KÁTIA MARIA SAMPAIO GOMES

**PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE 2 NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA POR INFARTO DO
MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

KÁTIA MARIA SAMPAIO GOMES

**PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE 2 NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA POR INFARTO DO
MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo
© reprodução total

Gomes, Kátia Maria Sampaio.

Participação da enzima aldeído desidrogenase 2 na insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio / Kátia Maria Sampaio Gomes. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Doença cardiovascular, estresse oxidativo e teste de novos fármacos.

Versão do título para o inglês: Role of aldehyde dehydrogenase 2 in myocardial infarction-induced heart failure.

1. Estresse oxidativo 2. Insuficiência cardíaca 3. ALDH2 4. 4HNE 5. Alda-1 I. Ferreira, Prof. Dr. Julio Cesar Batista II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kátia Maria Sampaio Gomes.

Título da Dissertação: Participação da enzima aldeído desidrogenase 2 na
insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio.

Orientador(a): Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP: 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **036** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Júlio Cesar Batista Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Participação da enzima aldeódo desidrogenase 2 na insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio*" do qual participam o(s) **Kátia Maria Sampaio Gomes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **21 .05.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 23 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

RECEBI ORIGINAL

12/106/12
Lima

Dedico esse projeto a DEUS que sempre guiou e iluminou os meus caminhos e aos meus pais Raimundo e Cilene que abriram mão de seus sonhos para viverem os meus.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira que me agraciou com a oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, por todas as horas dedicadas ao meu crescimento profissional, ajudando-me a pensar como pesquisadora. Certamente tudo que sou hoje profissionalmente dedico a ele que com muita paciência direciona-nos, sempre com muita ética, profissionalismos e altruísmo.

À minha mãe Cilene, ao meu pai Raimundo e aos meus irmãos Juscélio, Andréia, Rafaele e Rafael pelo apoio que sempre deram às minhas decisões e pela compreensão nas horas mais difíceis desse processo.

À algumas pessoas importantes que estiveram em meu caminho e ajudaram-me financeiramente, espiritualmente e moralmente. Obrigada Luciano, Telma, Nathalie, Katt, Cláudio, Cristiano, Silmara, Débora, Tábata, Lívia, Juliane, Fátima, Beatriz, Eneli, Patricia, Mendonça, Ana Paula, Ricardo, Ana Claudia, Pamella, João Artur, Alessandra, Magda e Rosiane.

À Juliane que foi a minha primeira mentora em técnicas laboratoriais, boa parte do que sei devo a ela. E a todos os meus amigos de laboratório e agregados que fizeram ou fazem parte da minha formação. Obrigada Vanessa Lima, Cintia, Luiz, Marcinho, Laís, André, Vanessa Zambelli, Glória, Marcele, Ney, Úsula, Alex, Vanessa Voltarelli, Paulo, Máx, Fabi, Chris, Aline, Tiago, Marcelo e Meiri.

À Profa. Dra. Patrícia Brum pelo empenho e dedicação no início da minha caminhada e ao Prof. Dr. Carlos Negrão que abriu as portas iniciais para o meu ingresso.

Ao Dr. Paulo Magno pelas análises ecocardiográficas, pelo tempo desprendido em orientações e ensinamentos, e pelo apoio constante em todas as minhas conquistas.

À Profa. Dra. Viviane Cárceres pelas análises hemodinâmicas e pela dedicação aos finais de semana.

À Profa. Dra. Alicia Kowaltowski e seus alunos Bruno Queliconi, Fernanda e Bruno Chausse, e sua técnica Camille por toda a ajuda nos ensaios de função mitocondrial.

À Rosana profissional de estatística e Patrícia secretária, ambas do departamento, pelo suporte prestado, sempre com muito profissionalismo e dedicação.

À FAPESP pelo apoio financeiro (processo 2012/02654-5).

“Face à realidade, o que julgamos saber
claramente ofusca o que deveríamos
saber” - Gaston Bachelard

RESUMO

Gomes KMS. Participação da Enzima aldeído desidrogenase 2 na insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A formação e o acúmulo de aldeídos decorrentes do estresse oxidativo são extremamente cardiotóxicos e contribuem para o aparecimento das doenças cardiovasculares. O 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), um aldeído originado a partir da oxidação de fosfolipídios, apresenta grande poder deletério ao coração. A enzima mitocondrial aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) é uma das principais responsáveis pela eliminação do 4HNE e manutenção do controle de qualidade mitocondrial. Recentemente, nossos colaboradores realizando experimentos *ex vivo*, observaram uma correlação inversa entre a atividade da ALDH2 e o grau de infarto do miocárdio após isquemia cardíaca. Esse estudo ainda demonstrou que a inibição farmacológica da ALDH2 resulta em acúmulo de 4HNE e maior dano ao miocárdio. De forma interessante, a utilização de uma pequena molécula ativadora da ALDH2 desenvolvida pelo grupo, chamada Alda-1, foi capaz de minimizar os efeitos nocivos da isquemia ao tecido cardíaco. Esses resultados apontam a ALDH2 como uma enzima-chave na manutenção da viabilidade cardíaca durante o processo de isquemia e abrem uma nova perspectiva no tratamento de doenças cardiovasculares. Tendo em vista que a insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares e que até ao momento não há nenhuma caracterização da participação da enzima ALDH2 nessa síndrome, tivemos como objetivos: 1) caracterizar a atividade da ALDH2 em diferentes tempos pós-infarto do miocárdio, 2) estudar o efeito da ativação sustentada da ALDH2, através da ativação seletiva por Alda-1, sobre a função e ultraestrutura cardíaca, função mitocondrial e balanço redox na IC. Nossos resultados apontam que na 1ª, 2ª, e 4ª semana pós-infarto do miocárdio a atividade da ALDH2 cardíaca apresenta-se reduzida. Nesse período também observamos aumento da peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial, caracterizada pelo aumento na liberação de peróxido de hidrogênio e redução do consumo de oxigênio em mitocôndria cardíaca isolada. Todos esses processos são acompanhados pela disfunção cardíaca. O tratamento com Alda-1 por um período de seis semanas em animais com IC induzida por infarto do miocárdio (entre a 4ª e 10ª semana pós-infarto do miocárdio) proporciona uma melhora na função sistólica cardíaca, aumento da complacência do ventrículo esquerdo e redução da disfunção diastólica em condições basais e após sobrecarga de estresse com fenilefrina. Além disso, os animais tratados com Alda-1 apresentam uma redução da fibrose cardíaca quando comparados ao grupo IC tratado com solução veículo. O tratamento também é capaz de reduzir os níveis de 4HNE e proteínas carboniladas no coração, além de melhorar a função mitocondrial. A ativação seletiva da ALDH2 reduz a formação de poros de permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c no grupo IC, além de prevenir a disfunção mitocondrial mediada pelo 4HNE *in vitro*. Por fim o tratamento com Alda-1 reduz níveis de hidroperóxidos lipídicos, previne redução da atividade da enzima superóxido dismutase e não apresenta toxicidade. Podemos concluir que a ativação seletiva da ALDH2 reduz os níveis de aldeídos citotóxicos, preserva a função mitocondrial e melhora a função cardíaca de ratos com insuficiência cardíaca, podendo ser considerada um importante alvo terapêutico no tratamento da IC.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Insuficiência cardíaca. ALDH2. 4HNE. Alda-1.

ABSTRACT

Gomes KMS. Role of aldehyde dehydrogenase 2 in myocardial infarction-induced heart failure. [Masters thesis (Morphofunctional Science)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

We previously demonstrated that acute pharmacological activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) protects the heart against acute ischemic/reperfusion events. Here we characterized the ALDH2 activity and aldehydic load in a time-window of 10 weeks after myocardial infarction as well as determined the benefits of chronic activation of ALDH2 on the progression of heart failure after the onset of symptoms using a post-myocardial infarction model in rats. We observed a significant reduction of cardiac ALDH2 activity until the 4th week after myocardial infarction surgery. This response was followed by aldehydic overload in failing hearts. We also showed that a six-week treatment of myocardial infarction-induced heart failure rats with Alda-1, a selective ALDH2 activator, enhanced contractile function, improved left ventricular compliance and increased diastolic function under basal conditions and after sudden pressure-overload stress. Moreover, sustained Alda-1 treatment showed no toxicity and promoted a cardiac anti-remodeling effect by suppressing myocardial fibrosis. In addition, accumulation of 4-hydroxynonenal (4-HNE)-protein adducts and protein carbonyls seen in heart failure was not observed in Alda-1-treated rats, suggesting that increasing the activity of ALDH2 contributes to the removal of excessive 4-HNE in failing hearts. Moreover, ALDH2 activation-mediated cardioprotection was associated with improved mitochondrial function, including elevated mitochondrial respiratory control ratios and reduced H₂O₂ release. Importantly, selective ALDH2 activation decreased mitochondrial Ca²⁺-induced permeability transition and cytochrome c release in failing hearts. Further supporting a mitochondrial mechanism for ALDH2, Alda-1 treatment preserved mitochondrial function *in vitro* upon 4-HNE addition. Therefore, selective activation of mitochondrial ALDH2 reduces aldehydic load, preserves mitochondrial function and improves heart failure outcome, suggesting that ALDH2 activators, such as Alda-1, have a potential therapeutic value for treating heart failure patients.

Keywords: Oxidative stress. Heart failure. ALDH2. 4HNE. Alda-1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema ilustrativo do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (CTE) -----	25
FIGURA 2	Estrutura química da Alda-1 -----	29
FIGURA 3	Esquema ilustrativo da hipótese do trabalho -----	32
FIGURA 4	Esquema ilustrativo do período experimental, cirurgia e tratamento na IC induzida por infarto do miocárdio -----	34
FIGURA 5	Modelo Experimental do Curso Temporal após Infarto do Miocárdio e Dados Ecocardiográficos -----	48
FIGURA 6	Curso Temporal da Atividade da ALDH2 cardíaca após Infarto do Miocárdio e Correlação com a Fração de Ejeção -----	51
FIGURA 7	Formação de Hidroperóxidos Lipídicos e Níveis de Glutathione cardíacos -----	52
FIGURA 8	Consumo de Oxigênio e Liberação de Peróxido de Hidrogênio em Mitocôndria Cardíaca Isolada -----	54
FIGURA 9	Desenho Experimental e Dados Ecocardiográficos no modo M dos períodos pré- e pós-tratamento dos grupos Sham, Insuficiência cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1) -----	58
FIGURA 10	Avaliação do ciclo cardíaco e Análises Morfométricas Cardíacas ---	64
FIGURA 11	Atividade e Expressão da ALDH2 e Expressão de Proteínas Danificadas no lisado cardíaco total -----	66
FIGURA 12	Consumo Máximo de Oxigênio e Liberação de Peróxido de Hidrogênio em Mitocôndria Cardíaca Isolada -----	68
FIGURA 13	Permeabilidade de Poros Mitocondriais, Liberação de Citocromo c e 4HNE <i>in vitro</i> -----	71

FIGURA 14	Peroxidação Lipídica, Atividade da Superóxido dismutase e Catalase -----	73
FIGURA 15	Análise da Toxicidade da Alda-1. -----	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Dados Ecocardiográficos no modo M referentes aos períodos 1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio (IM). -----	49
TABELA 2	Dados Ecocardiográficos referentes aos períodos pré- e pós-tratamento dos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). -----	59
TABELA 3	Parâmetros Fisiológicos. -----	61
TABELA 4	Parâmetros Hemodinâmicos -----	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

4HNA	4-hidroxi-2-nonenóico
4HNE	4-hidroxi-2-nonenal
A	Velocidade do fluxo mitral A
ACDA	Artéria coronária descendente anterior
ADH	Álcool desidrogenase
Alda-1	<i>Aldehyde dehydrogenase activator 1</i>
ALDH2	Aldeído desidrogenase 2
ALDH2*2	Aldeído desidrogenase mutante
ALDHs	Aldeído desidrogenases
ALT	Alanina aminotransferase
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ASP	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenil hydrazone</i>
CR	Glutathione redutase
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
Cys	Resíduos de cisteína
DC	Débito cardíaco
DdVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DMP	Distância máxima percorrida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
+dP/dt max	Elevação máxima da pressão do ventrículo esquerdo
-dP/dt max	Declínio máximo da pressão do ventrículo esquerdo
DsVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DTNB	5,5' DITIOBIS-2-NITROBENZÓICO
DTT	DL-Ditiotreitol
E	Velocidade do fluxo mitral E
λ_{em}	Absorbância emissão

λ_{ex}	Absorbância excitação
FC	Frequência Cardíaca
FE (%)	Porcentagem da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
Fenc	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FOX	Ferrous oxidation in xlenol orange
GAPDH	Gliceradeído - 3- fosfato desidrogenase
Glu	Glutamato
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GS-TNB	Glutathione oxidada TNB
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
I/R	Isquemia e reperfusão
IC	Insuficiência cardíaca
IC Alda	Insuficiência cardíaca tratado com Alda-1
ID	Isocitrato desidrogenase
IDM	Índice de desempenho do miocárdio
KCL	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L•	Radical lipídico
LOO•	Radical peroxila
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	B-Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O ₂ ^{•-}	Ânio superóxido
O ₂	Oxigênio
OH•	Radical Hidroxila
ON	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peróxido nitrito

PAS	Pressão Arterial Sistólica
PC	Peso Corporal
PDFVE	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PHE	Fenilefrina
PPVEd	Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
PPVEs	Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole
PSFVE	Pressão sistólica final do ventrículo esquerdo
PTMs	Poros de transição mitocondrial
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
RPVDF	Relação pressão volume na diástole final
RPVSF	Relação pressão volume na sístole final
-SH	Grupo tiol
Sham	Grupo controle
SIVd	Septo interventricular na diástole
SIVs	Septo interventricular na sístole
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SUS	Sistema único de saúde
TC	Trabalho cardíaco
TE	Tempo de ejeção
TNB	Cromóforo
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
TrxP	Tioredoxina peroxidase
TrxR	Tioredoxina redutase
VS	Volume sistólico
OMS	Organização mundial da saúde
Unidades	
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µL	Microlitro
Bpm	Batimento por minuto

g	Grama
L	Litro
m	Metro
Mg	Miligramma
Min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Insuficiência cardíaca	21
2.2 Mitocôndria e estresse celular	22
2.3 4HNE, disfunção mitocondrial e doenças cardiovasculares	26
2.4 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) e Alda-1	28
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 Amostra	36
5.2 Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto	36
5.3 Tratamento	37
5.4 Avaliação da função ventricular	37
5.5 Teste de tolerância ao esforço	38
5.6 Medidas de frequência cardíaca de pressão arterial	38
5.7 Avaliação da hemodinâmica cardíaca	39
5.8 Sacrifício e coletas de tecido	40
5.9 Avaliação morfométrica cardíaca	40
5.10 Atividade da enzima ALDH2	41
5.11 Caracterização da função mitocondrial cardíaca	41
5.12 Análise da expressão de proteínas mitocondriais e citosólicas	43
5.13 Peroxidação lipídica	44
5.14 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes	45
5.15 Análise de toxicidade hepática	46
5.16 Análise estatística	46
6 RESULTADOS (Estudo 1)	47
6.1 Modelo experimental e ecocardiograma modo M do curso temporal após infarto do miocárdio	47
6.2 Curso temporal da atividade da ALDH2 pós-infarto do miocárdio	50
6.3 Formação de hidroperóxidos lipídico e níveis de glutathione no coração	52
6.4 Consumo de oxigênio e liberação de peróxido de hidrogênio em	53

mitocôndria cardíaca isolada -----	
7 RESULTADOS (Estudo 2) -----	56
7.1 Modelo experimental e caracterização do fenótipo -----	56
<i>7.1.1 Análises ecocardiográficas -----</i>	<i>56</i>
<i>7.1.2 Parâmetros fisiológicos -----</i>	<i>60</i>
<i>7.1.3 Análises hemodinâmicas e morfométricas cardíaca -----</i>	<i>61</i>
7.2 Perfil de atividade e expressão da enzima ALDH2 cardíaca e acúmulo de proteínas danificadas -----	65
7.3 Caracterização da função mitocondrial -----	65
<i>7.3.1 Permeabilidade dos poros mitocondriais, liberação de citocromo c e 4HNE in vitro -----</i>	<i>69</i>
7.4 Peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase e da catalase ----	72
7.5 Toxicidade da Alda-1 -----	73
8 DISCUSSÃO -----	76
9 CONCLUSÃO -----	80
REFERÊNCIAS -----	81

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são consideradas um importante problema de saúde pública em todo mundo, estando associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 17 milhões de óbitos anualmente (WHO, 2014), nos Estados Unidos 1 a cada 3 americanos possui 1 ou mais tipos de doença cardiovascular. No Brasil as doenças cardiovasculares representam 29,4% da mortalidade no país, atingindo mais de 300 mil pessoas anualmente (Brasil, 2014)

A maioria das doenças cardiovasculares tem como via final comum a insuficiência cardíaca (IC), uma síndrome degenerativa multifatorial associada a alterações neuro-hormonais (ex, hiperativação dos sistemas nervoso simpático, SNS, e renina-angiotensina-aldosterona, SRAA) e consequente prejuízo da função cardíaca. Na IC, a capacidade de um ou de ambos os ventrículos apresenta-se comprometida, fazendo com que o coração diminua a sua eficácia no bombeamento adequado de sangue para atender as necessidades metabólicas do organismo (Liu, Eisen, 2014).

