

Mariele Castilho Pansani

Influência da deficiência de taurina no coração

Dissertação Apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração Nutrição

Orientador: Prof Adj. Sérgio A. R. de Paiva

Co-orientador: Prof Adj. Leonardo A. M. Zornoff

Botucatu – São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Pansani, Mariele Castilho.

Influência da deficiência de taurina no coração / Mariele Castilho Pansani. –
Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Sérgio A. R. de Paiva

Co-orientador: Leonardo A. M. Zornoff

Assunto CAPES: 40101150

1. Insuficiência cardíaca 2. Coração - Doenças - Aspectos nutricionais

Palavras-chave: β -alanina; Deficiência; Ratos Wistar; Remodelação cardíaca;
Taurina

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*A **Deus** por me guiar pelos melhores caminhos e realizar meus sonhos.*

*Aos meus pais **Benedito e Giseli** por todo apoio, incentivo, devoção e amor. Obrigada pelos ensinamentos essenciais da vida.*

*Ao meu irmão **Rafael** pela amizade infinita e admiração.*

*À minha avó **Nercy** pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida, principalmente, na minha formação e educação.*

*À tia **Elizabet**, tia **Nordília**, tia **Nílva**, tio **Augustinho** e à prima **Helen** pelo apoio e carinho em todos esses anos.*

*Ao meu namorado e companheiro **Davi** pela dedicação, amor, cumplicidade, encorajamento e tornar meus dias mais felizes.*

“Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito são maiores que o meu amor por vocês!”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao Prof. Adj. **Sergio Alberto Rupp de Paiva**, meu orientador, agradeço pelas horas dedicadas aos ensinamentos e discussão sobre nosso trabalho e pela oportunidade concedida em realizar esta pesquisa. Também agradeço a compreensão em minhas decisões profissionais e a competência em conduzir esta dissertação.*

*Ao Prof. Adj. **Leonardo Antônio Mamede Zornoff**, pela dedicação, ensinamentos e disponibilizada na co-orientação desta dissertação e aconselhamento em decisões importantes da minha profissão.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores do departamento de clínica médica:

Beatriz B. Matsubara, Elíne de Almeida Soriano, Irma Godoy, Leonardo A.M. Zornoff, Luiz S. Matsubara e Sérgio A. R. de Paiva. Vocês foram fundamentais para minha formação. Obrigada por todas as oportunidades e ensinamentos!

Às amigas:

Bruna P. Rafacho, Elíne de A. Soriano, Fabiana C. Marsola, Fabiana G. Denipote, Franciele D. Vanini, Lidiane P. Ardisson, Marita S. Mecca e Sílvia J. Papini.

Minha família em Botucatu! Por terem me apoiado para realização desta dissertação. Obrigada pela amizade e carinho.

Aos que colaboraram com a realização deste trabalho:

Prof. Adj. Luiz S. Matsubara e Profª Beatriz B. Matsubara pela realização do estudo do coração isolado e estudo ecocardiográfico e pela disponibilidade em colaborar com esta dissertação.

Dr. Marcos Minicucci e Drª Paula S. A. Gaiolla pelos ensinamentos, pela realização do estudo das metaloproteínas e disponibilidade em contribuir com esta dissertação.

*Ao Professor **Julio Sérgio Marchini**, ao Químico **Gilberto João Padovan**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo espaço concedido e pela realização das dosagens da taurina.*

*Aos amigos do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Clínica Médica **Albano, Ana Paula, Danieli, Djon e Ricardo** pelo apoio e contribuição com esta dissertação.*

*Prof. Dr. **Katashi Okoshi** e Dr^a **Paula S. A. Gaiolla** pelo excelente auxílio, contribuição e avaliação da minha prova de qualificação e melhoria desta dissertação.*

*Funcionários do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Clínica Médica, aos funcionários da **Biblioteca** e à **Seção de Pós Graduação** pelo apoio.*

*À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo.*

Meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

Há evidências que pacientes com insuficiência cardíaca são deficientes em muitos micronutrientes, que representam importante papel na manutenção da homeostase do cálcio, no controle do estresse oxidativo e do metabolismo energético-protéico. Estes pacientes podem apresentar necessidades nutricionais que são diferentes daquelas de indivíduos com estado fisiológico normal. A taurina é um destes nutrientes e corresponde a 50% do total de aminoácidos livres do coração. Estudos *in vivo* mostraram que a deficiência de taurina está associada à cardiomiopatia, à degeneração da retina e ao retardo do crescimento. Foi realizado estudo experimental para analisar a estrutura e a função cardíaca de ratos Wistar com deficiência de taurina induzida por β -alanina. Foram estudados 34 ratos machos, Wistar, pesando 100g, casualizados em 2 grupos: grupo controle (C), grupo deficiente em taurina (T (-)). O grupo T (-) recebeu 3% de beta-alanina na água para provocar a deficiência de taurina. Após 1 mês de tratamento os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica, avaliação funcional pelo coração isolado, avaliação morfométrica, avaliação histopatológica, avaliação da atividade das metalloproteinases e determinação da concentração de taurina no plasma e no tecido cardíaco. A deficiência de taurina por tratamento com solução de β -alanina resultou em atrofia cardíaca verificada por afinamento da espessura da parede ventricular, menor peso seco do ventrículo esquerdo e por menores valores de área seccional dos miócitos. Outro achado em nosso estudo foi que o grupo deficiente em taurina apresentou remodelação excêntrica verificada por maior cavidade ventricular (diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo), menor espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo e menor valor da geometria ventricular (razão entre as medidas da espessura da parede posterior e do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo). Em relação à função diastólica, os dados são compatíveis com piora da diástole nos animais deficientes em taurina. O grupo deficiente em taurina apresentou menor velocidade da onda A, maior razão onda E e onda A, e tendência menor do tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca. Em relação à função

sistólica, os dados ecocardiográficos, são compatíveis com disfunção sistólica. Foi possível observar menor fração de ejeção, porcentagem de encurtamento e débito cardíaco no grupo deficiente em taurina. Além disso, no presente estudo não foi evidenciado aumento de fibrose por meio do estudo por microscopia óptica e nem a maior ativação de metalloproteinases. Portanto, pode-se concluir que a deficiência de taurina promoveu alterações estruturais e funcionais cardíacas com características próprias.

Palavras-chave: ratos Wistar; deficiência; taurina; β -alanina; remodelação cardíaca.

ABSTRACT

Micronutrients deficiency is observed in heart failure patients. These micronutrients play important role in maintaining calcium homeostasis, controlling oxidative stress and protein/energy metabolism. Heart failure patients may present different nutritional requirements than those individuals who are healthy. Taurine is one of these nutrients and represents 50% of total free amino acids of the heart. Additionally, *in vivo* studies have related taurine deficiency to poor growth, cardiomyopathy and retina degeneration.

One study was conducted to evaluate the structure and cardiac function of rats with or without taurine deficiency. Thirty-four male Wistar rats (body weight = 100g) were weighed and randomly assigned to 1 of 2 treatments (d 0): Control (C) or taurine-deficient (T (-)). Beta-alanine in a concentration of 3% was added to water to induce taurine deficiency in T (-). On d 30, rats were individually submitted to echocardiography, functional assessment of isolated heart, morphometrical, histopathological and metalloproteinase activity evaluation. At the same day individual blood and cardiac tissue samples were collected to determine taurine concentration in plasma and heart. Rats treated T (-) presented cardiac atrophy verified by lower ventricular wall thickness, lesser dry weight of left ventricle, lower myocytes sectional area, eccentric cardiac remodeling verified by larger ventricular cavity (systolic diameter of left ventricle), lower posterior wall thickness of left ventricle and lower ventricular geometry (ratio between the measurements of posterior wall thickness and diastolic diameter of left ventricle). In addition, diastolic function was affected in T (-) rats due to diastole impairment. Rats treated T (-) showed lower velocity of A wave, higher ratio between E and A wave, and tend to have lower isovolumetric relaxation time corrected by heart rate. Systolic dysfunction was assessed by echocardiography results. Lower ejection fraction, fractional shortening and cardiac output was also observed in T (-) rats. Moreover, in the present study were not observed increased fibrosis by optical microscopy assessment and even greater activation of

metalloproteinases. These data imply that taurine deficiency appears to promote structural and functional cardiac alterations with unique characteristics.

Key-words: Wistar rats, deficiency, taurine, β -alanine, cardiac remodeling.

SUMÁRIO

<i>I. INTRODUÇÃO.....</i>	<i>20</i>
<i>II. HIPÓTESE DO TRABALHO</i>	<i>29</i>
<i>III. OBJETIVO</i>	<i>31</i>
<i>IV. MATERIAL E MÉTODOS.....</i>	<i>33</i>
<i>V. RESULTADOS</i>	<i>46</i>
<i>VI. DISCUSSÃO</i>	<i>71</i>
<i>VII. CONCLUSÃO.....</i>	<i>78</i>
<i>VIII. REFERÊNCIAS.....</i>	<i>80</i>

I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, sendo um dos mais importantes desafios clínicos atuais na área da saúde. Trata-se de problema epidêmico em progressão ¹⁷. É uma síndrome clínica complexa de caráter sistêmico, definida como disfunção cardíaca que ocasiona inadequado suprimento sanguíneo para atender necessidades metabólicas do organismo em diferentes situações ⁸. No ano de 2007, as doenças cardiovasculares representaram a terceira causa de internações no SUS, com 1.156.136 hospitalizações. A IC é a causa mais frequente de internação por doença cardiovascular ⁸.

Em relação à fisiopatologia, aceita-se que o quadro de IC ocorra em diferentes etapas. Inicialmente, ao reagir à determinada agressão, ocorre o processo de remodelação cardíaca, que se caracteriza por alterações genéticas, estruturais e bioquímicas. Essas alterações irão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, em resposta a uma determinada injúria ^{16, 51, 52}. Inicialmente, esse processo pode ser adaptativo e posteriormente, resultará em disfunção ventricular progressiva que acarretará prejuízos à capacidade funcional do coração ⁸².

Há evidências que pacientes com IC são deficientes em muitos micronutrientes, que representam importante papel na manutenção da homeostase do cálcio, no controle do estresse oxidativo e do metabolismo energético-protéico ^{69, 77}. Estes pacientes podem apresentar necessidades nutricionais que são diferentes daquelas de indivíduos com estado fisiológico normal ¹.

A taurina é um destes nutrientes e sua deficiência tem sido mostrada como uma das causas de IC em cães e gatos ¹. Azuma et al. ³⁻⁵ mostraram que a administração de taurina melhorou os sintomas e sinais da IC em humanos. Por isso, Allard, et al. ¹ e Birdsall ⁷ sugerem que a reposição desse nutriente deveria ser considerada como coadjuvante na terapia da IC.

Em estudo “crossover” duplo-cego controlado /placebo mostrou que a taurina é agente efetivo no tratamento da IC sem efeitos adversos. Neste estudo, pacientes com IC receberam suplementação 6g de taurina ou placebo por dia durante quatro semanas. Onze de 14 dos pacientes, enquanto recebiam taurina, apresentaram melhora da dispnéia, da ausculta pulmonar, dos sinais de descompensação do coração direito e das anormalidades observadas no exame radiológico de tórax enquanto que no período do tratamento com placebo apenas três apresentaram melhora ⁴.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DA TAURINA

Taurina (2-ácido aminoetanosulfônico) é um aminoácido que possui características singulares, por possuir grupo amino no carbono β e não no carbono α como usual. É por esta razão que este aminoácido não é incorporado na síntese protéica. Apresenta o grupo sulfônico (SO_3H) em substituição ao grupo carboxila (COOH) ^{30, 57, 71}

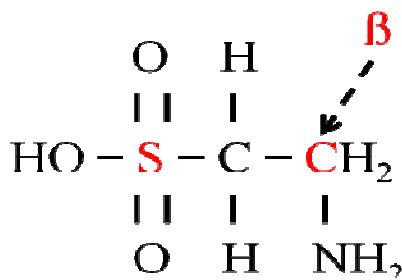


Figura 1 – Estrutura da taurina

É aminoácido sulfurado condicionalmente essencial, pois suas concentrações plasmáticas diminuem em determinadas situações de estresse metabólico como: sepse, traumas e cirurgias ^{7, 15, 65}. Estudos *in vivo* mostraram, também, que a taurina é essencial durante o desenvolvimento de mamíferos, já que estes possuem capacidade limitada em sintetizá-la ^{70, 71}. Está presente em altas concentrações no plasma e células de mamíferos e é o aminoácido livre mais abundante no músculo cardíaco ³⁰.

FUNÇÕES

O papel fisiológico da taurina não é totalmente conhecido, mas este aminoácido está envolvido em vários processos biológicos: formação de sais biliares, osmorregulação, inibição do estresse oxidativo, ação anti-inflamatória, estabilização de membrana, modulação dos níveis de cálcio celular, imunomodulação, modulação atividade da insulina, ação anti-hipertensiva, ação anti-aterogênica, hepatoproteção e neurotransmissão ^{7, 10, 70, 78, 79}.

METABOLIZAÇÃO E NECESSIDADES

O conteúdo corporal de taurina é derivado: (1) da dieta, (2) da síntese, principalmente, no fígado e (3) da reabsorção renal ⁷⁰.

