VANESSA MORAIS LIMA

PAPEL DA MUTAÇÃO ALDH2*2 NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ALDA-1

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

São Paulo
2016

VANESSA MORAIS LIMA

PAPEL DA MUTAÇÃO ALDH2*2 NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ALDA-1

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira.

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lima, Vanessa Morais
Papel da mutação ALDH2*2 na insuficiência cardíaca: potencial terapêutico da Alda-1 / Vanessa Morais Lima; orientador Julio Cesar Batista Ferreira. -- São Paulo, 2016.
88 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ALDH2. 2. Mutação ALDH2*2. 3. Insuficiência cardíaca. 4. Metabolismo mitocondrial. 5. Alda-1. I. Ferreira, Julio Cesar Batista, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Morais Lima

Título da Tese: Papel da mutação ALDH2*2 na insuficiência cardíaca: potencial terapêutico da Alda-1

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 **181** nas fls. **139** do livro **02** para uso de animais em Aula, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Júlio Cesar Batista Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Papel da mutação ALDH2*2 na insuficiência cardíaca: potencial terapêutico da Alda-1"* do qual participam o(s) aluno(s), **Vanessa Morais Lima, Kátia Sampaio,** 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 **11.12.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 12 de dezembro de 2012.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha avó Iolita (*in memoriam*) por seus abraços gostosos,
sorrisos carinhosos e amor incondicional.
Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter me dado sabedoria, força, paciência e grandes oportunidades. Ser cientista me fez entender um pouco mais a forma perfeita como o Senhor criou todas as coisas.

Aos primeiros responsáveis por tudo isto, Reginaldo Lima e Neusa Morais, os melhores pais que Deus poderia me dar. Obrigado pelo empenho na minha educação, pelos valores passados e por tantas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que eu pudesse sonhar os meus. Ao meu irmão Lázaro Vinícius que com amor sempre esteve na torcida e no incentivo. À toda a minha família, tios e primos, em nome do meu avô paterno Joaquim e da minha avó materna Iolita (quem nos deixou no início desse doutorado e que faz imensa falta). Este título é nosso! Perdoem-me pela ausência em tantos momentos importantes em nossa família, a dedicação para conclusão deste trabalho foi a maneira que encontrei de dizer obrigado por tudo. A distância destes anos me fez entender que vocês são meus maiores tesouros. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Julio Ferreira, agradeço imensamente pela oportunidade concedida. Muito obrigada pelos ensinamentos durante esses 4 anos. Sou eternamente grata por ter contribuído para o meu amadurecimento científico, humano e profissional. Obrigado por abrir as portas do laboratório e permitir que o LiSB (Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos) se tornasse minha segunda casa, por vezes a primeira.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração pela colaboração na realização dos exames ecocardiográficos, em especial ao Leonardo Jensen e ao Rafael Dariolli pela prontidão, disposição e por tornarem as longas tardes/noites de exames mais divertidas.

À Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração, em especial ao técnico Leandro Ezequiel de Souza pela grande colaboração em realizar as cirurgias de infarto nos animais.

À Dra. Daria Mochly-Rosen da Universidade de Stanford CA-EUA por ter gentilmente cedido os camundongos mutantes ALDH2*2 para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum, ao Prof. Dr. Jackson Bittencourt e à Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara por sempre tornar seus laboratórios disponíveis para o nosso uso.

Aos meus companheiros e amigos do LiSB por estarem presentes no dia-a-dia de trabalho: Cintia Ueta, Juliane Campos, Kátia Gomes, Laís Domingues, Ligia Kiyuna, Luiz Bechara, Luiz Bozi, Maíra Fresqui, Márcio Ribeiro, Ricardo Bandeira e Rudá Prestes. Obrigada pelo companheirismo, apoio na realização dos experimentos e amizade cativada durante esse período. Com os seus jeitos únicos e especiais, vocês contribuíram muito para o meu crescimento. Pois a colaboração de cada um de vocês foi fundamental para que essa tese pudesse ser concluída com êxito. Em especial, ao Márcio Ribeiro, a pessoa que escolhi compartilhar sonhos e planos, obrigada pelo apoio, amizade e amor.

Aos amigos LBCAF, porque “uma vez LBCAF, sempre LBCAF”. Primeiramente ao Prof. Dr. Renato Chopard (*in memoriam*) por quem tenho uma gratidão e admiração enorme e à Profa. Dra. Maria Luiza por sempre me abrir as portas do laboratório, com equipamentos, reagentes e conselhos sempre disponíveis, obrigada por terem sido os primeiros a me acolher em São Paulo, na família LBCAF. Um agradecimento especial ao meu grande amigo e agora doutor Ivson Silva, pelos anos de amizade, por fazer parte do mestrado e principalmente do doutorado, obrigada por me ajudar em cada experimento e por fazer minha vida de pós-graduanda mais leve e divertida. Você tem total participação nesse trabalho, muito obrigada! Agradeço, ainda, às três outras grandes amizades que o LBCAF me deu pra vida toda, Ana Paula Takano, Caroline Emy e Caroline Lino, obrigada pelo apoio, pelos jantares, pelos risos e choros, mas principalmente, por estarem sempre presentes!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, em nome de sua coordenadora Prof. Dra. Elen Miyabara, pela oportunidade de cursar o Doutorado. À secretária Patrícia Campos por sua atenção e disponibilidade. Aos bioteristas por seu essencial trabalho, em especial ao Renivaldo de Souza por cuidar dos camundongos. À Marta Righetti, à Sônia Yokomizo e ao Sebastião Boleta, profissionais do Laboratório de Histologia pela disponibilidade e competência durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos professores do programa, em especial os quais eu tive oportunidade de ser monitor do PAE (Programa de

Aprimoramento ao Ensino) e à todos os professores que ministraram aulas nas disciplinas que cursei. Aos amigos do programa de Ciências Morfofuncionais Camila Moreno, Diego Cury, Igor Baptista, Ismael Cabral, João Guilherme, Miguel Lima, Miguel Rangel, Nathalia Senger e Tábata Leal.

Agradeço em especial aos meus cookies amados: Ivson Silva, Manuela Miranda, Marília Bianca, Marina Silveira e Milena Freitas. Que bom que através da pós-graduação Deus me presenteou com essas amizades. Muito obrigada por todos esses anos de amizade, por cada café científico, por estarem sempre por perto e por fazerem minha vida no departamento e em São Paulo mais divertida e cheia de amor.

Às professoras presentes na qualificação Profa. Dra. Silvia Lacchini, Profa. Dra. Cecília Ferreira e Profa. Dra. Eliana Akamine, suas considerações foram de extrema importância para o resultado final deste trabalho.

Às instituições de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por terem nos concedido auxílio financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento deste estudo e diversos projetos do nosso laboratório.

À todos os que me auxiliaram neste trabalho cujos nomes, por ventura, foram omitidos, os meus sinceros agradecimentos.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”
Leonardo da Vinci

RESUMO

Lima, VM. Papel da mutação ALDH2*2 na insuficiência cardíaca: potencial terapêutico da Alda-1. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), localizada na matriz mitocondrial, é crucial na manutenção da viabilidade celular. Seu principal papel é metabolizar aldeídos reativos produzidos durante o estresse oxidativo. Recentemente demonstramos que a inibição farmacológica da ALDH2 resulta em acúmulo de aldeídos citotóxicos e maior dano ao miocárdio frente estresse isquêmico. Atualmente, estima-se que 8% da população mundial (~600 milhões de pessoas) apresentam uma mutação pontual no gene da ALDH2 (E487K) que confere perda de até 95% na sua atividade enzimática. Baseado nisso, o nosso objetivo foi avaliar o impacto da redução da atividade catalítica da ALDH2 decorrente da mutação E487K no metabolismo cardíaco basal e com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio; e o papel da ativação sustentada da ALDH2 com a Alda-1 sobre esse fenótipo. Para isso, avaliamos o consumo de oxigênio e liberação de H_2O_2 em mitocôndrias cardíacas isoladas de camundongos selvagens e ALDH2*2 mutantes (*knock-in* portadores da mutação E487K no gene da ALDH2) em heterozigose e homozigose. Ainda, avaliamos, por ecocardiografia, se os animais mutantes são mais suscetíveis aos danos metabólicos oriundos do infarto do miocárdio. Em nossos resultados, observamos que os animais mutantes possuem a atividade e a expressão proteica da ALDH2 reduzidas comparadas ao WT, 44% no heterozigoto e 75% no homozigoto. Vimos também, que os animais com a mutação ALDH2*2, tanto em heterozigose, quanto em homozigose, desenvolvem disfunção cardíaca e remodelamento ventricular equivalente ao animal selvagem após infarto do miocárdio. Porém, os animais com a mutação E487K possuem uma significante redução no consumo de oxigênio máximo (medido indiretamente em teste físico até a exaustão) e em mitocôndria cardíaca isolada, quando comparados aos animais selvagens dentro do grupo controle. Entretanto, a mitocôndria desses animais não parece estar disfuncional, respondendo com menor liberação de peróxido de hidrogênio e maior consumo de O_2 que os animais WT quando infartados. Além disso, o tratamento sustentado com a molécula ativadora específica da ALDH2 (Alda-1) durante 6 semanas aumenta a atividade da ALDH2, que remove de forma mais eficiente os aldeídos tóxicos, restaurando a função cardíaca dos animais infartados, independente do genótipo. Baseado nisso, 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 da ALDH2 é suficiente para atenuar danos causados pela insuficiência cardíaca.

Palavras-chave: ALDH2. Mutação ALDH2*2. Insuficiência cardíaca. Metabolismo mitocondrial. Alda-1.

ABSTRACT

Lima, VM. Role of ALDH2*2 mutation in heart failure: therapeutic potencial of Alda-1. [Ph.D. Thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), located in the mitochondrial matrix, is critical for the maintenance of cellular redox balance by removing reactive aldehydes produced during oxidative stress. We recently reported that pharmacological inhibition of ALDH2 results in accumulation of cytotoxic aldehydes and increased myocardial damage during ischemic stress. Currently, it is estimated that 8% of the world population have a point mutation in the ALDH2 gene (E487K) which reduces its enzymatic activity by 95%. Based on this we aim to assess the impact of the E487K variant of ALDH2 on cardiac mitochondrial metabolism during myocardial infarction-induced heart failure; and the role of the sustained activation of ALDH2 using Alda-1. We evaluated the oxygen consumption and H_2O_2 release using cardiac mitochondria isolates from wild-type (WT), heterozygous and homozygous ALDH2 E487K knock-in mice. We also evaluated whether ALDH2 E487K knock-in mice are more prone to develop cardiac dysfunction after myocardial infarction. Our results show that mice carrying the ALDH2 variant have reduced ALDH2 activity and protein levels compared to WT mice. Despite of reduced oxidative metabolism, animals with ALDH2 mutation develop cardiac dysfunction and ventricular remodeling equivalent to WT animals after myocardial infarction. Finally, sustained Alda-1 treatment (ALDH2 activator) during 6 weeks improved cardiac function of infarcted animals, regardless of genotype. Alda-1 treatment was effective in normalizing both mitochondrial respiration and reactive oxygen species in WT animals after cardiac dysfunction, with no impact on mutant mice. In conclusion, our findings unravel a critical role for ALDH2 activation against myocardial infarction-induced ventricular dysfunction in mice.

Keywords: ALDH2. ALDH2*2 mutation. Heart failure. Mitochondrial metabolism. Alda-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons com formação e remoção de EROS. A cadeia respiratória transporta os elétrons dos substratos do complexo I (Mal = Malato e Glut = Glutamato) ou complexo II (Succ = succinato), adquiridos do NADH ou $FADH_2$, para a coenzima Q, complexo III, citocromo c (Cyt c) e o complexo IV, onde o oxigênio molecular é reduzido à H_2O. E a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP, pelo retorno de prótons pelo complexo V. No entanto, os elétrons podem escapar, formando o ânion superóxido (O_2^-), este por sua vez, é transformado em H_2O_2 pela MnSOD (Superóxido dismutase – cofator manganês). O H_2O_2 pode ser transformado em H_2O e O_2 pela catalase (Cat) ou pela glutationa peroxidase/tiredoxina peroxidase (GPx/TPx) com oxidação da glutationa/tioredoxina (GSH/TSH). A glutationa ou tioredoxina oxidadas (GSSG/TSST) podem ser reconvertidas a GSH/TSH pelas glutationa ou tioredoxina redutases (GR ou TR), que utilizam os estoques de NADPH como fonte de elétrons. Se o H_2O_2 não for reduzido à H_2O, ele pode se difundir pela membrana, se acumular na mitocôndria, ou ainda, pode gerar o radical hidroxila (OH) pela reação de Fenton. (Fonte: Lima, 2016; adaptado de Facundo, 2007; Tahara *et al.*, 2009) 25

Figura 2 - Estrutura cristalográfica da enzima ALDH2 WT selvagem, ALDH2*2 mutante e da ALDH2*2 mutante com a molécula ativadora Alda-1.....29

Figura 3 - Esquema ilustrativo da hipótese deste estudo. A mutação ALDH2*2 faz com que a atividade da ALDH2 reduza em até 95%, o que leva ao acúmulo de 4-HNE e maior formação de adutos de Michaelis entre 4-HNE e proteínas. O aumento da formação dos adutos de Michaelis resulta em disfunção mitocondrial, colapso/morte celular, e consequentemente, agravamento da IC. O tratamento crônico com a Alda-1, molécula ativadora da ALDH2, resultará na maior remoção do 4-HNE e melhora da viabilidade celular e função cardíaca. (Fonte: Lima, 2016).....32

Figura 4 - Desenho experimental. Infarto do miocárdio, período de tratamento com Alda-1 e medidas com 4 e 10 semanas após a cirurgia de infarto. 35

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na medida do consumo de O_2 em mitocôndria isolada. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Posteriormente avaliamos o consumo máximo de oxigênio induzido pela adição de ADP. Em seguida, medimos o consumo de oxigênio na presença de oligomicina (inibidor do complexo V). Por fim, avaliamos o consumo de oxigênio na presença de FCCP, um desacoplador mitocondrial. Ressalto que a redução dos níveis de oxigênio na câmara é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio mitocondrial.....43

Figura 6 - Esquema ilustrativo da liberação de H_2O_2 em mitocôndria isolada. A medida basal é feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e

mitocôndria. Quando adicionamos ADP ocorre uma aceleração da cadeia respiratória, menor escape de elétrons e menor produção de espécies reativas. Já quando colocamos oligomicina, bloqueamos síntese de ATP tendo uma diminuição na respiração e um acúmulo de elétrons, possibilitando maior escape e maior formação de espécies reativas. Posteriormente, adicionando FCCP, que é um desacoplador da membrana mitocondrial, ocorre uma aceleração da entrada de prótons levando ao consumo máximo de oxigênio, menor possibilidade de liberação de elétrons e diminuição da formação de H_2O_2. 44

Figura 7 - Atividade da ALDH2 (A) no coração e no fígado. Expressão proteica da ALDH2 (B). Expressão proteica da ALDH1A1 (C). *Western blotting* representativo da ALDH2, ALDH1A1 e seus normalizadores VDAC e GAPDH, respectivamente (D). Expressão gênica da ALDH2 (E). Expressão gênica da ALDH1A1 (F). Em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05; * vs WT, # vs *1/*2, número de animais expresso entre parênteses. 50

Figura 8 - Aldeídos cardíacos. Acetaldeído (A). Formaldeído (B). Hexanal (C). 4-hidroxi-hexanal (D). Pentanal (E). Acroleína (F). Expressão proteica da formação de adutos 4-hidroxi-2-nonenal-proteína (G). *Western blotting* representativo dos adutos 4-HNE-proteína e normalizador VDAC (H), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses. 52

Figura 9 - Glutationa total (A). Glutationa reduzida (GSH) (B). Glutationa oxidada (GSSG) (C). Razão glutationa reduzida/oxidada (GSH/GSSG) (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses. 53

Figura 10 - Mitocôndria cardíaca. Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e estado desacoplado (FCCP) (D). Liberação de H_2O_2 no Estado 2 (E), Estado 3 (F), Estado 4 (G) e estado desacoplado (FCCP) (H). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (I), Estado 3 (J), Estado 4 (K) e estado desacoplado (FCCP) (L), em camundongos WT (selvagem), 2/*1 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses. 55

Figura 11 - Mitocôndria hepática. Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e estado desacoplado (FCCP) (D). Liberação de H_2O_2 no Estado 2 (E), Estado 3 (F), Estado 4 (G) e estado desacoplado (FCCP) (H). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (I), Estado 3 (J), Estado 4 (K) e estado desacoplado (FCCP) (L), em camundongos WT (selvagem), 2/*1 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses. 56

Figura 12 - Complexos mitocondriais I (A), IV (B) e V (C) avaliados em lisado total de coração. *Western blotting* representativo dos complexos I (NDUFA9), IV (COX IV) e V (ATP5A) e o normalizador Beta actina (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, número de animais expresso entre parênteses.....57

Figura 13 - Sobrevida (A). Fração de encurtamento (FS) (B). Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (C). Diâmetro do cardiomiócito (D). Colágeno total (E). Consumo de oxigênio (VO_2) (F). Distância máxima percorrida (G), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, número de animais expresso entre parênteses. 59

Figura 14 - Atividade da ALDH2 cardíaca (A). Expressão proteica da ALDH2 (B). Expressão proteica da ALDH1A1 (C). *Western blotting* representativo da ALDH2, ALDH1A1 e seus normalizadores VDAC e GAPDH, respectivamente (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05. * vs WT ctrl, # vs *1/*2 ctrl, & vs IC e Traço vs WT, número de animais expresso entre parênteses.....61

Figura 15 - Sobrevida (A). Fração de encurtamento (FS) (B). Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (C). Consumo de oxigênio (VO2) (D). Distância máxima percorrida (E). Diâmetro do cardiomiócito (F). Colágeno total (G), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto), nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, Traço vs ctrl, * vs WT ctrl, número de animais expresso entre parênteses.....63

Figura 16 - Contratilidade do sarcômero e transiente de cálcio dos cardiomiócitos isolados estimulados com 1Hz e 5Hz de frequência. Amplitude de contração do sarcômero (A). Velocidade máxima de contração do sarcômero (+dL/dt) (B). Velocidade máxima de relaxamento do sarcômero (-dL/dt) (C). Amplitude do pico de cálcio (D). Velocidade de liberação do cálcio (E). Velocidade de captação do cálcio (F), em camundongos WT (selvagem) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, * vs WT, # vs Ctrl & vs IC Alda-1. 65

Figura 17 - Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (basal) (A) e Estado 3 (máximo após ADP) (B). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (C) e Estado 3 (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto), nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT ctrl, $ vs WT IC, # vs WT IC Alda-1, e & vs *2/*2 ctrl, número de animais expresso entre parênteses. 67

Figura 18 - *Heat map* da expressão proteica dos adutos 4-hidroxi-2-nonenal-proteína (A). Quantificação dos adutos 4-HNE-proteína nos animais WT (B), mutantes heterozigotos (C) e mutantes homozigotos (D). *Western blotting* representativo dos adutos 4-HNE-proteína e o normalizador VDAC (E), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs ctrl, # vs IC Alda-1 e & vs IC, número de animais expresso entre parênteses. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais..... 34

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por Western Blotting 47

Tabela 3 - Lista dos primers utilizados para análise de expressão gênica por qtPCR 47

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNA – Ácido 4-hidroxi-2-nonenóico

4-HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

***1/*2 –** Mutante ALDH2*1/*2 heterozigoto

***2/*2 –** Mutante ALDH2*2/*2 homozigoto

ADF – Área diastólica final

ADP – Adenosina difosfato

Alda-1 – *Aldehyde dehydrogenase activator 1*

ALDH – Aldeído desidrogenase

ALDH1A1 – Aldeído desidrogenase 1A1

ALDH2 – Aldeído desidrogenase 2

ALDH2*2 – Aldeído desidrogenase mutante

ASF – Área sistólica final

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

$CaCl_2$ – Cloreto de cálcio

COX 4 – Citocromo c oxidase 4

Ctrl – Controle

Cys – Cisteína

DdVE – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

+dL/dt – Velocidade de contração

-dL/dt – Velocidade de relaxamento

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DsVE – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

E487K – Troca do ácido glutâmico (E) por uma lisina (K) na região 487 da ALDH2

EF – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

EGTA – ácido etilenodiaminotetracético de etilenoglicol

FAC – Área fracional

FC – Frequência Cardíaca

FCCP - Carbonildiciano-P-trifluoro-metoxifenil-hidrazona

FS – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

GAPDH – Gliceradeído-3-fosfato desidrogenase

Glu – Ácido glutâmico

Glut1 – Transportador tipo 1 de glicose

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa oxidada

H^+ – Hidrogênio

H_2O – Água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

Hif1a – Hipóxia induzida fator-1alfa

Hk2 – Hexoquinase 2

HPRT – Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase

IC – Insuficiência cardíaca

IC Alda-1 – Insuficiência cardíaca tratado com Alda-1

KCL – Cloreto de potássio

KH2PO4 – Fosfato de potássio monobásico

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio

MnSOD – Superóxido dismutase manganês mitocondrial

NaCl – Cloreto de sódio

NAD(P) – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)

NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) reduzida

NaH_2PO_4 – Fosfato de sódio monobásico

LDHa – Lactato desidrogenase A

Lys – Lisina

O_2 – Oxigênio

O_2^- – Ânion superóxido

OH – Hidroxila

OH^- – Radical Hidroxila

PAS – Pressão arterial sistólica

PC – Peso corporal

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDB – *Protein data bank*

PDK1 – Piruvato desidrogenase quinase isoenzima 1

Pi – Fosfato inorgânico

PPVEd – Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole

PPVEs – Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole

SIVd – Septo interventricular na diástole

SIVs – Septo interventricular na sístole

SOD – Superóxido dismutase

TD – Tempo de desaceleração

TRIV – Tempo de relaxamento isovolumétrico

VDAC – Canal aniônico voltagem dependente

VE – Ventrículo esquerdo

WT – Selvagem (*Wild type*)

Unidades

λem - Absorbância emissão

λex - Absorbância excitação

Abs - Absorbância

bpm - Batimento por minuto

ºC - Grau(s) Celsius

KDa - Quilodalton

mmHg - Milímetros de mercúrio

MHz - Megahertz

Hz - Hertz

m - Metro

mm - Milímetro

µm - Micrômetro

nm - Nanômetro

Kg - Quilograma

g - Grama

mg - Miligrama

µg - Micrograma

M - Molar

mM - Milimolar

µM - Micromolar

l - Litro

ml - Mililitro

µl - Microlitro

h - Hora

min - Minuto

seg - Segundo

ms - Milissegundo

pH - Potencial hidrogêniônico

% - Porcentagem

U - Unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23
1.1 Insuficiência cardíaca 23
1.2 Bioenergética mitocondrial 24
1.3 Disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca 26
1.4 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) e mutação ALDH2*2 28
2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA 31
3 OBJETIVO 33
4 MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1 Material 34
4.1.1 Grupos experimentais 34
4.1.2 Desenho experimental 34
4.2 Métodos 35
4.2.1 Genotipagem 35
4.2.2 Cirurgia de indução do infarto do miocárdio 36
4.2.3 Tratamento com Alda-1 36
4.2.4 Medidas cardiovasculares 36
4.2.5 Avaliação da função ventricular in vivo 37
4.2.6 Teste de tolerância ao esforço 38
4.2.7 Consumo de oxigênio basal (VO_2) 39
4.2.8 Eutanásia e coleta de tecidos 39
4.2.9 Avaliação morfométrica cardíaca 39
4.2.10 Isolamento dos cardiomiócitos 40
4.2.11 Ensaio de contratilidade do cardiomiócito isolado 41
4.2.12 Avaliação do transiente de cálcio no cardiomiócito isolado 41
4.2.13 Avaliação do metabolismo mitocondrial cardíaco 42
4.2.14 Atividade da enzima ALDH2 44
4.2.15 Avaliação do estado redox da Glutationa 44
4.2.16 Extração e derivatização dos aldeídos cardíacos 45
4.2.17 Análise da expressão de proteínas 46
4.2.18 Análise da expressão de gênica 47

4.2.19 Análise estatística 48
5 RESULTADOS 49
5.1 Etapa 1: Caracterização do fenótipo dos animais (saudáveis) com a mutação dominante negativa E487K para a ALDH2 49
5.2 Etapa 2: Os animais com a mutação E487K são mais suscetíveis ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca? E o tratamento com Alda-1 é capaz de reverter/minimizar os efeitos deletérios do infarto do miocárdio? 60
6 DISCUSSÃO 71
7 CONCLUSÃO 76
REFERÊNCIAS 77
APÊNDICE 84
A - MATERIAL SUPLEMENTAR 84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência cardíaca

Segundo a Organização Mundial de Saúde as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no mundo. A estimativa em 2012 foi de que a cada ano, 17,5 milhões de pessoas morrem por essas doenças, representando 31% de todas as mortes. Dentre as doenças cardiovasculares, a doença isquêmica cardíaca, como o infarto agudo do miocárdio, é a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2014).

A insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares, atingindo 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, sendo que 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 (SBC, 2012).

A IC é caracterizada pela incapacidade dos ventrículos em bombear quantidades adequadas de sangue para manter a perfusão tecidual (Colucci, 1998). Essa síndrome era descrita, na década de 70, como um distúrbio hemodinâmico associado à redução do débito cardíaco, com consequente baixo fluxo renal, levando à retenção de sódio, água e o surgimento de edemas periféricos e pulmonares que acabavam por levar o paciente ao óbito. Atualmente, a IC é vista como uma doença sistêmica. Quando o débito cardíaco é reduzido após agressão miocárdica, sistemas neuro-humorais (sistema nervoso simpático e sistema renina angiotensina) são ativados com o objetivo de desencadear respostas compensatórias (taquicardia, aumento da contratilidade miocárdica, hipertrofia cardíaca e remodelamento cardíaco) e preservar a homeostase cardiovascular (Fiorelli et al., 2008; Poyton, Ball, Castello, 2009). Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena sustentada de neuro-hormônios parece exercer papel deletério e crucial no estabelecimento/desenvolvimento da IC, pelo aumento da sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída. Além disso, a hiperativação neuro-humoral sustentada resulta no aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio e da resistência vascular (Chen, Niki, 2006). Por fim, os

neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas já existentes, ocasionando o aparecimento de arritmias cardíacas (Liu, O'Rourke, 2009).

Em detrimento a hiperativação de fatores neuro-humorais, a progressão da IC é caracterizada por uma série de anormalidades celulares. Uma das alterações celulares mais marcantes na IC é a disfunção mitocondrial, que é normalmente acompanhada pelo estresse oxidativo e seus efeitos deletérios (Tsutsui, Kinugawa, Matsushima, 2011). 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, Matsushima, 2011; Ventura-Clapier et al., 2011).

1.2 Bioenergética mitocondrial

A mitocôndria é conhecida como a central energética celular, uma vez que processos como beta-oxidação, Ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa ocorrem em seu interior (Mitchell, Moyle, 1967). A mitocôndria também é local de outras importantes reações metabólicas, incluindo o ciclo da ureia, o metabolismo lipídico e a síntese de aminoácidos, hormônios e outras moléculas envolvidas na sinalização intracelular (Brookes et al., 2004). Inclusive, já é sabido, que as mitocôndrias possuem participação na regulação direta de processos como apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular (Antico Arciuch et al., 2012; Ott et al., 2007).

A síntese de ATP mitocondrial ocorre por meio do acoplamento da fosforilação oxidativa à cadeia de transporte de elétrons. O gradiente eletroquímico de prótons gerado durante o transporte de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons é utilizado na conversão de ADP (adenosina difosfato) + Pi (fosfato inorgânico) em ATP pelo complexo ATP-sintase (complexo V) (Mitchell, Moyle, 1967). Praticamente toda a energia disponível a partir da oxidação de carboidratos, gorduras e outros substratos é inicialmente armazenada na forma de elétrons de alta energia, provenientes da dissociação dos átomos de hidrogênio em prótons e elétrons, que são transferidos para o O_2 através de uma série de complexos proteicos.

A cadeia respiratória transporta elétrons dos complexo I (malato-NADH) ou complexo II (succinato-FADH2) para os complexos III e IV, onde o oxigênio é

reduzido a H_2O. Nesse processo, elétrons podem extravasar para o espaço intermembranar mitocondrial e reagir com o O_2, formando ânion superóxido (O_2^-). Este por ação da superóxido desmutase mitocondrial (MnSOD), que tem como cofator o manganês é transformado em H_2O_2. O H_2O_2 pode difundir pela membrana ou se acumular na mitocôndria, onde pode ser transformado em H_2O e O_2 pela ação da catalase ou pela oxidação da glutationa peroxidase/tioredoxina peroxidase, utilizando os estoques de NAD(P)H como fonte de elétrons. Se esse sistema não for eficaz e o H_2O_2 se acumular, pode ser gerado o radical hidroxila (OH) que é um dos mais reativos dentre as espécies reativas (Facundo, 2007; Kowaltowski et al., 2009) (Figura 1).

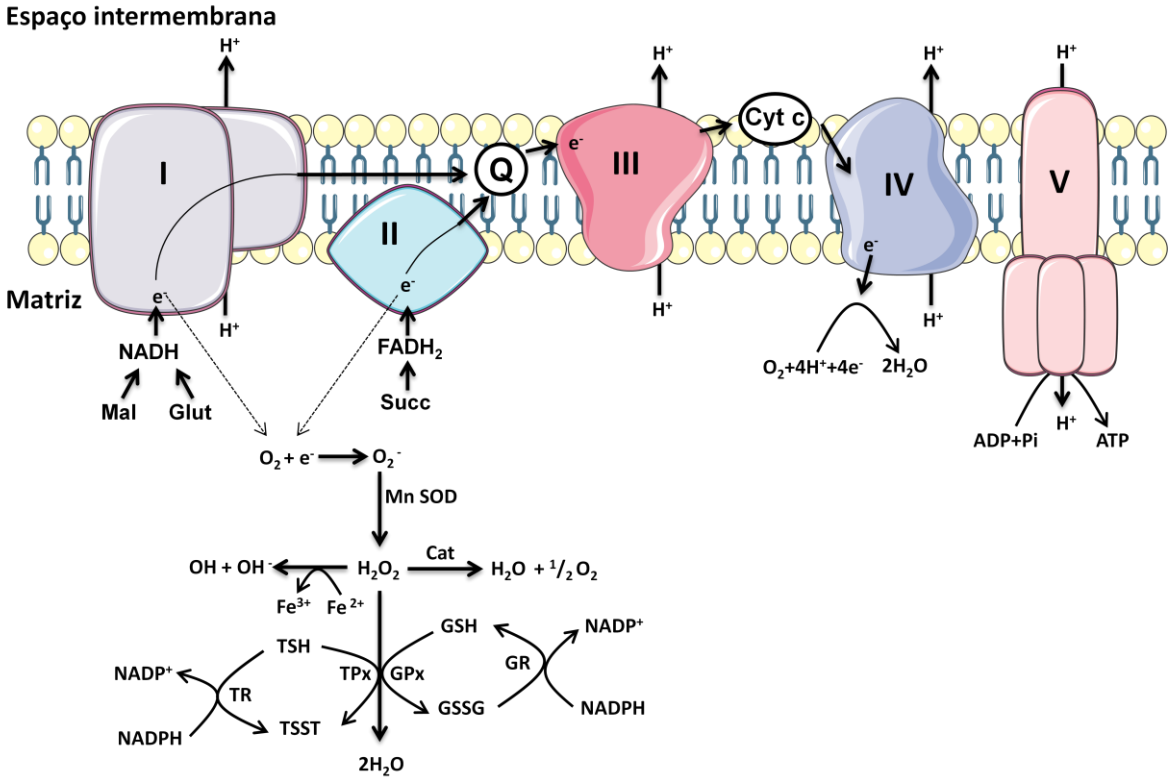

Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons com formação e remoção de EROS. A cadeia respiratória transporta os elétrons dos substratos do complexo I (Mal = Malato e Glut = Glutamato) ou complexo II (Succ = succinato), adquiridos do NADH ou $FADH_2$, para a coenzima Q, complexo III, citocromo c (Cyt c) e o complexo IV, onde o oxigênio molecular é reduzido à H_2O. E a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP, pelo retorno de prótons pelo complexo V. No entanto, os elétrons podem escapar, formando o ânion superóxido (O_2^-), este por sua vez, é transformado em H_2O_2 pela MnSOD (Superóxido dismutase – cofator manganês). O H_2O_2 pode ser transformado em H_2O e O_2 pela catalase (Cat) ou pela glutationa peroxidase/tiredoxina peroxidase (GPx/TPx) com oxidação da glutationa/tioredoxina (GSH/TSH). A glutationa ou tioredoxina oxidadas (GSSG/TSST) podem ser reconvertidas a GSH/TSH pelas glutationa ou tioredoxina redutases (GR ou TR), que utilizam os estoques de NADPH como fonte de elétrons. Se o H_2O_2 não for reduzido à H_2O, ele pode se difundir pela membrana, se acumular na mitocôndria, ou ainda, pode gerar o radical hidroxila (OH) pela reação de Fenton. (Fonte: Lima, 2016; adaptado de Facundo, 2007; Tahara, Navarete, Kowaltowski, 2009)

A produção exacerbada das diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio decorrente da disfunção mitocondrial tem sido considerada essencial na geração e propagação do dano celular que resulta no estabelecimento e agravamento das doenças cardiovasculares (Palaniyandi et al., 2010).

1.3 Disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca

Diversas evidências têm mostrado que a disfunção mitocondrial está relacionada com doenças degenerativas, como Alzheimer, Parkinson (Abramov et al., 2011; Young-Collier, McArdle, Bennett, 2012) e insuficiência cardíaca (Abel, Doenst, 2011; Tsutsui, Kinugawa, Matsushima, 2011; Ventura-Clapier et al., 2011).

No coração, aproximadamente 90% das espécies reativas de oxigênio são produzidas através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Di Lisa et al., 2009; Poyton, Ball, Castello, 2009). Em condições de homeostase, estas espécies reativas são reduzidas por enzimas ou por “scavengers” como a vitamina E ou ubiquinol. Contudo, em processos de envelhecimento, hipóxia ou hiperativação neuro-humoral, pode ocorrer uma alteração no controle redox, resultando em aumento excessivo nas concentrações de espécies reativas de oxigênio.

Em geral, o aumento exacerbado da produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria, resulta em redução da viabilidade celular. Esse fenômeno está diretamente associado à oxidação de DNA mitocondrial, lipídios, açúcares e proteínas, resultando em uma série de anormalidades na mitocôndria, como redução do potencial da membrana interna, diminuição na síntese de ATP, aumento da captação de cálcio, prejuízo no controle de qualidade de proteína e ativação de vias pró-apoptóticas (Chen, Niki, 2006).

Dentre os oxidantes produzidos, encontram-se os peróxidos lipídicos que podem ser metabolizados pela glutationa 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 (4-HNE). Esta molécula é gerada endogenamente, a partir da clivagem de hidroperóxidos lipídicos, e é altamente reativa com resíduos de cisteína, lisina ou histidina presentes em proteínas. Resumidamente, o processo da peroxidação lipídica pode ser definido como uma deterioração auto-oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados.

É interessante mencionar que, quando produzidos em níveis basais (i.e. < 1 μM), os aldeídos como o 4-HNE, atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares.

Entretanto, sob condições de estresse oxidativo, ocorre produção exacerbada destes aldeídos, saturando as vias de seu metabolismo, o que favorece modificações de moléculas biológicas e o início de processos patológicos. A importância clínica deste aldeído decorre de sua habilidade em se difundir para locais mais distantes de onde é produzido. Assim, ele pode formar adutos (ligações químicas de alta afinidade) com diversas proteínas, modificando-as irreversivelmente. O 4-HNE pode se ligar a albumina plasmática, enzimas do metabolismo, proteínas de membrana e citosólicas, cadeia transportadora de elétrons, entre outros (Budas, Disatnik, Mochly-Rosen, 2009; Chen, Sun, Mochly-Rosen, 2010; Kutuk, Basaga, 2007; Song et al., 2011; Yang et al., 2003). Este aldeído tem sido extensivamente relacionado à etiologia de diversas doenças, como as cardiovasculares e hepáticas (Kaplan et al., 2007).

O 4-HNE possui um carbono reativo, localizado na posição 3 (posição central) da molécula. Este carbono pode formar uma ligação (ligação de Michaelis) com resíduos de cisteína, histidina ou lisina da proteína alvo, modificando-a. Estudos têm demonstrado que cerca de 1 a 8% do 4-HNE formado na célula modifica proteínas, resultando em perda de função dessas proteínas (Backos, et al., 2011).

Outro tipo de modificação decorrente de ataque eletrofílico é a carbonilação de proteínas (ligação de grupamentos carbonila), um tipo de oxidação proteica 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 4-HNE (Budas, Disatnik, Mochly-Rosen, 2009; Chen, Sun, Mochly-Rosen, 2010; Kutuk, Basaga, 2007; Song et al., 2011; Yang et al., 2003). Resultados prévios do nosso grupo mostram que níveis elevados de proteínas carboniladas são encontrados no coração de roedores e humanos portadores de IC, assim, a carbonilação é considerada um importante biomarcador na IC (Ferreira et al., 2012).

A disfunção mitocondrial, bem como o desbalanço redox, são processos que colaboram diretamente para o estabelecimento das doenças cardiovasculares. Porém, os mecanismos celulares envolvidos nesses processos ainda são controversos. Demonstramos, em colaboração com a Universidade de Stanford, que a isquemia resulta em acúmulo de 4-HNE 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 4-HNE. De fato, Ma e colaboradores (Ma et al., 2011) demonstraram que camundongos que hiperexpressam ALDH2 apresentam níveis reduzidos de 4-HNE após isquemia/reperfusão, já a ablação do gene da ALDH2 resulta em maior acúmulo de 4-HNE frente ao mesmo estresse.

1.4 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) e mutação ALDH2*2

A aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) faz parte da superfamília aldeído desidrogenase (ALDH), composta por enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos correspondentes, não tóxicos, em uma reação irreversível dependente de $NAD(P)^+$. Já foram descritos 19 genes que codificam a superfamília ALDH, localizados em cromossomos diferentes. As ALDHs são conservadas na evolução e estão distribuídas em várias regiões subcelulares incluindo citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo. Além disso, as ALDHs possuem uma ampla distribuição tecidual e exibem especificidade para substratos específicos. (Chen, Sun, Mochly-Rosen, 2010; Marchitti et al., 2008; Song et al., 2011)

O gene que codifica a ALDH2, com 517 peptídeos, está localizado no cromossomo 12q24. Após codificada a enzima é transportada para a matriz mitocondrial em um processo que depende do peptídeo sinal localizado na porção N-terminal. Na matriz mitocondrial ocorre a clivagem do peptídeo sinal (17 peptídeos), permitindo a maturação completa da enzima, com 500 peptídeos formando uma enzima homotetramérica de ~56kDa. 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 coenzima NAD^+; e um domínio de oligomerização (Chen et al., 2014; Gross et al., 2015).

A ALDH2 é expressa abundantemente no fígado e pulmão, e está também presente em órgãos que requerem uma capacidade mitocondrial elevada para a geração de ATP, tais como, coração e cérebro (Marchitti et al., 2008). A ALDH2 é também conhecida pelo seu papel em remover o acetaldeído, produzido durante o metabolismo do etanol pela álcool desidrogenase. A ALDH2 é responsável pelo metabolismo de aldeídos alifáticos de cadeia curta, sendo responsável pela conversão oxidativa do 4-hidroxinonenal (4-HNE) ao seu ácido fraco, o ácido 4-hidroxinonenóico (4-HNA). Em adição à sua atividade de desidrogenase, a ALDH2 possui atividade de redutase, na conversão da nitroglicerina em óxido nítrico e

atividade de esterase na hidrólise da nitroglicerina para gerar o 1,2-dinitrato de gliceril e nitrato (Li et al., 2006).

Além disso, a ALDH2 é conhecida por apresentar uma mutação pontual, ALDH2*2, presente em 40% da população asiática. Essa mutação afeta cerca de 8% da população mundial, ou aproximadamente 560 milhões de pessoas, sendo a mutação mais prevalente em humanos (Gross et al., 2015). A mutação ALDH2*2 é decorrente de uma substituição pontual de nucleotídeos (G para A) no éxon 12, que resulta na troca do ácido glutâmico (Glu, E) por uma lisina (Lys, K) na região 487 da ALDH2, mutação também chamada por E487K. Essa troca promove uma alteração na estrutura tridimensional da enzima e resulta na desestabilização do sítio de ligação do cofator NAD^+, com consequente diminuição da atividade enzimática em até 95%.

Como podemos observar na figura 2, a estrutura cristalográfica da ALDH2 WT (Protein Data Bank Acession Code PDB:10O5) mostra os resíduos 245-262, que formam a hélice αG (roxo), e os resíduos 466-478, que formam o loop do sítio ativo (azul). Na enzima ALDH2*2 mutante (PDB: 1ZUM), a substituição E487K resulta na perda de densidade de elétrons nas duas regiões. A ativação seletiva da ALDH2, utilizando uma pequena molécula (N-(1,3-benzodioxol-5-dylmethyl)-2,6-dichlorobenzamide) desenvolvida pelos nossos colaboradores de Stanford, chamada Alda-1 *(aldehyde dehydrogenase activator 1*), se liga na enzima ALDH2*2 (vermelho – PDB: 3INL), restaurando, de forma alostérica, a estrutura da α hélice (roxo) e do loop (azul) para próximo da enzima WT (Larson, Weiner, Hurley, 2005; Larson et al., 2007; Perez-Miller et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura cristalográfica da enzima ALDH2 WT selvagem, ALDH2*2 mutante e da ALDH2*2 mutante com a molécula ativadora Alda-1.

Portadores dessa mutação ALDH2*2 são geralmente reconhecidos pela intolerância ao álcool; porém, estes também apresentam maior probabilidade em desenvolver diferentes tipos de câncer (Brooks et al., 2009; Chen et al., 2006; Seitz, Stickel, 2010) e doenças degenerativas (Budas, Disatnik, Mochly-Rosen, 2009; Chen et al., 2008).

Demonstramos, recentemente, que tanto na progressão da cardiomiopatia induzida por infarto do miocárdio quanto na insuficiência cardíaca ocorre uma disfunção mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), peroxidação lipídica e aumento exacerbado na produção de aldeídos tóxicos com consequente diminuição da atividade enzimática da ALDH2. Além disso, vimos que a ativação seletiva da ALDH2, utilizando a molécula ativadora da ALDH2, Alda-1, foi capaz de reduzir a quantidade de aldeídos tóxicos cardíacos, restaurar o metabolismo mitocondrial e melhorar a função cardíaca (Gomes et al., 2014). Ainda, demonstramos que a Alda-1 tem efeito protetor em modelo de isquemia cardíaca *in vivo* (Sun, Ferreira, Mochly-Rosen, 2011).

Considerando os resultados supracitados mostrando o importante valor da ALDH2 na manutenção da viabilidade cardíaca perante estímulos estressores, decidimos avaliar no presente estudo se camundongos que possuem a mutação ALDH2*2, e consequente atividade da ALDH2 reduzida, são mais suscetíveis ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio; e se a molécula Alda-1 é capaz de minimizar a degeneração cardíaca observada na IC.

2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

A IC, caracterizada pelo remodelamento cardíaco e disfunção ventricular, associados à elevada taxa de morbi-mortalidade, representa um importante problema de saúde pública. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pelo agravamento da disfunção cardíaca na progressão da IC é um importante foco de estudo. Mais especificamente, alterações na função mitocondrial e acúmulo de produtos do estresse oxidativo parecem contribuir para o desenvolvimento da IC.