O estabelecimento e o agravamento da IC estão associados ao desbalanço metabólico cardíaco caracterizado muitas vezes pelo prejuízo do funcionamento da mitocôndria (Abel, Doenst, 2011; Schwarz et al., 2014; Tsutsui et al., 2011). A mitocôndria é uma organela importante para a sobrevivência celular, não apenas por gerar ATP (adenosina trifosfato), mas também por controlar o balanço redox, sintetizar aminoácidos não essenciais, bases precursoras do DNA (ácido desoxirribonucléico) e moléculas envolvidas na sinalização intracelular. Além disso, a mitocôndria regula diretamente processos apoptóticos, diferenciação, crescimento e proliferação celular (Handy, Loscalzo, 2012). Atualmente sabemos que o prejuízo na produção de energia, associado aos efeitos deletérios da exacerbada produção de radicais livres está diretamente relacionado à menor viabilidade cardíaca tanto em modelos animais de IC quanto em pacientes portadores de IC (Abel, Doenst, 2011; Tsutsui, Kinugawa et al., 2011; Ventura-Clapier et al., 2011).

Recentemente, os conhecimentos sobre a fisiopatologia das doenças cardiovasculares estabeleceram que a produção exacerbada de radicais livres resulta na formação e no acúmulo de aldeídos cardíacos (Chen et al., 2014). Dentre os diversos aldeídos acumulados no coração, o 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), originado a partir da oxidação de fosfolipídios presentes na membrana interna da mitocôndria, apresenta grande poder nocivo ao coração (Buday et al., 2010). Esse aldeído eletrofílico é capaz de atacar aminoácidos nucleofílicos e formar adutos

com proteínas (adutos de Michaelis), resultando na inativação da proteína-alvo e consequente desarranjo/disfunção celular (Raza, John, 2006).

A principal enzima responsável pela remoção desse aldeído tóxico é a aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), uma proteína localizada na matriz mitocondrial. Chen e colaboradores demonstraram que a atividade da ALDH2 cardíaca apresenta uma correlação inversa com a área de infarto após isquemia cardíaca em ratos (Chen et al., 2008). De fato, a ativação direta (farmacológica) ou indireta (etanol) da ALDH2 durante a isquemia cardíaca tem efeito protetor e resulta em menor dano ao miocárdio (Chen, Budas et al., 2008). Este efeito benéfico é decorrente, pelo menos em parte, da maior remoção do 4HNE pela ALDH2.

A utilização de uma pequena molécula ativadora da ALDH2 desenvolvida por nossos colaboradores da Universidade de *Stanford*, denominada Alda-1, foi capaz de minimizar os efeitos nocivos da isquemia ao tecido cardíaco (Chen, Budas et al., 2008). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a Alda-1 também tem efeito protetor em modelo *ex vivo* de isquemia cardíaca (Sun et al., 2011). Esses resultados apontam a ALDH2 como uma enzima-chave na manutenção da viabilidade cardíaca durante o processo isquêmico e abrem uma nova perspectiva no tratamento das doenças cardiovasculares. Baseados nos resultados supracitados, levantamos a hipótese que a ativação sustentada da ALDH2 é capaz de proteger contra a progressão da IC. Sendo assim, estabelecemos como objetivos do presente estudo: 1) caracterizar o perfil de ativação da ALDH2 e remoção de aldeídos cardíacos ao longo da progressão da disfunção cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio em ratos (1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio) e 2) estudar o efeito da ativação sustentada da enzima ALDH2, através do tratamento farmacológico com Alda-1, sobre a função e ultraestrutura cardíaca, função mitocondrial e balanço redox na IC de etiologia isquêmica em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência cardíaca

A IC atualmente atinge mais de 23 milhões de pessoas em todo o mundo, em taxas crescentes a cada ano (Liu, Eisen, 2014). Nos Estados Unidos surgem 550 mil novos casos/ano, e 1 a cada 5 pessoas corre o risco de desenvolver IC (Liu, Eisen, 2014). No Brasil a IC é a causa mais frequente de internação por doenças cardiovasculares e, em 2007 foi responsável pelo gasto de 3% dos recursos totais destinados à internação do sistema único de saúde (SUS) (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2012).

A etiologia mais recorrente da IC é a cardiomiopatia isquêmica (SBC, 2012), caracterizada pela redução do aporte sanguíneo nas coronárias cardíacas. O estabelecimento da IC ocorre da seguinte forma: após o infarto do miocárdio ocorre inicialmente uma redução do débito cardíaco, essa redução gera uma ativação dos barorreceptores do coração que são capazes de sinalizar a ativação do SNS na tentativa de preservar a homeostase circulatória, como consequência ocorre um aumento da frequência cardíaca, pressão arterial sistêmica, vasoconstrição e consequente aumento da contratilidade cardíaca, essas adaptações atenuam a queda do débito cardíaco (Montera, 2009). Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena sustentada de neuro-hormônios parece exercer papel deletério no desenvolvimento da IC, pelo aumento da sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída. Esses neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas presentes, ocasionando o estabelecimento da IC. Essa pode ser caracterizada (não em sua totalidade) por algumas alterações cardíacas funcionais (disfunção sistólica e diastólica ventricular esquerda, e redução do débito cardíaco), estruturais (dilatação ventricular, redução da complacência cardíaca) e elétricas (taquicardia e arritmias cardíacas) (Chatterjee, 2005). Considerada uma síndrome degenerativa, a IC também pode ser caracterizada, dependendo do estágio da doença, pela intolerância aos esforços físicos e pela formação de edema pulmonar.

Em detrimento da hiperativação sustentada de sistemas neuro-humorais, a progressão da IC também é caracterizada por uma série de anormalidades celulares cardíacas. Um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo demonstrou que ratos com IC de etiologia isquêmica, apresentam um aumento do estresse oxidativo, acompanhado por elevadas taxas da peroxidação lipídica e acúmulo de proteínas danificadas. Além disso, esses animais apresentam uma disfunção mitocondrial e uma redução na atividade do sistema proteolítico

ubiquitina-proteassoma (Campos et al., 2012). O sistema ubiquitina-proteassoma auxilia na remoção de proteínas danificadas, uma vez que o acúmulo dessas proteínas contribui para o agravamento da disfunção cardíaca e o estabelecimento da IC (Campos, Queliconi et al., 2012). Outra anormalidade presente na IC, causada pela hiperativação neuro-humoral, é o aumento dos níveis de angiotensina II (Ang II) no coração. Daí e colaboradores demonstraram que o aumento nos níveis de Ang II em cardiomiócitos de ratos com IC contribui para o aumento da fibrose cardíaca, hipertrofia e dano mitocondrial (Dai et al., 2011).

Apesar dos avanços no tratamento da IC, as taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes ainda é alta (Hummel et al., 2010). Portanto, a busca por novos alvos terapêuticos é importante na tentativa de melhorar a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes. A disfunção mitocondrial é apontada como uma importante alteração celular associada à progressão e agravamento da IC (Abel, Doenst, 2011; Schwarz, Siddiqi et al., 2014; Tsutsui, Kinugawa et al., 2011). Atualmente sabemos que o prejuízo na produção de energia, associado aos efeitos deletérios do desbalanço redox está diretamente relacionado à menor viabilidade cardíaca tanto em modelos animais de IC quanto em pacientes portadores de IC (Abel, Doenst, 2011; Tsutsui, Kinugawa et al., 2011; Ventura-Clapier, Garnier et al., 2011).

2.2 Mitocôndria e estresse celular

A mitocondrial é responsável por produzir a maior parte da energia do coração, > 95% do ATP gerado no coração é proveniente da mitocôndria (Doenst et al., 2013). O processo de produção aeróbia de ATP é denominado fosforilação oxidativa, que ocorre devido ao gradiente eletroquímico mantido entre a membrana interna e o espaço intermembranar da mitocôndria. O interior da mitocôndria é denominado matriz mitocondrial, onde ocorre boa parte de suas reações. A oxidação de substratos, aminoácidos e ácidos graxos pela β -oxidação fornece energia para a cadeia de transporte de elétrons (CTE) por meio das coenzimas NADH^+ e FADH_2 , essas coenzimas doam elétrons para proteínas que compõem a CTE, dando início a fosforilação oxidativa. Ao final da CTE esses elétrons são transferidos para o oxigênio que por sua vez é reduzido à água (H_2O). A passagem dos elétrons pela CTE gera o bombeamento de prótons para espaço intermembranar mitocondrial criando um gradiente eletroquímico, ou seja, a matriz mitocondrial torna-se mais negativa que o espaço intermembranar. Os prótons são atraídos para a matriz mitocondrial por essa diferença de carga. A passagem dos prótons pela ATP sintase (Complexo V) gera uma força mecânica

suficiente para a síntese de ATP (Hernandez-Resendiz et al., 2013; Kowaltowski et al., 2009) (Figura 1).

Alterações no fluxo de elétrons através da CTE podem resultar na formação de radicais livres. Radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o primeiro radical a ser gerado. Sua formação ocorre por uma adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (O_2). A formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre quando o $O_2^{\bullet-}$ recebe um elétron e dois íons de hidrogênio. Essa reação ocorre por meio da enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 não é considerado um radical, mas é um precursor direto de outros radicais. O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é formado quando H_2O_2 recebe um elétron e um próton, ou quando o H_2O_2 reage com íons de ferro ou cobre, esse radical também pode ser gerado através da reação do H_2O_2 com o $O_2^{\bullet-}$ catalisada por íons de metal. Outro importante radical formado é o peróxido nitrito ($ONOO^{\bullet-}$) que é originado a partir da reação do $O_2^{\bullet-}$ o óxido nítrico (ON) (Kowaltowski, de Souza-Pinto et al., 2009). Os $OH^{\bullet}$ e $ONOO^{\bullet-}$ são os principais precursores da peroxidação lipídica.

Uma mitocôndria saudável possui um sistema de defesa antioxidante capaz de combater a formação exacerbada desses radicais, mantendo níveis fisiológicos para o bom funcionamento celular (Hernandez-Resendiz, Buelna-Chontal et al., 2013). No entanto, o desbalanço redox, ou seja, quando a produção de radicais livres é maior que a remoção, resulta na disfunção mitocondrial e morte celular. A disfunção mitocondrial e o aumento na formação de radicais livres estão associados à patogênese e progressão de diversas doenças degenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Hipertensão e IC (Abel, Doenst, 2011; Gandhi, Abramov, 2012; Tsutsui, Kinugawa et al., 2011).

A mitocôndria é a principal fonte de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , oriundos principalmente dos complexos I e III da CTE. No coração, grande parte das espécies reativas de oxigênio é produzida na CTE (Poyton et al., 2009). Em condições de homeostase, as espécies reativas de oxigênio são tamponadas por enzimas como a SOD, catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase (TrxP) ou por “scavengers” como a vitamina E ou ubiquinol (Kowaltowski, de Souza-Pinto et al., 2009) (Figura 1). Contudo, em processos como envelhecimento, hipóxia ou hiperativação neuro-humoral, pode ocorrer uma alteração no controle redox, resultando em aumento excessivo nas concentrações das espécies reativas de oxigênio.

Em geral, o aumento exacerbado da produção de EROs pela mitocôndria, resulta em redução da viabilidade celular. Esse fenômeno está diretamente associado à oxidação de

DNA, lipídios, açúcares e proteínas, resultando em uma série de anormalidades na mitocôndria, com a drástica redução do potencial da membrana interna mitocondrial, diminuição na síntese de ATP, aumento nas concentrações de cálcio na matriz mitocondrial, prejuízo no controle de qualidade de proteína mitocondrial e ativação de vias pró-apoptóticas (Campos, Queliconi et al., 2012; Kowaltowski, de Souza-Pinto et al., 2009). A ativação das vias pró-apoptóticas ocorre pela liberação do citocromo c através dos poros de transição mitocondrial (PTMs), ocasionada pela perda do potencial de membrana mitocondrial, sobrecarga de cálcio e aumento de espécies reativas de oxigênio (Lumini-Oliveira et al., 2011). O aumento das espécies reativas de oxigênio leva a formação do radical $H^{\bullet}$, que por sua vez oxida o grupo tiol (-SH) do PTM, e resulta na liberação do citocromo c. No citosol, o citocromo c ativa o complexo apoptosoma e induz a morte celular programada (apoptose). A abertura de PTMs depende da redução na expressão das proteínas anti apoptóticas (Bcl-2/Bcl-x), aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bad, que inibe a expressão Bcl-2/ Bcl-x) (Kroemer et al., 2007).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (CTE): A oxidação de substratos, aminoácidos e ácidos graxos fornece elétrons para a CTE através das coenzimas NADH e FADH₂. Ao final da CTE esses elétrons são transferidos para o oxigênio (O₂) que por sua vez é reduzido à água (H₂O). A passagem dos elétrons pela CTE gera o bombeamento de prótons para espaço intermembranar mitocondrial, criando um gradiente eletroquímico, ou seja, a matriz mitocondrial torna-se mais negativa que o espaço intermembranar. Os prótons são atraídos para a matriz mitocondrial por essa diferença de carga. A passagem dos prótons pela ATP sintase (Complexo V) gera uma força mecânica suficiente para a síntese de ATP. O escape de elétrons forma radicais livres como ânion superóxido (O₂^{•-}) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), esses radicais livres podem ser tamponados por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) ou a tioredoxina peroxidase (TrxP). A NADP⁺ é reduzida pela isocitrato desidrogenase (ID) a NADH que é utilizada tanto pela glutatona redutase (GR) quanto pela tioredoxina redutase (TrxR). Figura adaptada de Kowaltowski et al., 2009 e Tahara et al., 2009 (Kowaltowski, de Souza-Pinto et al., 2009; Tahara et al., 2009).

Os radicais livres são moléculas muito reativas, porém pouco estáveis, e portanto, agem em locais próximos aos locais onde são produzidos e por um curto período de tempo. Entretanto, a oxidação de lipídios insaturados, presentes na membrana interna da mitocôndria, pelos radicais livres, pode formar moléculas extremamente estáveis, reativas e lipofílicas, que são capazes de atuar em regiões distantes de sua origem e reagir com diferentes proteínas e DNA. Dentre os oxidantes produzidos pelos radicais livres, encontram-se os peróxidos lipídicos, que podem ser metabolizados pela glutatona peroxidase. Contudo, na presença de um doador de elétron, este peróxido sofre uma reação não-enzimática e se divide para

produzir um aldeído tóxico, o 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE). Esta molécula, gerada endogenamente a partir da clivagem de hidroperóxidos lipídicos, é altamente reativa e pode ligar-se aos resíduos cisteína, lisina e histidina das proteínas. Resumidamente, o processo da peroxidação lipídica pode ser definido como uma deterioração auto-oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Em particular, o 4HNE é formado pela degradação de PUFAs ômega 3 e 6 presentes em altas quantidades nas membranas biológicas (Yang et al., 2003).

É interessante mencionar que, quando produzidos em níveis basais (ou seja, $< 1 \mu\text{M}$), os aldeídos como o 4HNE, atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares (Esterbauer et al., 1991). Entretanto, sob condições de estresse oxidativo, ocorre produção exacerbada destes aldeídos, saturando as vias de seu metabolismo, o que favorece modificações irreversíveis de moléculas biológicas e o início de processos patológicos. A importância clínica do 4HNE decorre de sua habilidade em se difundir a locais mais distantes de onde é produzido. Assim, ele pode formar adutos, ligações químicas de alta afinidade, com diversas proteínas. Estudos têm demonstrado que o 4HNE pode se ligar a albumina plasmática, enzimas do metabolismo, proteínas de membrana e citosólicas, proteínas da CTE, dentre outros (Houglum et al., 1990; Hummel, Pauli et al., 2010; Kaplan et al., 2007). O acúmulo desse aldeído tem sido relacionado à etiologia de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, hepáticas e câncer (Petersen, Doorn, 2004; Takagi et al., 2002; Tanaka, 2014).

2.3 4HNE, disfunção mitocondrial e doenças cardiovasculares

O 4HNE é o principal produto da peroxidação lipídica, possui um carbono reativo (eletrofílico) localizado na posição 3 (posição central) da molécula. Este carbono pode formar uma ligação (ligação de Michaelis, ou seja, a ligação do carbono reativo do 4HNE a proteínas) com resíduos de cisteína, histidina ou lisina da proteína alvo, modificando-a irreversivelmente (Petersen, Doorn, 2004). Estudos têm demonstrado que cerca de 1 a 8% do 4HNE formado na célula modifica proteínas, resultando em perda de função dessas proteínas. Outro tipo de modificação decorrente de ataque eletrofílico é a carbonilação de proteínas (ligação de grupos carbonila), um tipo de oxidação protéica que pode ser produzida pela reação direta de espécies reativas de oxigênio com resíduos de arginina, lisina e treonina. As carbonilas podem também ser geradas pela reação de Michaelis, entre resíduos de cisteína,

lisina ou histidina e intermediários da peroxidação lipídica, como o 4HNE (Backos et al., 2011; Yang, Sharma et al., 2003).

