ciclo apoptótico irreversível por meio da ativação de proteínas da família das cisteinilproteases, chamadas capases[92].

Durante o processo apoptótico, há condensação da cromatina nuclear, ataques na membrana celular e as células assumem aparência de meia lua. O encolhimento celular acompanhado pela condensação citoplasmática também ocorre até a célula tornar-se multilobulada ou então fragmentada. O núcleo é também fragmentado, mas outras organelas subcelulares são preservadas em termos morfológicos até o final do estágio. As células fragmentadas são chamadas de corpos apoptóticos que, por sua vez, expressam marcadores de superfície. Assim, são rapidamente reconhecidos e fagocitados por

macrófagos ou outras células do sistema imunológico, ou pelas células teciduais adjacentes, sem que haja reação inflamatória no local[92].

De maneira notável, a apoptose vem sendo detectada durante todos os estágios do IAM. Esse fato sugere que a apoptose pode ser responsável por significante quantidade de morte de cardiomiócitos durante o estágio agudo da isquemia e durante os estágios subagudo e crônico. De forma consistente, se aceita que essa diminuição no número de cardiomiócitos possa contribuir diretamente para a disfunção contrátil do músculo cardíaco[92].

Nesse sentido, há vários trabalhos na literatura que avaliaram a ação da taurina na apoptose cardíaca. Recentemente, Oriyanhan e colaboradores, ao estudarem coração de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão miocárdica, observaram que a adição de taurina na solução de reperfusão previne as células apoptóticas[93]. Takatani e colaboradores mostraram que na cultura de miócitos isquêmicos tratados com taurina houve inativação da caspase 9 e 3. No modelo de indução de estresse oxidativo por arsênico, o grupo de ratos tratado com taurina apresentou supressão das ações apoptóticas[94]. Por outro lado, os efeitos da taurina no processo apoptótico no modelo do infarto experimental permanecem por ser determinados.

No nosso estudo, os animais infartados suplementados com taurina apresentaram taxas de apoptose igual aos animais controle e significantemente menor que o grupo infartado. A partir desses resultados, podemos afirmar que os efeitos benéficos da taurina no modelo de infarto experimental em ratos possam ter sido regulados pela atenuação do processo de apoptose cardíaca.

Considerando o metabolismo energético, em condições normais os ácidos graxos livres (AGL) são o principal substrato energético do coração, com participação variando de 60 a 90%. Por meio do processo de β-oxidação, metabólitos dos AGL participam da produção de ATP nos transportadores de elétrons na mitocôndria. Após a produção, a energia produzida é estocada e transportada na forma de fosfocreatina [95,96]. Já foram identificadas diversas alterações do metabolismo energético na remodelação, que se manifestam com diminuição da produção de energia: diminuição na utilização de AGL e aumento da utilização de glicose como substrato energético, diminuição da β-oxidação e alterações funcionais

mitocondriais[97]. Essas alterações estão associadas à diminuição dos níveis de fosfocreatina, que como dito anteriormente, representa a forma na qual o ATP é estocado.

Nosso grupo acreditava que os animais suplementados com taurina iriam continuar a priorizar a via da β-oxidação associado à diminuição da via glicolítica. Contudo, os nossos animais infartados suplementados com taurina apresentaram intensificação das duas vias, diferentemente dos animais infartados que intensificaram somente a via glicolítica. Assim, podemos deduzir que o infarto do miocárdio priorizou a utilização de glicose como substrato energético, enquanto a suplementação com taurina aumentou o substrato energético cardíaco pelas duas vias: utilização de ácidos graxos e glicolítica. Esse fenômeno foi acompanhado pelo aumento da citrato sintase, o que sugere melhora no metabolismo energético. Cabe ressaltar que não encontramos trabalhos prévios na literatura com o objetivo de avaliar a ação da taurina no metabolismo energético cardíaco no modelo do infarto.