As principais fontes alimentares de seres humanos são: leite materno, fórmulas lácteas infantis, produtos de origem animal (principalmente peixes e frutos do mar), ovos, bebidas energéticas e algumas algas ^{29, 79}.

No fígado, a taurina pode ser sintetizada a partir da metionina (aminoácido essencial) e da cisteína (aminoácido não essencial) e necessita da enzima *piridoxal-5-fosfato* (forma ativa da vitamina B6) como coenzima das enzimas *cistationina sintase*, *cistationase* e da *ácido cisteinossulfínico descarboxilase* (CSDA) ^{21, 30, 66}, desta forma a dieta deficiente em vitamina B₆ tem efeito negativo na síntese de taurina ^{21, 30}. A capacidade de síntese de taurina

é diferente entre os órgãos, entre as espécies e entre as diferentes faixas etárias. Por exemplo, o fígado apresenta maior concentração de todas as enzimas necessárias para a biossíntese de taurina, enquanto o cérebro, apesar de conter atividade CSDA adequada, apresenta atividade limitada da *cistationase* ³⁰. O fígado de humanos, macacos e gatos possuem atividade da CSDA extremamente baixa enquanto fígados de ratos e cães possuem alta atividade, deste modo com maior biossíntese de taurina ³⁰. Estudos realizados com animais jovens mostram baixa capacidade de síntese de taurina quando comparados com animais adultos ^{30, 65}. Assim, animais jovens são mais dependentes da taurina provinda da dieta que os animais velhos e estes são mais dependentes da oferta adequada de cisteína e metionina na dieta ³⁰.

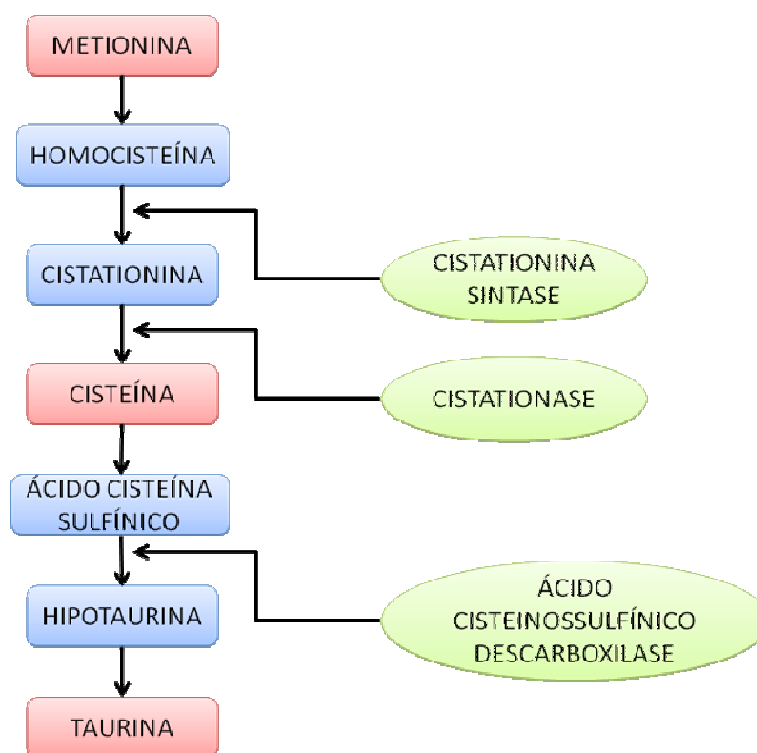


Figura 2 – Metabolismo da Taurina

A absorção é pequena pelos enterócitos, aproximadamente, 200mg/dia provenientes de produtos animais ⁴⁴. A absorção intestinal e reabsorção renal de taurina

aumentam quando a dieta é pobre neste aminoácido, por outro lado, quando a ingestão de taurina é alta, a excreção se torna aumentada ²⁸.

Existem dois mecanismos de transporte que controlam o movimento de taurina através da bordadura em escova nas vilosidades do intestino delgado: o transportador TauT (“taurine transport”) e o sistema PAT (“proton-coupled amino acid transporter”). Nos últimos anos, os estudos enfocaram o transportador TauT, que é caracterizado por possuir alta afinidade e baixa capacidade de transportar taurina e β alanina. Este transportador é Na^+ e Cl^- dependente e é eficiente na captura de taurina quando há baixas concentrações deste aminoácido na luz intestinal ². Esta situação ocorre na dieta pobre em taurina e entre as refeições ². O TauT foi isolado em ratos ⁶⁸, em camundongos ³⁹ e em humanos ⁵⁶ e tem sido chamado tanto de transportador β aminoácidos como transportador taurina ².

O sistema PAT1, também, foi isolado em ratos ⁵⁹, em camundongos ⁹ e em humanos ¹³. Este transportador, ao contrário do TauT, possui baixa afinidade e alta capacidade de transportar taurina e β alanina. São H^+ e pH dependentes e apresentam eficiência na captura de taurina quando há altas concentrações de taurina na luz intestinal ².

Os produtos finais do catabolismo da taurina são o ácido isetionico (ácido 2-hidroxi-etanesulfônico) e sulfato inorgânico ³². Em ratos e humanos a principal via de excreção é a urinária e em humanos também é excretado pela via biliar. Taurina é pouco absorvida pelo túbulo renal proximal, conseqüentemente a urina contém concentrações iguais ou maiores do que a do plasma ³⁰.

Estudos *in vivo* mostram que a deficiência de taurina está associada à cardiomiopatia, à degeneração da retina e ao retardo do crescimento, principalmente durante o desenvolvimento ⁷¹.

A deficiência de taurina pode ser produzida das seguintes maneiras em animais de experimentação:

- 1) por restrição alimentar de taurina, como a usada em gatos, cães e raposas ⁷²;
- 2) por competição pelos transportadores com o uso de β -alanina, como a usada em modelos de ratos e camundongos ⁴⁷, chamada de depleção farmacológica ³⁸. Exemplos de uso deste modelo: Parildar et al. ⁴⁸ usaram ratos machos Wistar tratados com β -alanina (3%) na água por um mês, estes apresentaram diminuição de 20% dos níveis de taurina no coração e o estudo de Dawson et al. ¹⁸ em ratos Sprague-Dawley com o mesmo protocolo, foi observado diminuição de 30% da concentração de taurina;
- 3) por mutação gênica (gene *taut-/-*) como no modelo de camundongo estudado por Warskulat et al. ⁷⁵;
- 4) por diminuição da síntese, como ocorre na infusão de TNF- α em animais experimentação. Nesta situação, acontece a redução da transsulfuração da metionina e cisteína com a diminuição das concentrações de glutatona e taurina ²⁷.

Com relação à toxicidade da taurina, não são observados sinais e sintomas relacionados ao excesso de taurina. O seu uso por seres humanos chega a 6 g/dia sem sinais adversos ¹¹.

INDICADORES BIOLÓGICOS

Estima-se que a quantidade de taurina nos tecidos depende da biossíntese, degradação, capacidade de transporte e captação ²⁹.

A concentração intracelular de taurina é de 5-50mM, a concentração plasmática de 40-100 μ M e no miocárdio é de, aproximadamente, 30mM, sendo que concentração plasmática $\leq 25\mu$ M é indicativo de depleção ^{14, 29}.

TAURINA E CORAÇÃO

Taurina corresponde a 50% do total de aminoácidos livres do coração ³⁴. A captação de taurina pelo músculo cardíaco ocorre por via de transporte específica para β aminoácidos e geralmente, o transporte ocorre contra gradiente de concentração que pode estar tão alto quanto 400:1 e a absorção parece saturar-se aproximadamente a $200\mu\text{M}$ ³¹.

Os estudos mostram que um dos efeitos cardíacos da taurina é provavelmente devido à sua capacidade de proteger o coração dos efeitos nocivos resultantes do excesso de cálcio, por exemplo induzir a morte celular ⁶¹. O trânsito de cálcio (Ca^{++}) intracelular é um dos principais mecanismos reguladores do ciclo de contração e relaxamento cardíaco. Enquanto a rápida elevação do Ca^{++} citosólico induz a contração, sua diminuição provoca o relaxamento. Desta forma, a atividade de diferentes canais e bombas localizados no sarcolema e no retículo sarcoplasmático regulam o trânsito de Ca^{++} intracelular, modulam a contratilidade e o relaxamento do miocárdio ⁴⁶. A taurina pode direta ou indiretamente ajudar a regular os níveis de íon Ca^{++} intracelular, modulando a ação de canais de Ca^{++} dependente e regular os canais de Na^{+} ^{7, 62}, mantendo desta forma, sua homeostase. Quando quantidades adequadas de taurina estão presentes, os danos miocárdicos causados pelo Ca^{++} reduzem significativamente, talvez pela interação entre taurina e proteínas de membrana ³⁵.

Ainda dentro das ações regulatórias de transporte de íons, a taurina possui papel osmorregulador. No estresse osmótico, acontecem trocas de íons e taurina entre as células e o meio extracelular com o intuito de manter o equilíbrio osmótico. Em presença de estresse hiposmótico, a célula libera rapidamente taurina e eletrólitos, enquanto os mesmos solutos são acumulados no estresse hiperosmótico. Portanto, a restauração do equilíbrio osmótico depende tanto da taurina quanto dos íons e quanto mais taurina sair ou entrar na célula, menor será a requisição dos íons. O desequilíbrio osmótico afeta o tamanho do citoplasma, assim a taurina previne alterações no tamanho das células ⁶³.

Outro potencial mecanismo das ações cardiovasculares da taurina refere-se ao fato de que ela protege as membranas lipossômicas contra danos causados por radicais livres. O estresse oxidativo é um dos principais moduladores do processo de remodelação cardíaca. Entre outros mecanismos fisiopatológicos, uma das principais consequências do estresse oxidativo é a lipoperoxidação. Logo, o estresse oxidativo pode ser indutor de danos celulares que alteram variáveis funcionais e estruturais cardíacas, participando da fisiopatologia da insuficiência cardíaca secundária a vários estímulos ²¹. A ação antioxidante da taurina seria por meio da eliminação desses componentes e por reforçar tanto as membranas dos miócitos como as terminações nervosas simpáticas do coração ²¹.

A taurina, também, protege o coração pela sua ação antiinflamatória, este aminoácido se liga ao ácido hipocloroso (HOCl), poderoso oxidante, para formar a taurina cloramina (TauCl), composto mais estável. Esta reação tem a capacidade de bloquear citocinas pró-inflamatórias ^{10, 78}. A taurolidina, composto derivado da taurina, possui a capacidade de bloquear a produção do fator de necrose tumoral α (TNF α), importante citocina pró-inflamatória, em 50-90% em humanos ⁷⁸.

Em estudos com gatos e cães, a deficiência de taurina foi relacionada com o desenvolvimento de cardiomiopatia, que foi resolvida com a administração de taurina ^{24, 53}. Foi observado em ratos que a indução farmacológica da depleção de taurina levou a alterações eletrocardiográficas ³⁶, de contratilidade no músculo papilar ³⁷ e desordens dos filamentos contrácteis e a perdas miofibrilares na ultraestrutura ³⁸. No modelo de camundongos transgênicos a deleção do gene TauT por Ito et al. ³³ resultou na atrofia cardíaca, danos mitocondriais e das miofibrilas e disfunção cardíaca.

Portanto, a taurina parece desempenhar papel fundamental na manutenção da estrutura e função cardíaca. É conhecida a importância da taurina no coração e nas alterações morfológicas e funcionais, usando o modelo de deficiência de taurina por mutação gênica. No

entanto, são poucos os achados de morfologia e de função cardíacas na deficiência de taurina por indução farmacológica em ratos.

II. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Os dados expostos anteriormente permitem levantar a hipótese de que a deficiência de taurina em ratos Wistar promove remodelação cardíaca com piora da função cardíaca.

III. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Analisar a estrutura e a função cardíaca de ratos Wistar com deficiência de taurina induzida por β -alanina.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

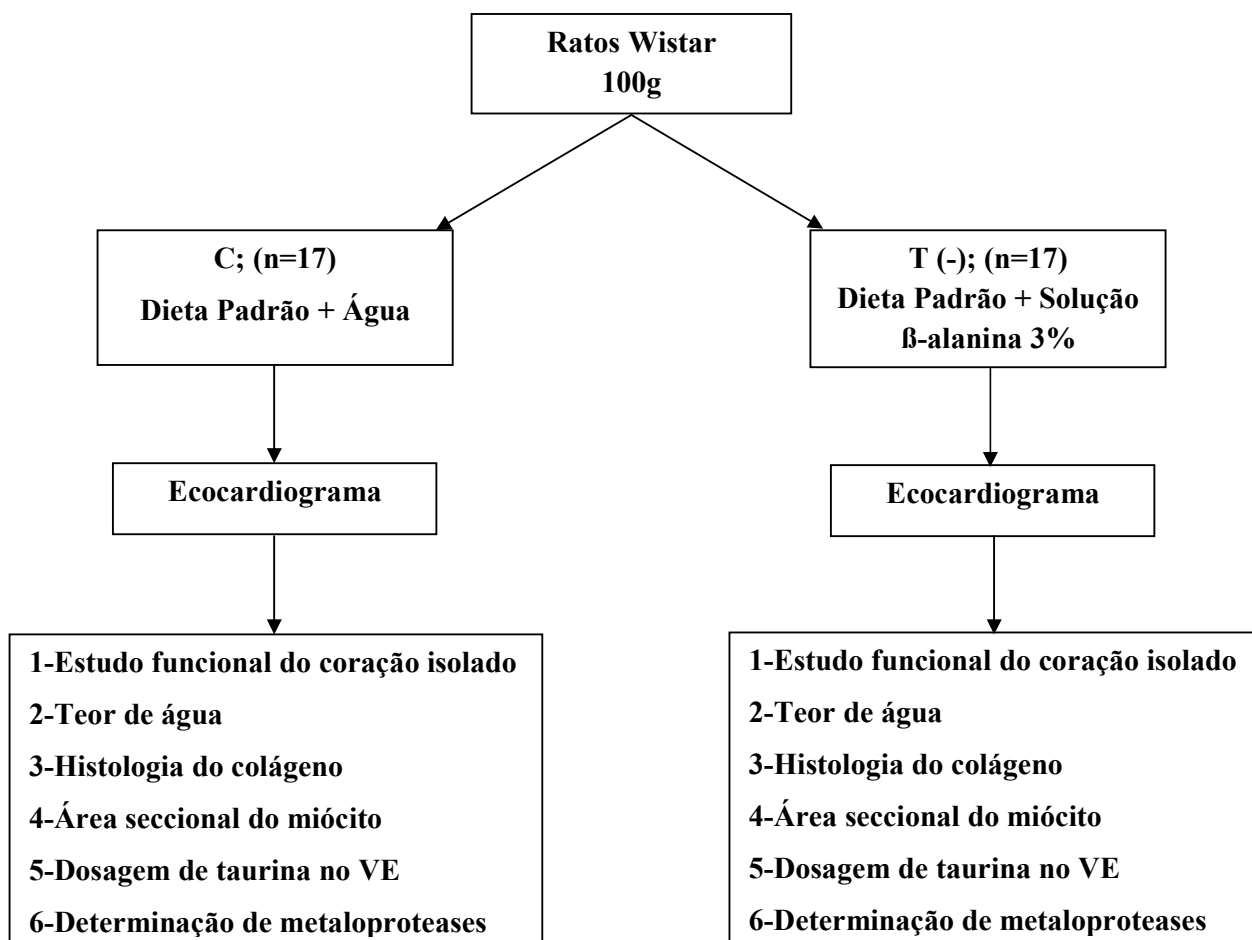
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto de pesquisa foi conduzido após aprovação pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com média de 21 dias de idade, previamente hígidos, pesando aproximadamente 100g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Botucatu.

Os ratos foram distribuídos de modo aleatório em dois grupos: controle (C; n=17) e deficiente em taurina (T (-); n=17). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno forradas com maravalha de *Pinus* esterilizadas, em ambiente com temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e submetidos a ciclos claro-escuro de 12 horas.

Os grupos receberam ração comercial RC FOCUS 1765 CAMUNDONGOS PP (*Agroceres*®) e água *ad libitum*. No grupo T(-) foram diluídos 3% de β -alanina na água. A ingestão alimentar dos animais foi controlada diariamente. O consumo de água ou solução foi mensurado em dias alternados. Os animais foram pesados semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2. Após 30 dias de tratamento os animais foram estudados por meio de ecocardiografia, estudo funcional pelo coração isolado e coleta de material biológico para realização de exames laboratoriais e de microscopia óptica.



ESTUDO FUNCIONAL

ESTUDO “IN VIVO”

O estudo foi realizado por meio de Doppler-ecocardiografia transtorácica convencional com equipamento Phillips (HDI 5000) dotado de transdutor eletrônico setorial multifrequência (7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura⁶⁰.

Todos os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) por via intramuscular, seguido de tricotomia da região anterior do tórax. Após estes procedimentos os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a realização do ecocardiograma. Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, obtida com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo-M passando pelas válvulas da valva aórtica. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo (DSVE), espessura da parede posterior (EPP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizados, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, obtendo-se a média aritmética em seguida. As imagens dos registros das câmaras ventriculares, modo M, foram arquivadas para eventuais consultas posteriores.

Os fluxos diastólico transmitral e sistólico transvalvar aórtico foram obtidos com o transdutor colocado nas posições apicais quatro e cinco câmaras, respectivamente, permitindo as medidas da onda E (E) (cm/s), onda A (A) (cm/s), velocidade máxima do fluxo sanguíneo na via de saída do ventrículo esquerdo (VAO) (cm/s). A frequência cardíaca (FC) foi estimada pelo tempo entre dois batimentos consecutivos. O tempo entre, o final da ejeção e o início do enchimento diastólico ventricular, corresponde ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI) (ms). Essa variável foi normalizada pela frequência cardíaca, conforme fórmula abaixo. As medidas referentes aos fluxos também foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, obedecendo a mesma sistemática descrita acima.

As outras variáveis derivadas de formulações, a partir das medidas realizadas estão descritas abaixo:

- EPP/DDVE
- AE/AO
- Onda E/A
- $MVE = \{ [DDVE + (2 \times EPP)]^3 - (DDVE)^3 \} \times 1,04 \} / 1000 \text{ (g)}$,

sendo MVE a massa do ventrículo esquerdo.

➤ $FE = (DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$, sendo FE a fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

➤ $\%ENC = [(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100 \text{ (\%)}$, sendo %E a porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo.

➤ $TRIC = TRI/\sqrt{RR} \text{ (ms)}$, sendo TRIC o tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido para FC e RR o tempo em milissegundos entre dois batimentos consecutivos.

O estudo “in vivo” possibilitou avaliar a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca como massa miocárdica e dimensão das câmaras ⁶⁰.

ESTUDO “IN VITRO”

Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff

Após o estudo ecocardiográfico, 6 animais C e 6 animais T (-), que foram submetidos ao ecocardiograma, receberam tiopental sódico (50 mg/kg, IP) e heparina (1000 UI), por via intraperitoneal e ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir foi efetuada a esternotomia mediana, com ventilação assistida, 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 CaCl₂, 1,2 MgPO₄, 1,15 NaH₂PO₄, 1,2 Na₂SO₄, 25 NaHCO₃ 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 ⁸¹.

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 CO₂, 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 ($+dP/dt$) e a derivada negativa de pressão ($-dP/dt$). 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)²⁰. A razão V0/PC (mL/g) foi utilizada como parâmetro de normalização do tamanho da câmara, onde V0 é volume para obtenção de pressão ventricular diastólica nula e PC é peso corporal²⁰.

O estudo funcional consistiu dos seguintes passos:

- Determinação do volume para obtenção de pressão ventricular diastólica de nula (V0);
- A partir do V0 foram acrescentados, 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 da primeira derivada temporal 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 foram separados e pesados.

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Dos animais submetidos ao estudo do coração isolados foram coletados sangue, antes da retirada do coração e fígado. Após o estudo, os corações foram dissecados, separando-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD) para armazenamento e não foram utilizados para aferição de peso dos tecidos ou teor de água, já que foram perfundidos de forma artificial por solução nutritiva. Os 11 animais controle e os 11 animais

deficientes em taurina, não submetidos ao estudo do coração isolado, foram anestesiados por administração de pentobarbital sódico (50mg/kg) intraperitoneal. Destes animais foram coletados sangue, fígado e coração.

O sangue de todos os animais foi coletado em tubo heparinizado e que depois era centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma e que foi a seguir congelado a -80°C . Os fígados, VE, VD e átrio esquerdo, dos animais não submetidos ao estudo do coração isolado, foram rapidamente lavados em soro fisiológico para retirada do sangue. Estes tecidos foram divididos em fragmentos utilizados para peso tecidual, teor de água, armazenamento em formol e congelamento a -80°C .

Foram realizadas as pesagens do VE, VD e átrios totais, após a dissecação dos corações dos animais não submetidos ao estudo do coração isolado. Em seguida o VE foi seccionado a 4 mm da ponta, em um fragmento 3 mm de espessura, colocado em formol. A base do VE e a ponta, seccionado em 2 fragmentos, foram congeladas a -80°C , em 3 frascos individuais. O VD foi seccionado em 2 fragmentos, um deles armazenado em formol e outro utilizado para a medida de teor de água. Os átrios foram utilizados apenas para a medida de teor de água.

Os fígados foram seccionados em 3 fragmentos: para medida do teor de água (Ta), armazenamento em formol e congelamento a -80°C . O teor de água destes tecidos foi calculado por meio de medida de peso do fragmento do tecido, após dissecação, chamado de peso úmido (Pu) e da medida de peso, do mesmo fragmento, após 48 horas em estufa a 65°C , chamado de peso seco (Ps).

Assim, $Ta = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$. A equação fornece informações da existência de edema tecidual.

O formol utilizado para o armazenamento foi o tamponado (formol 10%, água deionizada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico). Os tecidos ficaram nesta solução por 24 horas e depois foram transferidos para álcool 70%. Em seguida foram parafinizados em blocos, dos quais posteriormente foram realizadas as lâminas para estudo histopatológico.

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Após ser inserido no bloco de parafina, o corte histológico do VE foi seccionado em cortes de 5 micrômetros de espessura. Em seguida, foram corados em lâminas com solução hematoxilina-eosina para aferição área seccional transversa dos miócitos (ASM) e com coloração específica para colágeno que é o picrosirius vermelho (Sirius red F3BA em saturação aquosa de ácido pícrico). A área seccional dos miócitos foi determinada pela média das medidas, das áreas de aproximadamente 100 miócitos, por lâmina. Os miócitos escolhidos tinham núcleo central, em corte transversal, e foram medidos através do contorno gerado pelo cursor na tela do computador ¹⁹. As medidas foram realizadas utilizando o microscópio LEICA DM LS (lente com aumento de 40 vezes), ligado à câmera de vídeo que enviou imagem digital ao computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

A porcentagem de colágeno intersticial foi determinada nas lâminas coradas com picrosirius vermelho, no mesmo microscópio, com lente de aumento 40 vezes e mesmo software já citado. Esta coloração permite a diferenciação de estruturas que contenham colágeno, coradas em vermelho e as que não apresentam colágeno, coradas em amarelo. O software utilizado realiza a marcação destas cores. Assim, pôde-se estabelecer a porcentagem

de colágeno em relação à área total do campo. Depois foi realizada a média de todos os campos^{23, 40}.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TAURINA NO MIOCÁRDIO: por HPLC (*high-performance liquid chromatography* – *cromatografia líquida de alta eficiência*)

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 TurraxTM 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.

Foram colocados 20 µl 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 tubo 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% tetrahydrofurano).

Para a quantificação do aminoácido taurina, utilizou-se o 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 cromatográfica 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 carboximetil-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, (Na₂HPO₄), 2% de Acetonitrila(ACN), 2% de Metanol(MeOH) e 2% de Tetrahydrofurano(THF)), e fase B (Metanol a 65%, com 5% da fase A).

O fluxo das fases foi de 1,70 ml por minuto. O procedimento analítico ocorreu na temperatura ambiente até 26 minutos da corrida, quando o forno foi ligado a 45°C e desligado aos 38 minutos da corrida. Inicialmente, após a injeção da amostra, do tempo 0,01 até 30 minutos foi bombeada a fase móvel com as alterações de gradiente ocorrendo de forma linear na seguinte proporção: 81% da fase A e 19% da fase B até chegar a 100% da fase B. Este gradiente permaneceu até os 38 minutos quando ocorreu diminuição da fase B para 19% em

0,1 minutos. A corrida terminou aos 47 minutos. Este tempo foi suficiente para estabilizar novamente a coluna possibilitando novas determinações.

DETERMINAÇÃO DAS METALOPROTEASES 2 E 9

A zimografia é considerada método simples, sensível, quantitativo e funcional de se acessar a atividade proteolítica em tecidos e células. As metaloproteases são enzimas proteolíticas sintetizadas em sua forma inativa chamada zimógeno, que em presença de zinco se tornam ativas. As metaloproteases 2 e 9 ativadas têm peso molecular de 62kDa e 82kDa respectivamente. Estas enzimas são capazes de degradar gelatina, por isso são chamadas de gelatinases. Os géis do sistema SDS-page contém gelatina e observa-se degradação destas substâncias nas bandas de peso molecular entre 60 e 90 kDa, correspondentes a atividade destas enzimas ²⁶.

Os tecidos serão congelados a - 80° C e serão homogeneizados com tampão de extração composto de Tris_HCl 50mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, CaCl₂ 10mM, na proporção de 30mg de tecido/100µL de tampão de extração, por 3 vezes de 30 segundos. Esta mistura ficará em geladeira -4° C por 2 horas, para que haja extração protéica adequada. Em seguida será realizada a centrifugação a 4000RPM, 4° C por 20 minutos. O sobrenadante resultante será utilizado para a quantificação de proteína. Esta será realizada pelo método Bradford, permitindo que se obtenha a quantidade de proteínas em cada microlitro. Em seguida, adiciona-se o tampão de aplicação da amostra composto por 5,55mL de água destilada, 1,25mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 0,3 mL de glicerol, 0,2 mL de azul bromofenol 0,5%, de modo que cada amostra contenha a mesma quantidade de proteína por microlitro. Assim, a mesma quantidade de proteína por amostra será aplicada em cada sulco dos géis de separação e *stacking*. O gel de separação é composto por 8% de poliacrilamida e

0,1% de gelatina e o stacking 4%, da mesma forma descrita no item acima. Os géis serão colocados na cuba 16X16 Biorad 18Di seguido do tampão de corrida composto por 30,3g Tris base, 144g Glicina, 10g SDS para cada litro e com pH= 8.3. A corrida será feita a 80V em aproximadamente 2h, em condições não redutora.