No presente projeto de pesquisa induzimos IC em camundongos selvagens e mutantes para a ALDH2*2 (*knock-in* portadores da mutação E487K no gene da ALDH2) e avaliamos a contribuição dessa mutação na progressão da doença. Considerando o papel chave da enzima ALDH2 na remoção do 4-HNE, produzido durante o estresse oxidativo (Chen, Sun, Mochly-Rosen, 2010), levantamos a hipótese que a redução da atividade da ALDH2 decorrente da mutação ALDH2*2 resulta no maior acúmulo de 4-HNE cardíaco durante a IC. Essa resposta tem como consequência a inibição de uma série de proteínas envolvidas no metabolismo celular através da formação do aduto de Michaelis (4-HNE-proteína), resultando no agravamento da disfunção ventricular. Ainda, esperamos que o tratamento sustentado com a Alda-1 seja capaz de reverter os danos cardíacos oriundos da interação entre a mutação ALDH2*2 e a IC (Figura 3).

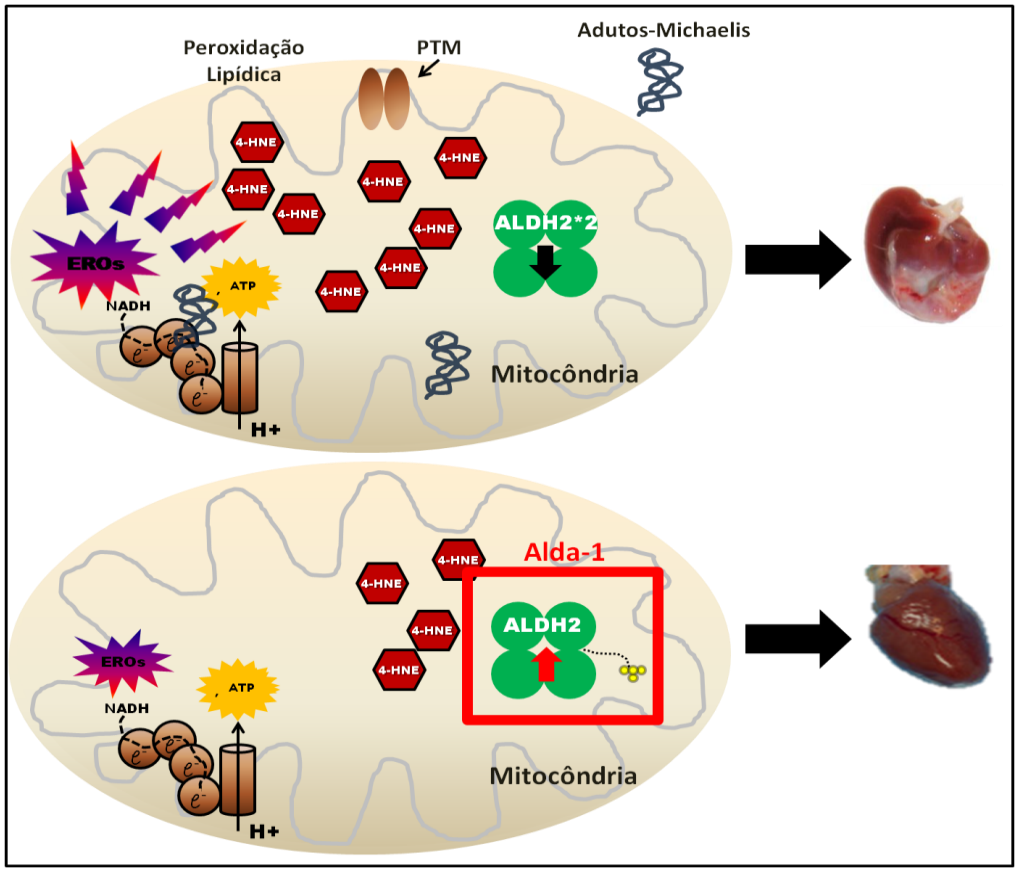

Figura 3 - Esquema ilustrativo da hipótese deste estudo. A mutação ALDH2*2 faz com que a atividade da ALDH2 reduza em até 95%, o que leva ao acúmulo de 4-HNE e maior formação de adutos de Michaelis entre 4-HNE e proteínas. O aumento da formação dos adutos de Michaelis resulta em disfunção mitocondrial, colapso/morte celular, e consequentemente, agravamento da IC. O tratamento crônico com a Alda-1, molécula ativadora da ALDH2, resultará na maior remoção do 4-HNE e melhora da viabilidade celular e função cardíaca.

Nesse estudo caracterizamos a função cardíaca; a contratilidade e o transiente de cálcio em cardiomiócito isolado; e o remodelamento ventricular em camundongos selvagens e mutantes, saudáveis e com IC. Ainda, analisamos no coração desses animais o perfil de expressão proteica e atividade da ALDH2, o acúmulo de adutos de Michaelis e atividade das enzimas antioxidantes. Considerando que o acúmulo de adutos de Michaelis pode prejudicar o metabolismo mitocondrial, avaliamos em mitocôndria isolada do tecido cardíaco o consumo de oxigênio e a produção de peróxido de hidrogênio.

Esse estudo torna-se necessário, pois descreverá pela primeira vez a contribuição da mutação ALDH2*2 na progressão da IC e o possível efeito terapêutico da Alda-1 no tratamento da IC em portadores dessa mutação.

3 OBJETIVO

Estudar o papel da mutação ALDH2*2 na função e estrutura cardíaca de camundongos com IC induzida por infarto do miocárdio; e o papel da Alda-1 sobre esse fenótipo.

Para isso, dividimos esse trabalho em 2 etapas:

- Etapa 1: Caracterizar o fenótipo dos animais (saudáveis) com a mutação dominante negativa E487K para a ALDH2;

- Etapa 2: Avaliar se os animais com a mutação E487K são mais suscetíveis ao desenvolvimento da IC quando comparados ao grupo selvagem. Avaliar se o tratamento com Alda-1 é capaz de reverter/minimizar os efeitos deletérios do infarto do miocárdio nos animais selvagens e com a mutação E487K.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Esse estudo se deu de acordo com os princípios éticos em animais, conforme normas da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (COBEA, www.cobea.org.br). Todos os experimentos foram realizados de acordo com a lei federal nº 6638 de 1979, que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica. Os protocolos em animais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (registrado sob nº181 na fl. 139 do livro 02, protocolo 181/12).

Utilizamos camundongos C57/Bl6 selvagens (WT) e portadores da mutação E487K no gene da ALDH2 (heterozigotos *1/*2 e homozigotos *2/*2, background C57/Bl6), machos, com idade inicial de 8 semanas e final de 18 semanas de vida. Os camundongos mutantes ALDH2*2 foram gentilmente cedidos pela nossa colaboradora Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen da Universidade de Stanford CA-EUA. Os animais utilizados neste estudo foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia - ICBIII/USP, com temperatura controlada (22-25 ºC), ciclo claro-escuro 12:12 horas, água e comida administradas *ad libitum*.

4.1.1 Grupos experimentais

Os animais C57Bl6 (WT), ALDH2*2 heterozigoto (*1/*2) e homozigoto (*2/*2) foram divididos em três grupos experimentais, sendo o grupo controle, grupo infartado e grupo infartado e tratado com Alda-1. Demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais

Controle			Infartado			Alda-1		
WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2

4.1.2 Desenho experimental

Camundongos C57Bl6 selvagens e ALDH2*2 mutantes com 8 semanas de idade foram submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (indução do infarto do miocárdio). 4 semanas após a cirurgia, os animais foram tratados com Alda-1 ou solução veículo (50% DMSO/ 50% PEG400) por 6 semanas sendo os animais eutanasiados ao término do tratamento. As

diferentes medidas foram realizadas com 4 e 10 semanas pós-cirurgia de infarto. (Figura 4)

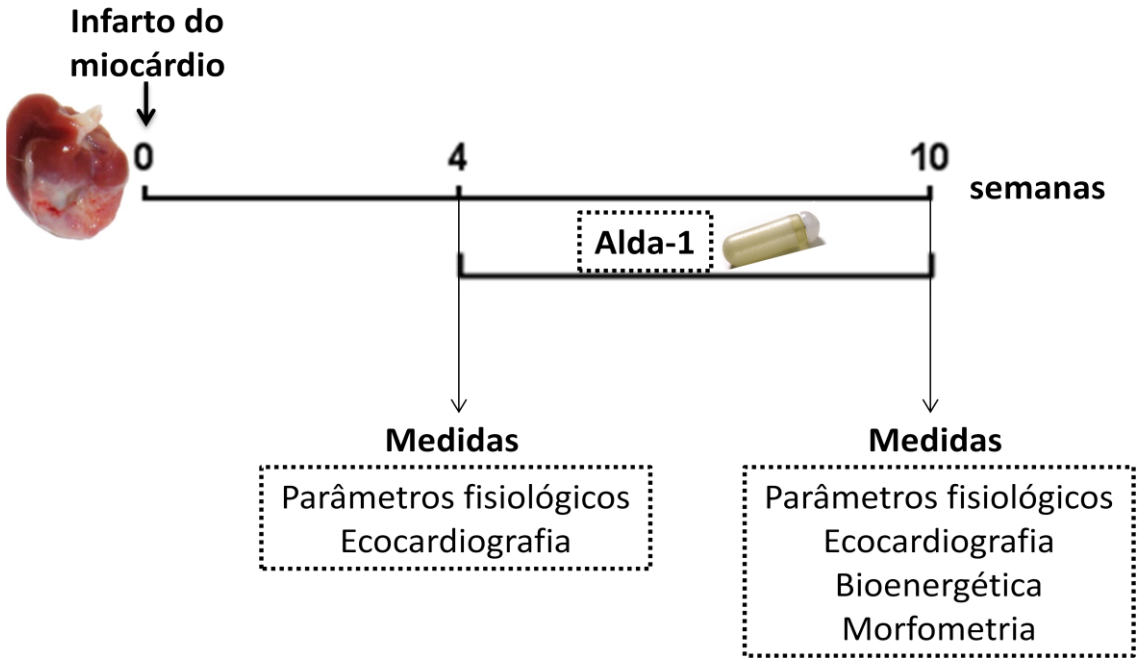

Figura 4 - Desenho experimental. Infarto do miocárdio, período de tratamento com Alda-1 e medidas com 4 e 10 semanas após a cirurgia de infarto.

4.2 Métodos

4.2.1 Genotipagem

Para a genotipagem dos camundongos mutantes ALDH2*2 heterozigotos e homozigotos foi extraído DNA genômico da cauda dos animais, realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers sense **EG534** GTTCTCTCCGATGACAGGATCAACTGCTAC e antisense **EG535** TACGTTCCCGTGGGCAGAACTGGTGCCTT, nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de desnaturação na condição de 98 ºC por 30 seg, seguido de 35 ciclos (98 ºC – 30 seg desnaturação, 68 ºC – 10 seg anelamento e 72 ºC – 30 seg extensão) e um ciclo de 72 ºC – 5 min. para extensão final e 4 ºC – indefinidamente no termociclador. Posteriormente, essas amostras amplificadas em PCR foram purificadas utilizando o kit Qiagen Cat. No. 20104 e o DNA foi sequenciado. A genotipagem dos animais é realizada por nossos colaboradores da Universidade de Stanford CA-EUA.

4.2.2 Cirurgia de indução do infarto do miocárdio

Os camundongos selvagens e mutantes, com oito semanas de idade, foram anestesiados com isoflurano (1,5%) e entubados para ventilação mecânica (vol. 0,75 ml; freq. 75-85). Uma toracotomia esquerda foi realizada no terceiro espaço intercostal e o pericárdio foi aberto. A artéria coronária descendente anterior esquerda foi ligada próximo a sua origem com fio de polipropileno não absorvível (7.0, ETHICON, Brasil), finalizando com o fechamento do tórax e a retirada do pneumotórax. Após a cirurgia os animais receberam dipirona (50 mg/kg) intraperitoneal e penicilina (20000U) intramuscular. As análises foram realizadas com 4 e 10 semanas após a cirurgia do infarto, na tentativa de identificar possíveis sinais de insuficiência cardíaca apresentados pelos animais. Vale ressaltar que escolhemos esses períodos baseados em nossa experiência prévia com o mesmo modelo experimental em ratos (Ferreira et al., 2012). A cirurgia é realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen pelo técnico Leandro Ezequiel de Souza do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração.

4.2.3 Tratamento com Alda-1

Os animais foram tratados com Alda-1 (molécula ativadora da ALDH2 – 10 mg/kg/dia) ou solução veículo (50% DMSO/ 50% PEG400). O tratamento foi realizado por meio da implantação de mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 2006, 0,5 μl/hora, 42 dias, 200 μl) no dorso dos camundongos, e teve duração de 6 semanas, iniciando na 4ª semana após a cirurgia de infarto do miocárdio, fase em que a IC já está estabelecida (Ferreira et al., 2012). Para a implantação das mini-bombas, os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5-2,5% em fluxo de 1 mLO_2/min). Após a cirurgia os animais receberam uma injeção de lidocaína (1 mg/kg) na região da incisão e penicilina (20000U) intramuscular. Vale ressaltar que a Alda-1 foi gentilmente cedida pela nossa colaboradora da Universidade de Stanford, Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen.

4.2.4 Medidas cardiovasculares

Com o intuito de avaliar as variáveis hemodinâmicas nesse modelo animal, foi realizada a medida indireta da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca através do método de pletismografia de cauda (Kent Scientific, EUA). Após um

período de 3 dias de adaptação, foram realizados cinco registros consecutivos por meio de um esfigmomanômetro de cauda, sendo posteriormente calculada a média dos valores obtidos.

4.2.5 Avaliação da função ventricular in vivo

Para a avaliação da função cardíaca nos animais, exames de ecocardiografia transtorácica foram realizados em dois períodos após a cirurgia de infarto: 4 semanas para que pudéssemos avaliar e selecionar os animais infartados (fração de encurtamento abaixo de 23% e área fracional abaixo de 35%) e 10 semanas para avaliarmos a progressão da disfunção cardíaca e a eficiência do tratamento. Essa análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração pelo Msc Leonardo Jensen e Dr. Rafael Dariolli.

Primeiramente, as imagens ecocardiográficas foram ajustadas para otimizar a aquisição das mesmas e os parâmetros ecocardiográficos foram mantidos constantes para todos os animais adicionados aos experimentos. Os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5-2,5% em fluxo de 1 mLO_2/min), tiveram a região torácica tricotomizada e então foram colocados em posição supina para a aquisição de imagens. Um sistema de ultrassom exclusivo para estudos em roedores (VEVO 2100 – VisualSonics Vevo® 2100 Imaging System, Canada) foi utilizado para a aquisição das imagens bem como uma sonda 40 MHz. As medidas ecocardiográficas foram realizadas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang et al., 2005), porém adaptada para o modelo de roedor. Todas as avaliações foram realizadas *off-line* no software de análises disponível no equipamento de aquisição de imagens (VevoCQ™ LV Analysis - VisualSonics, Canada). Todas as medidas foram realizadas em três ciclos cardíacos representativos de cada animal. A medida final de cada parâmetro foi dada pelas médias dos resultados obtidos a cada ciclo. Todas as imagens ecocardiográficas foram obtidas e analisadas por dois observadores experientes e cegos para os grupos experimentais estabelecidos no estudo.

Medidas lineares: A partir de imagens ecocardiográficas da janela paresternal, no plano de corte transversal (eixo curto), obtidas ao nível dos músculos papilares, foram realizadas medidas lineares de espessura de parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole e sístole (PPVEd e PPVEs), septo interventricular na

diástole e sístole (SIVd e SIVs), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE) e sistólico (DsVE). A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo foram obtidas automaticamente a partir das medidas lineares por algoritmos previamente estabelecidos pelo fabricante do software de análise.

Medidas de área: Imagens ecocardiográficas da janela paresternal, no plano de corte transversal (eixo curto), ao nível dos músculos papilares, foram adquiridas e a partir destas foram realizadas medidas planimétricas das áreas diastólica final (ADF) e sistólica final (ASF) do ventrículo esquerdo (VE). A variação da área fracional (FAC) foi calculada a partir da fórmula: FAC= (ADF-ASF)/ADF)*100.

Além disso, foi utilizada a ecocardiografia *doppler* transtorácica para avaliação da função diastólica.

Velocidade do fluxo na valva mitral: A partir de imagens bidimensionais obtidas na janela paraesternal, no plano de corte longitudinal (eixo longo), foram realizadas imagens *doppler* do fluxo sanguíneo abaixo da valva mitral, onde a amostra *doppler* foi posicionada. A velocidade de fluxo mitral foi estimada através da medida das ondas E e A, tempo de desaceleração (TD) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

4.2.6 Teste de tolerância ao esforço

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 estimada na 4ª e 10ª semana após a cirurgia de infarto do miocárdio por meio de um teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante (Ferreira et al., 2007), onde a velocidade inicial da esteira foi de 6 m/min sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de 3 m/min até a exaustão do animal. As variáveis medidas foram o tempo total e a distância em metros percorrida por cada animal durante o teste máximo. Vale ressaltar que o teste é realizado após um período de 3 dias de adaptação dos animais na esteira. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício - EEFE/USP, coordenado pela Prof. Dra. Patrícia Chakur Brum.

4.2.7 Consumo de oxigênio basal (VO_2)

O consumo de oxigênio (VO_2) que o corpo consegue capturar no ar presente nos pulmões, entregando-o aos tecidos através do sistema cardiovascular para ser usado na produção de energia, numa unidade de tempo, foi mensurado nos camundongos com 4 e 10 semanas após infarto, por meio de teste em câmara metabólica de calorimetria indireta (Van Klinken et al., 2012). Os animais foram colocados no interior de uma câmara metabólica conectada por tubos a um analisador de oxigênio e uma bomba de ar responsável pela manutenção do fluxo de gases dentro desta câmara. O aparelho foi calibrado após cada teste e o VO_2 foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VO_2 = \frac{(PO_2amb - PO_2feo) \times 3500}{m}$$

Onde PO_2amb representa a fração de oxigênio no ar ambiente, PO_2feo a fração expirada de oxigênio, 3500 o fluxo de ar em ml/min e “m” a massa corporal em quilogramas.

4.2.8 Eutanásia e coleta de tecidos

Dez semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (COBEA, www.cobea.org.br). Após a eutanásia foi realizada a coleta do coração, pulmão, rins, baço e fígado para pesagem e posterior congelamento em freezer -80 ºC. O peso total da víscera foi corrigido pelo peso corporal e comparado entre os grupos. Além disso, o pulmão e o fígado foram em parte congelados e em parte usados para fazer a razão peso úmido/seco. A secagem do pulmão e do fígado é realizada durante 4 dias em estufa à 37 ºC.

4.2.9 Avaliação morfométrica cardíaca

Foi coletada uma fatia central do coração com aproximadamente 2 mm de largura, abrangendo ventrículo esquerdo e direito em corte transversal, colocada inicialmente em KCl (0,1 M) para que o coração parasse em diástole e posteriormente fixada por 48 horas em formol 10%, a fatia cardíaca foi submetida ao processamento histológico habitual, incluída em parafina e cortada à 5 μm. Os

cortes obtidos foram corados pelos métodos de Hematoxilina-eosina (HE – diâmetro do cardiomiócito) e Picrossírius (componente colágeno). Após as técnicas de coloração, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados entre lâmina e lamínula, analisados e documentados em fotomicroscópio Nikon Eclipse E600/ NIS – Elements AR com programa Imaging Software NIS – Elements AR 3.1 do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional Instituto de Ciências Biomédicas III.

Para quantificação do diâmetro transverso dos cardiomiócitos, com HE, utilizamos um aumento de 200 x. Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados fora da área infartada, na parede livre do ventrículo esquerdo, orientados em corte longitudinal. O diâmetro dos cardiomiócitos foi considerado a partir de uma média de 20 valores medidos para cada animal, para determinação do grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Já na análise quantitativa de colágeno total, por Picrossírius, foi realizada uma varredura de todo o corte histológico, por meio do programa Imaging Software NIS – Elements AR 3.1, em aumento de 200 x, em cada campo realizamos a quantificação da área total e do colágeno total (intersticial e vascular) corado em vermelho, que posteriormente fizemos a razão área total/colágeno total.

4.2.10 Isolamento dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados do coração dos animais utilizando um procedimento de digestão enzimática, conforme descrito por Wisloff e colaboradores (Wisløff et al., 2002) e adaptado para camundongo. Após a eutanásia dos animais, os corações foram rapidamente removidos e montados em um aparelho de Langendorff, onde foi realizada a perfusão retrógrada pela artéria aorta (3 ml/min) com a solução A (130 mM NaCl, 1 mM ácido lático, 5,4 mM KCl, 3 mM ácido pirúvico, 25 mM HEPES, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,33 mM NaH_2PO_4, 22 mM D-glucose, 0,1 U/ml insulina) contendo 0,225 mM de EGTA por 5 minutos. Após esse tempo a solução A foi substituída por 15 ml de solução B (Solução A + 150 U/ml colagenase tipo II e 0,048 mM de $CaCl_2$), que foi perfundida por aproximadamente 12 minutos com fluxo 1,5 ml/min. Em seguida, os ventrículos foram cortados e os fragmentos cardíacos foram transferidos para um becker de 10-20 ml contendo a solução C (Solução A + 100 U/ml colagenase tipo II, 0,1% BSA e 0,06 mM de $CaCl_2$) e as células foram isoladas por agitação *up and down* com pipeta de plástico por 2

minutos 37 ^{0}C. As células suspensas foram filtradas e centrifugadas por um minuto (500 rpm). O sobrenadante foi descartado e o pelete contendo os cardiomiócitos foi ressuspendidos em solução D (Solução A + 0,2% BSA e 0,25 mM $CaCl_2$). Os cardiomiócitos foram centrifugados mais uma vez (1 min. - 500 rpm) e ressuspendidos em solução E (Solução A + 0,2% BSA e 0,5 mM $CaCl_2$), seguido de nova centrifugação (1 min. - 500 rpm), ressuspendidos em solução F (Solução A + 1,2 mM $CaCl_2$) e utilizados para experimentos de contratilidade e transiente de cálcio.