Outro fator importante que pode modular o processo de remodelação ventricular são as junções comunicantes, caracterizadas por aglomerados de canais transmembrana, que estão ligados por compartimentos citoplasmáticos das células vizinhas, de forma a conduzir a comunicação intercelular. No coração, as junções comunicantes mediam o acoplamento elétrico entre células cardíacas, formando o caminho célula a célula para a propagação ordenada da onda de excitação elétrica responsáveis pela contração sincronizada. Adicionalmente, as junções podem permitir a passagem de estímulos que ativarão vias de sinalização intracelulares associadas a diversos eventos relacionadas à remodelação[98-100].

As junções comunicantes estão localizadas no disco intercalar dos cardiomiócitos. O coração pode expressar junções comunicantes compostas por conexina 40 (Cx40), conexina 43 (Cx43) e conexina 45 (Cx45). Das três citadas, a mais relevante para o coração é a Cx 43 e, portanto, essa foi o objeto de análise em nosso estudo [98, 101].

No coração remodelado ocorrem alterações na quantidade e na localização das junções comunicantes, fato este, que leva a desarranjos no

acoplamento elétrico intercelular, o qual pode ter efeito na eletrofisiologia cardíaca e induzir arritmias malignas [101,102]. Nesse sentido, vários trabalhos avaliaram o efeito de alterações da Cx43 no coração. Assim, Rijen e colaboradores estudaram camundongos adultos geneticamente modificados homozigotos para a eliminação da conexina 43. Esses animais apresentaram redução na velocidade de condução, aumento na disperção da condução e predisposição para desenvolver arritmia ventricular quando comparado com o controle heterozigoto[103]. Kostin e colaboradores estudaram a distribuição e expressão da Cx43 em coração de pacientes com hipertrofia cardíaca descompensada, por meio de biopsia. Os pesquisadores encontraram reduzida porcentagem de sinalizantes de Cx 43 por área de miócito ou por disco intercalar, associado a menor número de junções comunicantes por disco intercalar e, diferente distribuição espacial da Cx 43 quando comparado com o grupo controle, composto por pacientes com estenose valvular mitral com função cardíaca normal[104].

No processo de remodelação, podem ocorrer diminuição das concentrações de CX 43 no disco, associados a migração das conexinas do disco intercalar para o citoplasma, fenômeno conhecido como lateralização da conexina[105]. Nossos resultados mostram que a intensidade e distribuição da Cx 43 no disco intercalar estavam diminuídas nos animais infartados. No entanto, a taurina não interferiu neste fator. Assim, nossos dados sugerem que os efeitos da taurina após o infarto foram independentes da Cx 43.

Pelo exposto, a suplementação com taurina atenuou o processo de remodelação ventricular após o IAM. Esse fenômeno foi associado com alterações no estresse oxidativo, metaloproteases 2 e 9, apoptose e metabolismo energético. Cabe ressaltar que existem outros mecanismos que podem participar do processo de remodelação ventricular que não foram avaliados neste estudo. Neste sentido, são necessários mais estudos sobre a ação da taurina no modelo do infarto para melhor entendimento de seu papel nessa agressão. Adicionalmente, nossos resultados levantam a hipótese sobre a utilização da taurina como estratégia de tratamento de rotina após o infarto do miocárdio.

7. Conclusão

Em conclusão, nosso trabalho evidenciou que a suplementação de taurina em animais infartados diminuiu a hipertrofia e melhorou a função diastólica cardíaca, com atenuação do estresse oxidativo, da apoptose e da atividade de metaloproteases, associada ao aumento do substrato energético cardíaco. Assim, nossos achados sugerem que a taurina resulta em efeitos benéficos em relação ao processo de remodelação ventricular cardíaca induzida pelo infarto experimental em ratos.

8. Referências Bibliográficas

1) Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. The potencial health benefits of taurine in cardiovascular diseases. Exp Clin Cardiol. 2008; 13: 57-65.

2) Birdsall TB. Therapeutic applications of taurine. Alt Med Rev. 1998; 3: 128-36.

3) Schuller-Levis G, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. FEMS Microbiol Lett. 2003; 226: 195-202.

4) Boucknooughe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine functional nutrient? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006 ; 9: 728-33.