Após a corrida, o gel será lavado duas vezes de 15 minutos em Triton X-100 e em seguida serão realizadas 2 lavagens de cinco minutos cada em Tris-HCl 50mM pH 8,4 para retirar o Triton. Os géis serão colocados em recipiente com solução de incubação com Tris-HCl 50 mM pH 8,4 mais 5mM de CaCl_2 e 1 μL de ZnCl_2 e deverão permanecer a 37°C, por 12horas. Os géis serão corados com comassie Brilliant Blue por 2 horas e descorados com 30% metOH 10% ácido em água . Os géis serão estudados após serem fotografados em analisador de imagem UVP, UV White Darkhon. A atividade colagenolítica será analisada por meio da razão da banda ativa pela banda inativa da metaloproteinase.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados com distribuição normal foram apresentados em média e desvio padrão e comparados pelo teste t de Student. Os resultados com distribuição não normal foram apresentados em mediana e quartil 1 – quartil 3 e comparados pelo teste Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

V. RESULTADOS

5. RESULTADOS

ASPECTOS GERAIS DO MODELO DE DEFICIÊNCIA DE TAURINA

Na tabela 1 estão apresentados os dados relativos ao peso, ingestão de água ou solução de β -alanina e a concentração de taurina no ventrículo esquerdo dos animais estudados. Considerando o peso corporal inicial ($C = 103,0 \pm 5,2$ e $T(-) = 106,5 \pm 6,0$ g, $p = 0,081$) e o peso corporal final ($C = 257$ (254 – 277)g e $T(-) = 262$ (252 – 288)g, $p = 0,558$) (figura 3), não foram observadas diferenças entre os grupos controle e deficiente em taurina. A quantidade de água ou solução de água e β -alanina, em média, foram semelhantes ($C = 38,9 \pm 4,9$ ml/dia e $T(-) = 38,2 \pm 5,5$ ml/dia, $p = 0,725$). Já a concentração de taurina no ventrículo esquerdo foi menor no grupo deficiente em taurina ($C = 1,8 \pm 0,8$ μmol/mg de tecido e $T(-) = 0,4 \pm 0,1$ μmol/mg de tecido, $p = 0,007$) (figura 4), quando comparado ao grupo controle.

AValiação ECOCARDIOGRÁFICA

Os dados relativos às análises ecocardiográficas estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Considerando os dados morfológicos, o grupo $T(-)$ apresentou menores valores da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ($C = 1,37 \pm 0,11$ mm e $T(-) = 1,24 \pm 0,16$ mm, $p = 0,013$) (figura 5) e da relação EPP/DDVE ($C = 0,20 \pm 0,02$ e $T(-) = 0,17 \pm 0,02$, $p = 0,016$) (figura 6) em comparação ao grupo C. Nas análises das outras variáveis morfológicas, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Tabela 2).

Na avaliação dos dados funcionais, apresentados na tabela 3, o grupo $T(-)$ apresentou maior valor do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ($C = 2,91 \pm 0,57$ mm e

T(-) = $3,42 \pm 0,53$ mm, $p = 0,011$) (figura 7) e do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, corrigido pelo peso corpóreo ($C = 12,1$ ($9,62 - 13,00$) mm/kg e T(-) = $12,3$ ($11,10 - 14,20$) mm/kg, $p = 0,046$) (figura 8); menor frequência cardíaca ($C = 340,2 \pm 30,1$ bpm e T(-) = $304,2 \pm 25,9$ bpm, $p < 0,001$) (figura 9), débito cardíaco ($C = 73,48 \pm 9,07$ mL/min e T(-) = $64,72 \pm 7,81$ mL/min, $p = 0,005$) (figura 10), porcentagem de encurtamento ($C = 58,012 \pm 6,98$ e T(-) = $51,70 \pm 4,82$, $p = 0,004$) (figura 11), fração de ejeção ($C = 0,92 \pm 0,03$ e T(-) = $0,88 \pm 0,03$, $p = 0,004$) (figura 12) e onda A ($C = 64,0$ ($52,1 - 75,15$)cm/s e T(-) = $52,0$ ($45,8 - 56,0$)cm/s, $p = 0,008$) (figura 13), quando comparado ao grupo controle. Na razão E/A, o grupo deficiente em taurina ($C = 1,31 \pm 0,22$ e T(-) = $1,62 \pm 0,26$, $p = 0,001$) (figura 14), obteve maior valor que o grupo controle. Nas análises das outras variáveis, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

AVALIAÇÃO FUNCIONAL *IN VITRO* – CORAÇÃO ISOLADO

Na tabela 4 estão apresentados os dados referentes à avaliação funcional *in vitro* do ventrículo esquerdo (coração isolado). Indicadores da função sistólica, representados pela pressão sistólica correspondente à pressão diastólica nula, pela pressão sistólica correspondente à pressão diastólica 25mmHg e a derivada positiva máxima; e indicadores da função diastólica, como derivada negativa máxima e complacência foram semelhantes entre os grupos. O tamanho da câmara, representada pelo volume para obtenção de pressão ventricular diastólica nula (V0) e pela razão V0/PC, também foram semelhantes entre os grupos.

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Os dados morfométricos obtidos por pesagem dos tecidos se encontram na tabela 5. Os pesos dos átrios, ventrículo esquerdo, ventrículo direito e fígado foram semelhantes entre os grupos. O mesmo fenômeno foi encontrado quando os pesos dos tecidos foram corrigidos pelo peso corporal. O teor de água do ventrículo esquerdo foi maior no grupo deficiente em taurina ($C = 72,4 \pm 0,08\%$ e $T(-) = 80,2 \pm 0,06\%$, $p = 0,027$) (figura 15) em comparação aos animais controle, indicando edema tecidual, enquanto que o peso seco do ventrículo esquerdo foi menor ($C = 0,53 \pm 0,16 \text{ mg/kg}$ e $T(-) = 0,38 \pm 0,15 \text{ mg/kg}$, $p = 0,051$) (figura 16). A análise do teor de água nos outros tecidos foi semelhante entre os grupos.

AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA E AVALIAÇÃO DAS METALOPROTEASES 2 E 9

A tabela 6 representa as variáveis área seccional dos miócitos, porcentagem de colágeno e metaloproteases 2 e 9. O grupo deficiente em taurina apresentou área seccional dos miócitos ($C = 238,3 \pm 24,2 \mu\text{m}^2$ e $T(-) = 196,3 \pm 29,7 \mu\text{m}^2$, $p = 0,013$) (figura 17) menor que o grupo controle, já a porcentagem de colágeno ($C = 1,37 \pm 0,8\%$ e $T(-) = 1,34 \pm 1,3\%$, $p = 0,955$) e as metaloproteases 2 ($C = 0,507 \pm 0,1$ e $T(-) = 0,514 \pm 0,1$, $p = 0,870$) e metaloproteases 9 ($C = 0,645 \pm 0,7$ e $T(-) = 0,604 \pm 0,4$, $p = 0,898$) foram semelhante entre os grupos.

Tabela 1. Aspectos gerais do modelo de deficiência de taurina

	Grupo C	Grupo T(-)	p
	n = 17	n = 17	
PI (g)	103,0 ± 5,2	106,5 ± 6,0	0,081
A (ml/dia)	38,9 ± 4,9	38,2 ± 5,5	0,725
PF (g)	257 (254,0 – 277,0)	262 (252,0 – 288,0)	0,558
Taurina (μmol/mg de tecido)	1,8 ± 0,8	0,4 ± 0,1*	0,007

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; PI: peso no início do experimento; A: média de ingestão de água ou solução de água e β-alanina; PF: peso final; Taurina: concentração de taurina por mg de ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (quartil 1 - quartil 3). *p ≤ 0,05.

Tabela 2. Estudo morfológico *in vivo* por meio de ecocardiografia

	Grupo C	Grupo T(-)	p
	n = 17	n = 17	
DDVE(mm)	6,76 (6,69 – 7,34)	6,90 (6,76 – 7,36)	0,654
DDVE/PC(mm/kg)	26,4 ± 2,45	26,4 ± 2,17	0,962
EPP (mm)	1,37 ± 0,11	1,24 ± 0,16*	0,013
EPP/DDVE	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,02*	0,016
AE (mm)	4,0 ± 0,61	3,83 ± 0,39	0,356
AO (mm)	3,16 ± 0,30	3,13 ± 0,18	0,755
AE/AO	1,26 ± 0,17	1,22 ± 0,15	0,489
AE/PC (mm/kg)	15,2 ± 2,38	14,4 ± 2,31	0,298
MVE (g)	0,34 (0,33 – 0,43)	0,36 (0,33 – 0,43)	0,654
IMVE (g/kg)	1,94 ± 0,49	1,87 ± 0,32	0,708

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal do animal; EPP: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (quartil 1 - quartil3). *p ≤ 0,05.

Tabela 3. Estudo funcional *in vivo* por meio de ecocardiografia

	Grupo C	Grupo T(-)	p
	n = 17	n = 17	
DSVE (mm)	2,91 ± 0,57	3,42 ± 0,53*	0,011
DSVE/PC (mm/kg)	12,1 (9,62 – 13,00)	12,3 (11,10 -14,20)*	0,046
FC (bpm)	340,15 ± 30,13	304,22 ± 25,91*	<0,001
DC (mL/min)	73,48 ± 9,07	64,72 ± 7,81*	0,005
% ENC	58,012 ± 6,98	51,70 ± 4,82*	0,004
FE	0,92 ± 0,03	0,88 ± 0,03*	0,004
VAo (cm/s)	108,29 ± 13,23	106,13 ± 13,06	0,635
Onda E (cm/s)	84,70 ± 12,73	83,62 ± 9,34	0,781
Onda A (cm/s)	64,0 (52,07 – 75,15)	52,0 (45,75 – 56,00)*	0,008
E/A	1,31 ± 0,22	1,62 ± 0,26*	0,001
TRIV (ms)	16,50 (15,0 – 19,00)	17,0 (15,5 – 18,25)	0,876
TRIVc (ms)	42,5 ± 8,8	38,0 ± 5,5	0,084

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal do animal; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; %ENC: porcentagem de encurtamento; FE: fração de ejeção; VAo: velocidade do sangue na aorta; E/A: relação entre as ondas E e A; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC. Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (quartil 1 – quartil 3). *p ≤ 0,05.

Tabela 4. Estudo funcional *in vitro* por meio de coração isolado

	Grupo C	Grupo T(-)	p
	n = 6	n = 6	
PS₂₅ (mmHg)	165,2 ± 19,8	144,4 ± 24,8	0,141
PS₀ (mmHg)	137,3 ± 20,4	123,3 ± 20,1	0,260
+dP/dt max (mmHg/s)	4375 ± 981	3833 ± 714	0,300
-dP/dt max (mmHg/s)	2469 ± 330	2125 ± 262	0,074
V0 (μL)	83,3 ± 17,5	84,2 ± 19,6	0,940
V0/PC (μL /g)	0,326 ± 0,08	0,322 ± 0,09	0,931
Δ₂₅ (μL)	69,5 ± 16,1	71,8 ± 23,7	0,846
Comp (μL/mmHg)	2,8 ± 0,6	2,9 ± 1,9	0,846

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; PS₂₅: pressão sistólica correspondente à pressão diastólica 25mmHg; PS₀: pressão sistólica correspondente à pressão diastólica 0 mmHg; +dp/dt max: derivada positiva máxima da pressão; -dp/dt max: derivada negativa máxima da pressão; V0: volume em que pressão diastólica é nula; PC: peso corporal; Δ₂₅: volume requerido para aumentar a pressão diastólica de zero para 25mmHg; Comp: complacência. Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (quartil 1 – quartil 3). p ≤ 0,05.

Tabela 5. Estudo morfométrico por meio de pesagem de tecidos

	n	Grupo C	n	Grupo T(-)	p
PA (mg)	10	0,015 (0,01 – 0,02)	8	0,014 (0,01 – 0,02)	0,100
PA/PC (mg/g)	10	0,05 (0,03 – 0,06)	8	0,05 (0,04 – 0,05)	0,824
PVE (g)	10	0,52 ± 0,11	11	0,52 ± 0,09	0,955
PVE/PC (mg/g)	10	1,74 ± 0,69	11	1,87 ± 0,32	0,589
PSVE (g)	9	0,14 ± 0,04	11	0,10 ± 0,04	0,072
PSVE/PC (mg/g)	9	0,53 ± 0,16	11	0,38 ± 0,15*	0,051
PVD (g)	9	0,15 ± 0,04	9	0,17 ± 0,03	0,286
PVD/P (mg/g)	9	0,57 ± 0,05	9	0,66 ± 0,03	0,208
Ta A (%)	10	82,6 (79,1 – 88,9)	7	88,9 (81,1 – 93,7)	0,353
Ta VD (%)	10	74,4 (72,1 – 80,6)	9	75,8 (74,5 – 80,8)	0,270
Ta VE (%)	11	72,4 ± 0,08	11	80,2 ± 0,06*	0,027
Ta F (%)	17	70,1 ± 0,02	17	69,4 ± 0,01	0,313

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; PA: peso dos átrios; PC: peso corporal do animal; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PSVE: peso seco do ventrículo esquerdo; PVD: peso do ventrículo direito; Ta A: teor de água nos átrios; Ta VD: teor de água no ventrículo direito; Ta VE: teor de água no ventrículo esquerdo; Ta F: teor de água no fígado. Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (quartil 1 – quartil 3). *p ≤ 0,05.