4.2.11 Ensaio de contratilidade do cardiomiócito isolado

As propriedades contráteis dos cardiomiócitos foram avaliadas por um sistema de aquisição *video-based sarcomere spacing* (SarcLen, IonOptix, Milton, MA), conforme demonstrado pelo nosso grupo (Ferreira et al., 2011). Cardiomiócitos quiescentes com a disposição clara das estriações foram escolhidos para as análises contráteis. As células foram colocadas numa câmara de cultura com sistema próprio de estimulação (Cell MicroControls, Norfolk, VA, EUA) acoplado ao microscópio invertido (Nikon TE2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), eletricamente estimuladas com frequências de 1 Hz e 5 Hz. Alterações no comprimento da célula e do sarcômero foram gravadas e posteriormente analisadas utilizando o software Íon Wizard (IonOptix, Milton, MA, EUA). Foram mensuradas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a velocidade máxima de contração (+dL/dt, μm/seg), a velocidade máxima de relaxamento (-dL/dt, μm/seg).

4.2.12 Avaliação do transiente de cálcio no cardiomiócito isolado

Seguimos o protocolo já padronizado pelo nosso grupo (Ferreira et al., 2011). Um grupo separado de cardiomiócitos foi carregado com 0,5mM do indicador de fluorescência para cálcio Fura2-acetoxymethyl ester (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) por 15 minutos, lavado e mantido em temperatura ambiente livre de luz por 40 minutos, com o intuito de permitir a de-esterificação da FURA-2 éster. Os miócitos foram eletricamente estimulados com frequências de 1 Hz e 5 Hz. As células foram alternadamente excitadas nos comprimentos de onda 340 e 380 nm em frequências acima de 250 pares/segundo utilizando o sistema HyperSwitch (IonOptix, Milton, MA, EUA). Essa frequência é independente da geometria celular e intensidade da frequência de excitação, e reflete as concentrações intracelulares de

cálcio. As frequências de FURA-2 coletadas no comprimento de onda 510 nm foram utilizadas para corrigir o background. Foram mensuradas as velocidades para liberação e captação de cálcio (μm/seg) e o pico de cálcio (%).

4.2.13 Avaliação do metabolismo mitocondrial cardíaco

Todos os ensaios referentes à avaliação bioenergética cardíaca foram realizados com mitocôndria isolada do coração dos animais.

Isolamento da mitocôndria. Logo após a eutanásia dos animais, os corações foram retirados e a mitocôndria isolada conforme descrito previamente por Cancherini e colaboradores (Cancherini, Queliconi, Kowaltowski, 2007). O tecido foi colocado no tampão de lise (Sacarose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2, 4 ºC) e triturado para liberação das mitocôndrias das fibras musculares cardíacas. A suspensão foi lavada no mesmo tampão e homogeneizada em um potter elétrico de tecido. O homogenato foi centrifugado a 900 g por 5 min (4 ºC). O sobrenadante resultante foi centrifugado a 10000 g por 10 min (4 ºC). O sobrenadante (fração citosólica) dessa segunda centrifugação foi coletado e mantido em -80 ºC para posteriores análises. E o pelete mitocondrial resultante foi lavado e ressuspendido no tampão de lise.

Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada. Essa variável foi avaliada utilizando um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador (*OROBOROS, Oxygraph-2k)*, como previamente descrito por da Silva et al. e Tahara et al. (da Silva et al., 2003; Tahara, Navarete, Kowaltowski, 2009). 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, $MgCl_2$ 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 (FCCP – *carbonil cianeto ρtrifluoro-metoxi fenilhidrazona,* 1 μM) para estimular o consumo máximo de oxigênio (Figura 5). Os valores foram expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

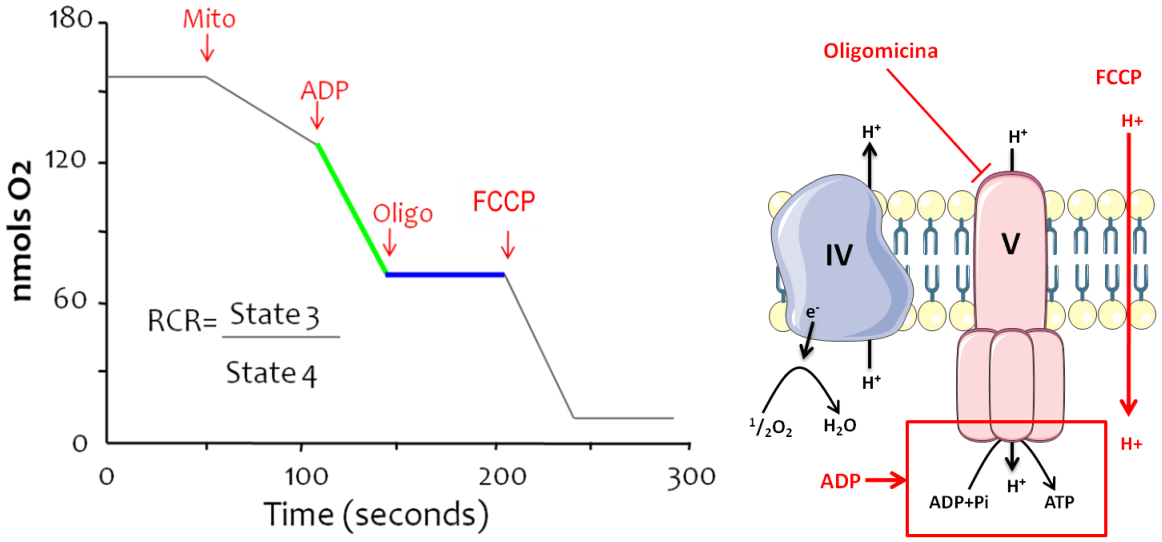

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na medida do consumo de O_2 em mitocôndria isolada. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Posteriormente avaliamos o consumo máximo de oxigênio induzido pela adição de ADP. Em seguida, medimos o consumo de oxigênio na presença de oligomicina (inibidor do complexo V). Por fim, avaliamos o consumo de oxigênio na presença de FCCP, um desacoplador mitocondrial. Ressalto que a redução dos níveis de oxigênio na câmara é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio mitocondrial. (Fonte: Lima, 2016)

Liberação de H_2O_2 pela mitocôndria cardíaca isolada. Foi avaliada por espectrofluorimetria (Tahara, Navarete, Kowaltowski, 2009). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes 10 mM, KH2PO4 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. A produção de H_2O_2 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) (Figura 6). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com quantidades conhecidas de H_2O_2, expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

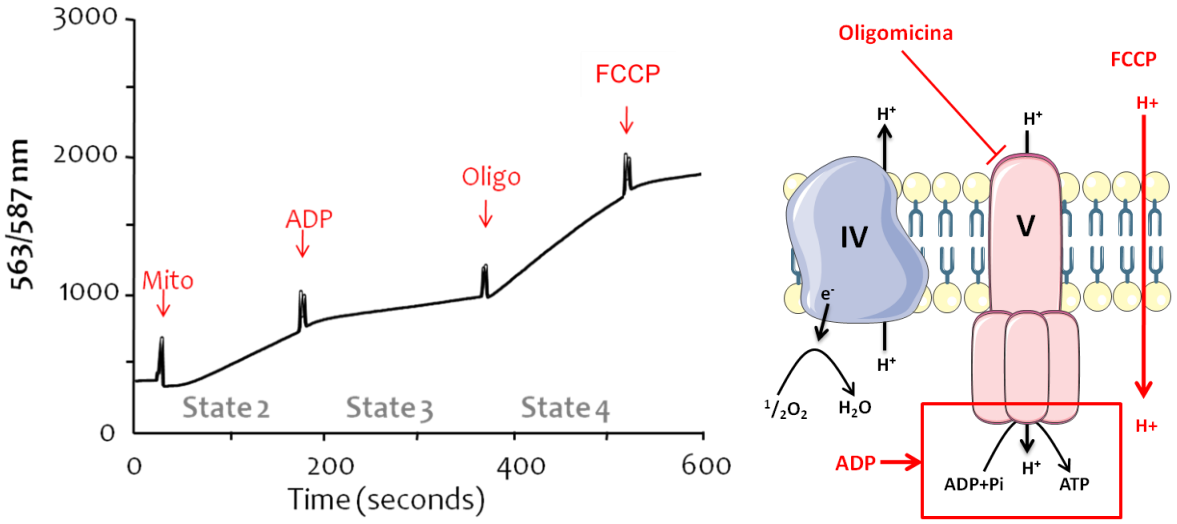

Figura 6 - Esquema ilustrativo da liberação de H_2O_2 em mitocôndria isolada. A medida basal é feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Quando adicionamos ADP ocorre uma aceleração da cadeia respiratória, menor escape de elétrons e menor produção de espécies reativas. Já quando colocamos oligomicina, bloqueamos síntese de ATP tendo uma diminuição na respiração e um acúmulo de elétrons, possibilitando maior escape e maior formação de espécies reativas. Posteriormente, adicionando FCCP, que é um desacoplador da membrana mitocondrial, ocorre uma aceleração da entrada de prótons levando ao consumo máximo de oxigênio, menor possibilidade de liberação de elétrons e diminuição da formação de H_2O_2. (Fonte: Lima, 2016)

4.2.14 Atividade da enzima ALDH2

Foi avaliada em mitocôndria cardíaca isolada e medida por espectrofotometria após a adição de pirofosfato de sódio (100 mM, pH 9,5), β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+ – 10 mM), acetaldeído (0,3 mM) e DL-Ditiotreitol (DTT, 0,1%), em um volume final de 200µl, na placa de 96 wells. A cinética enzimática da ALDH2 foi avaliada através da formação de NADH, medida pelas mudanças na absorbância (λ_{ex}= 340 nm) por um período de 10 minutos (Chen et al., 2008). O ensaio consiste na clivagem do acetaldeído em ácido acético e doação do próton H^+ para coenzima NAD^+ (forma oxidada) tornando-se NADH (forma reduzida).

4.2.15 Avaliação do estado redox da Glutationa

Avaliamos o estado redox do par glutationa reduzida (GSH)/ glutationa oxidada (GSSG) nos corações dos animais selvagens e mutantes heterozigotos e homozigotos pelo método de reciclagem da glutationa descrito por Rahman e colaboradores (Rahman, Kode, Biswas, 2006). Primeiramente, quantificamos a glutationa total. O ensaio se baseia na reação da glutationa reduzida com ácido 5,5'-

ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) que produz o aduto glutationa oxidada-TNB (GS-TNB) e o TNB cromóforo, o qual tem a absorbância de 412 nm. O produto GS-TNB é então reduzido pela glutationa redutase na presença de NADPH, reciclando a glutationa reduzida de volta para a reação. A taxa de formação do TNB, medida em 412 nm, é proporcional a concentração da glutationa total na amostra. Posteriormente, quantificamos glutationa oxidada, pelo mesmo método, porém as amostras foram previamente tratadas com 2-vinilpiridina, que reage com GSH, mas não com GSSG, sendo que a taxa do TNB (412 nm) agora é proporcional à concentração da glutationa oxidada na amostra. Concentrações padrões conhecidas de GSH e GSSG foram utilizadas em paralelo ao ensaio para obter-se as concentrações em uM a partir da taxa de formação de TNB. A glutationa reduzida foi calculada subtraindo-se os valores de GSSG dos valores de glutationa total.

4.2.16 Extração e derivatização dos aldeídos cardíacos

Para análise dos aldeídos cardíacos, 30mg de tecido foram homogeneizados em 150 μl de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 contendo 5 mM de EDTA. Ao homogenato foram adicionados 100 µl de dodecilsulfato de sódio 10% e 150 µl de butil-hidroxitolueno 0,2% em etanol. As amostras foram então incubadas em gelo por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 750 μl de etanol. Após homogeneização a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C por 10 min. Uma alíquota de 500 μl do sobrenadante foi transferida para um tubo, onde se adicionou 100 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (20 mM) em HCl 1,0 M (solução etanólica) e 1 µl de 0,05 nmol/µl de HNEd11-DNPH (padrão interno) e homogeneizadas. As amostras foram então incubadas por 2 h a 37 °C, sob agitação de 500 rpm. Após este tempo foram adicionadas as amostras 500 µl de diclorometano e 300 µl de água miliQ. A fase inferior (diclorometanólica) foi transferida para outro tubo e o solvente foi evaporado em *speed Vac*. O resíduo foi estocado em -20 °C e no dia de análise foi solubilizado em 500 µl de acetonitrila, 50 µl foram injetados no HPLC-ESI-MS/MS. Avaliamos os seguintes aldeídos no espectrômetro de massa: acetaldeído, formaldeído, hexanal, 4-hidroxi-hexanal, pentanal e acroleína.

4.2.17 Análise da expressão de proteínas

A expressão proteica no tecido cardíaco homogeneizado, mitocôndria isolada e citosol foi realizada pela técnica de *Western blotting*. Para isso, as amostras previamente mantidas congeladas em freezer -80 ºC, foram dosadas para obtermos a concentração de proteína pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) e calculada segundo a equação da reta, obtida a partir da curva de concentração padrão (Albumina Sérica Bovina - BSA), sendo todas as amostras dosadas em duplicata. As amostras proteicas contendo Laemmli foram separadas por eletroforese (120 V por ~1:30 h) em gel de 10% de SDS-Poliacrilamina (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamina) no aparelho para minigel (Mini-Protean), e então transferidas (10 V por 1:20 h) para uma membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilidene) em sistema *semidry*. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese. A ligação inespecífica de proteínas na membrana foi diminuída pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora por 1 hora em temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários para as respectivas proteínas a 4°C *overnight*. Na sequência as mesmas foram lavadas 3x 10min com TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 2% Tween-20), incubada por 1 hora com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase, após lavagem em TBS-T, foi acrescentada uma solução de ECL (Enhanced Chemiluminescence), que, ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente, visualizada e fotografada em sistema fotodocumentador Uvitec Cambridge, permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário. Posteriormente, as imagens adquiridas foram quantificadas pelo sistema ImageJ, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via Internet. As proteínas quantificadas foram: Aldeídos desidrogenases 2 e 1A1 (ALDH2 e ALDH1A1), Complexos I (NDUFA9), IV (Citocromo c oxidase IV - COX4) e V (ATP5A e ATPIF1), 4-Hidroxinonenal (4-HNE) e normalizadores Canal aniônico voltagem dependente (VDAC), Beta-actina e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As especificações dos anticorpos primários estão na tabela 2, e os anticorpos secundários utilizados foram com titulação de 1:10.000.

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por *Western Blotting*

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Titulação
ALDH2	Santa Cruz (sc-48837)	56KDa	1:1000
ALDH1A1	Abnova (H00000216-M05)	55KDa	1:1000
NDUFA9	Mitosciences (MS111)	36KDa	1:1000
COX4	Abcam (ab33985)	15KDa	1:1000
ATPIF1	Mitosciences (MS506)	12KDa	1:1000
ATP5A	Abcam (ab14748)	55KDa	1:1000
4-HNE	Calbiochem (CALB-393204)		1:1000
GAPDH	ImmunoChemical	37KDa	1:1000
β-actina	Sigma (A-2228)	42KDa	1:1000
VDAC-1	Santa Cruz (SC-32063)	35KDa	1:1000

4.2.18 Análise da expressão de gênica

A expressão gênica foi realizada em qtPCR. Uma porção de ~40 mg do tecido foi homogeneizada em 1 mL do reagente de TRIzol (Life Technologies) com o auxílio de um politron. O RNA total da amostra foi extraído conforme as instruções fornecidas no *datasheet* do produto. O RNA total extraído de cada amostra foi usado como molde para a síntese do cDNA com uma transcriptase reversa comercialmente disponível (M-MuLV reverse Transcriptase- Thermo scientific) usando oligo dTs como primers. O cDNA resultante foi usado como molde na reação de PCR em tempo real montada segundo as informações do kit da enzima utilizada (MAXIMA Sybr Green/ ROX qPCR máster mix- Thermo scientific) usando primers específicos desenhados a partir de sequências referências depositadas nos bancos de dados do NCBI (refseq), que estão disponíveis para consulta na tabela 3. Os resultados obtidos foram quantificados pelo método ΔΔcT e então expressos em nível de mRNA relativo ao controle (% de WT ctrl). Os genes avaliados foram: Aldeído desidrogenase 2 (Aldh2), Aldeído desidrogenase 1A1 (Aldh1A1) e o normalizador Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (Hprt).

Tabela 3 - Lista dos primers utilizados para análise de expressão gênica por qtPCR

Genes Analisados	NCBI RNAm (Cod. Seq.)	Sequência sense	Sequência antisense	Tamanho
ALDH2	NM_001308450.1	GGACAACAAGAAGG GGCGAAGC	ATCATTGGCCCGCC CCACA	189

ALDH1A1	NM_013467.3	GGGCCGCCTGCTGA ACAAG	TGCAGCCTCCTAAA TCCGACA	125
HPRT	NM_013556.2	AGTCCCAGCGTCGT GATTAG	TTTCCAAATCCTCGG CATAATGA	88

4.2.19 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism v6* e estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a primeira etapa, foi utilizado 1-way ANOVA, para a comparação entre WT, *1/*2 e *2/*2, e 2-way ANOVA, para os dados que possuem medidas repetidas em 4 e 10 semanas. Já na segunda etapa aplicamos 2-way ANOVA, para comparação dos animais com ou sem mutação dos grupos controle, infartado e infartado com Alda-1, e 3-way ANOVA, para os dados que possuem medidas repetidas em 4 e 10 semanas. O pós-teste utilizado foi o de Tukey com múltiplas comparações e o nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Etapa 1: Caracterização do fenótipo dos animais (saudáveis) com a mutação dominante negativa E487K para a ALDH2

Inicialmente, para caracterizar o fenótipo dos animais mutantes, avaliamos a atividade da enzima ALDH2, em mitocôndria cardíaca isolada, na presença do cofator NAD+ e fornecendo o substrato acetaldeído. Observamos que a atividade mitocondrial cardíaca da ALDH2 está reduzida tanto no coração, quanto no fígado dos animais mutantes heterozigotos (*1/*2) e homozigotos (*2/*2) (Figura 7A).

Avaliamos também a expressão proteica da ALDH2 e, da mesma forma, observamos redução nos animais mutantes, sendo WT 100%, *1/*2 44% e *2/*2 25%, como podemos observar na figura 7B e D. No entanto, não observamos alteração na expressão proteica da enzima ALDH1A1 nos corações dos animais mutantes, quando comparados ao controle selvagem (Figura 7C e D).

Avaliamos ainda a expressão gênica das enzimas ALDH2 e ALDH1A1, que apesar de não ter tido diferença significativa, foi possível observar uma tendência de aumento nos animais mutantes heterozigotos e homozigotos (Figura 7E e F).

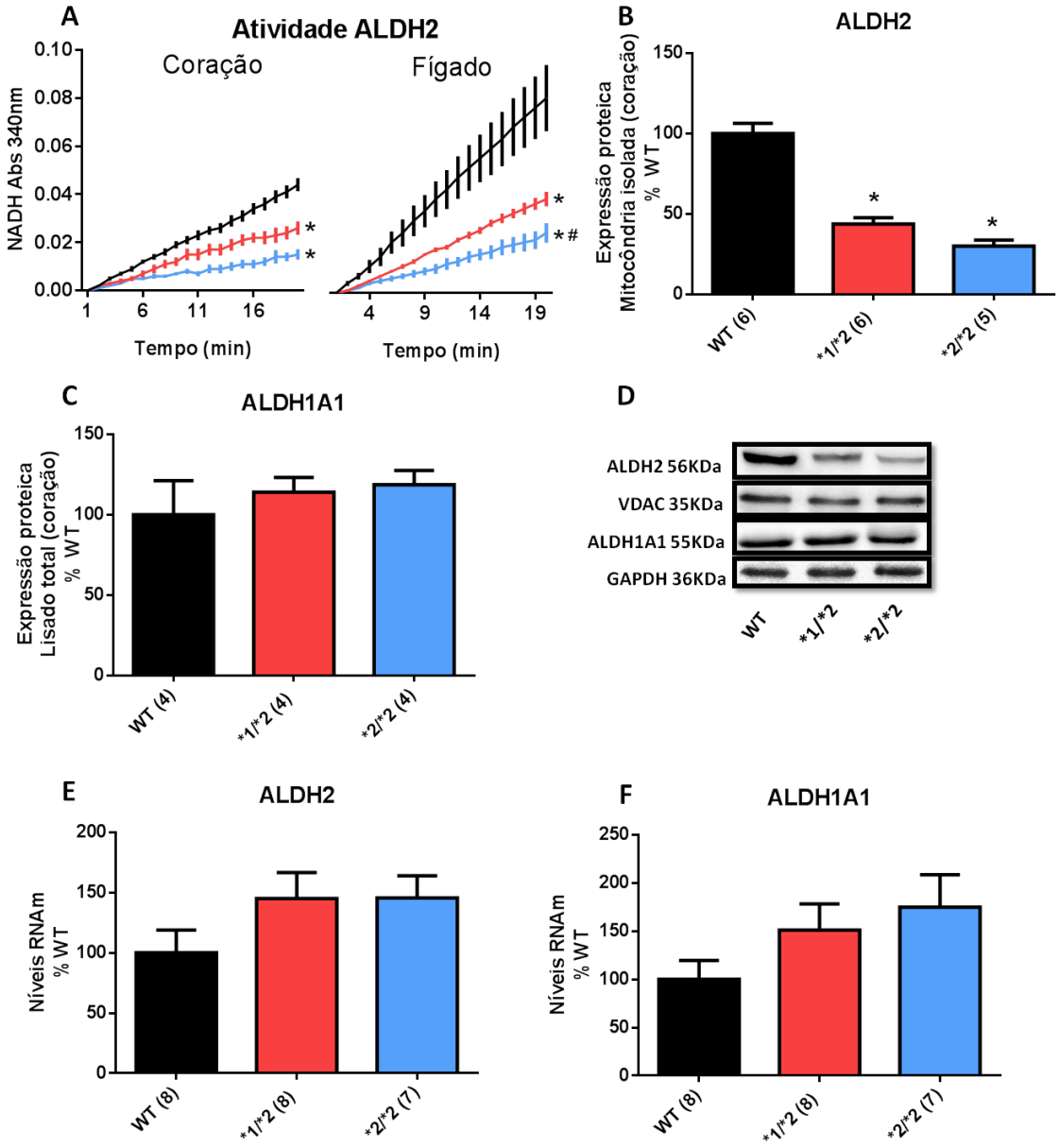

Figura 7 - Atividade da ALDH2 (A) no coração e no fígado. Expressão proteica da ALDH2 (B). Expressão proteica da ALDH1A1 (C). *Western blotting* representativo da ALDH2, ALDH1A1 e seus normalizadores VDAC e GAPDH, respectivamente (D). Expressão gênica da ALDH2 (E). Expressão gênica da ALDH1A1 (F). Em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05; * vs WT, # vs *1/*2, número de animais expresso entre parênteses.