5) Malmezat T, Breuilé D, Pouyet C, Minard PP, Obled C. Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. J Nutr. 1998; 128: 97-105.

6) Sole M, Jeejeebhoy KN. Conditioned nutritional requirements and the pathogenesis and treatment of myocardial failure. Curr Opin Clin Metab Care. 2000; 3:417-24.

7) Wright CE, Tallan HH, Lin YY. Taurine: biological update. Ann Rev Biochem. 1986; 55: 427-53.

8) Eby G, Halcomb WW. Elimination of cardiac arrythmias using oral taurine with L-arginine with case histories: Hypothesis for nitric oxide stabilization of the sinus node. Med Hypotheses. 2006; 67: 1200-4.

9) Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the developments of diabetic complications. Diabetes Metab Res Rev. 2001; 17: 330-46.

10) Watskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, et al. Phenotype of the taurine transporter knouckout mouse. Methods Enzymol. 1998; 3: 128-36.

11) Gupta RC, Win T, Bittner S. Taurine analogues: a new class of therapeutics: Retrospect and prospects. Curr Med Chem. 2005; 12: 2021-39

12) Parcell S. Surful in human nutrition and applications in medicine. Altern Med Rev. 2002; 7: 22-44.

13) Guizouarn H, Motais R, Garcia-Romeu, et al. Cell volume regulation: The roule of taurine loss in maintaining membrane potencial and cell pH. J Physiol. 2000; 523: 147-54.

14) Kong WX, Chen SW, Li YL, et al. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. Pharmacol Biochem Behav. 2006; 83: 271-6.

15) Soyka M, Roesner S. New pharmacological approaches for the treatments of alcoholism. Expert Opin Pharmacother. 2006; 7: 2341-53.

16) Trip J, Drost G, van Engelen BG, Faber CG. Drug treatment for myotonia. Cochrane Database Syst. Rev. 2006:CD004762.

17) Yu X, Xu Z, Mi M, et al. Dietary taurine supplementation ameliorates diabetic retinopathy via anti-excitotoxicity of glutamate in streptozotocin-induced Sprague-Dawley rats. Neurochem Res. 2008;33: 500-7.

18) Grimble RF. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. J Nutr. 2006; 136: 1660S-5S.

19) Klusa V, Klimaviciusa L, Duburs G, et al A. Anti-neurotoxic effects of tauropyrone, a taurine analogue. Adv Exp Med Biol. 2006; 583: 499-508.

20) Petrovic L, Schlegel KA, Ries J, et al. In vitro effect of taurolidine on squamous cell carcinoma in the oral cavity. Mund Kiefer Gesichtschir. 2003;583: 499-508.

21) Marcinkiewicz J, Kurnyt M, Biedron R, et al W. Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. Adv Exp Med Biol. 2006; 583: 481-92.

22) Denipote FG, Paiva SAR, Zornoff LAM. Influência da taurina na remodelação cardíaca. Nutrire 2009; 34: 211-23.

23) Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. Circ Res. 1985; 57: 84-95.

24) Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990; 81:1161-72.

25) Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000; 35: 569-82.

26) Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. Arq Bras Cardiol. 1997; 68: 453-60.

27) Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 1978; 41:1127-32.

28) Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. Am J Med. 2001; 110: 37S-46S.

29) Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, et al. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. Rev Soc Cardiol Estado São Paulo. 2002; 12: 371-8.

30) Bennet MR. Apoptosis in the cardiovascular system. Heart. 2002; 87: 480-7.

31) Swynghedauw R. Pathophysiology of chronic heart failure. Physiol Rev. 1999; 79: 215-62.

32) Weker KT. Cardioreparation in hypertensive heart disease. Hypertension. 2001; 38: 588-91.

33) Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. Hipertension. 2001; 38: 1227-32.

34) Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. Dial Cardiovasc Med. 1999; 4: 3-19.

35) Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in the heart disease. Cardiovasc Res. 1996; 31: 816-21.

36) Severs NJ. Gap junction remodeling in heart failure. J Card Fail. 2002; 8: S293- S9.

37) Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. Heart Lung and Circulation. 2004; 13: 132-8.

38) Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2000; 1: 8-16.

39) Norton GR, Woodiwitss AJ, Gaasch WH, et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy: the relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2002; 39: 664-71.

40) Abe M, Shibata K, Matsuda T, et al. Inhibition of hypertension and salt intake by oral taurine treatment in hypertensive rats. Hypertension. 1987; 10: 383-9.

41) Harada N, Ninomiya C, Osako Y, et al. Taurine alters respiratory gas exchange and nutrient metabolism in type 2 diabetic rats. Obes Res. 2004; 12: 1077-84.

42) Colivicchi MA, Raimondi L, Bianchi L, et al. Taurine prevents streptozotocin impairment of hormone-stimulated glucose uptake in rat adipocytes. Eur J Pharmacol. 2004; 497: 209-15.

43) Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. Basic Res Cardiol. 2000; 95: 208-14.

44) Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. J Nutr. 2005; 135: 2326-8.

45) Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. Arq Bras Cardiol. 2006, 86: 276-82.

46) Zornoff LA, Paiva SA, Matsubara BB, et al. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2000; 5: 203-9.

47) Lang RM, Bierig M, Devereaux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr 2005; 18: 1440-63.

48) Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, et al. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. J Card Fail. 1999; 5: 213-23.

49) Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, et al R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. J Appl Physiol. 2000; 89: 1445-54.

50) Zornoff LA, de Paiva SA, Tornero MT, et al. Influence of mannitol added to the nutrient solution on the mechanical performance and on the degree of myocardial edema of isolated hearts of rats. Arq Bras Cardiol. 1995; 64: 225-9.

51) De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. Eur J Heart Fail. 2006; 8: 784-9.

52) Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, et al. Characterization of myocardial infarcts in the rat. Arch Pathol Lab Med. 1980; 104: 179-83.

53) Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, et al. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. Am J Physiol. 2000; 279: 1534-9.

54) Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. Cardiovasc Res. 1998; 22: 686-95.

55) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

56) Nakamura W, Hosoda S, HayashiK. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. Biochem Biophys Acta. 1974; 358: 251-61.

57) Crouch RK, Gandy SC, Kisey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes. 1981; 30: 235-41.

58) Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York: Verlag chemie Weinheim. 1974

59) Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor nrf2 via the ubiquitin-proteasome patway and stabilization by cadmium. J Biol Chem. 2003; 278: 2396-402.

60) Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level enzymatic organization. Eur J Biochem. 1969; 11: 198-206.

61) Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. Nutrition. 2004; 20: 230-4.

62) Novelli ELB. Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2005.

63) Anversa P, Sonnenblick EH. Isquemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. Prog Cardiovasc Dis. 1990; 33: 49-70.

64) Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, et al. Insuling signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. J Clin Invest. 2002; 109: 629-39.

65) Pion PD, Kittleson MD, Rogers OR, et al. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. Science. 1987; 237: 764- 8.

66) Fascetti AL, Reed JR, Rogers QR, et al. Taurine deficiency in dogs with dilated cardiomyopathy: 12 cases. J Am Vet Med Assoc. 2003; 223:1137-41.

67) Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, et al. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy. J Mol Cell Cardiol. 2008; 44: 927-37.

68) Allard LM, Jeejeebhoy K N. The managements of conditioned nutritional requirements in heart failure. Heart Fail Rev. 2006; 11: 75-82.

69) Crass MF, Lombardini JB. Loss of cardiac muscle taurine after acute left ventricular ischemia. Life Sci. 1977; 21: 951-8.

70) Denipote F, Ardisson LP, Azevedo PS, et al. Influence of taurine on cardiac remodeling inducedby tobacco smoke exposure. Cell Physiol Biochem. 2011; 27:291-8.

71) Shi YR, Bu DF, et al. Dysfunction of myocardial taurine transport and effect of taurine supplement in rats with isoproterenol-induced myocardial injury. Acta Pharmacol Sin. 2002; 23: 910-8.