Tabela 6. Estudo histopatológico por microscopia óptica : área seccional dos miócitos e porcentagem de colágeno

	Grupo C	Grupo T(-)	p
	n = 7	n = 7	
ASM (μm^2)	238,3 \pm 24,2	196,3 \pm 29,7*	0,013
C (%)	1,37 \pm 0,8	1,34 \pm 1,3	0,955
MMP2 A/I	0,51 \pm 0,1	0,51 \pm 0,1	0,870
MMP2 A1+A2/I	2,5 \pm 0,4	2,7 \pm 0,4	0,495
MMP9 A/I	0,65 \pm 0,7	0,60 \pm 0,4	0,898

Grupo C: animais controle; Grupo T(-): animais deficientes em taurina; ASM: área seccional dos miócitos; C: porcentagem de colágeno; MPP2 A/I: razão entre a banda ativa e inativa da metaloprotease 2; MPP2 A1 + A2/I: razão entre a banda ativa 1 mais ativa 2 e inativa da metaloprotease 2; MPP9 A/I: razão entre a banda ativa e inativa da metaloprotease 9. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão ou mediana (quartil 1 – quartil 3). $p \leq 0,05$.

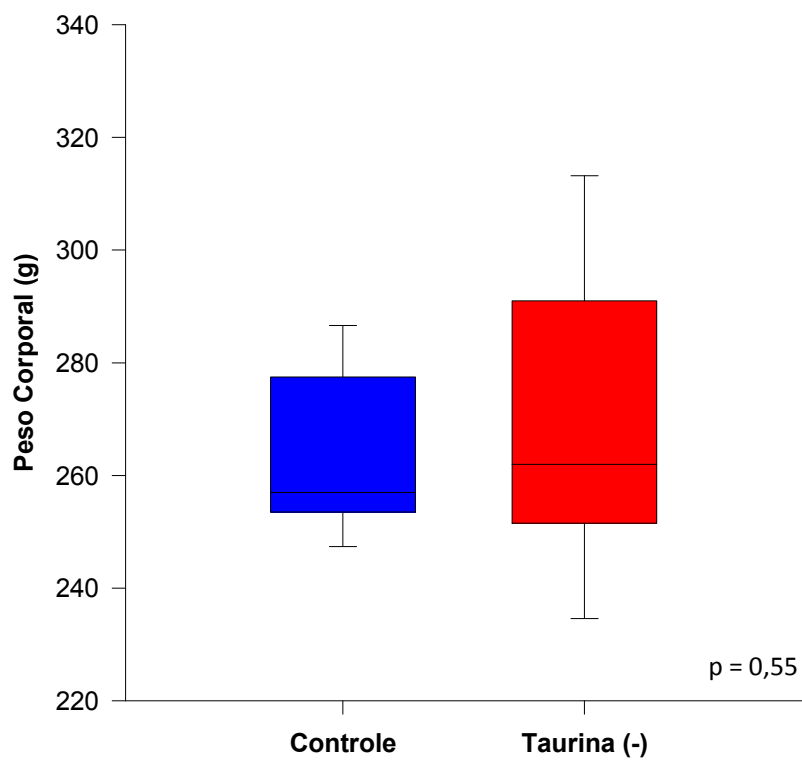


Figura 3. Gráfico de cinco pontos de Tukey com representação de mediana, quartil 1 - quartil3 e percentil 10 e percentil 90 dos pesos finais dos animais controle e deficientes em taurina

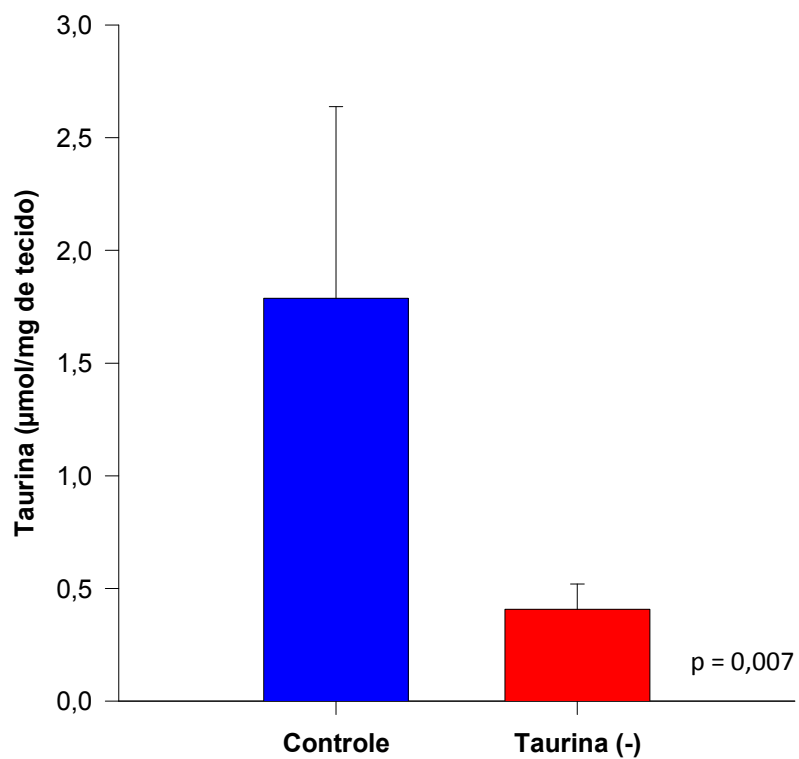


Figura 4. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração de taurina no ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência

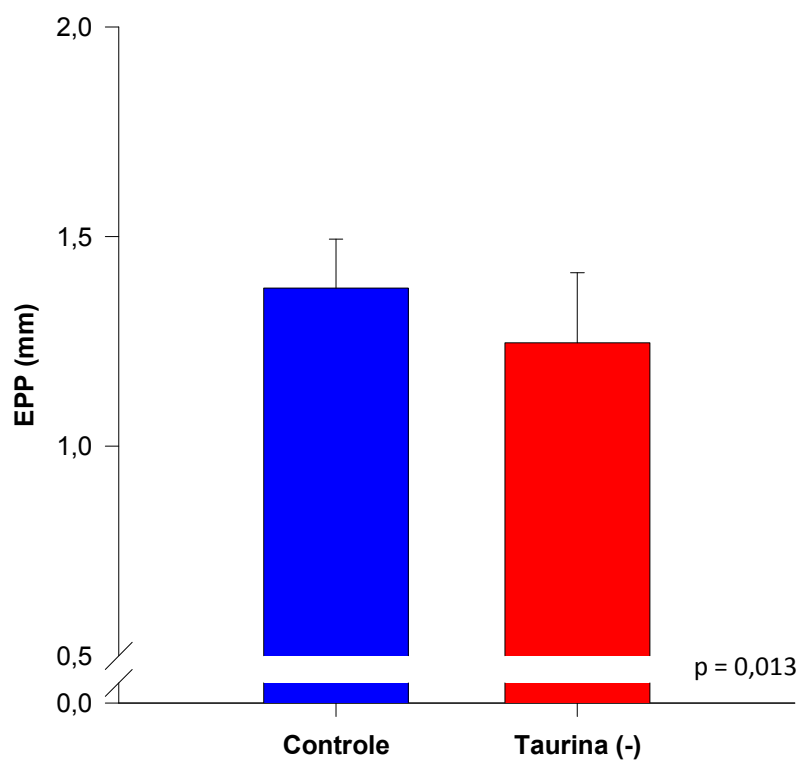


Figura 5. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

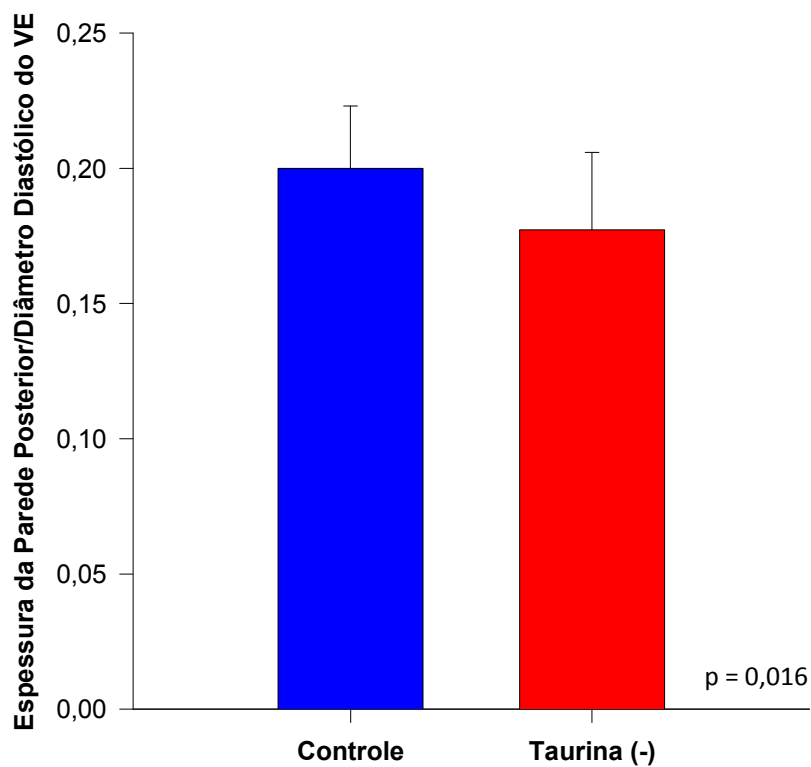


Figura 6. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da razão entre as medidas da espessura da parede posterior e do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

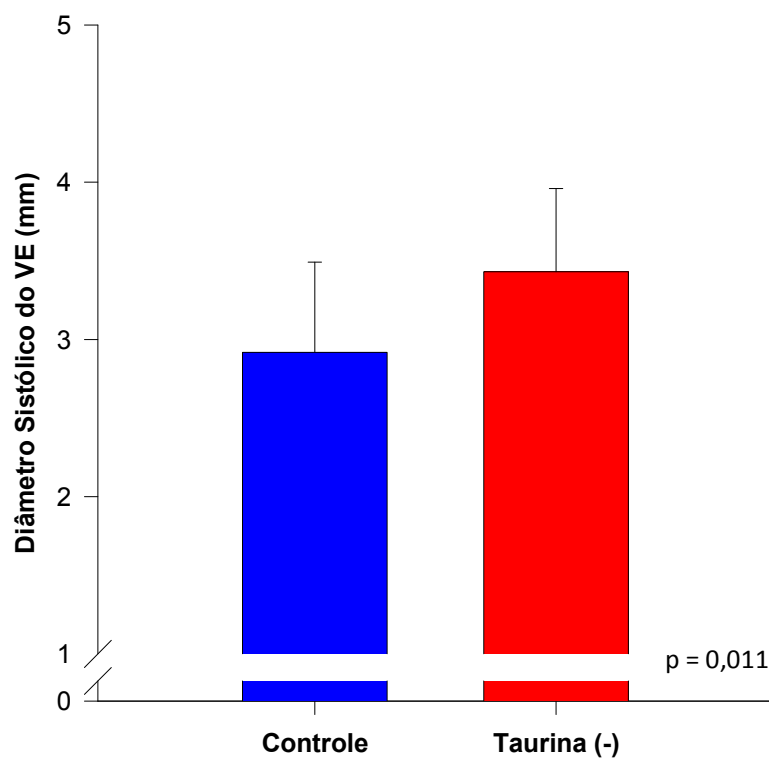


Figura 7. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da medida do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

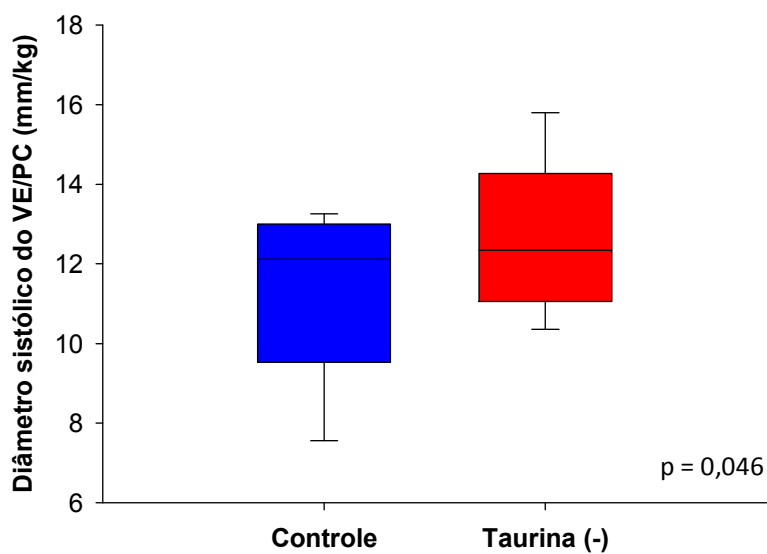


Figura 8. Gráfico de cinco pontos de Tukey com representação de mediana, quartil 1 - quartil3 e percentil 10 e percentil 90 do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