Considerando que a ALDH2 possui um papel importante em metabolizar aldeídos curtos de cadeia alifática, nós avaliamos os níveis de seis aldeídos, por espectrometria de massa, nos corações dos camundongos WT e mutantes *1/*2 e *2/*2, não observando alterações significantes entre os grupos (Figura 8A-F). Provavelmente, outras aldeído desidrogenases podem exercer a função da ALDH2 nessa condição e metabolizar os aldeídos supramencionados, em uma ação

compensatória, já que esses animais são viáveis. Não conseguimos detectar 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) por espectrometria de massa. Vale ressaltar que detectar o 4-HNE livre *in vivo* é muito difícil, pois a reatividade dele é muito alta. Provavelmente ele já reagiu com alguma proteína, lipídio ou até mesmo DNA e por isso nós não o detectamos nessa análise. Dessa forma, decidimos avaliar a formação de adutos de Michaelis (4-HNE-proteína) nos coração dos animais. Como podemos observar nas figuras 8G e H, os animais com mutação em heterozigose e homozigose apresentaram um significante aumento na expressão de adutos 4-HNE-proteína quando comparados com os animais WT.

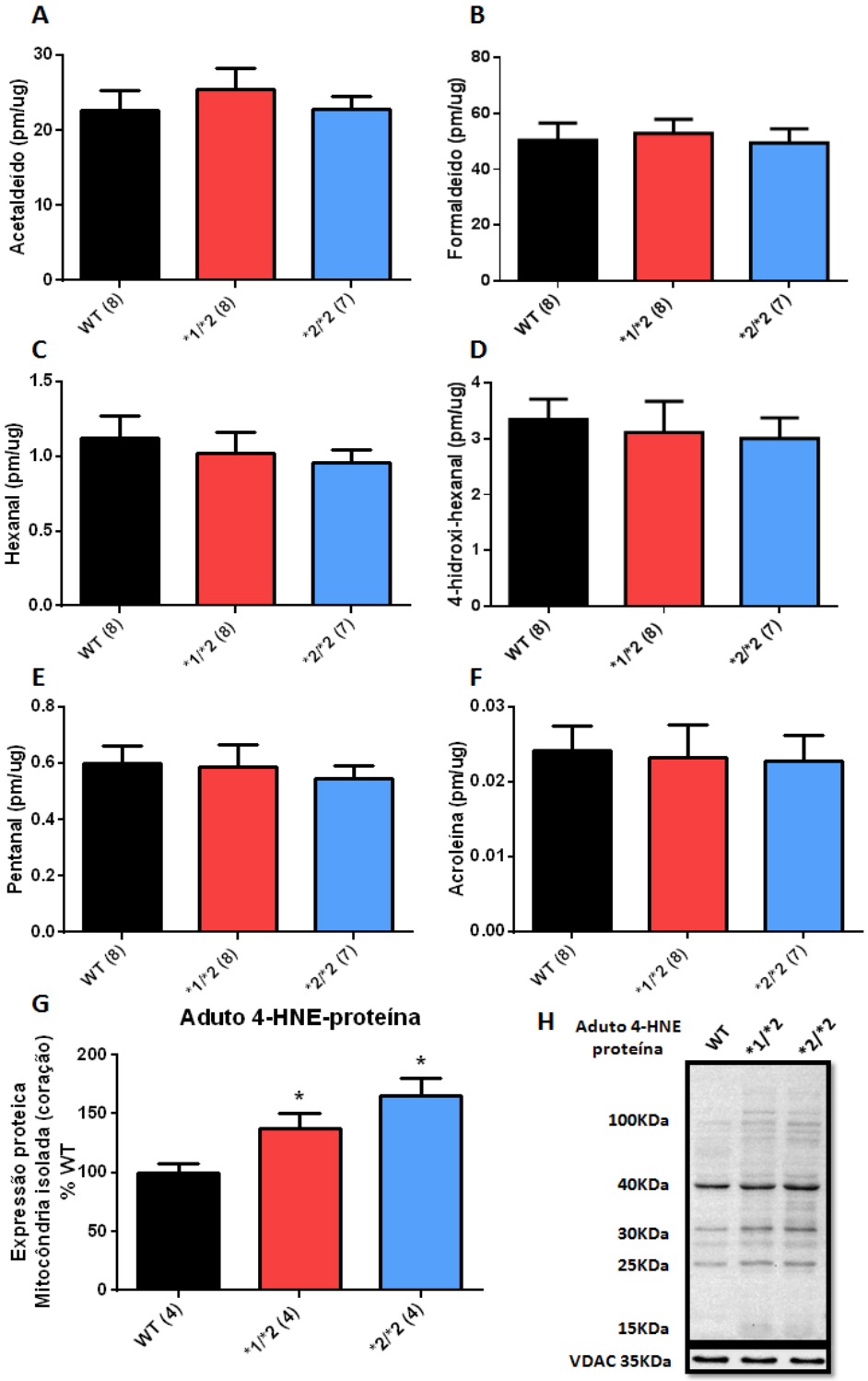

Figura 8 - Aldeídos cardíacos. Acetaldeído (A). Formaldeído (B). Hexanal (C). 4-hidroxi-hexanal (D). Pentanal (E). Acroleína (F). Expressão proteica da formação de adutos 4-hidroxi-2-nonenal-proteína (G). *Western blotting* representativo dos adutos 4-HNE-proteína e normalizador VDAC (H), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses.

Tendo em vista que a glutationa é uma alternativa para neutralizar alguns aldeídos, nosso próximo passo foi avaliar o estado redox do par glutationa reduzida (GSH)/glutationa oxidada (GSSG) nos corações dos animais selvagens e mutantes heterozigotos e homozigotos. Assim como podemos observar na figura 9A, a glutationa total não muda nos animais mutantes comparados aos animais selvagens. No entanto, a glutationa oxidada está significantemente aumentada nos camundongos mutantes (Figura 9C). De fato, a razão glutationa reduzida/oxidada sugere que os animais mutantes tem reduzida a capacidade de tamponamento pela glutationa (Figura 9D).

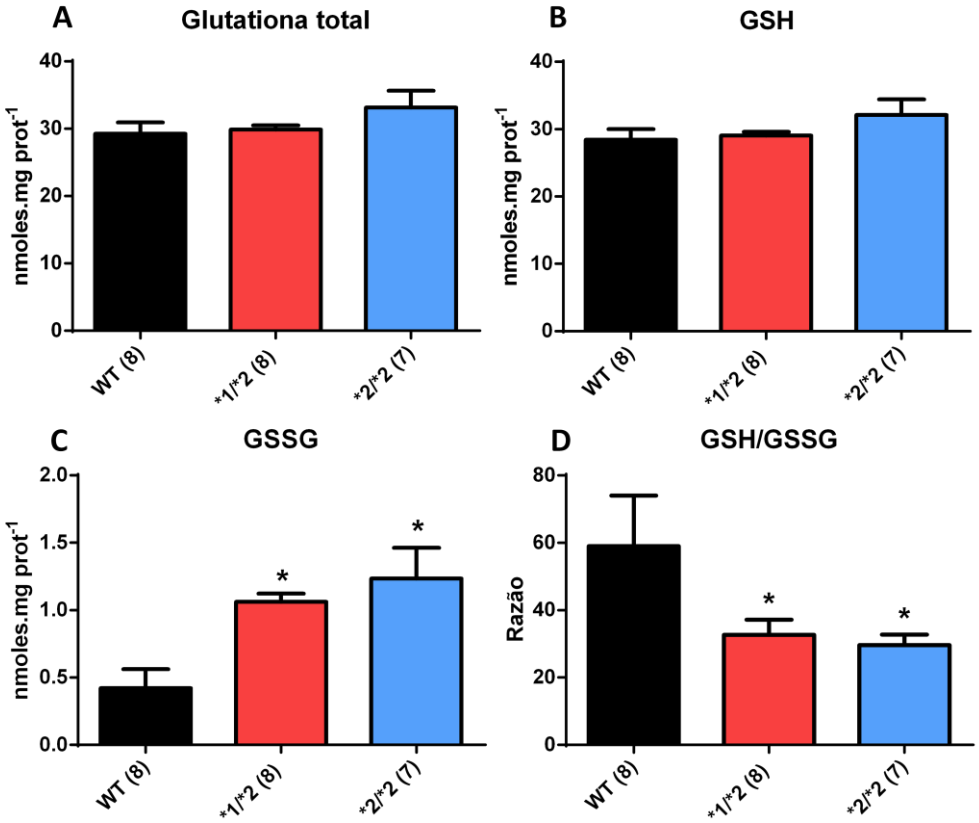

Figura 9 - Glutationa total (A). Glutationa reduzida (GSH) (B). Glutationa oxidada (GSSG) (C). Razão glutationa reduzida/oxidada (GSH/GSSG) (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses.

Diante desse cenário a respeito da mutação, nosso próximo passo foi avaliar se os camundongos com a mutação ALDH2*2 possuem algum prejuízo na bioenergética mitocondrial. Para isso, avaliamos o consumo de oxigênio e liberação de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias isoladas de coração. Também avaliamos a bioenergética em mitocôndrias isoladas do fígado dos animais com o intuito de

checar se a resposta obtida no coração era tecido dependente ou conservada entre diferentes tecidos.

Consumo de oxigênio. No consumo de oxigênio mitocondrial foram avaliadas as seguintes medidas: consumo de oxigênio no Estado 2 (respiração basal mitocondrial), consumo de oxigênio no Estado 3 (respiração máxima após adição de ADP), consumo de oxigênio no estado 4 (respiração após adição de oligomicina, que bloqueia o complexo V) e consumo de oxigênio no estado desacoplado (após adição de FCCP, um desacoplador).

Nossos resultados apontam que os animais mutantes possuem um déficit no metabolismo oxidativo, representado pela redução do consumo de oxigênio em todos os estados avaliados no coração (Figura 10A-D) e estados 2, 3 e 4 no fígado (Figura 11A-D), quando comparados ao grupo controle selvagem.

Liberação de H_2O_2. Foi possível notar que os animais mutantes possuem uma menor liberação mitocondrial de peróxido de hidrogênio quando comparamos ao WT nos diferentes estados avaliados no coração e no fígado (Figura 10 e 11 E-H). Esses resultados foram muito interessantes porque mostram que mesmo apresentando um déficit energético, o coração dos animais transgênicos não produzem espécies reativas em excesso.

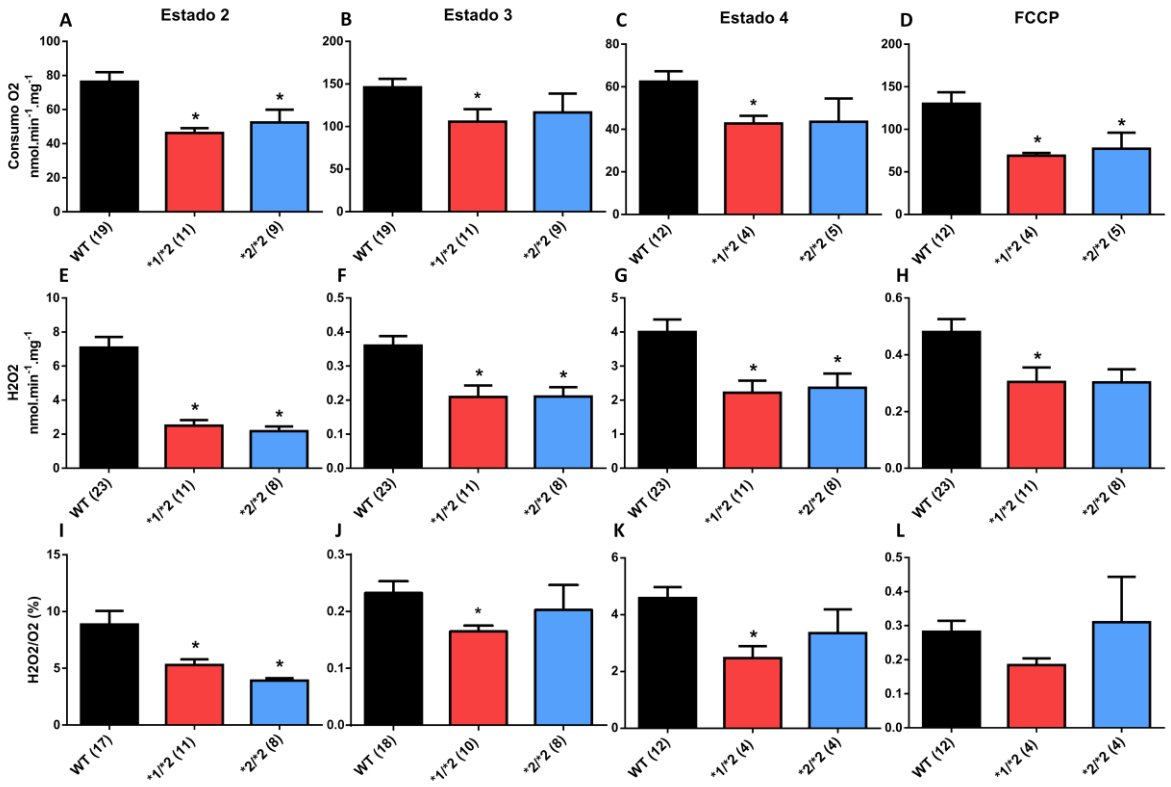

Figura 10 - Mitocôndria cardíaca. Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e estado desacoplado (FCCP) (D). Liberação de H_2O_2 no Estado 2 (E), Estado 3 (F), Estado 4 (G) e estado desacoplado (FCCP) (H). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (I), Estado 3 (J), Estado 4 (K) e estado desacoplado (FCCP) (L), em camundongos WT (selvagem), 2/*1 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, $p \leq 0,05$, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses.

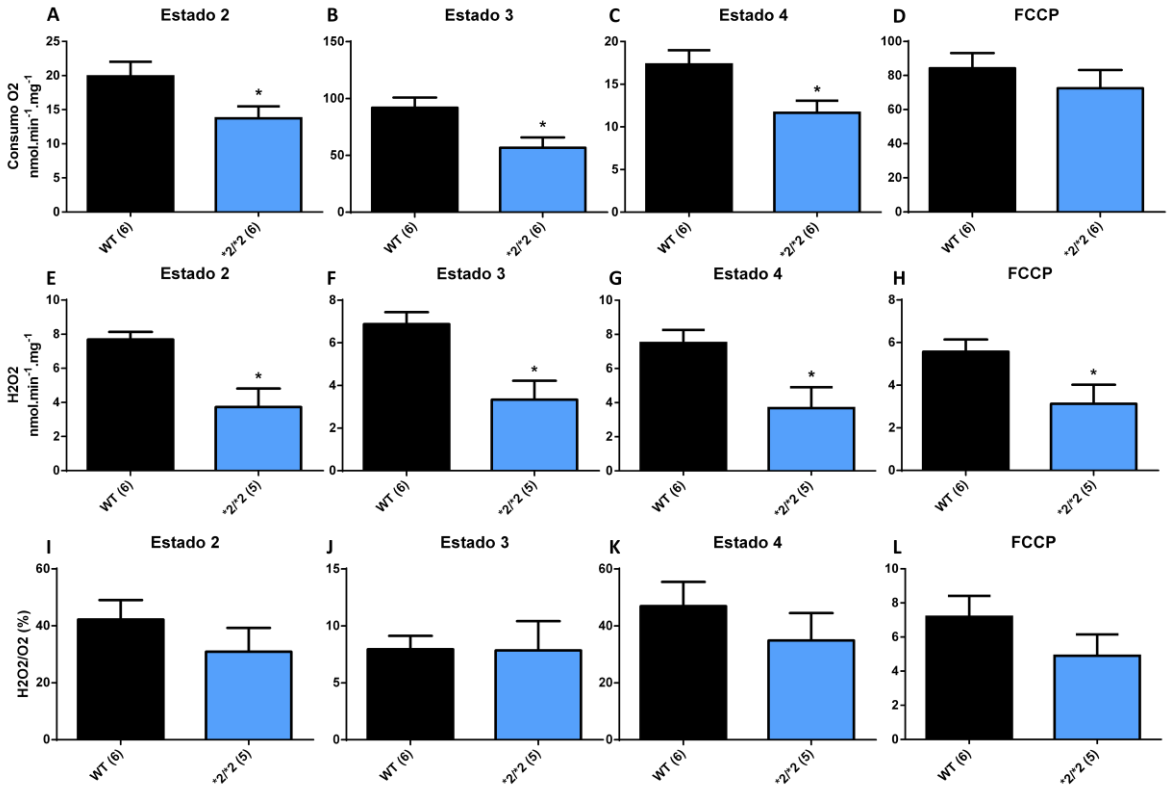

Figura 11 - Mitocôndria hepática. Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e estado desacoplado (FCCP) (D). Liberação de H_2O_2 no Estado 2 (E), Estado 3 (F), Estado 4 (G) e estado desacoplado (FCCP) (H). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (I), Estado 3 (J), Estado 4 (K) e estado desacoplado (FCCP) (L), em camundongos WT (selvagem), 2/*1 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT, número de animais expresso entre parênteses.

Expressão proteica. Posteriormente, avaliamos se a redução do consumo de oxigênio poderia estar associada ao menor número de mitocôndrias nos animais mutantes. Para isso, avaliamos por *Western blotting,* a expressão proteica dos complexos mitocondriais no lisado cardíaco, não observando diferenças dos complexos I, IV e V entre os grupos (Figura 12A-D).

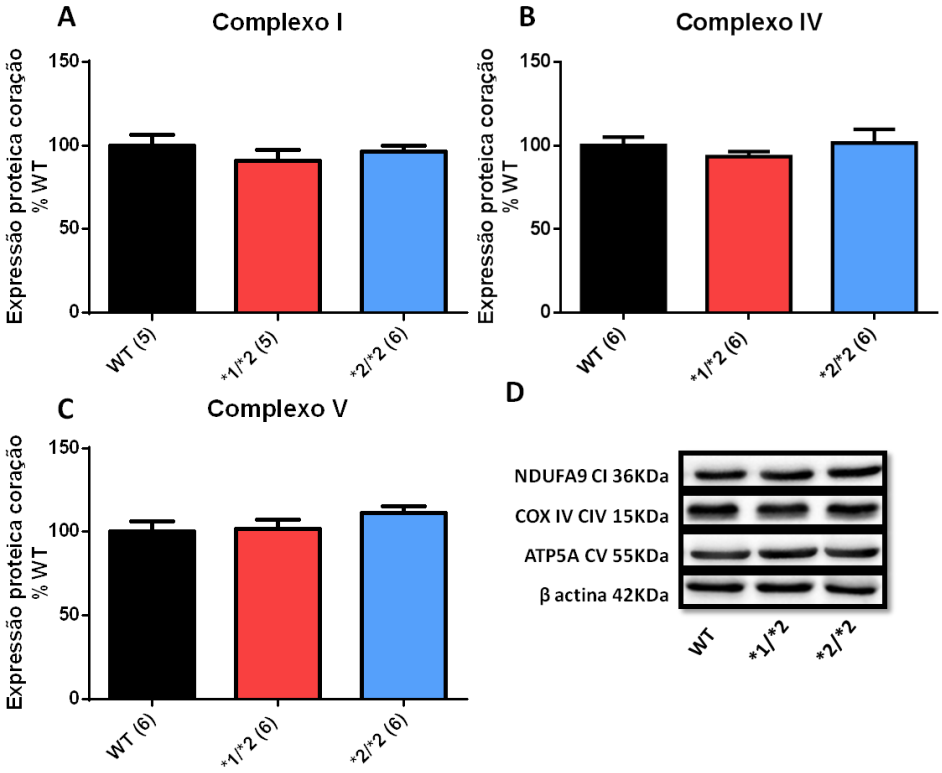

Figura 12 - Complexos mitocondriais I (A), IV (B) e V (C) avaliados em lisado total de coração. *Western blotting* representativo dos complexos I (NDUFA9), IV (COX IV) e V (ATP5A) e o normalizador Beta actina (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, p≤0,05, número de animais expresso entre parênteses.

Acompanhamos a sobrevida dos animais WT e mutantes ALDH2*2, a partir de 2 meses de idade, e vimos que os animais dos diferentes grupos possuem a mesma taxa de sobrevida, durante as 10 semanas de análise experimental (Figura 13A). No entanto, os animais mutantes, tanto hetero como homozigotos, possuem um peso corporal menor que o animal controle, além de menor peso da gordura retroperitoneal e epididimal (Tabela 3S). Nenhuma diferença foi encontrada nas massas cardíacas, pulmonares e renais, porém o animal mutante heterozigoto (*1/*2) possui um fígado aumentado e o mutante homozigoto (*2/*2) possui um aumento no peso do baço quando comparados aos animais WT (Tabela 3S). Essas diferenças podem ser explicadas por possíveis alterações no sistema imunológico dos animais mutantes.

Para avaliarmos a função cardíaca dos camundongos com a mutação ALDH2*2 realizamos a análise ecocardiográfica transtorácica, com 4 e 10 semanas, a partir de 2 meses de idade.

Nas medidas lineares ecocardiográficas, os camundongos mutantes (*1/*2 e *2/*2) não apresentam alterações no diâmetro, septo ou parede ventricular (Tabela 2S) e possuem a mesma fração de encurtamento e ejeção dos animais WT (Figura 13B e tabela 2S). Além disso, não houve diferença nas análises de velocidade do fluxo sanguíneo na válvula mitral (ondas E e A), tempo de desaceleração (Tabela 2S), tempo de relaxamento isovolumétrico (Figura 13C), nem nas medidas de eixo curto (Tabela 2S).

Ainda nenhuma alteração foi encontrada no diâmetro do cardiomiócito e na deposição de colágeno total, avaliados por histologia, no coração dos animais mutantes comparados aos animais WT (Figura 13D-E e 1-2S).