72) Azuma J, Takihara K, Awata N, et al. Beneficial effect of taurine on congestive heart failure induced by chronic aortic regurgitation in rabbits. Res Commun Chem Pathol Pharm. 1984; 45: 261-70.

73) Hanna J, Chahine R, Aftimos G, et al. Protective effect of taurine against free radical damage in the rat myocardium. Exp Toxicol Pathol. 2004; 56: 189-94.

74) Yalçinkaya S, Unlucerçi Y, Giris M, et al. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine. Nutrition. 2008; 25: 436-44.

75) Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, et al. Role of oxidative stress in Myocardial hypertrophy and failure. J Moll Cell Cardiol. 2002; 34: 379-88.

76) Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. Hipertension. 2007; 49: 241-48.

77) Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, et al. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. Antioxid Redox Signal. 2009; 11(3):497-508.

78) Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007; 47:89-116.

79) Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Adv Enzyme Regul. 2006; 46:113-40.

80) Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated Cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. Sci Signal. 2010; 3:re3.

81) Singh S, Vrishni S, Singh BK, et al. NRF2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. Free Radic Res. 2010;44:1267-88.

82) Sykiotis GP, Habeos LG, Samuelson AV, Bohmann D. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011; 14: 41-8.

83) Li J, Ichikawa T, Villacorta L, et al. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29: 1843-50.

84) Chahine JH, Aftimos G, Nader M, et al. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium. Exp Toxicol Pathol. 2004; 56: 189-94.

85) Ito T, Muraoka S, Takahashi K, et al. Beneficial affect of taurine treatment against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. Adv Exp Med Biol. 2009; 643: 65-74.

86) Parildar H, Dogru-Abbasoglu S, Mehmetçtk G, et al. Lipid peroxidation potencial and antioxidants in the heart tissues of β- alanine or taurine-treated old rats. J Nutr Sci Vitaminol. 2008; 54:61-5.

87) Matsubara BB, Zornoff LAM. Matriz colágeno intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. Arq Bras Cardiol. 1995; 64: 559-63.

88) Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, et al. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling, and regulatory mechanisms. J Mol Cell Cardiol. 1994; 26; 279-92

89) Peterson JT, Li H, Dillon L, et al. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. Cardiovasc Res. 2000; 46: 307-15.

90) Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. Circulation. 1999; 99: 3063-70.

91) Cogni AL. Avaliação das metaloproteases 2 e 9 séricas como preditoras da remodelação ventricular seis meses após o infarto agudo do miocárdio.[Tese]. Botucatu. Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista; 2011.

92) Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptose in remodeling after myocardial infarction. Pharmacology &Therapeutics. 2004; 104: 1-16.

93) Oriyanhan W, Yamazaki K, Miwa S, et al. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. Heart Vessels. 2005; 20: 278-85.

94) Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, et al. Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. Am J Physiol Cell Physiol. 2004; 287: C949 -C53.

95) Neubauer SN. The failing heart - an engine out of fuel. N Engl J Med. 2007; 356: 1140-51.

96) Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. Circulation. 2007; 116: 434-48.

97) Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. Am J Med. 2001; 110: S37-46.

98) Severs NJ, Coppen SR, Dupont E, et al. Gap junction alterations in human cardiac disease. Cardiovasc Res 2004; 62: 368-77.

99) Severs NJ, Dupont E, Thomas N, et al. Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. Adv Cardiol. 2006; 42: 228-42.

100) Harris AL, Locke D. Connexins: A Guide. Secaucus: Humana Press -Springer; 2008.

101) Teunissen BEJ, Jongsma HJ, Bierhuizen A. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling. Eur Heart J. 2004; 25:1979-89.

102) Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, et al. Remodelling of gap junctions and connexin in diseased myocardium. Cardiovasc Res. 2008; 80: 9-19.

103) Van Rijen HVM, Eckardt D, Degen J, et al. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adulce mice with induced deletion of connexin 43. Circulation. 2004;109:1048-55

104) Kostin S, Dammer S, hein S, et al. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. Cardiovasc Res. 2004; 62: 426 - 36.

105) Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG. Altered pattern of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. Heart 1996; 76: 412-7.