Devido à sua forte eletrofilicidade, o 4HNE tem elevada capacidade de modificar covalentemente componentes celulares como fosfolipídios, DNA, e proteínas (Yang, Sharma et al., 2003). De fato, a formação de adutos de Michaelis e carbonilação de proteínas pelo 4HNE são observados em diferentes modelos animais de doenças cardiovasculares (Awasthi et al., 2003; Raza, John, 2006). Resultados prévios do nosso grupo mostram que níveis elevados de proteínas carboniladas são encontrados no coração de roedores e humanos portadores de IC (Campos, Queliconi et al., 2012; Ferreira et al., 2012), assim, a carbonilação pode ser considerada um importante biomarcador na IC.

O 4HNE é capaz de inibir a atividade de importantes enzimas mitocondriais envolvidas no ciclo de Krebs e na CTE como: α -cetoglutarato, succinato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, citocromo c; e outras proteínas responsáveis pelo transporte de moléculas através das membranas mitocondriais (Hummel, Pauli et al., 2010). A inibição dessas proteínas parece ser mediada pelo ataque de resíduos de cisteína (Cys), críticos na manutenção da estrutura e função das proteínas. Outros possíveis alvos do 4HNE são os resíduos de histidinas, lisinas e os centros ferro-enxofre presentes nos complexos mitocondriais. O resíduo de Cys possui uma maior reatividade ao 4HNE comparado aos outros resíduos (histidina e lisina). O 4HNE reage com proteínas citosólicas, mitocondriais e com o proteossoma, resultando na menor produção de ATP pela mitocôndria, formação de poros mitocondriais, prejuízo do controle de qualidade de proteína e conseqüente acúmulo de proteínas danificadas, reduzindo a viabilidade mitocondrial e celular. Dessa forma, o 4HNE vem sendo considerado uma importante molécula envolvida no prejuízo cardíaco, associado à redução da contratilidade celular e indução de apoptose (Hummel, Pauli et al., 2010; Kaplan, Tatarkova et al., 2007).

A disfunção mitocondrial, bem como o desbalanço redox, são processos bem conhecidos nas doenças cardiovasculares. Porém, os mecanismos celulares envolvidos nesses processos ainda são controversos. Recentemente, nossos colaboradores da Universidade de *Stanford* constataram em modelo animal (*in vivo*) que o processo de isquemia resulta em acúmulo de 4HNE cardíaco em decorrência de dois processos: 1) oxidação de lipídios presentes na membrana mitocondrial; e 2) inativação da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), responsável pela remoção do 4HNE. Esse fenômeno acarreta na disfunção mitocondrial, ativação de vias celulares pró-apoptóticas e conseqüente redução da viabilidade cardíaca. De fato, agentes farmacológicos capazes de ativar diretamente ou indiretamente a enzima

ALDH2 durante a isquemia são capazes de melhorar a viabilidade celular (Budás et al., 2009; Budás, Disatnik et al., 2010; Chen, Budás et al., 2008). Dessa forma, o melhor entendimento do metabolismo e ação do 4HNE, bem como o desenvolvimento de novas terapias capazes de aumentar a remoção do 4HNE são de grande valia para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a IC.

2.4 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) e Alda-1

As aldeído desidrogenases (ALDHs) são um grupo de enzimas que catalisa a oxidação de aldeídos a seus ácidos correspondentes, não tóxicos, em uma reação irreversível dependente de NAD^+ . Já foram descritas dezenove isoformas das ALDHs, que estão expressas em diversos tecidos (Chen, Ferreira et al., 2014).

Nos últimos anos a isoforma ALDH2 vem sendo alvo de constante investigação por estar associada ao aparecimento de câncer, Parkinson, Alzheimer e doenças cardiovasculares, em especial na população asiática onde 40% dos indivíduos apresentam uma mutação nessa enzima (ALDH2*2). Essa mutação é a mais freqüente no mundo, atingindo ~540 milhões de pessoas, representando 8% da população mundial. A mutação ALDH2*2 é caracterizada pela síndrome de intolerância ao consumo do álcool, uma vez que os portadores da mutação ao consumirem baixas doses de álcool apresentam rubor facial, palpitações e náuseas. Esses sintomas ocorrem devido ao acúmulo de acetaldeído. A mutação ALDH2*2 é caracterizada pela substituição pontual do glutamato por uma lisina na região 487 da ALDH2, resultando na perda de densidade dos elétrons próximos aos resíduos 245-262 que formam a α -hélice G, e dos resíduos 466-478 que formam o “loop” do sítio ativo, gerando uma desestabilização do sítio de ligação do co-fator NAD^+ , o que confere perda de até 95% na sua atividade enzimática (Chen, Ferreira et al., 2014). Alguns estudos retratam a mutação na região 504 da enzima por levar em consideração o peptídeo sinal da porção N-terminal.

A ALDH2 é uma enzima homo-tetramérica de ~56 kDa, possui 517 polipeptídeos e está localizada na matriz mitocondrial. Sua codificação ocorre em um gene localizado no núcleo, cromossomo 12 região q24,1. Após a codificação, a enzima é transportada para matriz mitocondrial em um processo que depende do peptídeo sinal localizado na porção N-terminal (17 aminoácidos). Na matriz mitocondrial ocorre a clivagem do peptídeo sinal, permitindo a maturação completa da enzima. Cada subunidade da enzima é composta por três domínios: um domínio catalítico (formado por 3 resíduos de cisteína: Cys 301, 302 e 303), um domínio de ligação da co-enzima NAD^+ e um domínio de oligomerização (Chen, Ferreira et al., 2014).

A ALDH2 é responsável tanto pelo metabolismo do acetaldeído produzido a partir do etanol, pela enzima álcool desidrogenase (ADH), como pelo metabolismo de aldeídos alifáticos de cadeia curta e cadeia longa, sendo responsável pela conversão oxidativa do 4HNE a aldeídos menos tóxicos (4-hidroxi-2-nonenóico, 4HNA) (Hummel, Pauli et al., 2010). A localização mitocondrial da ALDH2 é de particular importância na remoção de 4HNE, uma vez que a membrana interna da mitocôndria é rica em ácidos graxos insaturados, sendo um importante alvo de ataque de radicais livres gerados na própria organela (Hulbert et al., 2007).

Chen e colaboradores demonstraram que a atividade da ALDH2 cardíaca apresenta uma correlação inversa com a área de infarto após isquemia cardíaca (Chen, Budas et al. 2008). De fato, a ativação direta ou indireta da ALDH2 durante a isquemia cardíaca tem efeito protetor e resulta em menores danos ao miocárdio (Chen, Budas et al., 2008). Este efeito benéfico é decorrente, pelo menos em parte, da maior remoção do 4HNE pela ALDH2. É importante ressaltar que esse aldeído regula negativamente a atividade da ALDH2, ou seja, quanto maior a quantidade de 4HNE, menor é a atividade da ALDH2 (Petersen, Doorn, 2004). O mecanismo sugerido para inativação da ALDH2 é a ligação covalente do 4HNE ao grupo tiol do sítio catalítico da enzima (Cys 302). Até o momento, esse fenômeno foi demonstrado apenas em modelo *in vitro* e na presença de altas concentrações de 4HNE (Doorn et al., 2006).

Na tentativa de melhor elucidar os mecanismos envolvidos na remoção de aldeídos tóxicos, bem como os seus efeitos deletérios, diversos estudos utilizam modelos geneticamente modificados para ALDH2, Fernandez e colaboradores analisaram animais nocautes para ALDH2 e constataram que esses animais apresentam acúmulo de aldeídos tóxicos e maior suscetibilidade à lesão cardíaca em modelo de isquemia e reperfusão (I/R) (Fernandez et al., 2006). Outro estudo utilizando animais que hiper-expressam a ALDH2 demonstrou que esses animais apresentam uma proteção contra lesões agudas e crônicas induzidas pelo estresse oxidativo ou pela toxicidade do etanol (Doser et al., 2009). Esses resultados conferem um papel cardioprotetor para enzima ALDH2.

Baseado nos efeitos cardioprotetores da ALDH2, Mochly-Rosen e colaboradores descobriram por meio de *high-throughput screen* uma molécula, N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2,6-dichlorobenzamide, capaz de aumentar a atividade da ALDH2, essa molécula foi chamada de Alda-1

Figura 2: Estrutura química da Alda-1

(*aldehyde dehydrogenase activator 1*). A Alda-1 aumenta a atividade da ALDH2 em até duas vezes, em comparação com sua atividade basal. Essa molécula possui elevada especificidade, não apresentando atividade sobre a enzima aldeído desidrogenase-1 (citossólica) ou sobre a enzima aldeído desidrogenase-5 (mitocondrial) (Chen, Budas et al., 2008). A ativação da ALDH2 pela Alda-1 é devido à ligação da molécula nas proximidades dos resíduos Cys 302/Glu 286 importantes para a catálise do substrato, isso causa uma drástica redução do K_m da ALDH2 para o co-fator NAD^+ e aumento do $V_{máx}$, da catálise do substrato, aumentando a hidrólise e liberação do produto catalítico. Na enzima mutante a Alda-1 restaura a estrutura da α -hélice e do “loop” da enzima mutante, aumentando em até 11 vezes sua atividade (Chen, Ferreira et al., 2014).

Recentemente nosso grupo demonstrou em modelo de I/R que a ativação seletiva da ALDH2, pela Alda-1, foi suficiente para induzir cardioproteção após processo isquêmico (Sun, Ferreira et al., 2011). A Alda-1 foi desenvolvida por nossos colaboradores (Chen, Budas et al., 2008) e a partir de 2008 diversos estudos utilizaram a Alda-1 em diferentes modelos experimentais na tentativa de reduzir os danos causados pela toxicidade de aldeídos. Solito e colaboradores demonstraram que 20 μM de Alda-1 foi capaz de prevenir disfunção de células endoteliais de humanos e restaurar a angiogênese (Solito et al., 2013). Outros estudos demonstraram que a Alda-1 é capaz de melhorar o fluxo autofágico (Ge et al., 2011) e de reduzir a disfunção contrátil, apoptose e dano mitocondrial cardíaco em modelo experimental de diabetes, (Zhang et al., 2012), sendo estes efeitos decorrentes, pelo menos em parte, da diminuição na formação dos adutos de 4HNE. De fato, Nakamura e colaboradores demonstraram que a redução de 40% das concentrações de 4HNE foi capaz de melhorar a função cardíaca em pacientes com cardiomiopatia dilatada (Nakamura et al., 2002).

Baseado nesses resultados, conclui-se que a ativação da ALDH2 e consequente redução do 4HNE se mostra de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias ou fármacos que auxiliem no tratamento do infarto agudo do miocárdio. Entretanto, não se sabe ao certo quais são os benefícios da ativação sustentada da ALDH2 no desenvolvimento e progressão da IC.

3 JUSTIFICATIVA

Além da hiperativação de fatores neuro-hormonais na IC, a progressão da síndrome é caracterizada por uma série de anormalidades celulares associadas ao remodelamento cardíaco e disfunção ventricular (Rolim et al., 2007). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pelo agravamento da disfunção cardíaca na progressão da IC é atualmente um importante foco de estudo. Mais especificamente, alterações na função mitocondrial e o acúmulo de produtos oriundos do estresse oxidativo, como o 4HNE, parecem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento da IC. Considerando a contribuição da enzima ALDH2 na remoção do 4HNE produzido durante o estresse oxidativo (Petersen, Doorn, 2004), levantamos a hipótese que durante a IC, ocorre acúmulo de 4HNE pelo aumento do estresse oxidativo, resultando na inativação de importantes proteínas envolvidas no metabolismo celular através da formação de adutos de Michaelis (Figura 3). Esse processo resulta em um ciclo vicioso, uma vez que cronicamente o acúmulo de adutos de Michaelis contribui para o desbalanço redox e consequente progressão da IC.

Figura 3 – Esquema ilustrativo da nossa hipótese: 1, O desequilíbrio redox observado na IC, decorrente da alteração no metabolismo mitocondrial, resulta em elevada oxidação de fosfolipídios presentes na membrana interna da mitocôndria e conseqüente formação do aldeído 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE); 2, Em condições fisiológicas o 4HNE é metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), presente na matriz mitocondrial; 3, O acúmulo de 4HNE, resultado do estresse oxidativo exacerbado e/ou inativação da ALDH2, resulta na formação do aduto de Michaelis entre 4HNE e resíduos nucleofílicos (cisteína, histidina e lisina) de diferentes proteínas, acarretando na inativação de proteínas-alvo; 4/5, O aumento da formação dos adutos de Michaelis resulta em disfunção mitocondrial, desequilíbrio redox, prejuízo contrátil e colapso/morte celular, e conseqüentemente, agravamento da IC; 6/7, A identificação dos alvos celulares do 4HNE bem como a utilização de terapias farmacológicas capazes de aumentar a atividade da ALDH2 serão de grande valia para o tratamento da IC.

Esse estudo torna-se interessante uma vez que a compreensão mais detalhada do papel da ALDH2 na IC poderá contribuir para o futuro emprego de terapias que atuem em mecanismos-chave envolvidos na fisiopatologia da IC, como o ativador da ALDH2, Alda-1. Além disso, tendo em vista que a mutação a ALDH2*2 se relaciona com o aparecimento de diversas doenças cardiovasculares, o nosso estudo poderá ter relevância clínica para esta população. Até o momento foram publicados apenas 16 estudos utilizando a Alda-1. As publicações deram início no ano de 2008, sendo 1 artigo de caracterização da molécula (Chen, Budas et al., 2008), 2 artigos de revisão (Ferreira, Mochly-Rosen, 2012; Hummel, Pauli et al., 2010), 1 sobre os mecanismos moleculares (Perez-Miller et al., 2010), 3 com modelo de

isquemia e reperfusão cardíaca (Fu et al., 2014; Gu et al., 2013; Masi et al., 2013; Sun, Ferreira et al., 2011), e 9 envolvendo estresse do retículo (Zhang et al., 2013), autofagia (Ge, Guo et al., 2011), radiação (Ning et al., 2012), diabetes (Zhang, Babcock et al., 2012), nitroglicerina (Beretta et al., 2010), disfunção endotelial (Solito, Corti et al., 2013), regeneração hepática (Ding et al., 2014), cardioplegia (Gong et al., 2012) e seletividade da ALDH2 (Kotraiah et al., 2013).

Atualmente, não foi publicado nenhum trabalho utilizando o tratamento sustentado com Alda-1 e sua contribuição na função/morfologia cardíaca em modelos crônicos de doenças cardiovasculares, o que fortalece a relevância e originalidade do presente projeto.

4 OBJETIVOS

Estudo 1: Caracterizar a atividade da ALDH2, o balanço redox e o metabolismo mitocondrial nos períodos de 1, 2, 4 e 10 semanas após o infarto do miocárdio em ratos. Para isso avaliamos ao longo do tempo as seguintes variáveis:

- ✓ Função cardíaca;
- ✓ Atividade da ALDH2;
- ✓ Peroxidação lipídica no lisado cardíaco;
- ✓ Quantidade total de glutathiona cardíaca;
- ✓ Consumo de oxigênio da mitocôndria cardíaca isolada;
- ✓ Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela mitocôndria cardíaca isolada.

Estudo 2: Melhor compreender o papel da ALDH2 na progressão da IC de etiologia isquemia com a utilização da Alda-1 em ratos. Para isso, os animais Sham e IC foram tratados com Alda-1 por seis semanas. O tratamento iniciou-se quatro semanas após a cirurgia (Figura 4).

Figura 4 - Esquema ilustrativo do período experimental, cirurgia e tratamento na IC induzida por infarto do miocárdio.

Ressaltamos que nesse momento os ratos infartados apresentam sinais de IC, como remodelamento cardíaco, dilatação ventricular e disfunção diastólica. As variáveis analisadas foram:

- ✓ Função cardíaca em repouso e mediante estresse;
- ✓ Tolerância à realização de esforços físicos;
- ✓ Comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca no repouso;

- ✓ Morfologia cardíaca (área de infarto, diâmetro dos cardiomiócitos e deposição de colágeno cardíaco);
- ✓ Atividade e expressão da ALDH2 no lisado cardíaco;
- ✓ Formação do aduto de Michaelis (4HNE-proteína) no lisado cardíaco;
- ✓ Expressão de proteínas carboniladas no lisado cardíaco;
- ✓ Consumo de oxigênio da mitocôndria cardíaca isolada;
- ✓ Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela mitocôndria cardíaca isolada;
- ✓ Permeabilidade dos poros mitocondriais;
- ✓ Liberação de citocromo c pela mitocôndria;
- ✓ Ação do 4HNE em mitocôndria cardíaca isolada *in vitro*;
- ✓ Peroxidação lipídica no lisado cardíaco;
- ✓ Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido desmutase e catalase no lisado cardíaco;
- ✓ Toxicidade da Alda-1.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra

O presente estudo teve a aprovação do comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (n° 036/127/02). Para a realização projeto, foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 gramas) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os ratos utilizados neste estudo foram mantidos em Biotério, com temperatura controlada entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro 12: 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, www.cobea.org.br).