Avaliamos também, alguns parâmetros fisiológicos dos animais, como pressão arterial sistólica (medida indireta), frequência cardíaca basal (medida indireta), consumo de oxigênio em repouso e tolerância ao esforço físico.

Os animais mutantes, tanto heterozigotos como homozigotos, possuem uma pressão arterial sistólica menor que os animais WT em 4 semanas. Além disso, a frequência cardíaca desses animais também está diminuída, quando comparada ao controle, independente da semana analisada (Tabela 1S). Ainda, quando avaliamos o consumo de oxigênio em repouso (avaliado por respirometria) não observamos diferenças entre os animais mutantes, quando comparados aos selvagens, no entanto, os animais mutantes apresentam consumo de oxigênio máximo reduzido em relação ao grupo controle, medido indiretamente pela distância máxima percorrida em teste físico até a exaustão, essa diferença foi observada na análise com 10 semanas (Figura 13F e G).

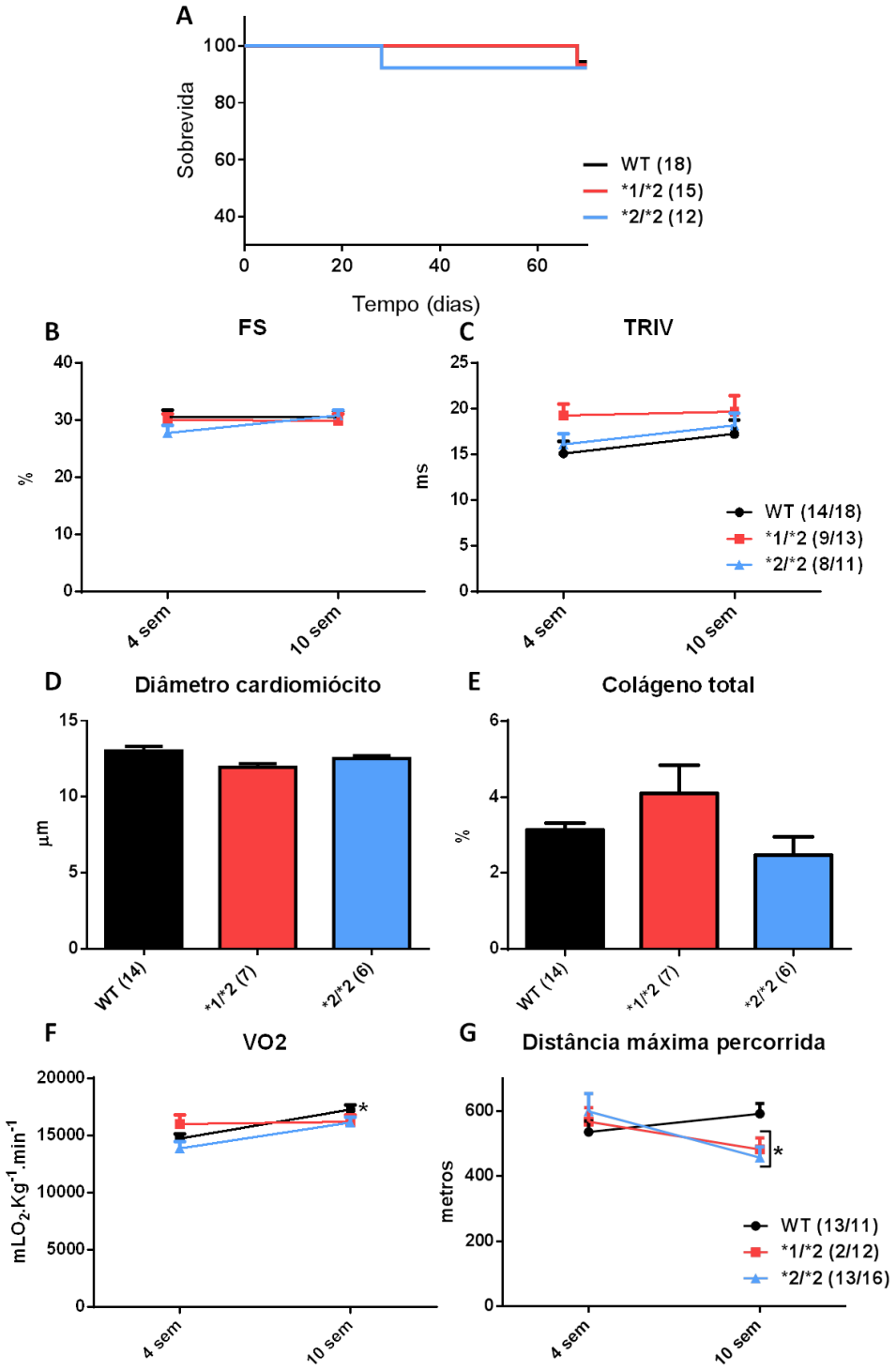

Figura 13 - Sobrevida (A). Fração de encurtamento (FS) (B). Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (C). Diâmetro do cardiomiócito (D). Colágeno total (E). Consumo de oxigênio (VO_2) (F). Distância máxima percorrida (G), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto). Média±erro padrão, número de animais expresso entre parênteses.

Sumarizando. Os animais com a mutação dominante negativa E487K para a ALDH2 apresentam redução da atividade enzimática e da expressão proteica da

ALDH2, e não apresentam alterações funcionais cardíacas. Além disso, os animais mutantes possuem um déficit metabólico, medido indiretamente pela distância máxima percorrida em teste físico até a exaustão e em mitocôndria isolada, e um estresse redox observado pela menor razão glutationa reduzida/oxidada e pelo acúmulo de adutos 4-HNE-proteína. No entanto, os camundongos mutantes não produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio quando comparamos ao WT. Então, parece que a mutação provoca algum tipo de desbalanço energético mitocondrial, mas como será que se comportam frente ao estresse, no caso, o infarto do miocárdio?

5.2 Etapa 2: Os animais com a mutação E487K são mais suscetíveis ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca? E o tratamento com Alda-1 é capaz de reverter/minimizar os efeitos deletérios do infarto do miocárdio?

Baseados nas alterações encontradas nos animais mutantes, nosso próximo passo foi avaliar os efeitos deletérios com o infarto do miocárdio nos animais WT e ALDH2*2 e testar se a ativação específica da ALDH2 com a molécula Alda-1 é capaz de reverter ou mesmo minimizar os danos cardíacos e mitocondriais encontrados após infarto do miocárdio. Para isso, o tratamento com a Alda-1 foi iniciado com 4 semanas após a cirurgia de oclusão da artéria coronária descendente esquerda e teve duração de 6 semanas (Figura 4).

Inicialmente, avaliamos a atividade da ALDH2, e observamos um comportamento da atividade bem característico do animal WT e mutante heterozigoto, onde o controle possui uma atividade basal, que é reduzida no animal infartado (WT IC e *1/*2 IC), e retorna ao valor do controle WT com o tratamento com a Alda-1 aumentando a atividade do heterozigoto em cerca de 60% em relação ao seu controle. Já os animais com a mutação em homozigose possuem uma atividade basal reduzida, quando comparada ao animal WT, que se mantém durante a IC, porém após o tratamento com a Alda-1 observamos um aumento de 104% da atividade enzimática, quando comparada ao seu estado basal (Ctrl). (Figura 14A).

A expressão proteica da ALDH2 durante a IC manteve-se a mesma, comparada aos controles, sendo que nos animais mutantes tanto hetero, como homozigotos está reduzida, sem interferência do tratamento com a Alda-1 (Figura

14B e D). Além disso, nenhuma alteração foi observada na expressão da ALDH1A1 após o infarto do miocárdio, nem após o tratamento com a Alda-1 (Figura 14C e D).

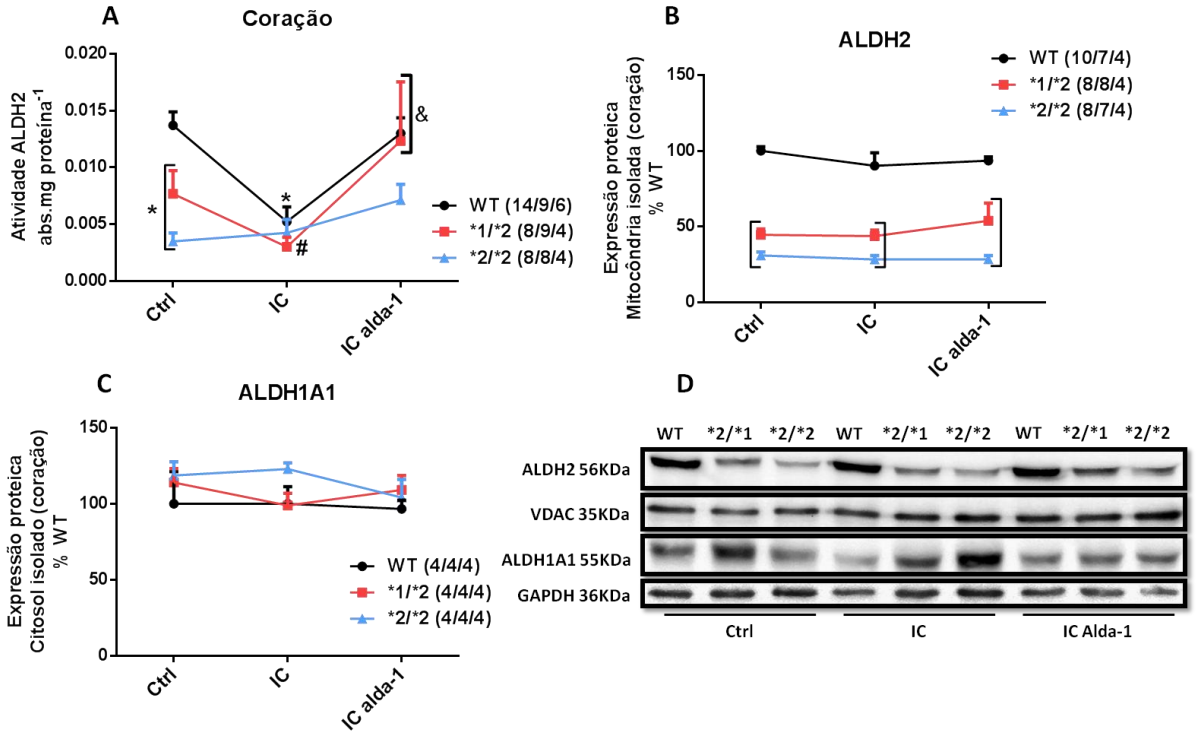

Figura 14 - Atividade da ALDH2 cardíaca (A). Expressão proteica da ALDH2 (B). Expressão proteica da ALDH1A1 (C). *Western blotting* representativo da ALDH2, ALDH1A1 e seus normalizadores VDAC e GAPDH, respectivamente (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05. * vs WT ctrl, # vs *1/*2 ctrl, & vs IC e Traço vs WT, número de animais expresso entre parênteses.

Avaliamos a sobrevida dos animais, a partir de 2 meses de idade, e vimos que cerca de 60% dos animais com a cirurgia de infarto do miocárdio, independente do genótipo, morrem no decorrer das 4 semanas após a cirurgia (período que antecede o tratamento). No momento em que iniciamos o tratamento (área hachurada do gráfico) não observamos mais perda de animais (Figura 15A).

Como observado na etapa anterior, os animais WT, *1/*2 e *2/*2 não possuem diferenças na função cardíaca avaliada por ecocardiografia em estado basal. No entanto, para confirmar a disfunção cardíaca dos camundongos infartados e o efeito do tratamento com a Alda-1 avaliamos parâmetros funcionais e morfológicos dos animais, com quatro e dez semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio.

Independente do genótipo, os animais com infarto do miocárdio apresentam uma significante redução na fração de encurtamento, fração de ejeção e área fracional ventricular esquerda em 4 semanas e 10 semanas após a cirurgia (Figura 15B e Tabela 2S), a qual foi acompanhada por dilatação da câmara ventricular esquerda, caracterizada pelo aumento no diâmetro diastólico e sistólico ventricular esquerdo (Tabela 2S) e aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV, Figura 15C) com 4 semanas. Além disso, nenhuma alteração foi observada no peso corporal dos animais, no entanto, os corações dos animais WT e *1/*2 com infarto tiveram maior massa, quando comparados aos controles e o *2/*2 praticamente manteve sua massa cardíaca, mesmo pós-infarto (Tabela 3S). E na análise histológica dos corações infartados, observamos um aumento no diâmetro do cardiomiócito (Figura 15F e 1S), acompanhado por um aumento no colágeno total (Figura 15G e 2S). Essas alterações mostram que o infarto do miocárdio foi efetivo em gerar uma cardiomiopatia dilatada nos animais, porém diferente do que hipotetizamos, essas alterações cardíacas não são exacerbadas com a mutação E487K da ALDH2.

Ainda, a ativação sustentada da ALDH2, com a Alda-1, durante seis semanas, foi efetiva em melhorar a função cardíaca dos animais IC, recuperando os valores próximos aos controles, independente do genótipo. O tratamento restaura a fração de encurtamento, ejeção e FAC (Figura 15B e Tabela 2S), ameniza a dilatação da câmara do ventrículo esquerdo e o tempo de relaxamento isovolumétrico (Figura 15C e Tabela 2S) e reduz o diâmetro do cardiomiócito e a deposição de colágeno (Figura 15F-G e 1-2S).

Com relação às variáveis consumo de oxigênio basal (VO2), distância máxima percorrida, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 15D-E e Tabela 3S).

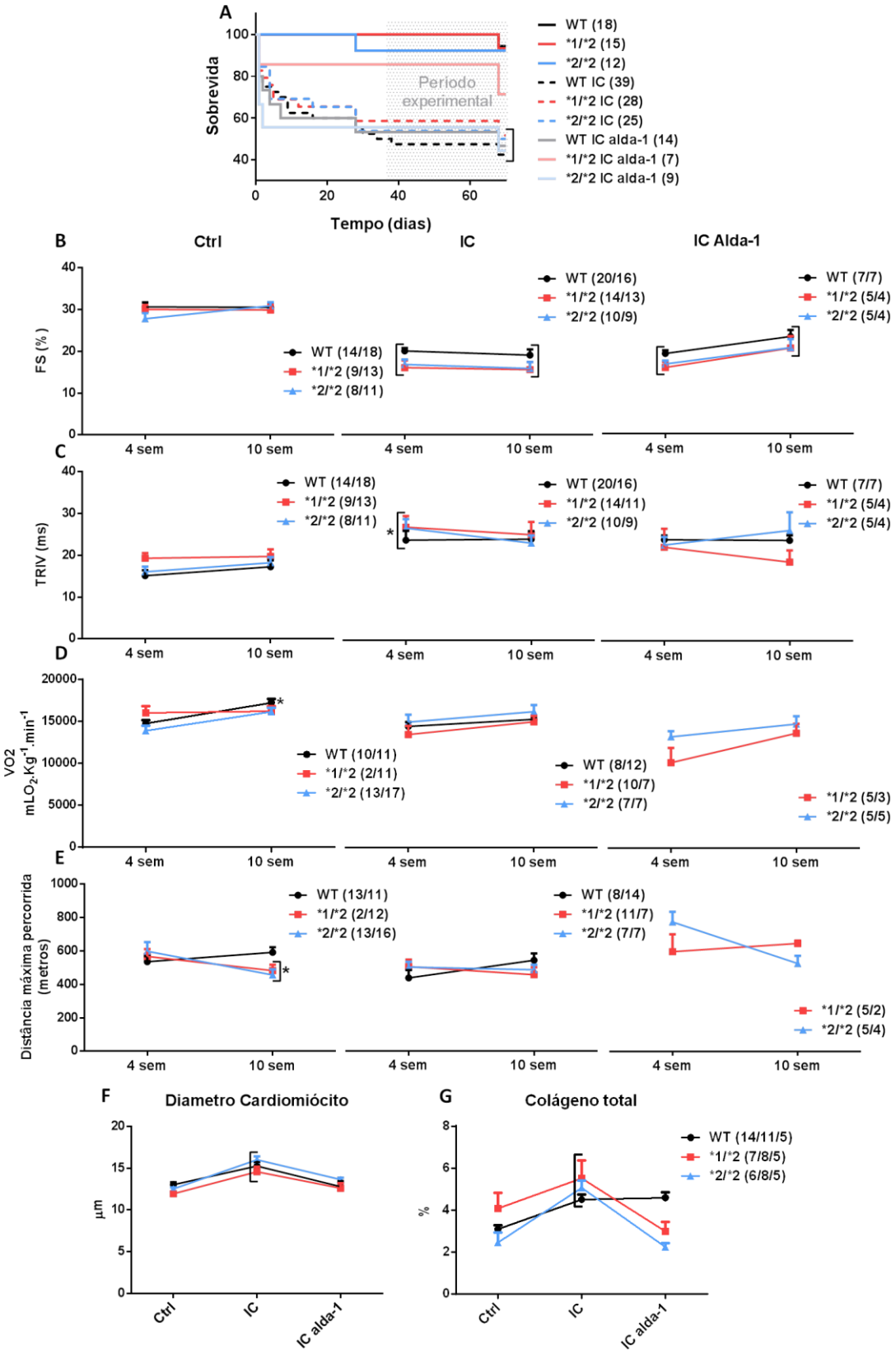

Figura 15 - Sobrevida (A). Fração de encurtamento (FS) (B). Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (C). Consumo de oxigênio (VO2) (D). Distância máxima percorrida (E). Diâmetro do cardiomiócito (F). Colágeno total (G), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto), nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1).

Média±erro padrão, Traço vs ctrl, * vs WT ctrl, número de animais expresso entre parênteses.

Avaliamos ainda a contratilidade sarcomérica do cardiomiócito isolado e o transiente de cálcio para verificar se a mutação ALDH2*2 em homozigose causaria disfunção contrátil dos cardiomiócitos isolados estimulados eletricamente com 1Hz e 5Hz.

Contratilidade do cardiomiócito. Observamos que os cardiomiócitos dos animais mutantes possuem menor amplitude de contração e menor velocidade de contração e de relaxamento da +dL/dt e da –dL/dt, quando comparados aos cardiomiócitos dos animais WT dentro do grupo controle (1Hz) (Figura 16A-C). Após infarto do miocárdio não observamos alterações na amplitude de contração quando comparados aos controles (Figura 16A). No entanto, os animais mutantes IC possuem maior velocidade de contração e de relaxamento da +dL/dt e da –dL/dt, que os seus controles e que os animais selvagens IC, o que foi normalizado com o tratamento com a Alda-1, retornando ao controle (Figura 16B e C).

Transiente de cálcio. Nenhuma alteração foi observada no transiente de cálcio dos animais mutantes homozigotos, quando comparados aos animais selvagens, estimulados na frequência de 1Hz. No entanto, quando estimulados com 5Hz, os animais mutantes apresentam maior amplitude, liberação e captação de cálcio que os animais selvagens (Figura 16D-F). Ainda, os animais com a mutação ALDH2*2 com IC possuem maior pico de cálcio e maior liberação e captação de cálcio que os animais WT também IC, que também foi normalizado pelo tratamento com a Alda-1 (Figura 16D-F).

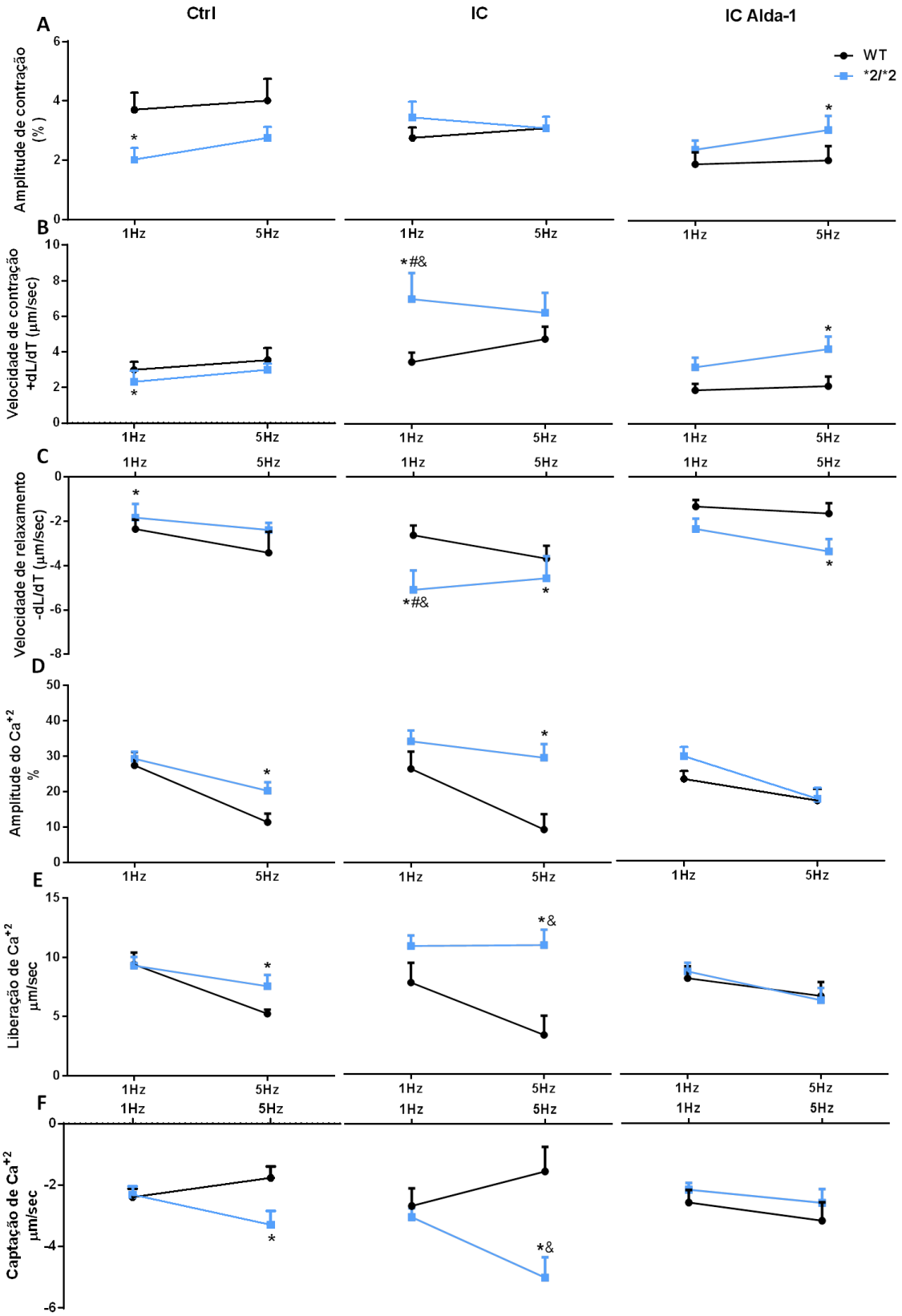

Figura 16 - Contratilidade do sarcômero e transiente de cálcio dos cardiomiócitos isolados estimulados com 1Hz e 5Hz de frequência. Amplitude de contração do sarcômero (A). Velocidade máxima de contração do sarcômero (+dL/dt) (B). Velocidade máxima de relaxamento do sarcômero (-dL/dt) (C). Amplitude do pico de cálcio (D). Velocidade de liberação do cálcio (E). Velocidade de captação do cálcio (F), em camundongos WT (selvagem) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência

cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, * vs WT, # vs Ctrl & vs IC Alda-1.