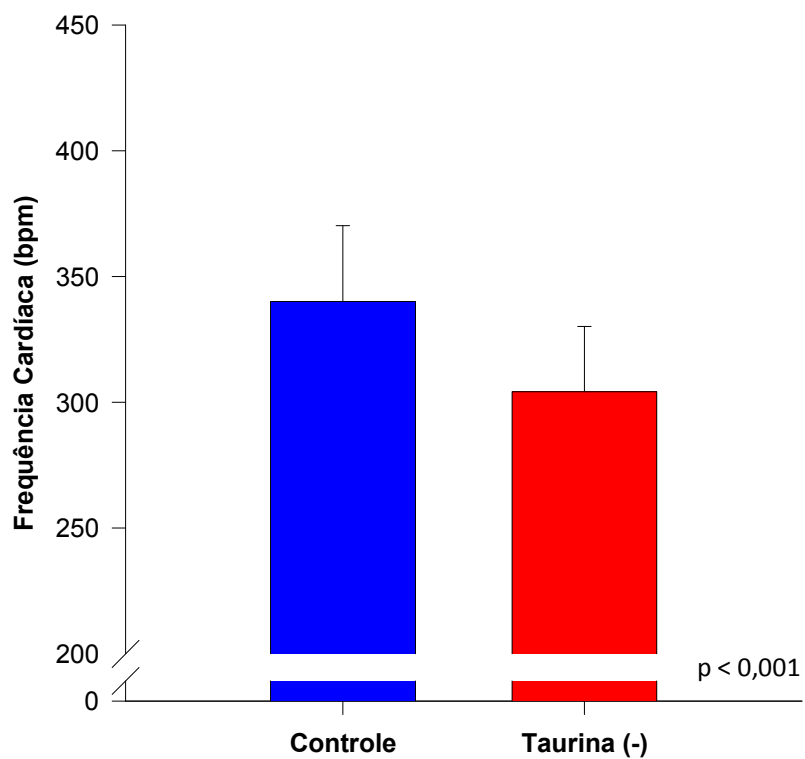


Figura 9. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da medida da frequência cardíaca dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

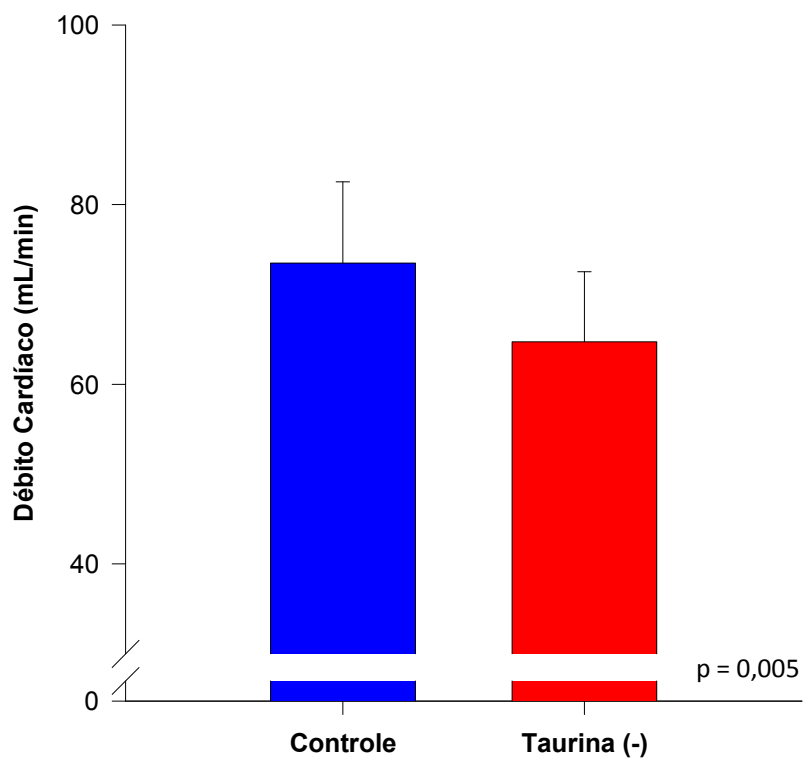


Figura 10. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração do débito cardíaco dos animais controle e deficientes em taurina obtida por ecocardiografia

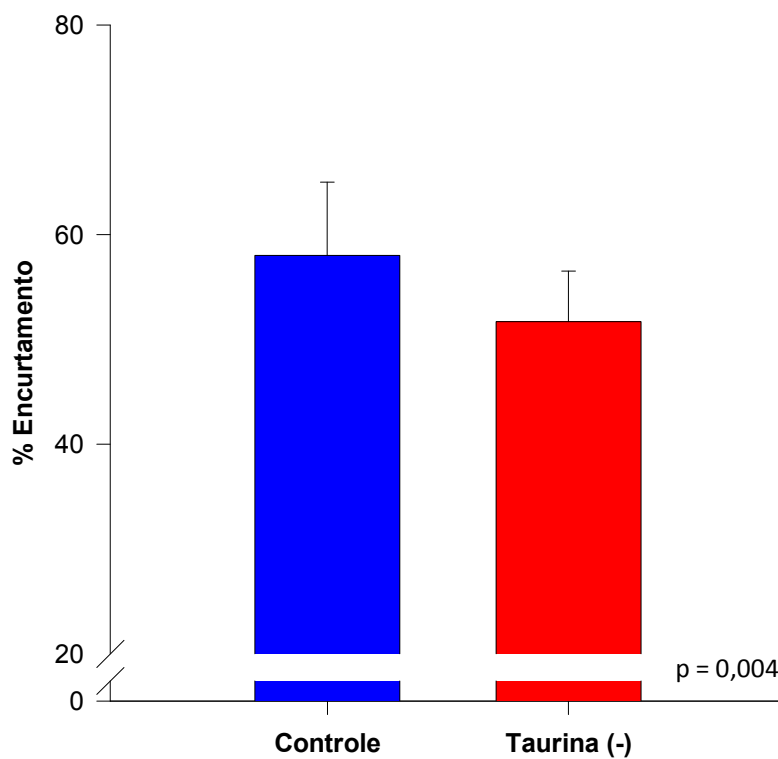


Figura 11. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da função sistólica do ventrículo esquerdo por meio da porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina realizada por ecocardiografia

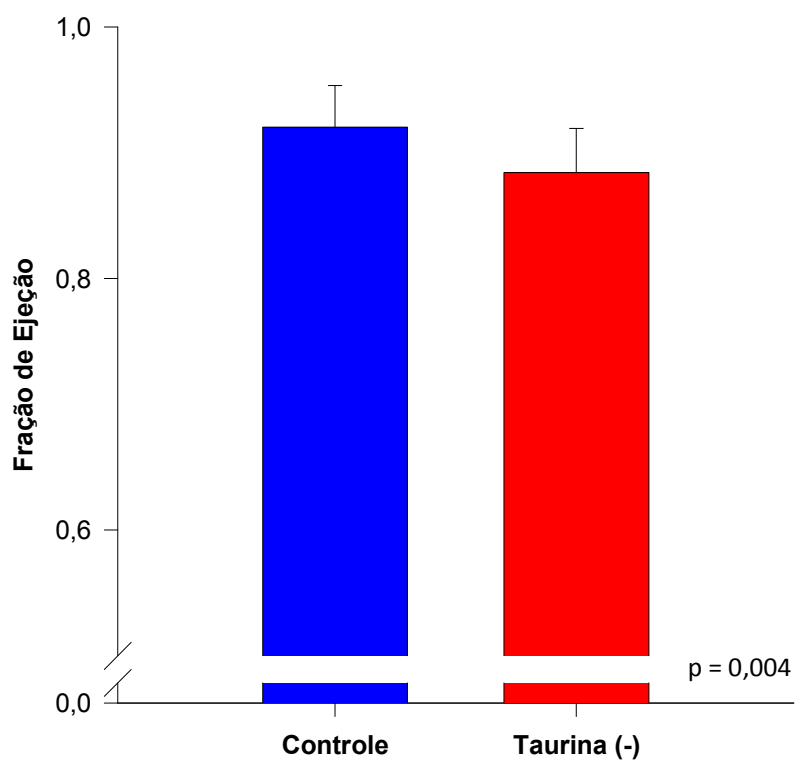


Figura 12. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da concentração da fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina realizada por ecocardiografia

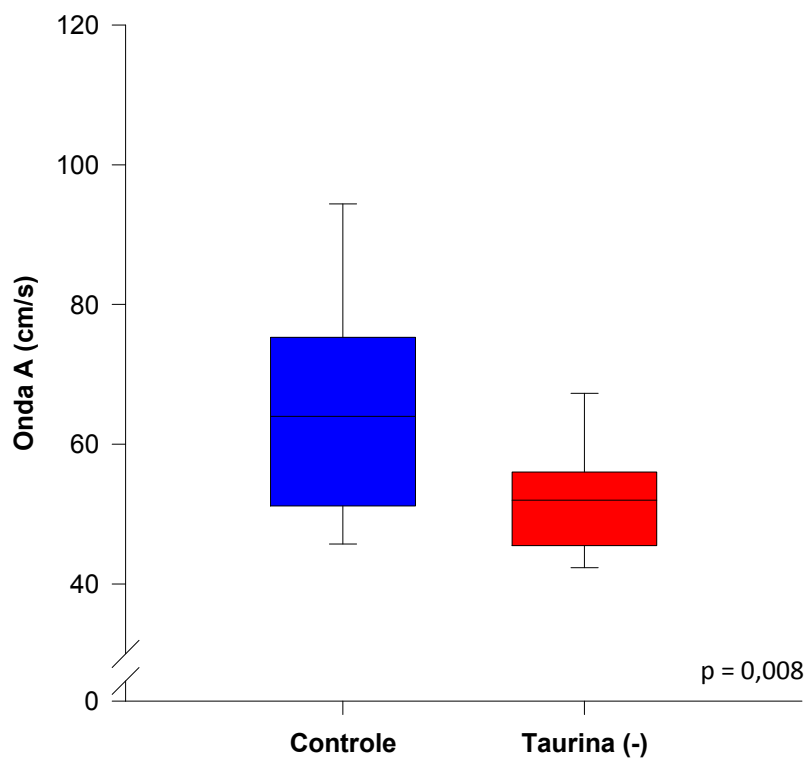


Figura 13. Gráfico de cinco pontos de Tukey com representação de mediana, quartil 1 - quartil3 e percentil 10 e percentil 90 do fluxo transvalvar mitral dos animais controle e deficientes em taurina realizada por ecocardiografia

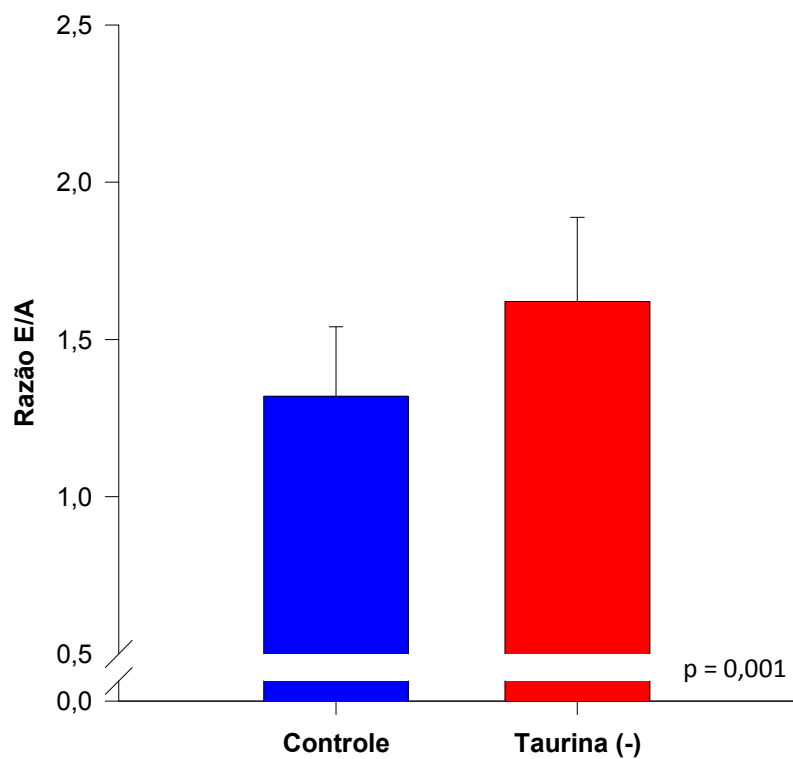


Figura 14. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da razão onda E e onda A dos animais controle e deficientes em taurina realizada por ecocardiografia