5.2 Protocolo de cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio

A cirurgia cardíaca para a indução do infarto do miocárdio foi realizada em ratos com doze semanas de idade. Inicialmente os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal e foram entubados para ventilação mecânica (frequência respiratória de 60-70 ventilações/minuto e volume tidal de 2,5 mL). Uma toracotomia esquerda, sob condições assépticas, foi realizada no terceiro espaço intercostal e o pericárdio foi aberto. Foi realizada uma ligadura permanente na artéria coronária descendente anterior esquerda distalmente a 2 mm de sua origem com fio de polipropileno não absorvível (5,0, ETHICON, Brasil), finalizando com o fechamento do tórax, conforme protocolo descrito por Johns e Olson (Johns, Olson, 1954). No período pós-cirúrgico os animais foram tratados com injeções intraperitoneais de Ampicilina (7 mg/kg) e Dipirona (7 mg/kg). Para o estudo 1, os animais foram acompanhados ao longo de 10 semanas pós-infarto do miocárdio, sendo as análises realizadas nas semanas 1, 2, 4 e 10. Já no estudo 2, os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: grupo Sham, que passou por uma cirurgia fictícia; grupo insuficiência cardíaca (IC) tratado com uma solução veículo (50% DMSO/50% PEG 400); e grupo insuficiência cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). As análises foram realizadas 4 e 10 semanas após a cirurgia.

5.3 Tratamento

No estudo 2, os animais dos grupos IC foram tratados com Alda-1 (10 mg/kg/dia) ou solução veículo (50% DMSO/50% PEG 400) por meio da implantação de mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 2 ml2, 50 µl/hora) no dorso. O tratamento teve duração de 6 semanas, iniciando na 4ª semana após a cirurgia de infarto do miocárdio, fase em que a IC já está estabelecida. Para a implantação das mini-bombas osmóticas, os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Após a cirurgia, os animais receberam injeções intraperitoneais de Ampicilina (7 mg/kg) e Dipirona (7 mg/kg) por um período de cinco dias. As mini-bombas osmóticas foram trocadas a cada duas semanas de tratamento. A Alda-1 foi gentilmente cedida pela nossa colaboradora da Universidade de *Stanford*, Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen.

5.4 Avaliação da função ventricular

A avaliação da função ventricular no estudo 1 foi realizada por ecocardiografia modo M no Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (InCor) em colaboração com o Dr. Paulo M, M, Dourado. Já no estudo 2, realizamos tanto o modo M quanto o Doppler tecidual. Para a análise ecocardiográfica os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) na altura dos músculos papilares foi realizado o exame e obtidos os seguintes parâmetros: Diâmetro diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo, espessura do septo intraventricular na diástole e na sístole e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole e na sístole. Além disso, baseado nos dados oferecidos pelo equipamento calculamos a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnc), pela fórmula $FEnc (\%) = [(DdVE - DsVE) / DdVE] \times 100$, onde DsVE é o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, o DdVE é o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al., 1978).

O método Doppler tecidual foi realizado no sistema Vevo 770 ultra-som (Visual Sonics, Canadá), equipado com um transdutor mecânico de alta resolução (17 MHz-scanhead RMV716). Em resumo, o fluxo sanguíneo cardíaco foi avaliado no eixo longo paraesternal de

acordo com as recomendações da Sociedade America de Ecocardiografia (Pellikka et al., 2013). O fluxo mitral padrão foi avaliado a partir do corte apical das 4 câmaras com Doppler pulsátil. Da mesma forma, foi realizada a avaliação do Doppler tecidual.

5.5 Teste de tolerância ao esforço

O teste de esforço ou teste ergométrico é utilizado na clínica para determinar a classe funcional da IC de acordo com as determinações da *New York Heart Association* (NYHA) (Tang et al., 2010), uma vez que algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão.

A capacidade máxima de realização do exercício físico foi avaliada na 4ª e 10ª semana após a cirurgia de infarto do miocárdio por meio de um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante (estudo 2). Foi realizado um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de 6 m/min sem inclinação. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de 3 m/min até a exaustão do animal (Ferreira et al., 2007). As variáveis medidas foram o tempo total e a distância em metros percorrida por cada animal durante o teste máximo. Essas análises foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum, no laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da EEFÉ-USP. Não foi possível realizar essas análises no estudo 1 pela logística proposta no estudo.

5.6 Medidas de frequência cardíaca e pressão arterial

Com o intuito de acompanhar possíveis alterações hemodinâmicas no estudo 2, realizamos a medida indireta da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca através do método de pletismografia de cauda (RTBP 101 Kent Scientific Corporation, Litchfield, conn., EUA), conforme previamente padronizado (Rolim, Medeiros et al., 2007). Depois de um período de adaptação dos animais, foram coletados cinco registros consecutivos por meio de um esfigmomanômetro de cauda. Esses registros foram realizados em três diferentes dias da semana, sendo posteriormente calculada a média dos valores obtidos. As medidas foram coletadas na 4ª e 10ª semana pós-infarto do miocárdio.

5.7 Avaliação da hemodinâmica cardíaca

A avaliação da hemodinâmica cardíaca (método invasivo) foi realizada em repouso e frente ao aumento da pós-carga induzido por fenilefrina. Essa análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor-HCFMUSP. Para a realização desse experimento a veia femoral esquerda foi canulada para anestesia suplementar, injeção de drogas e salina. Um cateter de pressão-volume MicroTip (modelo 1,4 French SPR 839; Millar Instruments, Houston, TX) foi inserido na artéria carótida direita e posicionado imediatamente acima da válvula aórtica para monitorar a pressão sanguínea cardíaca. Após 5 minutos de medição da pressão sanguínea arterial, o cateter foi introduzido na cavidade do ventrículo esquerdo para medidas simultâneas e contínuas de pressão e volume. A veia jugular direita também foi canulada, e 10 μ l de solução salina 15% foram injetados para medir a condutância paralela. A calibração para volume foi realizada usando uma regressão linear da condutância do volume de sangue total (4 câmaras cilíndricas contendo um volume especificado de sangue de rato recém heparinizado) *versus* o sinal adquirido pelo cateter de condutância. Os dados foram adquiridos através do LabChart 7 Software System (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) (Pacher et al., 2008). Os seguintes parâmetros foram obtidos: frequência cardíaca (FC), pressão arterial diastólica e sistólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE e PSFVE, respectivamente), derivada positiva de pressão do ventrículo esquerdo sobre o tempo ($+dP/dt_{max}$) e derivada negativa de pressão do ventrículo esquerdo sobre o tempo ($-dP/dt_{max}$), volume sistólico (VS), débito cardíaco (DC) e trabalho cardíaco (TC). Os parâmetros hemodinâmicos foram determinados sob condições basais e durante uma sobrecarga de pressão com a injeção do vasoconstrictor fenilefrina (PHE) (25–75 mg/kg peso corporal) na veia femoral esquerda após vagotomia, que foi realizada para prevenir alterações nos valores de frequência cardíaca pelo baroreflexo. As doses de PHE foram ajustadas para cada animal para produzir elevações comparáveis de pressão sanguínea (60% a 80% maior que no basal). A inclinação da relação linear entre a pressão e o volume sistólico final foi obtida durante a oclusão transiente da veia cava inferior nos grupos de animais, para medir os resultados médios do desempenho cardíaco (Pacher, Nagayama et al., 2008).

5.8 Sacrifício e coletas de tecidos

Vinte e quatro horas após o último experimento, os animais foram anestesiados e decapitados, sendo os tecidos rapidamente coletados e armazenados a -80°C . Após o sacrifício foi realizada a excisão do coração para ulterior pesagem. Para as análises moleculares cardíacas utilizamos a região do coração não infartada (área remota). Para o isolamento da mitocôndria utilizamos todo o coração. Também foram coletados pulmão e fígado para calcular a razão peso úmido/seco, além do soro plasmático para posteriores análises.

5.9 Avaliação morfométrica cardíaca

Para as análises histológicas, parte do ventrículo esquerdo (porção medial) foi colocada em solução KCl e fixada em paraformaldeído a 4% por um período de 48 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados por lavagens com etanol 70%, 80%, 90% e 100% sequencialmente. Após as lavagens, o tecido passou por um processo de fixação em parafina por 48 horas, e posteriormente submetido ao processamento histológico com cortes de 5 μm ao longo de seu maior eixo (Savernini et al., 2013). A análise morfométrica cardíaca foi realizada através da determinação do tamanho da área infartada (corado com *tricomato de Masson*), medida do diâmetro dos cardiomiócitos (corado com hematoxilina e eosina) e avaliação do grau de fibrose do miocárdio (corado com *Picrosírius Red*).

Todas as análises foram realizadas em corte medial do ventrículo esquerdo. A medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 400x. Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados na área remota, ou seja, fora da área infartada, na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O diâmetro dos cardiomiócitos foi calculado a partir de uma média de 10 valores por animal (Ferreira et al., 2008). Para a análise do grau de fibrose foi realizada uma varredura completa da parede ventricular por sistema computadorizado (Imaging Software NIS- Elements AR 3,1). As imagens foram capturadas em objetiva 20x e a densidade de fibras do colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde) foi quantificada com uma ferramenta do programa que reconhece a variação de cor da imagem usando canais de cor vermelha, verde e azul, permitindo identificar uma cor por vez, dando a intensidade média da cor na área determinada, sendo que cada campo equivale a $75384,53 \mu\text{m}^2$. As fibras colágenas foram analisadas sob luz

polarizada (Whittaker et al., 1994). Esta análise teve como objetivo identificar possíveis alterações histopatológicas decorrentes da IC de etiologia isquêmica, bem como os possíveis benefícios do tratamento com o ativador da ALDH2, Alda-1. As análises histológicas foram realizadas somente no estudo 2.

5.10 Atividade da enzima ALDH2

A atividade da enzima ALDH2 foi avaliada em mitocôndria cardíaca isolada e medida por espectrofotometria. Na reação foram adicionados 100 mM de pirofosfato de sódio (pH 9,5), 10 mM de β -Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), 10mM de acetaldeído e 0,1% de DL-Ditiotreitol (DTT) em volume final de 1 ml. A cinética enzimática da ALDH2 foi avaliada através da formação de NADH. Esta pode ser medida pelas mudanças na absorbância ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$) por um período de 10 minutos (Chen, Budas et al., 2008). O ensaio consiste na clivagem do acetaldeído em ácido acético com doação do próton H^+ para coenzima NAD^+ (forma oxidada), formando NADH (forma reduzida).

5.11 Caracterização da função mitocondrial cardíaca

Isolamento da mitocôndria

Logo após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados e a mitocôndria foi isolada conforme descrito previamente por Tahara *et al*, 2009 (Tahara, Navarete et al., 2009). O tecido foi colocado no tampão de lise (Sacarose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2, 4° C) e triturado na presença de 0,1 mg/ml de protease do tipo I (*bovine pancreas*) para liberação das mitocôndrias das fibras musculares cardíacas. Após esse procedimento, a suspensão foi lavada no mesmo tampão, na presença de 0,1 mg/ml de BSA e homogeneizada em um moedor de tecido de 40 ml. O homogenato foi centrifugado a 1000g por 5 min (4°C). O sobrenadante resultante foi centrifugado a 9500g por 10 min (4°C). O pelete resultante foi lavado, ressuspendido no tampão de lise e submetido a uma nova centrifugação (9500g por 10

min, 4°C). O pelete mitocondrial resultante foi lavado e o pelete final foi ressuspenso no tampão de lise.

Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada

A medida do consumo de oxigênio mitocondrial foi realizada utilizando-se um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador (*Oxygraph System, Hansatech*), previamente descrito por da Silva et al, 2003 (da Silva et al., 2003). O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes, 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7,2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Os registros de consumo de oxigênio foram feitos na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM) e ADP (1 mM). Um inibidor do complexo V (Oligomicina 1 µg/ml) foi adicionado para inibir sua atividade durante esse ensaio. Além disso, utilizamos um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (CCCP – *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone*, 1 µM) para estimular o consumo máximo de oxigênio. Os valores estão expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína.

Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria cardíaca isolada

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mitocondrial foi avaliada por espectrofluorimetria. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl

(Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes, 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7,2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. A produção de H₂O₂ foi determinada pela geração de resorufina, fruto da oxidação do *Amplex Red* (25 µM) na presença de *horseradish peroxidase* (0,5 U/ml), identificada pelos comprimentos de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. O ensaio foi realizado na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM), ADP (1 mM) e Oligomicina (1 µg/ml) (Tahara, Navarete et al., 2009). Também foi realizada a quantificação da produção de H₂O₂ na presença de inibidores do complexo I (rotenona, 2 µM), complexo III (antimicina A, 0,15 µg/ml) e CCCP (1 µM). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com quantidades conhecidas de H₂O₂, expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína. Esse procedimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski, no Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Permeabilidade dos poros da mitocôndria cardíaca isolada

A abertura dos poros mitocondriais foi determinada pela máxima captação de cálcio medida por espectrofluorimetria. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes, 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7,2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Após a adição de *Calcium Green* (0,1 µM), succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM) e subsequentes adições de 50 µM de CaCl₂, a abertura dos poros foi determinada por mudanças na fluorescência (λ_{ex} = 506 nm e λ_{em} = 532 nm), e os valores foram expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína. Para confirmar se o inchamento é derivado da abertura dos poros de transição mitocondrial (PTM), realizamos o mesmo ensaio na presença de ciclosporina A (15 nM) um inibidor dos PTMs (Hermes-Lima et al., 1995).

5.12 Análise da expressão de proteínas mitocondriais e citosólicas

A análise da expressão protéica no tecido cardíaco foi realizada por meio da técnica de *Western blot*. Na fração mitocondrial foram quantificadas as proteínas: ALDH2 e citocromo c; já na fração citosólica foram quantificados os adutos de Michaelis, proteínas carboniladas e citocromo c. Para isso, as amostras contendo tampão Laemmli (Tris-HCl 240 mM, SDS 0,8%, Glicerol 40%, Azul de bromofenol 0,02%, β -mecaptoetanol 200 mM) (Laemmli, 1970),

foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em seguida as proteínas foram transferidas eletricamente para uma membrana de PVDF utilizando o aparelho Mini-Trans Blot da Bio-Rad. A transferência teve duração de ~1h sob 100 volts. As membranas foram coradas com Ponceau S (0,1%), para a verificação da qualidade das amostras bem como da eficácia da transferência. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação de 10 ml de solução bloqueadora (5% BSA em TBS - Tris-Base 50 mM, NaCl 0.9%) por 2 horas em temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários para as respectivas proteínas, diluídos em solução bloqueadora a 4°C overnight. Na sequência as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T (Tris-Base 50 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0,1%), incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, EUA). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa Image J (Scion Corporation based on NIH image), fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via Internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador (Rolim, Medeiros et al., 2007).

5.13 Peroxidação lipídica

Para a análise da peroxidação lipídica utilizamos o método FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol Orange*), que é baseado na oxidação do ferro II a ferro III pelos hidroperóxidos lipídicos. O ferro III reage com o xilenol orange produzindo um cromóforo azul púrpura que tem absorção máxima em 560 nm (Hermes-Lima, Willmore et al., 1995). Parte do tecido cardíaco foi homogenizado em tampão fosfato (50 mM, pH 7,8), centrifugadas a 12,000 rpm por 15 minutos (4 °C) , após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e adicionado metanol absoluto em uma proporção de 1:10 (metanol:amostra). As amostras ficaram no gelo por um período de 10 minutos e uma nova centrifugação foi realizada por um período de 10 minutos a 1000 g (4 °C), o sobrenadante foi retirado para a realização do experimento. Na reação foi adicionado sulfato de ferro amoniacal (1 mM), ácido sulfúrico (250 mM) e xilenol orange (1 mM). A análise foi realizada em espectrofotômetro e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.14 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por um método que consiste na queda da frequência de redução de citocromo c por radicais superóxidos gerados pelo sistema xantina-xantina oxidase, proporcionada pela SOD presente na amostra testada, que compete com o citocromo c pelos radicais gerados, conforme ilustrado abaixo:

Parte do tecido cardíaco foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mM PBS pH7,4, EDTA 1mM) e centrifugado em 12000g durante 15 minutos (4°C). Inicialmente, a taxa de redução de citocromo c foi avaliada na ausência de amostra, pela leitura da taxa de alteração de absorbância em 550 nm durante 5 minutos, em solução contendo citocromo c (19 mM), xantina (1,18 mM) e xantina oxidase diluídos em tampão fosfato (0,05 M, pH 7,8). A concentração de xantina oxidase foi ajustada para uma taxa de redução de citocromo c de 0,025 unidades de absorbância por minuto (UA/min). Na sequência a taxa de redução de citocromo c foi acompanhada durante 5 minutos na presença da amostra diluída na solução supracitada. A atividade da SOD da amostra foi então calculada pela diferença entre a taxa de oxidação de citocromo c na ausência e na presença de amostra (McCord, Fridovich, 1969).