Baseados na nossa proposta inicial onde tanto alterações da atividade da enzima mitocondrial ALDH2 quanto o quadro de disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio podem afetar o metabolismo cardíaco, decidimos caracterizar o metabolismo mitocondrial cardíaco através dos seguintes experimentos com mitocôndria isolada: avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial e liberação de peróxido de hidrogênio. As medidas foram realizadas nos animais com 18 semanas de idade (10 semanas após cirurgia).

Consumo de oxigênio. No consumo de oxigênio mitocondrial foram avaliados o consumo de oxigênio basal (Estado 2) e o consumo máximo de oxigênio após adição de ADP (Estado 3).

Esses dados avaliados podem ser observados na figura 17, onde nossos resultados apontam que os animais selvagens infartados (WT IC) possuem um déficit no consumo de oxigênio mitocondrial, representado pela redução nos estados 2 e 3 quando comparados ao grupo controle selvagem (WT), mostrando prejuízo devido ao infarto. Além disso, o tratamento com o ativador da ALDH2 (IC Alda-1) foi efetivo em restaurar o consumo de oxigênio dos animais WT infartados (Figura 17A e B). No entanto, como já observado na etapa anterior os animais mutantes homozigotos *2/*2 e heterozigotos *1/*2 controles possuem um déficit no consumo de oxigênio, quando comparados ao grupo controle selvagem, que se mantém reduzido após o infarto do miocárdio e durante o tratamento com Alda-1 (Figura 17A).

Liberação de H_2O_2. Avaliamos também a liberação de espécies reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio, pela mitocôndria. Os resultados mostram uma alta liberação de H_2O_2 por molécula de O_2 mitocondrial durante infarto do miocárdio dos animais WT (Figura 17C e D), que foi mantido a níveis basais com o tratamento com Alda-1 na insuficiência cardíaca (Figura 17C e D). Esses resultados são extremamente promissores, pois demonstram que o acúmulo de aldeídos na insuficiência cardíaca é suficiente para desencadear danos na maquinaria mitocondrial, sendo que a Alda-1 reverte todo esse processo, basicamente através da remoção dos aldeídos com mais eficiência.

Entretanto, foi possível notar que os animais mutantes produzem menor quantidade de peróxido de hidrogênio quando comparamos ao WT no grupo controle e no grupo infartado, e a Alda-1 não altera esse nível basal de espécies reativas (Figura 37E-H). Esses resultados mostram que mesmo apresentando um déficit energético, com menor produção de oxigênio, o coração dos animais transgênicos não produz radicais livres em excesso, mesmo frente ao estresse, infarto do miocárdio, eles liberam menos peróxido de hidrogênio que o grupo selvagem.

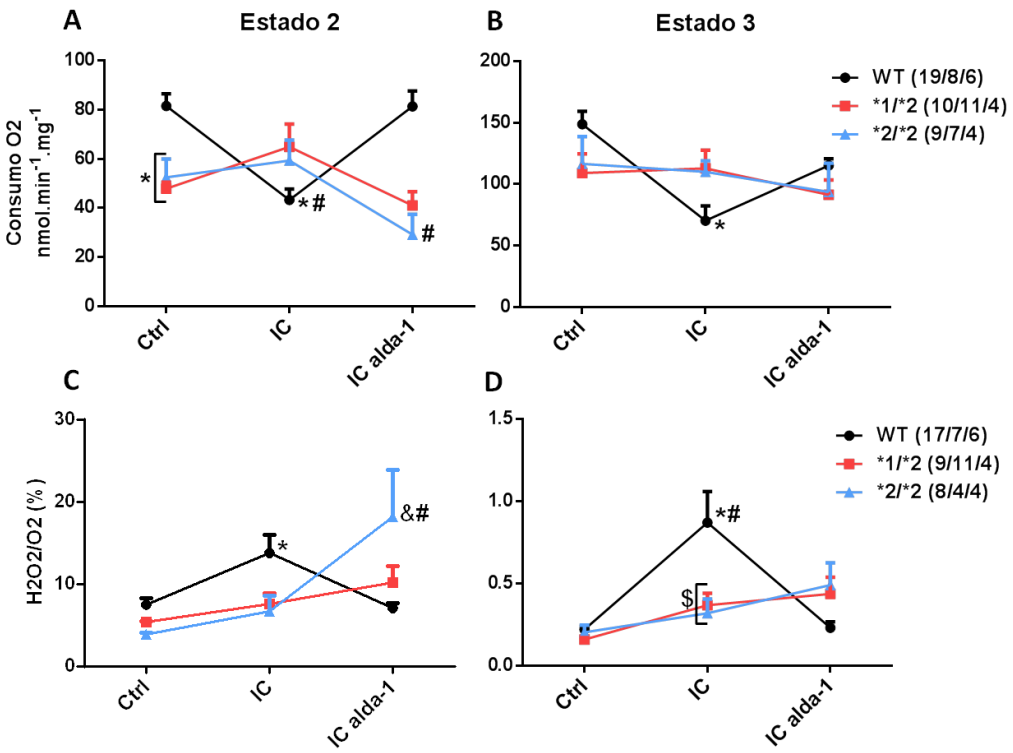

Figura 17 - Consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 2 (basal) (A) e Estado 3 (máximo após ADP) (B). Razão liberação de H_2O_2 pelo consumo de O_2 (H_2O_2/O_2) no Estado 2 (C) e Estado 3 (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto), nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT ctrl, $ vs WT IC, # vs WT IC Alda-1, e & vs *2/*2 ctrl, número de animais expresso entre parênteses.

Expressão proteica. Não vimos alterações nos complexos mitocondriais I, IV e V avaliados por *Western Blotting* (Figura 3S) entre os animais WT, *1/*2 e *2/*2 no grupo controle, nem IC e IC Alda-1.

Analisamos ainda, o aldeído produzido durante o estresse oxidativo, o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), através da sua ligação com proteínas e formação dos adutos de Michaelis. Observamos que durante a insuficiência cardíaca ocorre um

aumento na formação dos adutos 4-HNE-proteína nos animais selvagens e mutantes heterozigotos, sendo que nos animais mutantes homozigotos já está aumentado no controle e se mantém alto após a IC (Figura 18). Esse resultado sugere uma ineficiência enzimática da ALDH2 na insuficiência cardíaca, caracterizada pelo exacerbado acúmulo de aldeídos tóxicos cardíacos normalmente metabolizados pela ALDH2. No entanto, como podemos observar na figura 18, a ativação da ALDH2, pela molécula Alda-1, foi efetiva em remover o aldeído altamente reativo 4-HNE e reduzir os adutos 4-HNE-proteína, independente do genótipo. Os níveis de 4-HNE podem ser mais bem observados no *heat map* (Figura 18A e quantificação 18B-D), onde conseguimos identificar um aumento dos adutos 4-HNE-proteína com a redução da atividade da ALDH2 pela mutação (*1/*2 e *2/*2) e pelo infarto do miocárdio, e uma redução desses adutos pelo aumento da atividade da ALDH2 com Alda-1.

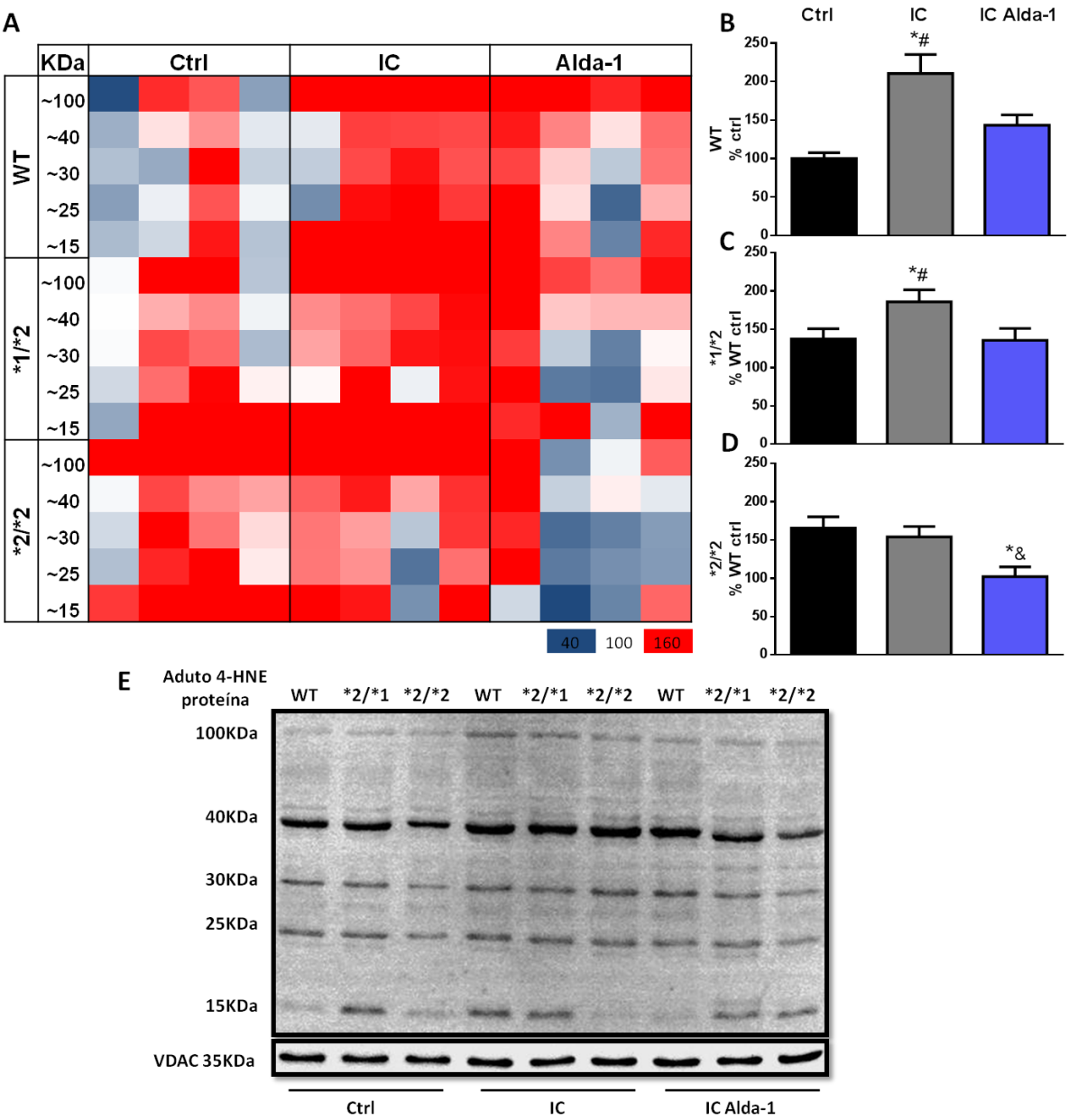

Figura 18 - *Heat map* da expressão proteica dos adutos 4-hidroxi-2-nonenal-proteína (A). Quantificação dos adutos 4-HNE-proteína nos animais WT (B), mutantes heterozigotos (C) e mutantes homozigotos (D). *Western blotting* representativo dos adutos 4-HNE-proteína e o normalizador VDAC (E), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs ctrl, # vs IC Alda-1 e & vs IC, número de animais expresso entre parênteses.

Sumarizando. Podemos concluir que os animais com a mutação ALDH2*2, tanto em heterozigose, quanto em homozigose, desenvolvem disfunção cardíaca e remodelamento ventricular equivalente ao animal C57Bl6, com maior compensação do cardiomiócito, que aumenta a velocidade de contração e relaxamento e a capitação e liberação de cálcio. Porém, quando avaliamos o consumo de oxigênio

dos mutantes vimos uma diminuição, tanto em repouso, quanto frente ao estresse causado pelo infarto. Entretanto, a mitocôndria desses animais parece estar pré-condicionada, respondendo com menor produção de peróxido de hidrogênio e maior consumo de O_2 que os animais controle quando infartados.

Além disso, podemos dizer que a Alda-1 foi efetiva em restaurar os danos cardíacos oriundos do infarto do miocárdio, recuperando os parâmetros ecocardiográficos, diâmetro do cardiomiócito e colágeno total, tanto nos animais selvagens, quanto nos mutantes hetero e homozigotos. Ainda, a ativação da ALDH2 pela Alda-1 removeu com maior eficiência o 4-HNE, reduzindo os adutos de Michaelis. No entanto, quando avaliamos a função mitocondrial, os mutantes parecem já ter uma proteção intrínseca com respiração basal e liberação de peróxido mais baixa que o WT, e por isso a Alda-1 não altera, como vista nos animais WT, onde ela foi efetiva em normalizar esses padrões pós-disfunção cardíaca.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, demonstramos em ratos, que a progressão do infarto do miocárdio é caracterizada por significante redução da atividade catalítica da ALDH2, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. O tratamento sustentado com Alda-1 (iniciando 24 h após a cirurgia de infarto) é capaz de reduzir o conteúdo de aldeídos e melhorar a função mitocondrial cardíaca após infarto do miocárdio. Essas alterações são acompanhadas pela melhora da função ventricular esquerda dos animais (Gomes et al., 2015), mostrando um papel importante da ALDH2 na função cardíaca desses animais.

Para melhor avaliarmos a contribuição dessa enzima na função cardíaca nós utilizamos no presente estudo camundongos *knock-in* para ALDH2. Essa mutação dominante negativa E487K para a ALDH2, conhecida como ALDH2*2, é a mesma encontrada em humanos, onde ela é muito prevalente (~600 milhões de pessoas). A mutação ALDH2*2 reduz a atividade da ALDH2 drasticamente. Em humanos é esperada uma redução da atividade enzimática em 50% no heterozigoto e 95% no homozigoto (Farrés et al., 1994; Ferencz-Biro, Pietruszko, 1984), sendo que nós observamos redução de 44% e 75% nos animais mutantes heterozigotos e homozigotos, respectivamente. Vimos também, redução na expressão proteica da ALDH2, WT 100%, *1/*2 44% e *2/*2 25%. Esses dados também corroboram achados em humanos, Lai e colaboradores (Lai et al., 2014) mostraram, em fígado de humanos com a mutação, uma redução para 44% em heterozigotos e 30% em homozigotos. Essa alteração na expressão proteica deve-se à desestabilização estrutural desenvolvida pela mutação da enzima, facilitando sua degradação (Larson, Weiner, Hurley, 2005; Larson et al., 2007; Perez-Miller et al., 2010).

Além disso, os animais mutantes apresentam menor peso corporal e menos gordura retroperitoneal e epididimal, que os animais selvagens. Isso já foi observado em animais que hiperexpressam a enzima mutada (ALDH2*2), de forma mais severa, inclusive com perda muscular e osteopenia (Endo et al., 2009).

No entanto, os animais mutantes, tanto em heterozigose, como em homozigose, possuem a mesma razão peso do coração pelo peso corporal e a mesma função cardíaca, avaliada por ecocardiografia, que os animais selvagens. O mesmo foi observado em animais knockout para ALDH2 (Wang et al., 2016) e nos animais que hiperexpressam a ALDH2 (Doser et al., 2009; Zhang et al., 2012).

Apesar dos animais mutantes não apresentarem alteração na função cardíaca, eles apresentam redução na amplitude de contração sarcomérica e menor velocidade de contração e de relaxamento dos cardiomiócitos isolados. Acreditamos que essas alterações se dão pela redução da atividade catalítica da ALDH2, tendo em vista que na hiperexpressão da ALDH2, esses parâmetros não foram alterados, quando comparados ao WT (Doser et al., 2009; Zhang et al., 2012).

Vimos ainda, que os nossos animais knock-in para ALDH2 possuem uma redução no metabolismo mitocondrial, essa redução também foi observada nos animais que superexpressam a mutação (Endo et al., 2009), nesse estudo eles também viram um aumento do 4-HNE cardíaco, assim como nos animais heterozigotos e homozigotos analisados. Endo e colaboradores observaram, ainda, estresse oxidativo na matrix mitocondrial, no entanto com um aumento da concentração de glutationa, através da razão GSH/GSSG. Ao contrário, os nossos animais apresentam a razão GSH/GSSG reduzida, mostrando redução de tamponamento pela glutationa.

Em vista desses resultados, parece que mesmo em estado basal, os animais mutantes possuem uma redução na bioenergética mitocondrial, mas que não afeta a função cardíaca. Nosso próximo passo foi avaliar se frente ao estresse, no caso o infarto do miocárdio, esses animais com a mutação E487K da ALDH2 respondem de forma exacerbada, quando comparados aos animais selvagens.

Para isso, nós optamos por desenvolver disfunção cardíaca nos animais através do infarto do miocárdio, visto que essa cirurgia cardíaca é utilizada para mimetizar o quadro de insuficiência cardíaca observado em humanos (Ferreira et al., 2012; Pfeffer et al., 1979). De fato, os animais com infarto do miocárdio apresentaram redução da fração de encurtamento e ejeção, além de disfunção diastólica, acompanhado de fibrose e dilatação cardíaca, características da disfunção cardíaca também já mostradas em estudos anteriores (Campos et al., 2012; Ferreira et al., 2012; Ferreira, Brum, Mochly-Rosen, 2011; Gomes et al., 2015; Gomes et al., 2014).

Entretanto, diferente do que hipotetizávamos, após o infarto do miocárdio, os animais com a mutação ALDH2*2, tanto em heterozigose, quanto em homozigose, desenvolvem disfunção cardíaca e remodelamento ventricular equivalente ao animal controle C57Bl6. De forma interessante, animais que superexpressam a mutação demonstraram maior tolerância ao estresse de isquemia

e reperfusão que os animais WT (Endo et al., 2009), o que eles atribuem essa cardioproteção ao aumento da glutationa cardíaca.

Além disso, a disfunção cardíaca desenvolvida pelos animais faz com que a atividade da ALDH2 reduza para valores próximos aos dos animais homozigotos, mostrando o prejuízo na enzima durante a insuficiência cardíaca. De fato, Ma e colaboradores (Ma et al., 2011) mostraram que a superexpressão e o knockout da ALDH2, em camundongos, atenuou e acentuou, respectivamente, a área de infarto, fração de encurtamento e a recuperação da função ventricular esquerda após isquemia e reperfusão, assim como na hipóxia e reoxigenação.

Após o infarto do miocárdio, os animais, tanto mutantes, quanto selvagens, mantiveram a amplitude de contração. Alguns pesquisadores também não observaram mudanças na amplitude de contração de cardiomiócitos de corações infartados (Gupta, Prahash; Anand, 2000; Mackiewicz et al., 2009; Song et al., 2004). Houser e Margulies fizeram uma revisão, onde discutem se a contratilidade do cardiomiócito possui papel central durante a insuficiência cardíaca e mostram que outros parâmetros possuem maior influência, e que as propriedades contráteis podem ser semelhantes no coração normal e no IC (Houser, Margulies, 2003). Enquanto que alguns autores, diferente do que encontramos, mostram redução da contração do cardiomiócito (Holt et al., 1998; Li et al., 1995; Loennechen et al., 2002).

Apesar de manterem a amplitude de contração dos cardiomiócitos após infarto do miocárdio, os animais mutantes, tanto heterozigotos, como homozigotos apresentam maior +dL/dt e -dL/dt e maior transiente de cálcio. Enquanto que os animais selvagens IC mantêm esses parâmetros iguais ao animal controle. Parece que o coração dos animais mutantes está sofrendo mais para a manutenção da contratilidade do cardiomiócito, precisando aumentar a velocidade de contração e relaxamento. A contração dos cardiomiócitos infartados ocorre em resposta às modificações na concentração de cálcio intracelular e na sensibilidade da célula ao cálcio, além disso, o transiente de cálcio tem se mostrado aumentado durante o infarto do miocárdio (Loennechen et al., 2002; Mackiewicz et al., 2009; Wisløff et al., 2002).

Além das alterações funcionais cardíacas, o metabolismo bioenergético mitocondrial pode ser crítico para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. De fato, nossos dados mostram redução do consumo de oxigênio nos animais

selvagens IC. No entanto, quando avaliamos o consumo de oxigênio dos mutantes vimos uma diminuição no estado basal, que foi mantido frente ao estresse causado pelo infarto. Ainda, os animais que superexpressam a mutação ALDH2*2 também mantiveram o consumo de oxigênio reduzido durante modelo de isquemia e reperfusão (Endo et al., 2009), onde eles mostram que esses animais possuem uma troca de metabolismo, ativando o ciclo redox da glutationa e conferindo resistência ao estresse causado pela isquemia e reperfusão. Tendo em vista que nós encontramos estresse redox do par glutationa reduzida e oxidada, nós levantamos outras hipóteses a serem confirmadas posteriormente.