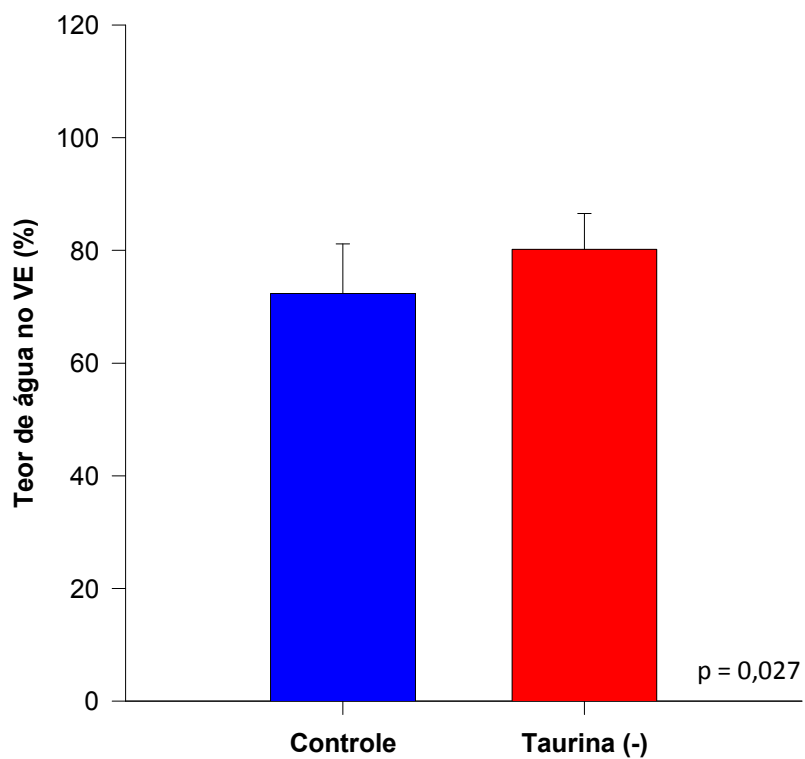


Figura 15. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão do teor de água no ventrículo esquerdo dos animais controle e deficientes em taurina

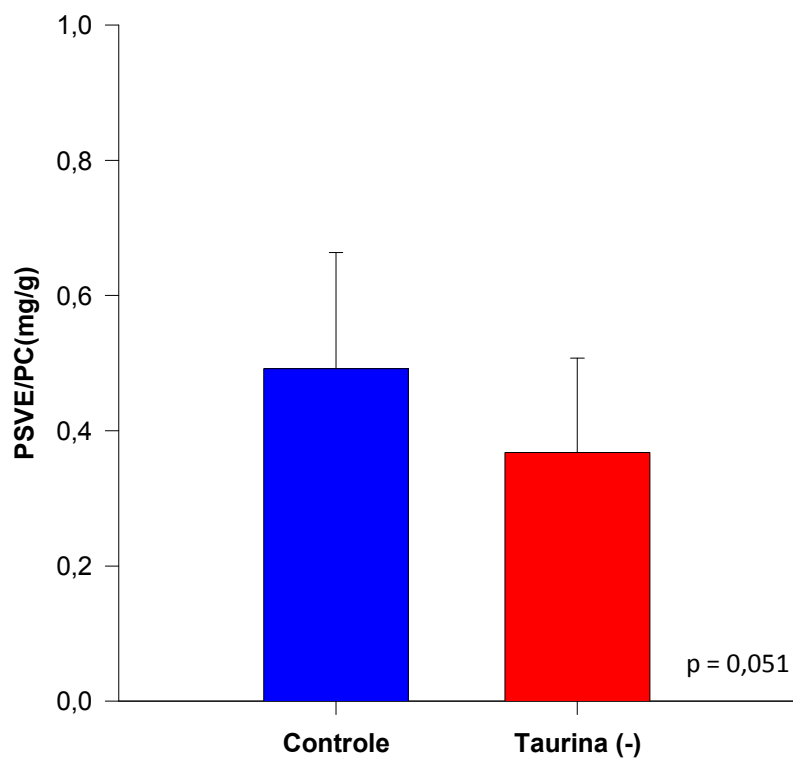


Figura 16. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão do peso seco do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal dos animais controle e deficientes em taurina

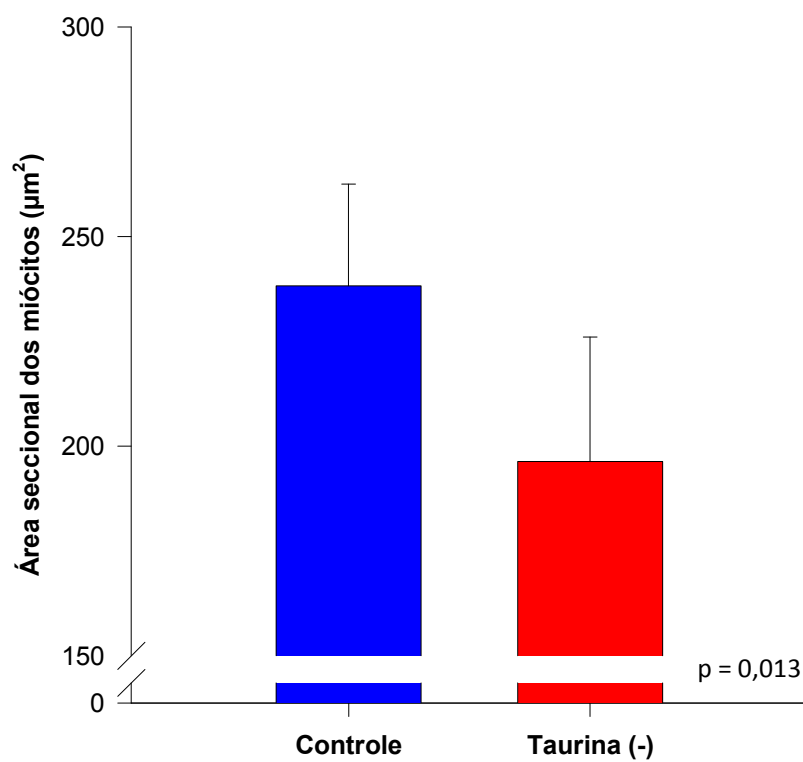


Figura 17. Gráfico de barra com representação de média e desvio padrão da área seccional dos miócitos dos animais controle e deficientes em taurina

VI. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da deficiência de taurina no coração.

O modelo utilizado para obter deficiência de taurina em ratos, tratamento com solução de β -alanina 3%, fez com que ocorresse diminuição de 77% da concentração de taurina no ventrículo esquerdo. Esta diminuição da concentração de taurina é superior ao encontrada por Parildar et al.⁴⁸ e por Dawson Jr et al.¹⁸, redução de 20% e 50% respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pela idade dos animais nos protocolos experimentais. O trabalho de Parildar et al.⁴⁸ utilizaram ratos com 22 meses e Dawson Jr et al.¹⁸ utilizaram ratos que pesavam 180 a 200 g. Os animais estudados por Dawson Jr et al.¹⁸ eram 2 a 3 semanas mais velhos do que os do presente estudo. Schuller-Lewis & Park⁶⁵, em artigo de revisão, descrevem que animais jovens mostram menor capacidade de síntese de taurina quando comparados aos animais mais velhos. Assim, as diferenças observadas entre os estudos podem ser devido às idades dos ratos.

A deficiência de taurina por tratamento com solução de β -alanina resultou em atrofia cardíaca verificada por afinamento da espessura da parede ventricular, menor peso seco do ventrículo esquerdo e por menores valores de área seccional dos miócitos. Outro achado em nosso estudo foi que o grupo deficiente em taurina apresentou remodelação excêntrica. Esta alteração foi observada porque os animais deficientes em taurina apresentaram maiores cavidades ventriculares (DSVE), menores EPP do VE e com menores valores da geometria ventricular (EPP/DDVE). Em relação à função diastólica, os dados são

compatíveis com piora da diástole nos animais deficientes em taurina. O grupo deficiente em taurina apresentou menor velocidade da onda A, maior razão E/A, e tendência menor do TRIV corrigido pela frequência cardíaca. Em relação à função sistólica, os dados ecocardiográficos são compatíveis com disfunção sistólica. Foi possível observar menor fração de ejeção, porcentagem de encurtamento e débito cardíaco no grupo deficiente em taurina. Além disso, no presente estudo não foi evidenciado aumento de fibrose por meio do estudo por microscopia óptica e nem maior ativação de metaloproteases.

Os achados do presente estudo são semelhante aos encontrados por Ito et al.³³ em camundongos transgênicos com depleção do gene TauT. Por exemplo, os camundongos apresentaram: atrofia cardíaca, menores áreas de miócitos, ausência de fibrose, remodelação excêntrica e disfunção sistólica.

As possíveis situações que podem explicar a remodelação cardíaca encontrada em nosso estudo são: restrição alimentar, desnutrição energética-protéica²⁵, alteração no metabolismo protéico⁴¹ alterações hemodinâmicas^{12, 76} e processo inflamatório^{80, 82}.

A restrição alimentar e desnutrição energética-protéica (DEP) induzem a alterações no coração como atrofia e disfunção cardíaca⁵⁴. A restrição alimentar de 50% da dieta de ratos jovens Wistar-Kyoto por 90 dias resultou em menor peso corporal, menor peso do VE, maior concentração de colágeno, sem alterar desempenho cardíaco⁴⁵. Já a desnutrição energética-protéica de ratos recém desmamados promoveu a atrofia com dilatação de cavidade (remodelação excêntrica) e disfunção diastólica²⁵. Estes animais eram caquéticos com diminuição de peso corporal e do peso cardíaco de modo proporcional. Além disso, a área seccional dos miócitos foi menor e a concentração de colágeno foi maior no grupo DEP²⁵. Outros achados comuns na DEP são bradicardia, hipotensão e menor débito cardíaco⁴³. Assim, os nossos dados são parecidos com os encontrados na DEP. A diferença é que nossos

animais não sofreram restrição alimentar, não apresentaram diferenças no peso corporal e na concentração colágeno.

Outro mecanismo que poderia explicar os achados do nosso estudo seria o da diminuição da síntese e/ou do aumento do catabolismo protéico. A síntese protéica é dependente dos aminoácidos limitantes e em situações que ocorre deficiência desses aminoácidos, seja pela dieta ou por utilização excessiva (estresse catabólico), a síntese de proteínas será prejudicada ⁴¹. Exemplos desta situação podem ocorrer com a deficiência de aminoácidos sulfurados como a metionina e a cisteína. No entanto, com a taurina, outro aminoácido sulfurado, isto não ocorre. A taurina não é incorporada a nenhuma proteína e é produto final da via metabólica da metionina ⁴¹.

Outra função da taurina poderia ser a de agir como regulador (sinalizador) de vias metabólicas intracelulares envolvidas na síntese protéica. Exemplo deste mecanismo seria a dos inibidores de enzima conversora da renina angiotensina (IECA). Esta medicação atua no processo da síntese e do catabolismo protéico, promovendo a diminuição da massa do ventrículo esquerdo ⁶⁷. Entretanto, diferentemente dos outros aminoácidos sulfurados a taurina não participa das vias de sinalização e controle do “turnover” protéico ⁴¹.

Assim, os mecanismos que levaram à atrofia cardíaca e disfunção ventricular nos animais deficientes em taurina não são os mesmos envolvidos na restrição alimentar, desnutrição energética-protéica e ou alteração no metabolismo protéico.

Alterações no mecanismo hemodinâmico de “carga” do miocárdio podem resultar em remodelação estrutural. Em situações em que o coração é submetido à sobrecarga de pressão ocorre hipertrofia concêntrica, enquanto a sobrecarga de volume ocorre hipertrofia excêntrica ¹². Nesta última situação pode ser encontrada dilatação de cavidade, alteração de geometria e disfunção ventricular e aumento da massa cardíaca ¹². Ao contrário, a atrofia

ocorre em situações em que haja redução da pós-carga ¹². Corações de ratos transplantados, sem “carga” hemodinâmica, apresentaram redução de 41% do volume e 26% da área seccional dos miócitos. No entanto, apesar da atrofia do miocárdio, a função contrátil desses animais estava preservada ⁷⁶. Também é conhecida a regressão da massa do ventrículo esquerdo quando a pressão arterial é reduzida ⁵⁰. Entretanto, no presente estudo não foram realizadas medidas de pressão arterial e foram observadas piora da função sistólica e diastólica. Em estudos em que animais foram submetidos ao mesmo modelo de deficiência de taurina não foram observados diferenças na pressão arterial quando comparados com animais não deficientes ^{42, 58}. Assim, é pouco provável que as alterações encontradas no presente estudo se devam à redução na pressão arterial.