Atividade da catalase

A atividade da catalase foi avaliada pelo acompanhamento da decomposição de peróxido de hidrogênio adicionado às amostras e por meio de leitura de absorbância em 240nm em espectrofotômetro. Os tecidos cardíacos foram homogeneizados em tampão fosfato (50 mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugados a 12000 g durante 15 minutos (4°C). A fração

sobrenadante foi utilizada no ensaio. Peróxido de hidrogênio foi adicionado ao lisado na concentração final de 10 mM e a absorbância em 240nm foi acompanhada durante 4 minutos (Avramovic et al., 2012). A taxa de decaimento da absorbância corresponde à atividade de catalase presente na amostra testada. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Níveis de glutathiona

Os níveis de glutathiona do tecido cardíaco foram determinados espectrofotometria, tal como descrito anteriormente (Correa-Costa et al., 2011). O ensaio é baseado na reação da glutathiona reduzida (GSH) com o ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) que produz aduto de glutathiona oxidada TNB (GS-TNB) e o cromóforo TNB, que tem máxima absorbância a 412 nm. O produto GS-TNB é, então, reduzido pela glutathiona redutase na presença de NADH. A taxa de formação de TNB é proporcional à concentração de glutathiona da amostra.

5.15 Avaliação da toxicidade hepática

Para avaliar a possível toxicidade causada pelo tratamento sustentado com Alda-1, utilizamos como marcadores as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (ASP) analisados no soro dos animais. Para as análises foram utilizados kits comerciais da marca Randox, produtos AL3801 e AS3804, respectivamente. A análise foi realizada no aparelho analisador bioquímico automatizado, marca Randox, modelo Daytona. Essas análises foram realizadas pela Dra. Clara Satsuki Mori da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP/SP.

5.16 Análise estatística

Inicialmente a distribuição dos dados obtidos nesse estudo foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão e comparados pela análise de variância (ANOVA) de um ou dois caminhos (cirurgia e tratamento como fatores independentes) seguida de *post hoc* de Duncan. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS (Estudo 1)

6.1 Modelo experimental e ecocardiograma modo M do curso temporal após infarto do miocárdio

O desenho experimental utilizado para caracterizar a atividade enzimática da ALDH2 na progressão da disfunção cardíaca após infarto do miocárdio está ilustrado na Figura 5A. Ratos com doze semanas de idade foram submetidos à cirurgia cardíaca, que consiste na ligadura crônica da artéria coronária descendente anterior (ACDA). No dia seguinte, os animais realizaram um exame de ecocardiograma modo M para avaliação da função cardíaca e análise da efetividade da cirurgia. Os animais foram selecionados para o estudo com base na função cardíaca (fração de encurtamento ventricular esquerda <30%) e divididos em 4 diferentes grupos: 1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio. Com o intuito de acompanhar a evolução da disfunção cardíaca após infarto do miocárdio, o exame ecocardiográfico modo M foi realizado no final de cada período experimental. Em seguida, os animais foram sacrificados e avaliamos os seguintes parâmetros: atividade da ALDH2, peroxidação lipídica, níveis de glutathione e consumo de O_2 e liberação H_2O_2 mitocondrial. Essas análises foram realizadas no tecido cardíaco total, incluindo áreas viáveis e não viáveis.

Conforme observado na Figura 5, os animais que realizaram a cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram significativa redução das frações de encurtamento e ejeção cardíaca ao longo do tempo quando comparados ao grupo controle (Sham) (Figuras 5B-C). Além disso, os animais com infarto do miocárdio apresentaram aumento crescente dos diâmetros diastólico e sistólico finais ao longo do tempo (Figuras 5D-E). Também observamos um aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole na 4ª e 10ª semanas pós-infarto do miocárdio (Figura 5F), o que sugere uma hipertrofia cardíaca nesse período. O septo interventricular na diástole não apresentou diferença entre os grupos (Figura 5G). Outras alterações podem ser melhor observadas na Tabela 1.

Figura 5 - Modelo Experimental do Curso Temporal após Infarto do Miocárdio e Dados Ecocardiográficos. A) Protocolo experimental, B) Fração de encurtamento, C) Fração de ejeção, D) Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DdVE), E) Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DsVE), F) Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd), G) Septo interventricular na diástole (SIVd). Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguido de *post hoc* de Duncan *, $p < 0,05$ vs Sham.

Tabela 1: Parâmetros Ecocardiográficos:

Parâmetros	Sham	1 sem pós-IM	2 sem pós-IM	4 sem pós-IM	10 sem pós-IM
FC, bpm	295±12 (n=9)	319±6 (n=8)	306±12 (n=13)	271±6 (n=11)	267±14 (n=7)
FEnc, %	45±3 (n=9)	26±2* (n=8)	20±1* (n=13)	20±1* (n=11)	18±3* (n=7)
FEje, %	81±3 (n=9)	55±4* (n=8)	46±2* (n=13)	46±3* (n=11)	50±3* (n=7)
DdVE, cm	0,601±0,03 (n=9)	0,833±0,02* (n=8)	0,902±0,02* (n=13)	0,931±0,05* (n=11)	0,967±0,06* (n=6)
DsVE, cm	0,333±0,02 (n=9)	0,620±0,03* (n=8)	0,722±0,03* (n=13)	0,799±0,049* (n=11)	0,783±0,06* (n=6)
SIVd, cm	0,103±0,008 (n=9)	0,081±0,006 (n=8)	0,072±0,003 (n=13)	0,087±0,004 (n=13)	0,091±0,007 (n=6)
SIVs, cm	0,173±0,010 (n=9)	0,095±0,006* (n=8)	0,091±0,008* (n=13)	0,079±0,006* (n=11)	0,117±0,007* (n=10)
PPVEd, cm	0,117±0,003 (n=9)	0,113±0,006 (n=8)	0,118±0,004 (n=13)	0,141±0,008* (n=12)	0,159±0,009* (n=5)
PPVEs, cm	0,211±0,009 (n=9)	0,181±0,010 (n=8)	0,190±0,010 (n=13)	0,206±0,014 (n=11)	0,235±0,017 (n=11)

Tabela 1 - Dados Ecocardiográficos no modo M referentes aos períodos 1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio (IM). Frequência cardíaca (FC), Fração de encurtamento (FEnc), Fração de ejeção (Feje), Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE), Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE), Septo intraventricular na diástole (SIVd), Septo intraventricular na sístole (SIVs), Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd), Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVEs). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados pela ANOVA dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. *, p<0.05 vs. Sham.

Após observarmos essas alterações na função cardíaca dos animais com infarto do miocárdio ao longo do tempo, tivemos como objetivo caracterizar a atividade da enzima ALDH2 nesse período.

6.2 Curso temporal da atividade da ALDH2 pós-infarto do miocárdio

Como pode-se observar na figura 6A, a atividade da enzima ALDH2 estava reduzida no período entre 1^a e 4^a semana após infarto do miocárdio quando comparada ao grupo Sham. Na 10^a semana após a cirurgia de infarto do miocárdio a atividade da ALDH2 foi restabelecida para valores semelhantes aos encontrados no grupo Sham (controle). Essa resposta pode ser melhor visualizada na figura 6B, que representa o delta da atividade da ALDH2 (em relação ao grupo Sham). Além disso, observamos uma correlação positiva entre a fração de ejeção cardíaca e a atividade da ALDH2 quando agrupamos todos os animais estudados no curso temporal, ou quando avaliamos isoladamente nas semanas 1, 2 e 4 após infarto do miocárdio (Figuras C-F). Já na 10^a semana pós-infarto do miocárdio essa associação foi perdida.

Figura 6 – Curso Temporal da Atividade da ALDH2 cardíaca após Infarto do Miocárdio e Correlação com a Fração de Ejeção. A) Atividade da enzima ALDH2, B) Delta da atividade da enzima ALDH2, C) Correlação entre a atividade da ALDH2 e a fração de ejeção cardíaca de todos os grupos com infarto do miocárdio e sham. Correlação entre a atividade da ALDH2 e a fração de ejeção na 1^a (D), 2^a (E), 4^a (F) e 10^a (G) semana após infarto do miocárdio. O grupo sham foi incluído em todas as análises associativas. Os dados obtidos nas Figuras A e B foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan *, $p < 0,05$ vs Sham. Para os demais dados calculamos o coeficiente de Pearson e o coeficiente de determinação (r^2).

A inativação da enzima ALDH2 pode ocorrer pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e consequente formação de hidroperóxidos lipídico como o 4HNE. Esses hidroperóxidos lipídicos podem ligar-se covalentemente ao sítio catalítico da enzima causando sua inativação. No entanto, até o momento essa inativação por acúmulo de peróxido lipídico só foi demonstrada *in vitro*. Tendo em vista que 1, 2 e 4 semanas pós-infarto do miocárdio ocorreu uma inativação da ALDH2, o nosso próximo passo foi analisar a peroxidação lipídica no lisado cardíaco desses animais. Analisamos também os níveis

cardíacos de glutathione, uma enzima antioxidante que auxilia na remoção desses aldeídos.

6.3 Formação de hidroperóxidos lipídico e níveis de glutathione no coração

Os animais com infarto do miocárdio apresentaram um aumento na hidroperoxidação lipídica cardíaca em relação ao grupo controle (Sham) (Figura 7A). Esse aumento ocorreu em todos os momentos analisados e foi acompanhado pela elevação dos níveis totais de glutathione (Figura 7B). Apenas na 10ª semana pós-infarto do miocárdio houve uma redução nos níveis cardíacos de hidroperóxidos lipídicos (porém ainda diferente do grupo controle) e glutathione total. Acreditamos que o aumento nos níveis de glutathione ocorre na tentativa de combater o estresse causado pelo acúmulo de hidroperóxidos lipídicos nos corações infartados.

Figura 7 – Formação de Hidroperóxidos Lipídicos e Níveis de Glutathione. A) Hidroperóxidos lipídico e B) Níveis de glutathione no lisado cardíaco de animais Sham, 1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguido de *post hoc* de Duncan *, $p < 0,05$ vs Sham.

Sabendo que a alta taxa de peroxidação lipídica associada à redução da atividade enzimática da ALDH2 pode gerar danos na bioenergética mitocondrial, nosso próximo passo foi caracterizar a função mitocondrial através das análises do consumo máximo de oxigênio e liberação de peróxido de hidrogênio em mitocôndria isolada do coração desses animais.

6.4 Consumo de oxigênio e liberação de peróxido de hidrogênio em mitocôndria cardíaca isolada

Observamos que os animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram uma redução do consumo de oxigênio basal (Estado 2 – Figura 8A) e máximo (Estado 3 – Figura 8B). Na figura 8C podemos observar que apenas os grupos de 1 e 4 semanas apresentaram um consumo de oxigênio reduzido após o bloqueio da ATP sintase, representado pelo estado 4. A figura 8D representa o consumo de oxigênio no estado desacoplado, ou seja, com adição de CCCP. Nesse caso os animais com infarto do miocárdio também apresentaram um consumo de oxigênio reduzido quando comparados ao grupo controle. Todas as alterações metabólicas mitocondriais supracitadas podem ser melhor visualizadas na Figura 8E, onde os animais com infarto do miocárdio apresentam significativa redução no controle respiratório mitocondrial. Paralelo ao reduzido consumo de oxigênio foi observado um aumento na liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria, especialmente no estado 3 (Figura 8G). Esses dados apontam para uma disfunção mitocondrial cardíaca nos animais com infarto do miocárdio, independente do estágio de evolução da doença.

Figura 8 – Consumo de Oxigênio e Liberação de Peróxido de Hidrogênio em Mitocôndria Cardíaca Isolada. A) Consumo de oxigênio no estado 2 (presença de substratos), B) consumo de oxigênio no estado 3 (presença de ADP), C) Consumo de oxigênio no estado 4 (presença de Oligomicina), D) Consumo de oxigênio com CCCP, E) Controle respiratório (Estado 3/4), F) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 2, G) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 3, H) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 4, I) Liberação de peróxido de hidrogênio com CCCP, ou estado desacoplado. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguido de *post hoc* de Duncan *. $p < 0,05$ vs Sham.

Sintetizando os resultados, observamos que animais com 1, 2, 4 e 10 semanas pós-infarto do miocárdio apresentam disfunção cardíaca, representada pela redução na fração de encurtamento e fração de ejeção cardíaca. A atividade da ALDH2 está reduzida até a 4ª semana pós-infarto do miocárdio. Além disso, há uma correlação positiva entre a função cardíaca e a atividade da ALDH2 em 1, 2 e 4 semanas pós-infarto do miocárdio. Entretanto essa correlação se perde na 10ª semana pós-infarto do miocárdio. Por fim, observamos uma redução no consumo máximo de oxigênio, aumento da produção de peróxido, peroxidação

lipídica e níveis de glutathione durante a progressão da doença. Apenas na 10ª semana não observamos alterações nos níveis totais de glutathione, momento em que a atividade da ALDH2 está restabelecida.

A partir dos resultados supracitados decidimos investigar os possíveis benefícios terapêuticos da Alda-1 (ativador seletivo da ALDH2) no mesmo modelo experimental. Escolhemos iniciar o tratamento na 4ª semana pós-infarto do miocárdio, momento em que a atividade da ALDH2 está reduzida e os animais já apresentam sinais de insuficiência cardíaca como dilatação ventricular esquerda e disfunção diastólica (ver próximos resultados). O tratamento teve duração de 6 semanas e foram avaliadas todas as variáveis descritas no objetivo do estudo 2.

7 RESULTADOS (Estudo 2)

7.1 Modelo experimental e caracterização do fenótipo

Os ratos com doze semanas de idade foram submetidos à cirurgia cardíaca, que consistiu na ligadura crônica da artéria coronária descendente anterior. Após quatro semanas esses animais foram pré-selecionados com base na função cardíaca (fração de encurtamento ventricular esquerda <30%) e divididos randomicamente em dois grupos: um grupo tratado com Alda-1 (IC Alda-1, 10mg/kg/dia) e outro grupo tratado com solução veículo (IC, 50%DMSO+50% PEG). Ainda, outro grupo de animais foi submetido à cirurgia fictícia do infarto do miocárdio (Sham), utilizado como controle saudável no estudo. O início do tratamento realizou-se quatro semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio, fase em que os animais já apresentavam sinais de insuficiência cardíaca. A Alda-1 foi administrada através de mini-bomba osmótica por um período de seis semanas. Durante o período do estudo (período de tratamento) não tivemos perdas significantes de animais nos diferentes grupos supramencionados.

7.1.1 Análises ecocardiográficas

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas pré- e pós-tratamento com o intuito de avaliar o efeito da terapia com Alda-1 sobre a função cardíaca e o remodelamento ventricular esquerdo após infarto do miocárdio. Observamos que os animais com insuficiência cardíaca apresentaram uma significativa redução na fração de encurtamento ventricular esquerda 4 semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio (Figura 9B), a qual foi acompanhada por dilatação da câmara ventricular esquerda (caracterizada pelo aumento no diâmetro ventricular ao final da diástole, Figura 9C). Após seis semanas de tratamento com Alda-1 os animais com insuficiência cardíaca melhoraram a fração de encurtamento ventricular esquerda comparada ao período pré-tratamento, enquanto os animais tratados com solução veículo apresentaram um agravamento da disfunção cardíaca no mesmo período experimental (Figuras 9B e E). Ainda, a ativação sustentada da ALDH2 foi capaz de amenizar a dilatação ventricular esquerda comparada aos animais infartados tratados com solução veículo no mesmo período experimental (Figura 9C). A Alda-1 também foi eficaz em evitar a hipertrofia cardíaca causada pela insuficiência cardíaca na 10ª semana, representada pela redução da parede posterior do ventrículo esquerdo comparada ao grupo insuficiência

cardíaca tratado com solução veículo (figura 9D). Essas modificações benéficas podem ser melhor observadas nas figuras 9E, 9F e 9G, que representam o delta da fração de encurtamento, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo, respectivamente. Esse delta está representado em relação ao período pré-tratamento.

Além do ecocardiograma modo M, realizamos a análise ecocardiográfica *doppler* tecidual, tornando possível a medida de parâmetros funcionais cardíacos (sistólicos e diastólicos) através da avaliação do fluxo sanguíneo cardíaco. Os dados do ecocardiograma Doppler tecidual estão apresentados na Tabela 2. Observamos que quatro semanas após o infarto do miocárdio os animais apresentaram sinais de disfunção diastólica ventricular esquerda como aumento da onda E de enchimento ventricular esquerdo e elevado índice de desempenho do miocárdio em relação ao grupo Sham. Já quando avaliados na 10^a semana pós-infarto do miocárdio, os animais com insuficiência apresentaram um agravamento da disfunção diastólica, caracterizado pelo aumento da onda E, redução da onda A, e consequente aumento da razão E/A, além de significativa elevação do tempo de relaxamento isovolumétrico, bem como do índice de desempenho do miocárdio. Esses resultados mostram que nesse período os animais apresentam sinais mais claros de insuficiência cardíaca. O tratamento sustentado com Alda-1 foi capaz de minimizar a progressão da disfunção diastólica cardíaca nos animais com insuficiência cardíaca.

Figura 9 – Desenho Experimental e Dados Ecocardiográficos no modo M dos períodos pré- e pós-tratamento dos grupos Sham, Insuficiência cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). O grupo Sham não recebeu nenhum tratamento nesse momento, A) Desenho experimental, B) Fração de encurtamento ventricular esquerda (FE), C) Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DdVE), D) Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVED), E) Delta da fração de encurtamento, F) Delta do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, G) Delta da parede posterior do ventrículo esquerdo. Os dados foram analisados pela ANOVA um e dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan, *, $p < 0,05$ vs. Sham; #, $p < 0,05$ vs. IC; &, $p < 0,05$ vs. Pré-tratamento.

Tabela 2: Parâmetros Ecocardiográficos

Grupos	Sham (n=8-22)	IC (n=8-14)	IC Alda-1 (n=8-13)	Sham (n=8-22)	IC (n=8-12)	IC Alda-1 (n=8-12)
Período	Pré-tratamento	Pré-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento
FEje, %	82±2	48±2 *	45±2*	76±3	43±3*	57±4*†‡
FEnc, %	43±1	25±3 *	20±4*	42±2	18±2*	27±4*†‡
DdVE, cm	0,753±0,023	0,849±0,025*	0,865±0,030*	0,767±0,018	0,991±0,029*	0,881±0,038*†‡
DsVE, cm	0,414±0,015	0,758±0,024*	0,718±0,037*	0,489±0,023	0,679±0,050*	0,631±0,026*†‡
SIVd, cm	0096±0,003	0,085±0,004	0,098±0,004	0,101±0,004	0,094±0,004	0,105±0,004
SIVs, cm	0,160±0,004	0,134±0,008*	0,133±0,006*	0,176±0,008	0,117±0,006*	0,134±0,007*
PPVEd, cm	0,129±0,005	0,134±0,007	0,134±0,009	0,145±0,004	0,159±0,006*	0,140±0,004†
PPVEs, cm	0,218±0,008	0,193±0,001	0,211±0,001	0,232±0,007	0,235±0,017&	0,224±0,017
TE, ms	78,5±0,6	68,0±2,3*	64,9±3,9*	81,7±2,4	66,3±2,6*	79,2±4,4
E, cm/s	70,7±1,0	80,8±1,7*	79,9±2,6*	70,5±1,8	93,0±2,7*	74,4±3,7†
A, cm/s	43,5±1,0	43,8±1,8	41,5±2,1	41,9±1,5	31,0±2,1*	39,1±1,5
E/A	1,6±0,1	1,9±0,1*	2,0±0,1*	1,7±0,1	3,1±0,3*‡	1,9±0,1†
TRIV, ms	24,2±1,7	25,9±1,6	28,2±1,4	26,0±1,8	32,3±3,0*	27,2±2,2
IDM	0,40±0,02	0,54±0,03*	0,58±0,06*	0,41±0,03	0,63±0,03*	0,43±0,04†‡
FC, bpm	295±12	272±6	285±7	296±5	266±14	274±9

Tabela 2 - Dados Ecocardiográficos referentes aos períodos pré- e pós-tratamento dos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). Fração de encurtamento (FE), Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE), Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE), Septo intraventricular na diástole (SIVd), Septo intraventricular na sístole (SIVs), Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd), Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVEs), Tempo de ejeção (TE), Velocidade do fluxo mitral E (E), velocidade do fluxo mitral A (A), Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), Índice de desempenho do miocárdio (IDM) e Frequência cardíaca (FC). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados pela ANOVA dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. *, p<0.05 vs. Sham; †, p<0.05 vs. IC; ‡, p<0.05 vs. Pré-tratamento.

7.1.2 Parâmetros fisiológicos

Consideramos como parâmetros fisiológicos as seguintes variáveis: tolerância ao esforço físico, pressão arterial sistólica (medida indireta), frequência cardíaca basal (medida indireta), e peso corporal dos animais. Essas análises foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum da Escola de Educação Física e Esporte-USP.

Com relação às variáveis distância máxima percorrida, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 3). Com relação à massa corporal, todos os animais ganharam peso durante o tempo do protocolo experimental, não havendo diferença entre os grupos sham e IC pós-período experimental (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros Fisiológicos

Parâmetros	Sham	IC	IC Alda-1	Sham	IC	IC Alda-1
Período	Pré-tratamento	Pré-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento
DMP, metros	514±36 (n=18)	537±54 (n=13)	447±59 (n=11)	500±38 (n=20)	525±53 (n=10)	478±52 (n=13)
PAS, mmHg	123±5 (n=18)	125±5 (n=13)	125±4 (n=12)	125±5 (n=14)	113±5 (n=10)	119±5 (n=11)
FC, bpm	476±17 (n=18)	484±27 (n=13)	522±23 (n=12)	488±15 (n=13)	479±19 (n=10)	531±23 (n=12)
PC, gr	365±11 (n=14)	337±21 (n=9)	347±18 (n=12)	429±11* (n=13)	419±21* (n=6)	419±19* (n=12)

Tabela 3 - Parâmetros Fisiológicos. Distância máxima percorrida (DMP) em teste de esforço com cargas incrementais até a exaustão em esteira rolante, Pressão arterial sistólica (PAS), Frequência cardíaca (FC), Peso Corporal (PC), em ratos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1) pré e pós-tratamento. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi realizada ANOVA dois fatores, seguida de *post hoc* de Duncan. *, p<0.05 vs. Pré-tratamento.

7.1.3 Análises hemodinâmicas e morfométrica cardíaca

Para a realização das medidas hemodinâmicas, um cateter com sensores de pressão e volume foi inserido no ventrículo esquerdo através da artéria carótida direita, sendo possível a análise do ciclo cardíaco. Essas medidas foram realizadas somente no período pós-experimental. Inicialmente analisamos a função sistólica representada pela derivada positiva de pressão sobre o tempo ($+dP/dT_{máx}$) e a função diastólica representada pela derivada negativa de pressão sobre o tempo ($-dP/dT_{máx}$) no estado basal. Também avaliamos a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), volume sistólico (VS) e trabalho cardíaco (TC).

Como podemos observar na Tabela 4, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram uma redução na $+dP/dT_{máx}$, volume sistólico e trabalho cardíaco, além de menor complacência cardíaca, demonstrada pela maior pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Entretanto, não observamos alterações significativas na $-dP/dT_{máx}$ cardíaca quando comparada aos valores do grupo controle (Sham). O tratamento com Alda-1 foi capaz de minimizar a disfunção cardíaca basal, melhorando os índices de função sistólica e complacência cardíaca (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros Hemodinâmicos:

Pós-protocolo experimental (22 sem.)			
Parâmetros	Sham	IC	IC Alda-1
PDFVE (mmHg)	3,2±0,6 (n=4)	8,9±1,2* (n=5)	4,6±0,6# (n=4)
+dP/Dt máx, (mmHg,s ⁻¹)	10034±455 (n=4)	6913±344* (n=6)	8521±336# (n=4)
-dP/Dt máx, (mmHg,s ⁻¹)	6599±467 (n=4)	6220±448 (n=6)	6682±815 (n=4)
VS (mL)	120±5 (n=4)	57±7* (n=7)	85±9# (n=5)
TC (mmHg,mL ⁻¹)	12,9±0,9 (n=4)	4,9±1,1* (n=7)	9,4±1,3# (n=5)

Tabela 4 - Parâmetros Hemodinâmicos, Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE), Velocidade Máxima de Elevação da Pressão ($+dP/dT_{máx}$), Velocidade Máxima de Declínio da Pressão ($-dP/dT_{máx}$), Volume Sistólico (VS), Trabalho Cardíaco (TC). Os dados foram analisados pela ANOVA um fator seguido de *post-hoc* de Duncan, *, $p<0,05$ vs, Sham; #, $p<0,05$ vs, IC.

Muitas alterações cardíacas (positivas ou negativas) podem ser visualizadas somente quando ocorre um aumento da demanda energética, não podendo ser identificadas em

condições basais. Na tentativa de investigar quais os efeitos da insuficiência cardíaca e do tratamento com Alda-1 sobre a função cardíaca mediante ao estresse, decidimos avaliar a curva pressão-volume cardíaca desses animais na presença de um vasoconstritor (fenilefrina), que promove aumento de pós-carga cardíaca (dos Santos et al., 2010). Nossos resultados demonstram que os animais com insuficiência cardíaca apresentam um déficit nos parâmetros funcionais cardíacos sistólico (delta de aumento $+dP/dT_{máx}$ em relação à condição basal) (Figura 10A) e diastólico (delta de aumento $-dP/dT_{máx}$ em relação à condição basal) frente ao estímulo com fenilefrina (Figura 10B), além de apresentarem uma drástica redução da complacência ventricular esquerda, demonstrada pelo aumento na razão pressão volume no final da diástole (RPVDF) (Figuras 10C-F).

Diferente dos dados obtidos no ecocardiograma e na avaliação do ciclo cardíaco no repouso, o tratamento sustentado com Alda-1 foi capaz de normalizar, em relação ao grupo controle, a porcentagem de aumento dos índices sistólicos e diastólicos frente ao estímulo com fenilefrina (Figuras 10A-F). Vale ressaltar que as alterações cardíacas que levam à falência normalmente acontecem em situações de estresse, fortalecendo assim os possíveis benefícios da Alda-1 no tratamento da insuficiência cardíaca e na melhora da morbidade dos pacientes.

Além das avaliações funcionais, caracterizamos possíveis alterações morfológicas cardíacas oriundas da progressão da doença, bem como do tratamento sustentado com Alda-1 nos animais com insuficiência cardíaca. Para isso realizamos as seguintes análises histológicas: área de infarto, deposição de colágeno cardíaco e diâmetro dos cardiomiócitos. Todas as análises, exceto a medida da área de infarto, foram realizadas na área remota, ou seja, área livre de infarto,

Como esperado, a área de infarto não apresentou diferença entre os grupos infartados (Figuras 10G e K). Os animais com insuficiência cardíaca apresentaram hipertrofia cardíaca, caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, e aumento na deposição de colágeno total e tipo I cardíaco quando comparados ao grupo Sham (Figuras 10G-M). O tratamento com Alda-1 foi capaz de diminuir parcialmente tanto a hipertrofia do cardiomiócito quanto a deposição de colágeno cardíaco nos animais com insuficiência cardíaca. Acreditamos que o aumento do colágeno tipo I observado somente no grupo insuficiência cardíaca tratado com solução veículo está associado à menor complacência ventricular esquerda. Não observamos diferenças entre os grupos quando avaliamos as concentrações do colágeno tipo III, como apresentado na Figura 10I. A Figura 10J apresenta as razões entre o colágeno tipo I e tipo III.

Figura 10 – Avaliação do ciclo cardíaco e Análises Morfométricas Cardíaca, A) Velocidade Máxima de Elevação da Pressão ($+dP/dt_{max}$), B) Velocidade Máxima de Declínio da Pressão ($-dP/dt_{max}$), C) Razão Pressão Volume Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (RPVDF), D) Imagem representativa do ciclo cardíaco em animal Sham, E) animal Insuficiência Cardíaca, F) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 por 6 semanas, G) Imagem da área de infarto (superior) e colágeno total, tipo I e tipo III (inferior), H) Colágeno tipo I, I) Colágeno tipo III, J) Razão do colágeno Tipo I/Tipo III, K) Quantificação da área de infarto, L) Diâmetro de cardiomiócitos, M) Deposição de colágeno total dos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan, *, $p < 0,05$ vs, Sham; #, $p < 0,05$ vs, IC.

Considerando os efeitos benéficos observados no tratamento com Alda-1 referentes à melhora da função cardíaca e prevenção do remodelamento ventricular na insuficiência

cardíaca, nosso próximo passo foi caracterizar a efetividade do tratamento sobre a atividade da ALDH2 e o acúmulo de proteínas danificadas.

7.2 Perfil de atividade e expressão da enzima ALDH2 cardíaca e acúmulo de proteínas danificadas

Para confirmar se o nosso tratamento foi efetivo em aumentar a atividade da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) em animais com insuficiência cardíaca, analisamos a atividade enzimática da ALDH2 mitocondrial por espectrofotometria, como descrito anteriormente. Constatamos que, de fato, a Alda-1 aumentou em 120% a atividade da enzima ALDH2 em animais com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (Figura 11A). Ainda, o aumento da atividade da ALDH2 não estava relacionado à maior expressão da enzima (Figuras 11B e F). Esse resultado já era esperado, pois sabemos que a Alda-1 aumenta a atividade da ALDH2 através da facilitação tanto da entrada do substrato (no caso o acetaldeído) quanto do co-fator NAD^+ , como já descrito anteriormente. A atividade da ALDH2 não se alterou na insuficiência cardíaca em relação ao grupo controle.

Após a constatação da eficácia da Alda-1 em aumentar a atividade ALDH2 na insuficiência cardíaca, avaliamos os possíveis benefícios desse processo. Considerando que um dos papéis da ALDH2 é a remoção do principal aldeído produzido durante o estresse oxidativo, o 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), decidimos caracterizar os níveis desse aldeído no coração dos animais com insuficiência cardíaca. Como pode-se observar nas Figuras 11C-D, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram um significativo aumento na expressão tanto de adutos 4HNE-proteína quanto de proteínas carboniladas quando comparados com grupo controle (Sham). Esses resultados sugerem uma ineficiência enzimática da ALDH2 na insuficiência cardíaca, caracterizada pelo exacerbado acúmulo de aldeídos tóxicos cardíacos normalmente metabolizados pela ALDH2 (Figuras C-E). A ativação sustentada da enzima mitocondrial ALDH2 foi eficaz em normalizar na insuficiência cardíaca os valores de adutos 4HNE-proteína e proteínas carboniladas cardíacas para próximos do grupo sham.

Figura 11 – Atividade e Expressão da ALDH2 e Expressão de Proteínas Danificadas no lisado cardíaco total, A) Atividade da ALDH2, B) Expressão da ALDH2, C) Quantificação de adutos 4-hidroxi-2-nonenal-proteína (4HNE), D) Proteínas carboniladas nos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). E)- Blot representativo dos adutos de Michaelis (4HNE-proteína) e proteínas carboniladas, F) Blot representativo da ALDH2. Os níveis cardíacos de adutos de Michaelis e proteínas carboniladas e ALDH2 foram normalizados pela GAPDH. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan, *, $p < 0,05$ vs, Sham; #, $p < 0,05$ vs, IC.

Sabe-se que a propagação do sinal deletério oriundo da peroxidação lipídica e do desbalanço redox ocorre em parte pelo acúmulo de 4HNE, onde o excesso desse aldeído resulta em disfunção mitocondrial e colapso metabólico cardíaco durante processos isquêmicos (Chen, Budas et al., 2008). Entretanto, ainda não se sabe a contribuição do acúmulo desse aldeído para com a progressão da disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Acreditamos que o 4HNE apresenta papel chave na disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, afetando diretamente o metabolismo mitocondrial cardíaco. Sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar a bioenergética mitocondrial e a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial no coração dos animais com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 ou veículo.

7.3 Caracterização da função mitocondrial

Para caracterizar a função mitocondrial realizamos os seguintes experimentos: avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial, liberação de peróxido de hidrogênio e

captação máxima de cálcio pela mitocôndria. Todos esses experimentos foram realizados com mitocôndrias isoladas do coração dos animais sham, IC veículo e IC Alda-1.

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado utilizando um oxígrafo do tipo Clark, conforme descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados na presença dos substratos malato (complexo I), glutamato (complexo I) e succinato (complexo II). As medidas avaliadas foram: consumo de oxigênio no Estado 2 (respiração basal), consumo de oxigênio no Estado 3 (respiração máxima após adição de ADP), consumo de oxigênio no estado 4 (respiração após adição de oligomicina, uma droga que bloqueia o complexo V) e consumo de oxigênio no estado desacoplado (após adição de CCCP, um desacoplador - *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone*, 1 μ M). Ainda, para avaliar a eficiência respiratória mitocondrial calculamos a razão estado3/estado4, descrita como controle respiratório mitocondrial.

Na figura 12B pode-se observar que a mitocôndria isolada do coração dos animais com insuficiência cardíaca apresentou um déficit no consumo máximo de oxigênio, representado pela redução no estado 3. A respiração mitocondrial também estava prejudicada no estado desacoplado em relação ao grupo controle (Figura 12D). Ainda, o controle respiratório mitocondrial estava reduzido na insuficiência cardíaca (Figura 12E), apontando para um prejuízo no acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial na insuficiência cardíaca. O tratamento sustentado com Alda-1 foi capaz de restaurar o consumo de O_2 nos estados respiratórios 3 e desacoplado (CCCP) (Figuras 12C e D), bem como melhorar o controle respiratório mitocondrial (Figura 12E). Esses resultados sugerem que a ativação crônica da enzima mitocondrial ALDH2 é suficiente para impedir a disfunção mitocondrial associada à fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Baseado nesses resultados, nosso próximo passo foi avaliar a produção de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria nos seus diferentes estados de ativação.

A liberação de H_2O_2 pela mitocôndria foi avaliada por espectrofluorimetria, conforme descrito anteriormente. Nossos resultados apontam para uma exacerbada liberação de H_2O_2 mitocondrial na insuficiência cardíaca (Figuras 12 F-I). Esse aumento de radicais livres parece acontecer tanto em situações basais (Estado 2) quanto extremas (Estados 3, 4 e desacoplamento por CCCP) (Figuras 12 F-I). O tratamento com Alda-1 amenizou a liberação de H_2O_2 mitocondrial na insuficiência cardíaca. Esses resultados são extremamente promissores, pois demonstram que o acúmulo de 4HNE na insuficiência cardíaca é suficiente para desencadear danos na maquinaria mitocondrial, sendo que a Alda-1 reverte todo esse processo basicamente através da remoção do 4HNE com mais eficiência.