E por último poderíamos sugerir o processo inflamatório como causador da disfunção cardíaca observada em nosso estudo. É interessante lembrar que dentre funções biológicas da taurina estão incluídas as ações antioxidantes e anti-inflamatórias. Compostos derivados da taurina como a taurina-cloramina (TauCl) e a taurolidina possuem capacidade de bloquear a produção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) ⁷⁸. A taurolidina bloqueia em 50 a 90% a produção de TNF- α em células mononucleares de sangue humano ⁶. Em camundongos, a quantidade de (TNF- α) sintetizado por macrófagos foi reduzida de forma dose dependente por TauCl ⁴⁹. Estudos experimentais têm mostrado que citocinas inflamatórias como TNF- α , interleucina-1b, entre outras, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da falência do coração por promover hipertrofia cardíaca, ativando metaloproteinases da matriz celular, provocando disfunção contrátil e induzindo apoptose ^{80, 82}. Ao contrário desses estudos, em nosso trabalho observamos atrofia cardíaca com diminuição da área dos miócitos, ausência de fibrose e metaloproteases equivalentes.

De acordo com o exposto acima, os achados estruturais e funcionais cardíacos em animais deficientes em taurina, por tratamento com β -alanina apresentam características próprias.

Além disso, observamos aumento do teor de água no ventrículo esquerdo nos ratos com deficiência de taurina. Este acúmulo de água no ventrículo esquerdo ($80,2 \pm 0,06\%$) é fenômeno indicativo de edema tecidual. Já no fígado, no ventrículo direito e nos átrios não foi observado o acúmulo de água. Assim, o edema ocorrido neste estudo, pode ser classificado como edema localizado. O edema miocárdico pode ser agudo ou crônico ²². O edema agudo está associado com alterações da complacência e disfunção ventricular e o edema crônico está associado com alterações de complacência, disfunção ventricular e com maior fibrose tecidual ²². No estudo de Desai et al. o edema agudo foi caracterizado por período de um mês de tratamento, enquanto o edema crônico por período maior de dois meses ²². É importante ressaltar que o desempenho ventricular diminui quando a quantidade de água ultrapassa 76 a 79 % do peso do miocárdio ⁵⁵. Assim, parte da disfunção diastólica e sistólica poderia ser devido ao edema. Além disso, o tempo de tratamento com β -alanina de 1 mês e a ausência de fibrose são indicativos de situação aguda.

A taurina é importante soluto orgânico das células. Mudanças no conteúdo intracelular de taurina podem causar estresse celular, resultando em mudanças no tamanho e na forma ⁶⁴. Ito et al. ³³ observaram a diminuição do volume do miócito em camundongos transgênicos (TauTKO) e explicaram que as estas alterações seriam por osmorregulação. As alterações por osmorregulação são geralmente transitórias, mas que no modelo TauTKO a diminuição ocorreu de modo persistente. Esta alteração também foi observada por Schaffer et al. ⁶⁴ em modelo de cultura de miócitos incubados com solução de β -alanina. Assim, a

diminuição da área dos miócitos e o aparecimento de edema devem ser relacionados às alterações da osmorregulação.

Outra explicação para maior teor de água encontrado no VE em nosso estudo seria a de que a deficiência de taurina poderia ter prejudicado mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios. Assim, o coração poderia ser mais susceptível ao estresse oxidativo⁴⁸ ou à ação de citocinas inflamatórias⁷⁸ sobre permeabilidade capilar levando a presença de edema. O estresse oxidativo é um dos principais moduladores do processo de remodelação cardíaca^{21, 73}. Entre outros mecanismos fisiopatológicos, uma das principais consequências do estresse oxidativo é a lipoperoxidação²¹. No estudo de Parildar et al.⁴⁸, animais deficientes em taurina, tratados com β -alanina, apresentaram aumento nos níveis de marcadores de estresse oxidativo no coração como malondealdeído e dienos conjugados. Logo, o estresse oxidativo pode ser indutor de danos celulares que alteram variáveis funcionais e estruturais cardíacas, participando da fisiopatologia da insuficiência cardíaca²¹. No entanto, espécies reativas de oxigênio induzem hipertrofia de miócitos e fibrose com maior atividade das metaloproteases⁷³, diferente do observado em nosso estudo.

Como exposto acima, os nossos achados mostraram que a deficiência de taurina provoca alterações estruturais e disfunção cardíaca. Estes dados são semelhantes aos encontrados na literatura, entretanto os mecanismos são desconhecidos, mas devem ser próprios da deficiência. O encontro do edema localizado no ventrículo esquerdo é o achado original do presente trabalho e se deve provavelmente às alterações osmorregulação.

VII. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir que a deficiência de taurina promoveu alterações estruturais e funcionais cardíacas com características próprias e edema localizado no ventrículo esquerdo, provavelmente por alteração da osmorregulação.

VIII. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS⁷⁴

1. Allard ML, Jeejeebhoy KN, Sole MJ. The management of conditioned nutritional requirements in heart failure. *Heart Fail Rev* 2006;11:75-82.
2. Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* 2009;587:731-44.
3. Azuma J, Hasegawa H, Sawamura A, Awata N, Ogura K, Harada H, et al. Therapy of congestive heart failure with orally administered taurine. *Clin Ther* 1983;5:398-408.
4. Azuma J, Sawamura A, Awata N, Ohta H, Hamaguchi T, Harada H, et al. Therapeutic effect of taurine in congestive heart failure: a double-blind crossover trial. *Clin Cardiol* 1985;8:276-82.
5. Azuma J, Sawamura A, Awata N. Usefulness of taurine in chronic congestive heart failure and its prospective application. *Jpn Circ J* 1992;56:95-9.
6. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA. Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 1991;3:568-75.
7. Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* 1998;3:128-36.
8. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* 2009;92:1-71.

9. Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem* 2002;277:22966-73.
10. Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:728-33.
11. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006;136:1636S-40S.
12. Campbell SE, Korecky B, Rakusan K. Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res* 1991;68:984-96.
13. Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, et al. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J Physiol* 2003;546:349-61.
14. Chesney RW, Lippincott S, Gusowski N, Padilla M, Zelikovic I. Studies on renal adaptation to altered dietary amino acid intake: tissue taurine responses in nursing and adult rats. *J Nutr* 1986;116:1965-76.
15. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J Nutr* 2000;130:2222-7.
16. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling- concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
17. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, et al. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:208-25.
18. Dawson R, Jr., Biasetti M, Messina S, Dominy J. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids* 2002;22:309-24.

19. de Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2242-6.
20. 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.
21. Denipote FG, Paiva SAR, Zornoff LAM. Influência da taurina na remodelação cardíaca. *Nutrire* 2009;34:211-23.
22. Desai KV, Laine GA, Stewart RH, Cox CS, Jr., Quick CM, Allen SJ, et al. Mechanics of the left ventricular myocardial interstitium: effects of acute and chronic myocardial edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2428-34.
23. Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998;22:689-95.
24. Fascetti AJ, Reed JR, Rogers QR, Backus RC. Taurine deficiency in dogs with dilated cardiomyopathy: 12 cases (1997-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:1137-41.
25. Fioretto JR, Querioz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1327-33.
26. Frederiks WM, Mook OR. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004;52:711-22.
27. Grimble RF, Jackson AA, Persaud C, Wride MJ, Delers F, Engler R. Cysteine and glycine supplementation modulate the metabolic response to tumor necrosis factor alpha in rats fed a low protein diet. *J Nutr* 1992;122:2066-73.

28. Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;187:61-73.
29. Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:330-46.
30. Hayes KC, Sturman JA. Taurine in metabolism. *Ann Rev Nutr* 1981;1:401-25.
31. Huxtable RJ, Chubb J, Azari J. Physiological and experimental regulation of taurine content in the heart. *Fed Proc* 1980;39:2685-90.
32. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72:101-63.
33. Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, Takai M, Muraoka S, Matsuda T, 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.
34. Jacobsen JG, Smith LH. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev* 1968;48:424-511.
35. Kramer JH, Chovan JP, Schaffer SW. Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *Am J Physiol* 1981;240:H238-46.
36. Lake N, de Roode M, Nattel S. Effects of taurine depletion on rat cardiac electrophysiology: in vivo and in vitro studies. *Life Sci* 1987;40:997-1005.
37. Lake N, Splawinski JB, Juneau C, Rouleau JL. Effects of taurine depletion on intrinsic contractility of rat ventricular papillary muscles. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:800-6.
38. Lake N. Loss of cardiac myofibrils: mechanism of contractile deficits induced by taurine deficiency. *Am J Physiol* 1993;264:H1323-6.
39. Liu QR, Lopez-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12145-9.

40. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1534-9.
41. Metayer S, Seiliez I, Collin A, Duchene S, Mercier Y, Geraert PA, et al. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem* 2008;19:207-15.
42. Mozaffari MS, Abebe W. Cardiovascular responses of the taurine-depleted rat to vasoactive agents. *Amino Acids* 2000;19:625-34.
43. Nutter DO, Murray TG, Heymsfield SB, Fuller EO. The effect of chronic protein-calorie undernutrition in the rat on myocardial function and cardiac function. *Circ Res* 1979;45:144-52.
44. O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Intestinal taurine transport: a review. *Eur J Clin Invest* 1997;27:873-80.
45. Okoshi MP, Okoshi K, Pai VD, Pai-Silva MD, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:754-60.
46. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH, editor. *The heart. Physiology, from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 209-231.
47. Parildar-Karpuzoglu H, Dogru-Abbasoglu S, Balkan J, Aykac-Toker G, Uysal M. Decreases in taurine levels induced by beta-alanine treatment did not affect the susceptibility of tissues to lipid peroxidation. *Amino Acids* 2007;32:115-9.
48. Parildar H, Dogru-Abbasoglu S, Mehmetcik G, Ozdemirler G, Kocak-Toker N, Uysal M. Lipid peroxidation potential and antioxidants in the heart tissue of beta-alanine- or taurine-treated old rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008;54:61-5.

49. Park E, Quinn MR, Wright CE, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. *J Leukoc Biol* 1993;54:119-24.
50. Pauletto PP, Vescovo G, Scannapieco G, Angelini A, Piccolo D, Pessina AC, et al. Progression and regression of cardiac hypertrophy in hypertensive rats: Biochemical and molecular changes in ventricular myosin. *J Hypertens* 1986;4:s135-7.
51. 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.
52. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
53. Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR, Morris JG. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science* 1987;237:764-8.
54. Pissaia O, Rossi MA, Oliveira JS. The heart in protein-calorie malnutrition in rats: morphological, electrophysiological and biochemical changes. *J Nutr* 1980;110:2035-44.
55. Pogatsa G, Koltai MZ, Grosz G. The role of the myocardial water content in heart function. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1982;59:305-9.
56. Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, Han H, Yang-Feng T, Blakely RD, et al. Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem J* 1994;300 (Pt 3):893-900.
57. Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* 1998;14:599-604.
58. Roysommuti S, Suwanich A, Jirakulsomchok D, Wyss JM. Perinatal taurine depletion increases susceptibility to adult sugar-induced hypertension in rats. *Adv Exp Med Biol* 2009;643:123-33.

59. Sagne C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, et al. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7206-11.
60. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58:1072-83.
61. Satoh H. Cardioprotective actions of taurine against intracellular and extracellular calcium-induced effects. *Adv Exp Med Biol* 1994;359:181-96.
62. Satoh H, Sperelakis N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. *Gen Pharmacol* 1998;30:451-63.
63. Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 2000;19:527-46.
64. Schaffer SW, Ballard-Croft C, Azuma J, Takahashi K, Kakhniashvili DG, Jenkins TE. Shape and size changes induced by taurine depletion in neonatal cardiomyocytes. *Amino Acids* 1998;15:135-42.
65. Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 2003;226:195-202.
66. Shin HK, Linkswiler HM. Tryptophan and methionine metabolism of adult females as affected by vitamin B-6 deficiency. *J Nutr* 1974;104:1348-55.
67. Siddiq T, Richardson PJ, Trotter SE, Preedy VR. Protein synthesis during regression of left ventricular hypertrophy with lisinopril in abdominal aortic constriction model of hypertension. *Biochem Mol Med* 1996;57:19-24.
68. Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 1992;42:563-9.

69. Sole MJ, Jeejeebhoy KN. Conditioned nutritional requirements: therapeutic relevance to heart failure. *Herz* 2002;27:174-8.
70. Spaeth DG, Schneider DL, Sarett HP. Taurine synthesis, concentration, and bile salt conjugation in rat, guinea pig, and rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;147:855-8.
71. Sturman JA. Taurine in development. *Physiol Rev* 1993;73:119-47.
72. Tenaglia A, Cody R. Evidence for a taurine-deficiency cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1988;62:136-9.
73. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;81:449-56.
74. Volpato ESN, Silva RC, Pizzani L. Manual de apresentação de trabalho científico: Tese, Dissertação, Monografia. In. Botucatu: Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação-UNESP-Campus de Botucatu; 2009. p. 34.
75. Warskulat U, Flogel U, Jacoby C, Hartwig HG, Thewissen M, Merx MW, et al. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J* 2004;18:577-9.
76. Welsh DC, Dipla K, McNulty PH, Mu A, Ojamaa KM, Klein I, et al. Preserved contractile function despite atrophic remodeling in unloaded rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1131-6.
77. Witte KK, Clark AL, Cleland JG. Chronic heart failure and micronutrients. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1765-74.
78. Wojcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2010;208:19-25.
79. Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol* 2008;13:57-65.

80. Yndestad A, Damas JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2007;9:236-41.
81. Zornoff LA, de Paiva SA, Tornero MT, Carvalho MS, Tucci PJ. 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.
82. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol* 2009;92:150-64.