Figura 12 - Consumo Máximo de Oxigênio e Liberação de Peróxido de Hidrogênio em Mitocôndria Cardíaca Isolada, A) Consumo de oxigênio no estado 2, B) Consumo de oxigênio no estado 3, C) Consumo de oxigênio no estado 4, D) Consumo de oxigênio com CCCP, E) Controle respiratório (Estado 3/4), F) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 2, G) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 3, H) Liberação de peróxido de hidrogênio no estado 4, I) Liberação de peróxido de hidrogênio com CCCP, ou estado desaclopado. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguido de *post hoc* de Duncan *, $p < 0,05$ vs Sham, #, $p < 0,05$ vs IC.

Após a constatação da exacerbada liberação de radicais livres pela mitocôndria na insuficiência cardíaca, decidimos avaliar outros parâmetros da biologia mitocondrial importantes para sua funcionalidade. Essas análises foram realizadas com o intuito de entender quão fragilizada estava a mitocôndria na insuficiência cardíaca, e quais seriam os possíveis benefícios da ativação seletiva da enzima mitocondrial ALDH2. Para isso, avaliamos a permeabilidade dos poros mitocondriais e liberação do citocromo c para o citosol no coração dos animais com insuficiência cardíaca.

7.3.1 Permeabilidade dos poros mitocondriais, liberação de citocromo c e 4HNE *in vitro*

A formação de poros de transição mitocondriais está relacionada ao aumento da permeabilidade mitocondrial e consequente morte celular (Kroemer, Galluzzi et al., 2007). Avaliamos a permeabilidade dos poros de transição mitocondrial utilizando o ensaio de captação máxima de cálcio pela mitocôndria cardíaca isolada, como descrito anteriormente. Observamos que a captação máxima de cálcio mitocondrial estava debilitada no coração dos animais com insuficiência cardíaca em relação ao grupo sham, demonstrando uma maior abertura dos poros de transição mitocondriais (Figura 13A). O tratamento com Alda-1 foi capaz de restaurar este efeito. Esses resultados foram validados com a utilização de ciclosporina A, uma molécula capaz de bloquear a formação dos poros mitocôndrias (Broekemeier et al., 1989). De fato, a utilização de ciclosporina A nos ensaios *in vitro* foi capaz de normalizar a captação máxima de cálcio pela mitocôndria isolada dos corações dos animais com insuficiência cardíaca (Figura 13A).

Uma outra forma de avaliar a abertura dos poros mitocondriais é analisar o extravasamento de citocromo c da mitocôndria (uma proteína ancorada na membrana interna da mitocôndria) para o citosol. Já está bem descrito na literatura que o citocromo c no citosol ativa diretamente proteínas apoptóticas da família Bcl2 e induz morte celular (Kroemer, Galluzzi et al., 2007). Nossos resultados apontam que na insuficiência cardíaca existe um exacerbado extravasamento de citocromo c para o citosol, caracterizado pela elevada razão citocromo c citosol/mitocôndria (Figuras 13 B-D). Esses resultados comprovam a maior abertura dos poros mitocondriais na insuficiência cardíaca. O tratamento com Alda-1 foi capaz de reverter esse processo, normalizando os valores de citocromo c no citosol para próximo do grupo sham.

Até o momento, nossos achados apontam que o acúmulo de 4HNE no coração é essencial para a progressão da insuficiência cardíaca, e que essa progressão está diretamente associada à disfunção mitocondrial, exacerbada produção de radicais livres e abertura dos poros mitocondriais. Entretanto, nossos dados são associativos e não podem explicar os mecanismos pelos quais o acúmulo de 4HNE contribui para a disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca. Dessa forma, com o intuito de traçar uma relação causal entre 4HNE e alguns processos observados na insuficiência cardíaca, como a disfunção mitocondrial, decidimos realizar experimentos mais pontuais. Para isso, incubamos mitocôndrias isoladas com diferentes concentrações de 4HNE *in vitro* e avaliamos seu efeito na respiração mitocondrial. Ainda, considerando que a Alda-1 foi uma importante ferramenta na reversão

da disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca em nosso modelo, testamos se a incubação *in vitro* com Alda-1 em mitocôndrias isoladas poderia prevenir agudamente os efeitos negativos do 4HNE.

Portanto, o nosso objetivo neste experimento foi investigar se de fato o 4HNE *in vitro* provoca danos na respiração mitocondrial e qual o efeito da Alda-1 nesse processo. Esse experimento foi realizado em mitocôndria isolada do coração de ratos Wistar controle, ou seja, não passaram por nenhum procedimento cirúrgico. Na Figura 13E, podemos observar o consumo máximo de oxigênio no estado 3, consumo máximo de oxigênio no estado 4 e controle respiratório. Os dados estão apresentados em porcentagem do controle (sem tratamento).

Como mostra a Figura 13, o 4HNE reduziu o consumo de oxigênio mitocondrial no estado 3. Esse processo parece ser dose-dependente, pois quanto maior a concentração de 4HNE menor é a respiração mitocondrial. A respiração mitocondrial no estado 4 (na presença de oligomicina) não foi alterada pelo 4HNE, sugerindo que o 4HNE não afeta o acoplamento mitocondrial. Por fim, quando calculamos o controle respiratório observamos um comportamento semelhante ao estado 3 mitocondrial. Esses resultados apontam que o 4HNE afeta negativamente a respiração mitocondrial cardíaca. Quando testamos a Alda-1, observamos que a pré-incubação das mitocôndrias com Alda-1 ameniza os danos oriundos do 4HNE (10 μ M). Escolhemos essa concentração de 4HNE uma vez que é próxima da observada no coração após processos isquêmicos. Nossos resultados *in vitro* reproduziram os achados *in vivo*, demonstrando que a Alda-1 é capaz de reverter os danos mitocondriais oriundos do 4HNE. Entretanto, as proteínas-alvo do 4HNE nesse processo ainda não foram identificadas, Outro projeto do nosso laboratório identificará essas proteínas.

Figura 13 – Permeabilidade de Poros Mitocondriais, Liberação de Citocromo c e 4HNE *in vitro*. A) Captação máxima de cálcio, B) Blot representativo do citocromo c e da eficiência de fracionamento celular, C) Expressão do citocromo c na fração citosólica, D) Expressão do citocromo c na fração mitocondrial dos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1), E) Avaliação da respiração mitocondrial após incubação *in vitro* com 4HNE e Alda-1. As mitocôndrias foram isoladas do coração de animais controle (sham). As doses de 4HNE variaram entre 0,5 e 10,0 μM e o tratamento teve duração de 5 minutos. No experimento com Alda-1 e 4HNE as mitocôndrias foram incubadas primeiramente com Alda-1 seguida de 4HNE. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan. *, $p < 0,05$ vs. controle; #, $p < 0,05$ vs. IC; &, $p < 0,05$ vs. Pré-tratamento; †, $p < 0,05$ vs. 4HNE 10 μM .

Esses dados demonstram que um dos possíveis mecanismos associados aos efeitos benéficos da ativação da ALDH2 na insuficiência cardíaca é pela maior remoção de aldeídos tóxicos (ex, 4HNE) produzidos a partir da peroxidação lipídica. Portanto o nosso próximo passo foi a avaliação a peroxidação lipídica no lisado cardíaco de animais Sham, IC veículo e IC Alda-1. Além disso, como nossos resultados apontam para uma exacerbada liberação de radicais livres pela mitocôndria na insuficiência cardíaca, decidimos avaliar a atividade de algumas enzimas antioxidantes com o intuito de traçar um perfil do balanço redox na insuficiência cardíaca, bem como os possíveis efeitos da ativação sustentada da ALDH2 nesse processo.

7.4 Peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase e da catalase

A formação de hidroperóxidos lipídicos ocorre devido ao ataque de espécies reativas, tais como o $H^\bullet$ e o $ONOO^-$, ocasionando uma autodestruição da membrana. O processo de peroxidação ocorre em três etapas distintas, inicialmente ocorre o ataque o radical ao PUFA, essa etapa é denominada iniciação e tem como produto um radical lipídico ($L^\bullet$), esse radical associa-se com um O_2 formando um radical peroxila ($LOO^\bullet$) que ataca outro PUFA e forma um $L^\bullet$ e um $LOO^\bullet$ em uma etapa denominada de propagação, a ultima etapa denominada terminação ocorre quando $L^\bullet$ e um $LOO^\bullet$ propagam-se até a auto destruição. A peroxidação lipídica é considerada o principal indutor da disfunção mitocondrial e celular em situações de estresse por induzir a formação de aldeídos tóxicos como o 4HNE (Hermes-Lima, Willmore et al., 1995). Tendo em vista o aumento nas concentrações de 4HNE no nosso modelo de insuficiência cardíaca, fomos analisar a formação desses hidroperóxidos lipídicos através de espectrofotometria, como descrito anteriormente. Como podemos observar na Figura 14A o grupo IC Alda-1 apresentou uma menor peroxidação lipídica quando comparado com o grupo insuficiência cardíaca sem tratamento.

A superóxido dismutase e a catalase são importantes enzimas antioxidantes envolvidas na manutenção do balanço redox na fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Investigamos a atividades dessas enzimas em nosso modelo através da técnica de espectrofotometria, como descrito anteriormente. A atividade da superóxido dismutase estava diminuída nos animais com insuficiência cardíaca (Figura 14B). O tratamento com Alda-1 foi capaz de restaurar a atividade da enzima (Figura 14B). A enzima superóxido dismutase é uma enzima essencial para a vida, pois a deleção sistêmica da SOD2 gera letalidade em camundongos neonatos e a deleção condicional gera cardiomiopatia dilatada (Koyama et al., 2013; Lebovitz et al., 1996).

Portanto, é de fundamental importância a melhora da atividade da SOD gerada após seis semanas de tratamento com Alda-1 em animais com insuficiência cardíaca. A atividade da enzima catalase não apresentou diferenças entre os grupos como mostra a Figura 14C.

Figura 14 – Peroxidação Lipídica, Atividade da Superóxido Dismutase e Catalase, A) Hidroperóxidos Lipídicos, B) Atividade da Enzima Superóxido Dismutase – SOD e C) Atividade da catalase nos grupos Sham, Insuficiência Cardíaca (IC) e Insuficiência Cardíaca tratado com Alda-1 (IC Alda-1). Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan, *, $p < 0,05$ vs. Sham; #, $p < 0,05$ vs. IC.

O nosso próximo questionamento foi a respeito da toxicidade da molécula Alda-1. Visto que até o momento não existe nenhum dado na literatura a respeito da toxicidade causada pelo tratamento sustentado com Alda-1. Decidimos então analisar no plasma dos animais enzimas que apontam sinais de toxicidade hepática.

7.5 Toxicidade da Alda-1

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são enzimas que estão envolvidas no metabolismo celular. A quantificação dessas enzimas no

plasma é comumente utilizada na clínica para identificação de dano hepático. A análise foi realizada no plasma dos animais Sham, IC e IC Alda-1, como descrito anteriormente. Como podemos observar na Figura 15, a razão dos níveis circulantes dessas enzimas apresenta-se inalterada, sugerindo que o nosso tratamento não possui nenhum efeito tóxico.

Figura 15 - Análise da Toxicidade da Alda-1. Razão dos níveis circulantes das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (ASP) em animais Sham, IC e IC tratado com Alda-1. Os dados foram analisados pela ANOVA um fator, seguida de *post hoc* de Duncan.

8 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o tratamento das doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca, avançou consideravelmente. No entanto, a insuficiência cardíaca continua sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade mundial (Hummel, Pauli et al., 2010). Assim, torna-se necessário a busca por novas terapias farmacológicas que melhorem a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes, uma vez que a disfunção cardíaca já está estabelecida.

A mitocôndria é apontada como uma importante organela associada ao agravamento e/ou aparecimento da insuficiência cardíaca devido ao seu importante papel na bioenergética e balanço redox celular. A disfunção mitocondrial existente na insuficiência cardíaca leva a redução da produção de energia, a diminuição da contratilidade dos cardiomiócitos e aumento da morte celular, resultando no agravamento da disfunção ventricular (Ahuja et al., 2013). Diversos mecanismos e vias moleculares são propostos para explicar a disfunção mitocondrial e a disfunção cardíaca presente na insuficiência cardíaca, no entanto, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio parece ser um importante fator deletério e está diretamente relacionado à disfunção do miocárdio (Ide et al., 2000).

O aumento de espécies reativas de oxigênio gera um desbalanço redox e como consequência ocorre o aumento da peroxidação lipídica e a formação de aldeídos tóxicos, como o 4HNE. O 4HNE pode prontamente interagir com resíduos de cisteína, histidina e lisina de proteínas chave, inativando-as e contribuindo para o prejuízo metabólico e contrátil observado na insuficiência cardíaca (Petersen, Doorn, 2004). De fato, esse aldeído parece estar diretamente relacionado com a disfunção cardíaca. Nakamura e colaboradores demonstraram que a redução de 40% dos níveis circulante de 4HNE, em pacientes com cardiomiopatia dilatada, está associada à melhora da função cardíaca (Nakamura, Kusano et al., 2002).

A ALDH2 é a principal enzima responsável na remoção do 4HNE. Diversas patologias estão diretamente relacionadas com a redução da atividade dessa enzima. A deficiência na ALDH2 está associada com o aparecimento de doenças com Alzheimer (Wang et al., 2008), câncer (Seitz et al., 2001) e doenças cardiovasculares como hipertensão (Hui et al., 2007) e diabetes (Xu et al., 2010). Recentes estudos apontam a ALDH2 como enzima chave em mecanismos de cardioproteção, uma vez que elimina de forma eficiente aldeídos tóxicos. No entanto, o papel da ALDH2 na insuficiência cardíaca ainda não foi determinado.

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, a caracterização da atividade da ALDH2 pós-infarto do miocárdio, além de concordarem com a literatura, apontando a ALDH2 como uma enzima importante para a manutenção da viabilidade cardíaca.

Na parte I dos nossos resultados (estudo 1) evidenciamos que a atividade da ALDH2 apresentam-se reduzida em 1, 2 e 4 semanas pós-infarto do miocárdio (Figura 6A). Essa redução foi acompanhada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (Figura 8) e aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos (Figura 7A). Esses resultados sugerem que a ALDH2 apresenta papel chave na remoção de aldeídos tóxicos, onde sua inativação pode estar associada ao agravamento do desbalanço redox e disfunção contrátil observados na progressão da disfunção cardíaca pós-infarto do miocárdio (Figura 6). Porém, nossos dados apontam apenas uma associação entre os fatores supracitados. Estudos anteriores *in vitro* demonstram que o 4HNE é capaz de inibir a atividade da ALDH2 através de uma ligação covalente ao sítio catalítico da enzima (Doorn, Hurley et al., 2006). Contudo, são necessários outros experimentos que comprovem o aumento desse aldeído nas primeiras semanas pós-infarto do miocárdio.

O 4HNE pode ser removido também pela glutathione, uma importante enzima antioxidante, através de uma ligação do 4HNE como o grupo tiol da enzima. Essa reação ocorre por meio da enzima glutathione-S-transferase. Alterações nos níveis de glutathione podem induzir aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, danos mitocondriais e cardíacos (Raza, John, 2006). Sendo assim, investigamos os níveis dessa enzima em nosso modelo, nossos resultados apontam um aumento dos níveis de glutathione na 1ª, 2ª e 4ª semana pós-infarto do miocárdio. Acreditamos que esse aumento ocorra na tentativa de combater a redução da atividade da ALDH2 e o aumento de hidroperóxidos lipídico demonstrado na Figura 7. Os efeitos deletérios do infarto do miocárdio ao longo do tempo, apresentados até o momento, foram associados com redução do consumo máximo de oxigênio pela mitocôndria (Figura 8E) e redução da fração de encurtamento e ejeção cardíaca (Figura 5), sugerindo uma disfunção mitocondrial e cardíaca.

Após a caracterização do curso temporal da atividade da ALDH2 e acúmulo de 4HNE e hidroperóxidos lipídicos após infarto do miocárdio, decidimos utilizar animais com quatro semanas pós-infarto para compreender o papel da ALDH2 na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e investigar os possíveis benefícios terapêuticos da Alda-1 nessa síndrome. A utilização de animais com quatro semanas pós-infarto foi baseada em nossos

resultados que apontam que animais com infarto do miocárdio apresentam disfunção cardíaca sistólica e diastólica em repouso, além de dilatação ventricular esquerda e maior índice de desempenho do miocárdio nesse período (Tabela 2).

A segunda parte dos nossos resultados (estudo 2) aponta que a ativação sustentada da ALDH2 utilizando Alda-1 aumenta a contratilidade cardíaca tanto em repouso (Figura 9) quanto em estresse (Figura 10A-F), além de reverter o remodelamento cardíaco patológico (Figura 10G-M). A cardioproteção induzida por Alda-1 é evidenciada pela melhora da função cardíaca, diminuição da dilatação do ventrículo esquerdo e diminuição da fibrose cardíaca.

Para testar a efetividade do nosso tratamento realizamos a análise da atividade da ALDH2. Constatamos que o nosso tratamento foi efetivo em aumentar 2,7 vezes a atividade da ALDH2 sem alterar sua expressão. Em publicações anteriores foi demonstrado que a Alda-1 é um agonista alostérico da ALDH2, sendo capaz de diminuir drasticamente o K_m da ALDH2 para o co-factor NAD^+ , e aumentar o $V_{máx.}$ da catálise do substrato de aldeídos (Chen, Ferreira et al., 2014). De fato, o aumento da atividade da ALDH2 não está associado à expressão da enzima (Figura 11B). Sendo assim, nossos resultados corroboram os dados encontrados na literatura em outros modelos experimentais, onde o tratamento com Alda-1 torna a enzima mais eficiente. Testamos essa eficiência da ALDH2, por meio da técnica de western blot para quantificação de acúmulo de aldeídos tóxicos e proteínas carboniladas. Verificamos que o aumento da atividade enzimática da ALDH2 foi capaz de atenuar a carga de aldeídos no miocárdio de ratos com insuficiência cardíaca, caracterizada pela redução de adutos de proteína-4HNE e de carbonilação de proteínas, o que sugere uma redução de proteínas danificadas cardíacas (Figura 11).

O acúmulo de aldeídos tóxicos pode inativar proteínas importantes, tanto da via glicolítica como da via oxidativa e proteínas da cadeia de transporte de elétrons (Chen et al., 2010) gerando disfunção mitocondrial. Além disso, sabemos que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e a sobrecarga de cálcio provoca a dissipação do gradiente eletroquímico e consequente aberturas de poros de transição mitocondrial, o que resulta na maior da produção de espécies reativas de oxigênio. Essas alterações podem levar a liberação de citocromo c para o citosol e consequente ativação de vias pró-apoptóticas através de proteínas da família Bcl (Kroemer, Galluzzi et al., 2007). Portanto decidimos investigamos se o acúmulo desses aldeídos se relaciona com a disfunção mitocondrial.

De fato, nossos resultados apontam que os animais com insuficiência cardíaca apresentam uma disfunção mitocondrial, caracterizada pela redução no consumo de oxigênio pela mitocôndria (figura 12) e pelo aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio pela

mitocôndria (Figura 12). Além disso, os nossos resultados sugerem que a mitocôndria dos animais com insuficiência cardíaca apresenta maior formação de poros de transição mitocondrial (Figura 13A), visto que a mitocôndria desses animais apresentou baixa tolerância às adições consecutivas de cálcio *in vitro*, sendo que o tratamento dessas mitocôndrias com ciclosporina A (bloqueador de poros de transição mitocondrial) restaurou a tolerância ao cálcio. O nosso tratamento com Alda-1 foi efetivo em melhorar a respiração mitocondrial, reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a formação de poros de transição mitocondrial. Outro resultado que confirma a abertura de poros de permeabilidade mitocondrial é a liberação do citocromo c para o citosol. Nossos resultados apontam uma maior liberação do citocromo c para o citosol nos animais com insuficiência cardíaca. O tratamento com Alda-1 foi eficaz em diminuir essa liberação, o que sugere uma redução da ativação de vias apoptóticas. No entanto, experimentos mais pontuais são necessários para avaliar morte celular nesse modelo experimental.

A literatura demonstra claramente que os aldeídos podem prejudicar diversas funções celulares, como já descrito anteriormente. De fato, nossos resultados indicam que os aldeídos são extremamente tóxicos e prejudicam a função mitocondrial e cardíaca. Quando testamos a reatividade do 4HNE em mitocôndria cardíaca isolada de animais saudáveis *in vitro*, através de uma curva de dose resposta, verificamos que o 4HNE reduz o consumo de oxigênio mitocondrial proporcional as quantidades adicionadas. Além disso, a Alda-1 foi capaz de evitar a disfunção mitocondrial ocasionada pelo 4HNE (Figura 13E). Portanto, nossos resultados *in vitro* reproduziram os achados *in vivo*, demonstrando que a Alda-1 é capaz de reverter os danos mitocondriais oriundos do 4HNE.

O aumento do 4HNE no tecido cardíaco do nosso modelo de insuficiência cardíaca se relaciona com aumento da peroxidação lipídica e redução da enzima superóxido dismutase (Figura 14A e 14B, respectivamente). O tratamento com Alda-1 reverteu esse processo, reduzindo os níveis de hidroperóxidos lipídicos e restaurando a atividade da superóxido dismutase cardíaca. Dados publicados anteriormente demonstram que pacientes com insuficiência cardíaca crônica apresentam redução na atividade da superóxido dismutase (Xu, Chen et al., 2010) corroborando com os nossos resultados.

Por fim, decidimos analisar a toxicidade da Alda-1 visto que nenhum estudo até o momento testou o efeito sustentado dessa molécula. Para testar a toxicidade da Alda-1 foi realizada a análise dos níveis circulantes das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (ASP), essa análise é muito utilizada na clínica para testar toxicidade hepática (Tahir, Sultana, 2011). A enzima ALT é encontrada principalmente no fígado, assim

como a enzima ALT que também é encontrada no coração e músculo esquelético, danos hepáticos causam aumento dos níveis circulantes dessas enzimas. Nossos resultados apontam a não toxicidade da Alda-1 (figura 15) sendo um tratamento seguro em longo prazo em ratos com IC induzido por infarto do miocárdio.

Acreditamos que os aldeídos tóxicos, como o 4HNE, estão no centro de um ciclo de retro-alimentação positivo em um coração insuficiente, em que espécies reativas de oxigênio produzem aldeídos através da peroxidação lipídica, que, em seguida promovem disfunção mitocondrial e levam a uma maior geração de espécies reativas de oxigênio. A interrupção desse ciclo, através da maior remoção de 4HNE cardíaco pela ALDH2 melhora a função mitocondrial e diminui a produção de espécies reativas de oxigênio, o que resulta na melhora da função cardíaca e melhora do quadro de insuficiência cardíaca. Ao contrário dos tratamentos antioxidantes, que visam reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio, que são instáveis, e devem ser biologicamente disponível no local certo (por exemplo, no interior da mitocôndria) a uma concentração estequiométrica, a Alda-1 funciona cataliticamente sobre um produto estável de estequiométrica, a Alda - aldeídos - dentro do microambiente correto - mitocôndria.

9 CONCLUSÃO

Nossos resultados fornecem evidências de que a ALDH2 é uma importante enzima que auxilia na manutenção da viabilidade cardíaca pós-infarto do miocárdio, e que a redução da carga de aldeídos cardíacos através da ativação seletiva ALDH2 é suficiente para atenuar danos causados pela insuficiência cardíaca em ratos. Dessa forma, baseados em nossos estudos pré-clínicos, podemos concluir que o ativador da ALDH2 (Alda-1) tem um importante papel na melhora da bioenergética mitocondrial associada à redução do estresse oxidativo, contribuindo sobremaneira para a reversão da fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Portanto, a ALDH2 pode ser apontada como um novo alvo terapêutico no tratamento da insuficiência cardíaca. Entretanto, outros estudos, incluindo a utilização de diferentes modelos experimentais de insuficiência cardíaca, são necessários para validar o uso terapêutico da Alda-1 no tratamento desta síndrome.

REFERÊNCIAS*

- Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. Pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 2011;90(2):234-42.
- Ahuja P, Wanagat J, Wang Z, Wang Y, Liem DA, Ping P, et al. Divergent mitochondrial biogenesis responses in human cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;127(19):1957-67.
- Avramovic N, Dragutinovic V, Krstic D, Colovic M, Trbovic A, de Luka S, et al. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. *Hippokratia*. 2012;16(3):241-5.
- Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, et al. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Molecular Aspects of Medicine*. 2003;24(4-5):219-30.
- Backos DS, Fritz KS, Roede JR, Petersen DR, Franklin CC. Posttranslational modification and regulation of glutamate-cysteine ligase by the alpha,beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011;50(1):14-26.
- Beretta M, Gorren AC, Wenzl MV, Weis R, Russwurm M, Koesling D, et al. Characterization of the east asian variant of aldehyde dehydrogenase-2: Bioactivation of nitroglycerin and effects of alda-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(2):943-52.
- Brasil. Mistério da Saúde. 2014 [cited 2014 Fev 15]. Available from: <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares>.
- Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin a is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(14):7826-30.
- Budas GR, Disatnik MH, Chen CH, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 (aldh2) confers cardioprotection in protein kinase c epsilon (pkcvarepsilon) knockout mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48(4):757-64.
- Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: A new therapeutic target? *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2009;19(5):158-64.
- Campos JC, Queliconi BB, Dourado PM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LR, et al. Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PloS One*. 2012;7(12):e52764.
- Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *The American Journal of Cardiology*. 2005;95(9A):8B-13B.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008;321(5895):1493-5.

Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: New therapeutic opportunities. *Physiological Reviews*. 2014;94(1):1-34.

Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovascular Research*. 2010;88(1):51-7.

Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, Hayashida CY, Bechara LR, Elias RM, et al. Pivotal role of toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule myd88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PloS One*. 2011;6(12):e29004.

da Silva MM, Sartori A, Belisle E, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases h₂O₂ release, and enhances K⁺ transport. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(1):H154-62.

Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, Chin MT, Nieves-Cintrón M, Chen T, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and galphag overexpression-induced heart failure. *Circulation Research*. 2011;108(7):837-46.

Ding X, Beier JJ, Baldauf KJ, Jokinen JD, Zhong H, Arteel GE. Acute ethanol preexposure promotes liver regeneration after partial hepatectomy in mice by activating ald2. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014;306(1):G37-47.

Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: Implications beyond ATP production. *Circulation Research*. 2013;113(6):709-24.

Doorn JA, Hurley TD, Petersen DR. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chemical Research in Toxicology*. 2006;19(1):102-10.

dos Santos L, Antonio EL, Souza AF, Tucci PJ. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010;88(7):724-32.

Doser TA, Turdi S, Thomas DP, Epstein PN, Li SY, Ren J. Transgenic overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 rescues chronic alcohol intake-induced myocardial hypertrophy and contractile dysfunction. *Circulation*. 2009;119(14):1941-9.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991;11(1):81-128.

Fernandez E, Koek W, Ran Q, Gerhardt GA, France CP, Strong R. Monoamine metabolism and behavioral responses to ethanol in mitochondrial aldehyde dehydrogenase knockout mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2006;30(10):1650-8.

Ferreira JC, Bacurau AV, Evangelista FS, Coelho MA, Oliveira EM, Casarini DE, et al. The role of local and systemic renin angiotensin system activation in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(1):R26-32.

Ferreira JC, Boer BN, Grinberg M, Brum PC, Mochly-Rosen D. Protein quality control disruption by pkcbetaⁱⁱ in heart failure; rescue by the selective pkcbetaⁱⁱ inhibitor, betaⁱⁱv5-3. *PloS One*. 2012;7(3):e33175.

Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2012;76(1):15-21.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2007;34(8):760-5.

Fu SH, Zhang HF, Yang ZB, Li TB, Liu B, Lou Z, et al. Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2014;387(1):87-94.

Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012;2012:428010.

Ge W, Guo R, Ren J. Amp-dependent kinase and autophagic flux are involved in aldehyde dehydrogenase-2-induced protection against cardiac toxicity of ethanol. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011;51(9):1736-48.

Gong D, Zhang Y, Zhang H, Gu H, Jiang Q, Hu S. Aldehyde dehydrogenase-2 activation during cardioplegic arrest enhances the cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Toxicology*. 2012;12(4):350-8.

Gu C, Xing Y, Jiang L, Chen M, Xu M, Yin Y, et al. Impaired cardiac sirt1 activity by carbonyl stress contributes to aging-related ischemic intolerance. *PloS One*. 2013;8(9):e74050.

Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012;16(11):1323-67.

Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on fe(iii)xylene orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;19(3):271-80.

Hernandez-Resendiz S, Buelna-Chontal M, Correa F, Zazueta C. Targeting mitochondria for cardiac protection. *Current Drug Targets*. 2013;14(5):586-600.

Houglum K, Filip M, Witztum JL, Chojkier M. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *The Journal of Clinical Investigation*. 1990;86(6):1991-8.

Hui P, Nakayama T, Morita A, Sato N, Hishiki M, Saito K, et al. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: Aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2007;30(7):585-92.

Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*. 2007;87(4):1175-213.

Hummel SL, Pauli NP, Krumholz HM, Wang Y, Chen J, Normand SL, et al. Thirty-day outcomes in Medicare patients with heart failure at heart transplant centers. *Circulation Heart Failure*. 2010;3(2):244-52.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circulation Research*. 2000;86(2):152-7.

Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of Surgery*. 1954;140(5):675-82.

Kaplan P, Tatarkova Z, Racay P, Lehotsky J, Pavlikova M, Dobrota D. Oxidative modifications of cardiac mitochondria and inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*. 2007;12(5):211-8.

Kotraiah V, Pallares D, Toema D, Kong D, Beausoleil E. Identification of aldehyde dehydrogenase 1a1 modulators using virtual screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2013;28(3):489-94.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009;47(4):333-43.

Koyama H, Nojiri H, Kawakami S, Sunagawa T, Shirasawa T, Shimizu T. Antioxidants improve the phenotypes of dilated cardiomyopathy and muscle fatigue in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Molecules*. 2013;18(2):1383-93.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*. 2007;87(1):99-163.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9782-7.

Liu L, Eisen HJ. Epidemiology of heart failure and scope of the problem. *Cardiology Clinics*. 2014;32(1):1-8, vii.

Lumini-Oliveira J, Magalhaes J, Pereira CV, Moreira AC, Oliveira PJ, Ascensao A. Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia. *Mitochondrion*. 2011;11(1):54-63.

Masi LN, Rodrigues AC, Curi R. Fatty acids regulation of inflammatory and metabolic genes. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2013;16(4):418-24.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 1969;244(22):6049-55.

Montera. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*. 2009; 93(1 supl.1):1-70.

Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, et al. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*. 2002;105(24):2867-71.

Ning S, Budas GR, Churchill EN, Chen CH, Knox SJ, Mochly-Rosen D. Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice. *Radiation Research*. 2012;178(1):69-74.

Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature Protocols*. 2008;3(9):1422-34.

Pelikka PA, Douglas PS, Miller JG, Abraham TP, Baumann R, Buxton DB, et al. American society of echocardiography cardiovascular technology and research summit: A roadmap for 2020. *Journal of the American Society of Echocardiography : Official Publication of the American Society of Echocardiography*. 2013;26(4):325-38.

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2010;17(2):159-64.

Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004;37(7):937-45.

Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2009;20(7):332-40.

Raza H, John A. 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione s-transferase a4-4 and cytochrome p450 2e1 in pc12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006;216(2):309-18.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiological Genomics*. 2007;29(3):246-52.

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(6):1072-83.

Savergnini SQ, Ianzer D, Carvalho MB, Ferreira AJ, Silva GA, Marques FD, et al. The novel mas agonist, cgen-856s, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PloS One*. 2013;8(3):e57757.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica 2012 [cited 2014 Fev 15]. Available from: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2012/Diretriz%20IC%20Cr%C3%B4nica.pdf>.

Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP. The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *International Journal of Cardiology*. 2014;171(2):134-43.

Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Vakevainen S, Wang XD. Alcohol and Cancer. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2001;25(5 Suppl ISBRA):137S-43S.

Solito R, Corti F, Chen CH, Mochly-Rosen D, Giachetti A, Ziche M, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents beta-amyloid-induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis. *Journal of Cell Science*. 2013;126(Pt 9):1952-61.

Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Aldh2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. *Science Translational Medicine*. 2011;3(107):107ra11.

Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009;46(9):1283-97.

Tahir M, Sultana S. Chrysin modulates ethanol metabolism in wistar rats: A promising role against organ toxicities. *Alcohol and Alcoholism*. 2011;46(4):383-92.

Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, Kojima S, Yasuno S, Baba T, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in japanese men. *Hypertension research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2002;25(5):677-81.

Tanaka H. Advances in cancer epidemiology in japan. *International journal of cancer Journal International du Cancer*. 2014;134(4):747-54.

Tang WR, Yu CY, Yeh SJ. Fatigue and its related factors in patients with chronic heart failure. *Journal of Clinical Nursing*. 2010;19(1-2):69-78.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(6):H2181-90.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the Failing Heart. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1813(7):1360-72.

Wang B, Wang J, Zhou S, Tan S, He X, Yang Z, et al. The association of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (aldh2) polymorphism with susceptibility to late-onset alzheimer's disease in chinese. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008;268(1-2):172-5.

Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Research in Cardiology*. 1994;89(5):397-410.

World Health Organization. Cardiovascular diseases prevention and control missed opportunities: [cited 2014 Feb 15]. Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en/.

Xu F, Chen Y, Lv R, Zhang H, Tian H, Bian Y, et al. Aldh2 genetic polymorphism and the risk of type ii diabetes mellitus in cad patients. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2010;33(1):49-55.

Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochimica Polonica*. 2003;50(2):319-36.

Zhang B, Zhang Y, La Cour KH, Richmond KL, Wang XM, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase obliterates endoplasmic reticulum stress-induced cardiac contractile dysfunction via correction of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1832(4):574-84.

Zhang Y, Babcock SA, Hu N, Maris JR, Wang H, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (aldh2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: Role of gsk3beta and mitochondrial function. *BMC Medicine*. 2012;10:40.