Em nossos animais, nós também achamos que possa existir uma troca de metabolismo, mas de oxidativo para glicolítico, visto que, além de manterem os níveis baixos de consumo de oxigênio, os animais não possuem alteração na liberação de H_2O_2. Ou ainda, que eles possuem um déficit na demanda de NAD, o que também manteria o consumo de oxigênio reduzido. Essas hipóteses estão sendo testadas através de metabolômica, mas para suportar a hipótese, o trabalho de Frederick e colaboradores (Frederick et al., 2016) mostra que com a perda da homeostase de NAD os animais apresentaram redução no consumo de O_2 e aumento de metabólitos da via glicolítica para manutenção do fluxo via GAPDH. O que também explicaria a menor liberação de H_2O_2 nos animais mutantes quando comparados aos WT.

Então, os animais mutantes mantêm a homeostase redox com metabolismo mitocondrial reduzido, menor consumo de O_2 e menor produção de H_2O_2 que os animais selvagens, mesmo durante a IC. Durante a IC já foi descrito uma perda da homeostase redox, representada pelo aumento exacerbado de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como vimos nos animais WT. Esse quadro contribui para o não funcionamento da maquinaria mitocondrial, o que gera um ciclo de retroalimentação positiva entre a disfunção mitocondrial e a produção de EROs no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Essa disfunção mitocondrial pode ser pelo desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons e consequente prejuízo da fosforilação oxidativa (Nojiri et al., 2006).

Além disso, em pacientes com IC, o aumento de produtos derivados da oxidação (hidroperóxidos lipídicos, 4-HNE e proteínas carboniladas) possui uma correlação positiva com a severidade da doença (Belch et al., 1991; Dhalla, Hill, Singal, 1996; Mallat et al., 1998; Singh et al., 1995; Tingberg et al., 2006). De fato,

Nakamura e colaboradores demonstraram que a redução de 40% dos níveis de 4-HNE circulante está associada à melhora da função cardíaca em pacientes com cardiomiopatia dilatada (Nakamura et al., 2002). Nos corações dos animais que passaram pela cirurgia de infarto do miocárdio foi constatado um acúmulo de 4-HNE, derivado da peroxidação lipídica.

A ALDH2 é a principal enzima responsável na remoção do 4-HNE. Nosso próximo passo foi avaliar se a ativação da dessa enzima, tanto WT, como mutada ALDH2*2, poderia reverter ou minimizar a disfunção cardíaca oriunda do infarto do miocárdio. Nossos resultados apontam que a ativação sustentada da ALDH2 utilizando a Alda-1, aumenta a atividade da ALDH2, que remove de forma mais eficiente o 4-HNE, restaurando a função cardíaca, a contratilidade do cardiomiócito e o transiente de cálcio, tanto nos animais WT, quanto nos mutantes heterozigotos e homozigotos.

De fato, a ativação farmacológica ou a hiperexpressão genética de ALDH2 tem mostrado que a melhora na desintoxicação de aldeídos reativos, tais como 4-HNE, é protetor contra lesões de isquemia/reperfusão (Chen et al., 2008), nitroglicerina (Ferreira, Mochly-Rosen, 2012), cardiomiopatia alcoólica (Ma et al., 2010) e recentemente nosso grupo demonstrou sua eficiência na insuficiência cardíaca de ratos (Gomes et al., 2014, 2015).

Por fim, o tratamento com Alda-1 foi efetivo em melhorar a respiração mitocondrial e reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio nos animais WT IC, melhora também observada em ratos com IC (Gomes et al., 2014, 2015). No entanto, nenhuma alteração foi vista no consumo de O_2 e liberação de H_2O_2 dos animais mutantes, que já possuíam a bioenergética mitocondrial reduzida no estado basal, que se manteve durante a IC e no tratamento com Alda-1. O que nos sugere, mais uma vez, a troca de metabolismo dos animais mutantes heterozigotos e homozigotos.

7 CONCLUSÃO

A mutação E487K da ALDH2 reduz a atividade da enzima ALDH2 e induz um déficit metabólico em mitocôndria isolada, e um estresse redox observado pela menor razão glutationa reduzida/oxidada e pelo acúmulo de adutos 4-HNE-proteína. No entanto, essa condição não altera a função cardíaca dos animais. Mesmo frente ao estresse causado pelo infarto do miocárdio, os animais heterozigotos e homozigotos desenvolvem a mesma disfunção cardíaca que os animais selvagens.

Além disso, a Alda-1 foi efetiva em restaurar os danos cardíacos oriundos do infarto do miocárdio, recuperando a função cardíaca, tanto nos animais selvagens, quanto nos mutantes heterozigotos e homozigotos. No entanto, quando avaliamos a função mitocondrial, os mutantes parecem já ter uma proteção intrínseca com respiração basal e liberação de peróxido mais baixa que o WT.

Baseado nisso, 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.

REFERÊNCIAS*

Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res. 2011;90(2):234-42.

Abramov AY, Gegg M, Grunewald A, Wood NW, Klein C, Schapira AH. Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in Parkinson disease. PLoS One. 2011;6(10):e25622.

Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. Antioxid Redox Signal. 2012;16(10):1150-80.

Backos DS, Fritz KS, Roede JR, Petersen DR, Franklin CC. Posttranslational modification and regulation of glutamate-cysteine ligase by the α,β-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal. Free Radic Biol Med. 2011;50(1):14-26.

Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. Br Heart J. 1991;65(5):245-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287(4):C817-33.

Brooks PJ, Enoch MA, Goldman D, Li TK, Yokoyama A. The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. PLoS Med. 2009;6(3):e50.

Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? Trends Cardiovasc Med. 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.

Cancherini DV, Queliconi BB, Kowaltowski AJ. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K+ channel activity in isolated heart mitochondria. Cardiovasc Res. 2007;73(4):720-8.

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.

_____

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. Physiol Rev. 2014;94(1):1-34.

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

Chen YJ, Chen C, Wu DC, Lee CH, Wu CI, Lee JM, et al. Interactive effects of lifetime alcohol consumption and alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms on esophageal cancer risks. Int J Cancer. 2006;119(12):2827-31.

Chen ZH, Niki E. 4-hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? IUBMB Life. 2006;58(5-6):372-3.

Colucci WS. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. Clin Cardiol. 1998;21(12 Suppl 1):I20-4.

da Silva MM, Sartori A, Belisle E, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H2O2 release, and enhances K+ transport. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(1):H154-62.

Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. J Am Coll Cardiol. 1996;28(2):506-14.

Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M. Mitochondria and vascular pathology. Pharmacol Rep. 2009;61(1):123-30.

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.

Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, et al. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. Circ Res. 2009;105(11):1118-27.

Facundo HdTF. Efeitos redox e protetores do pré-condicionamento isquêmico e da abertura do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP contra morte celular por isquemia e reperfusão cardíaca. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica). São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2007. 94 p.

Farrés J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H. Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. J Biol Chem. 1994;269(19):13854-60.

Ferencz-Biro K, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: catalytic activity in oriental liver. Biochem Biophys Res Commun. 1984;118(1):97-102.

Ferreira JC, Boer BN, Grinberg M, Brum PC, Mochly-Rosen D. Protein quality control disruption by PKCβII in heart failure; rescue by the selective PKCβII inhibitor, βIIV5-3. PLoS One. 2012;7(3):e33175.

Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D. βIIPKC and εPKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2011;51(4):479-84.

Ferreira JC, Koyanagi T, Palaniyandi SS, Fajardo G, Churchill EN, Budas G, et al. Pharmacological inhibition of βIIPKC is cardioprotective in late-stage hypertrophy. J Mol Cell Cardiol. 2011;51(6):980-7.

Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. Circ J. 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. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34(8):760-5.

Fiorelli AI, Coelho GHB, Oliveira Junior JdL, Oliveira AS. Insuficiência cardíaca e transplante cardíaco. Revista Medicina2008. p. 105-20.

Frederick DW, Loro E, Liu L, Davila A, Chellappa K, Silverman IM, et al. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. Cell Metab. 2016;24(2):269-82.

Gomes KM, Bechara LR, Lima VM, Ribeiro MA, Campos JC, Dourado PM, et al. Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. Int J Cardiol. 2015;179:129-38.

Gomes KM, Campos JC, Bechara LR, Queliconi B, Lima VM, Disatnik MH, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. Cardiovasc Res. 2014;103(4):498-508.

Gross ER, Zambelli VO, Small BA, Ferreira JC, Chen CH, Mochly-Rosen D. A personalized medicine approach for Asian Americans with the aldehyde dehydrogenase 2*2 variant. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2015;55:107-27.

Gupta S, Prahash AJ, Anand IS. Myocyte contractile function is intact in the post-infarct remodeled rat heart despite molecular alterations. Cardiovasc Res. 2000;48(1):77-88.

Holt E, Tønnessen T, Lunde PK, Semb SO, Wasserstrom JA, Sejersted OM, et al. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. J Mol Cell Cardiol. 1998;30(8):1581-93.

Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? Circ Res. 2003;92(4):350-8.

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 Rep. 2007;12(5):211-8.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 2009;47(4):333-43.

Kutuk O, Basaga H. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. Redox Rep. 2007;12(1):30-4.

Lai CL, Yao CT, Chau GY, Yang LF, Kuo TY, Chiang CP, et al. Dominance of the inactive Asian variant over activity and protein contents of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 in human liver. Alcohol Clin Exp Res. 2014;38(1):44-50.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr. 2005;18(12):1440-63.

Larson HN, Weiner H, Hurley TD. Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant. J Biol Chem. 2005;280(34):30550-6.

Larson HN, Zhou J, Chen Z, Stamler JS, Weiner H, Hurley TD. Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: roles of residues 475 and 487. J Biol Chem. 2007;282(17):12940-50.

Li P, Park C, Micheletti R, Li B, Cheng W, Sonnenblick EH, et al. Myocyte performance during evolution of myocardial infarction in rats: effects of propionyl-L-carnitine. Am J Physiol. 1995;268(4 Pt 2):H1702-13.

Li Y, Zhang D, Jin W, Shao C, Yan P, Xu C, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. J Clin Invest. 2006;116(2):506-11.

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

Liu T, O'Rourke B. Regulation of mitochondrial Ca2+ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart. J Bioenerg Biomembr. 2009;41(2):127-32.

Loennechen JP, Wisløff U, Falck G, Ellingsen Ø. Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during post-infarction failure in rat. Acta Physiol Scand. 2002;176(1):17-26.

Ma H, Guo R, Yu L, Zhang Y, Ren J. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. Eur Heart J. 2011;32(8):1025-38.

Ma H, Yu L, Byra EA, Hu N, Kitagawa K, Nakayama KI, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. J Mol Cell Cardiol. 2010;49(2):322-9.

Mackiewicz U, Maczewski M, Konior A, Tellez JO, Nowis D, Dobrzynski H, et al. Sarcolemmal Ca2+-ATPase ability to transport Ca2+ gradually diminishes after myocardial infarction in the rat. Cardiovasc Res. 2009;81(3):546-54.

Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. Circulation. 1998;97(16):1536-9.

Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4(6):697-720.

Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature. 1967;213(5072):137-9.

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.

Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. J Biol Chem. 2006;281(44):33789-801.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis. 2007;12(5):913-22.

Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. Drug Discov Today Dis Mech. 2010;7(2):e95-e102.

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. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(2):159-64.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 1979;44(4):503-12.

Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. Trends Endocrinol Metab. 2009;20(7):332-40.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nat Protoc. 2006;1(6):3159-65.

SBC. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica, 2012. 2012:http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2012/Diretriz%20IC%20Cr%C3%B4nica.pdf.

Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. Genes Nutr. 2010;5(2):121-8.

Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem. 1995;147(1-2):77-81.

Song BJ, Abdelmegeed MA, Yoo SH, Kim BJ, Jo SA, Jo I, et al. Post-translational modifications of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and biomedical implications. J Proteomics. 2011;74(12):2691-702.

Song J, Zhang XQ, Wang J, Carl LL, Ahlers BA, Rothblum LI, et al. Sprint training improves contractility in postinfarction rat myocytes: role of Na+/Ca2+ exchange. J Appl Physiol (1985). 2004;97(2):484-90.

Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. ALDH2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. Sci Transl Med. 2011;3(107):107ra11.

Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med. 2009;46(9):1283-97.

Tingberg E, Ohlin AK, Gottsäter A, Ohlin H. Lipid peroxidation is not increased in heart failure patients on modern pharmacological therapy. Int J Cardiol. 2006;112(3):275-81.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;301(6):H2181-90.

Van Klinken JB, van den Berg SA, Havekes LM, Willems Van Dijk K. Estimation of activity related energy expenditure and resting metabolic rate in freely moving mice from indirect calorimetry data. PLoS One. 2012;7(5):e36162.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(7):1360-72.

Wang C, Fan F, Cao Q, Shen C, Zhu H, Wang P, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 deficiency aggravates energy metabolism disturbance and diastolic dysfunction in diabetic mice. J Mol Med (Berl). 2016.

WHO. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases. 2014

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca2+ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2002;54(1):162-74.

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 Biochim Pol. 2003;50(2):319-36.

Young-Collier KJ, McArdle M, Bennett JP. The dying of the light: mitochondrial failure in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2012;28(4):771-81.

Zhang Y, Babcock SA, Hu N, Maris JR, Wang H, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: role of GSK3β and mitochondrial function. BMC Med. 2012;10:40.

APÊNDICE

A - MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 – Parâmetros fisiológicos dos animais comparados entre os grupos

	Controle						Infartado						Alda-1					
	4 semanas			10 semanas			4 semanas			10 semanas			4 semanas			10 semanas		
	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2
N	13	2	13	11	12	20	8	11	7	14	7	7	---	5	5	---	---	---
FC (BPM)	538± 23	437± 51	406± 20*	571± 13	441± 36#	462± 12#	518± 33	475± 33	516± 40	532± 28	553± 30	469± 3	---	422± 28	430± 30	---	---	---
PAS (mmHg)	139± 5	98± 9*	113± 6*	106± 3*	121± 5	118± 2	116± 7*	127± 5	125± 7	132± 5#	123± 5	121± 2	---	113± 9	102± 9*	---	---	---

Frequência cardíaca (FC). Pressão arterial sistólica (PAS). Média±erro padrão, p≤0,05, 4 semanas: * vs WT controle; 10 semanas: # vs WT controle. n= número de animais.

Tabela 2 – Dados ecocardiográficos

	Controle						Infartado						Alda-1					
	4 sem			10 sem			4 sem			10 sem			4 sem			10 sem		
	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2
N	14	9	8	18	13	11	20	14	10	16	12	9	7	5	5	7	4	4
FC (BPM)	378± 11	379± 13	361± 12	370± 11	373± 9	353± 12	333± 13	371± 14	353± 19	368± 18	372± 15	377± 22	380± 12	384± 37	411± 20	374± 19	427± 14	401± 33
EF (%)	59,0± 1,7	57,5± 1,6	54,3± 2,0	58,3± 1,6	57,3± 1,9	59,1± 1,2	40,9± 1,4*	33,4± 2,2$	35,2± 2,3&	38,9± 2,4**	32,3± 3,4@	33,1± 3,0%	39,5± 1,4*	33,4± 2,2$	35,0± 1,4&	47,0± 2,8	41,7± 5,2	41,8± 3,7
DdVE (mm)	3,39± 0,09	4,16± 0,11	3,98± 0,07	3,92± 0,12	4,14± 0,11	3,88± 0,10	4,74± 0,24*	4,65± 0,33*	4,62± 0,21*	4,51± 0,19	5,06± 0,32	4,77± 0,17	4,58± 0,15	4,66± 0,39	4,85± 0,42	4,03± 0,19	4,47± 0,18	4,66± 0,18
DsVE (mm)	2,35± 0,08	2,92± 0,09	2,88± 0,40	2,72± 0,09	2,91± 0,11	2,68± 0,7	3,82± 0,22*	3,96± 0,36*	3,86± 0,22*&	3,60± 0,16**	4,32± 0,36$	4,01± 0,16%	3,70± 0,11*	3,91± 0,30	4,04± 0,78&	3,10± 0,20	3,55± 0,16	3,71± 0,23%
SIVd (mm)	0,78± 0,03	0,74± 0,03	0,72± 0,02	0,79± 0,02	0,74± 0,03	0,83± 0,03	0,59± 0,03*§	0,61± 0,02	0,65± 0,06	0,73± 0,05	0,69± 0,04	0,62± 0,08	0,80± 0,08	0,75± 0,07	0,45± 0,12	0,66± 0,06	0,53± 0,13	0,34± 0,08%
SIVs (mm)	1,09± 0,04	1,08± 0,06	1,05± 0,04	1,20± 0,04	1,05± 0,05	1,21± 0,06	0,74± 0,06*	0,82± 0,06	0,84± 0,08	1,01± 0,08#	0,94± 0,07	0,83± 0,12	0,99± 0,13	1,07± 0,12	0,55± 0,14	0,86± 0,10	0,84± 0,22	0,51± 0,12%
PPVEd (mm)	0,76± 0,03	0,72± 0,02	0,76± 0,02	0,80± 0,02	0,75± 0,02	0,81± 0,02	0,73± 0,04	0,70± 0,05	0,80± 0,09	0,82± 0,02	0,78± 0,03	0,72± 0,04	0,83± 0,09	0,74± 0,09	0,67± 0,04	0,77± 0,05	0,59± 0,02	0,65± 0,05
PPVEs (mm)	1,24± 0,15	1,78± 0,39	1,86± 0,33	1,42± 0,15	1,68± 0,32	1,92± 0,26	1,24± 0,22	0,94± 0,05	1,12± 0,10	1,54± 0,32	1,03± 0,06	1,04± 0,06	1,25± 0,14	1,07± 0,10	1,06± 0,11	0,98± 0,06	0,85± 0,03	0,96± 0,10
Veloc. A (mm/s)	273± 26	240± 18	288± 31	270± 29	274± 28	245± 37	247± 25	273± 35	228± 19	274± 29	230± 30	302± 37	264± 35	387± 55	349± 38	415± 55	434± 23	418± 60
Veloc. E (mm/s)	448± 31	507± 39	464± 49	480± 41,8	503± 36	492± 52	506± 38	480± 49	512± 69	487± 59	523± 31	488± 54	534± 51	492± 26	581± 69	678± 45	663± 57	618± 37
E/A	1,75± 0,16	2,13± 0,12	1,62± 0,1	1,85± 0,13	2,02± 0,19	2,21± 0,24	2,16± 0,17	2,12± 0,45	2,5± 0,4	1,8± 0,2	2,6± 0,3	2,8± 1,0	2,3± 0,4	1,37± 0,2	1,7± 0,2	1,73± 0,2	1,5± 0,1	1,5± 0,1
TD (ms)	20,8± 1,6	23,8± 2,0	20,4± 1,9	21,4± 1,7	20,6± 1,7	21,6± 2,6	22,6± 1,5	18,2± 2,4	21,5± 3,2	19,2± 1,8°	17,7± 2,1	20,4± 1,8	21,8± 2,4	19,2± 2,0	17,2± 2,3	31,2± 4,3	12,1± 1,0°	14,8± 0,9°
FAC (%)	47,7± 1,9	45,8± 1,6	42,1± 2,7	47,1± 1,7	45,4± 1,9	47,6± 2,0	27,7± 1,6*	24,9± 2,0$	26,1± 1,4&	28,7± 2,6**	21,5± 1,6@	20,3± 1,4%	27,0± 3,1*	26,5± 3,7$	24,9± 4,1&	33,2± 1,7	26,8± 5,4	29,9± 3,6
Área sístole (mm^2)	6,2± 0,4	7,0± 0,4	7,2± 0,4	6,8± 0,3	7,8± 0,4	6,9± 0,4	12,2± 1,3*	14,9± 2,5	13,3± 1,5	8,6± 0,8	17,6± 3,0@	11,9± 0,9	10,8± 1,1	16,0± 4,9	13,7± 2,4	13,1± 2,7	13,6± 3,2	14,5± 2,5
Área diástole (mm^2)	12± 0,5	12,8± 0,5	12,4± 0,4	12,6± 0,3	14,2± 0,4	13,2± 0,6	16,4± 1,4	19,2± 2,7	17,8± 1,7	13,4± 0,9	21,7± 3,3	14,9± 1,1	14,8± 1,3	21,4± 6,5	17,9± 2,4	17,7± 2,4	18,1± 3,0	20,5± 2,8

Frequência cardíaca (FC). Fração de ejeção (EF). Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE). Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE). Septo interventricular na diástole e na sístole (SIVd e SIVs). Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole e sístole (PPVEd e PPVEs). Velocidade de fluxo mitral A e E (Veloc. A e E). Razão E e A (E/A). Tempo de desaceleração (TD). Área fracional (FAC). Média±erro padrão, p≤0,05, 4 semanas: * vs WT controle, # vs WT IC, § vs WT IC Alda-1, $ vs *1/*2 controle, & vs *2/*2 controle; 10 semanas: ** vs WT controle, ° vs WT IC Alda-1, @ vs *1/*2 controle, % vs *2/*2 controle. n= número de animais.

Tabela 3 – Parâmetros morfológicos dos animais comparados entre os grupos

	Controle			Infartado			Alda-1		
	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2	WT	*1/*2	*2/*2
PC (g)	29,8±0,36 (n=26)	27,9±0,58 (n=15)*	27,9±0,52 (n=16)*	27,5±0,54 (n=17)*$	28,7±0,43 (n=14)	28,1±0,67 (n=9)	30,2±0,68 (n=6)	29,6±1,09 (n=5)	28,8±0,57 (n=5)
Gordura retroperitoneal/PC (mg/g)	4,55±0,69 (n=8)	2,16±0,24 (n=8)*	3,02±0,53 (n=7)						
Gordura epididimal/PC (mg/g)	16,8±1,16 (n=8)	12,8±0,97 (n=8)*	13,1±0,85 (n=7)*						
Gordura marrom/PC (mg/g)	5,21±0,25 (n=8)	3,60±0,12 (n=8)	3,56±0,22 (n=7)						
Coração/PC (mg/g)	5,78±0,12 (n=22)	5,83±0,21 (n=11)	5,74±0,33 (n=9)	7,10±0,39 (n=14)*	7,16±0,58 (n=12)*	6,23±0,34 (n=7)	6,83±0,17 (n=6)	5,92±0,57 (n=4)	6,53±0,32 (n=4)
Rim dir./PC (mg/g)	6,81±0,18 (n=23)	7,15±0,14 (n=11)	7,12±0,24 (n=9)	7,20±0,16 (n=15)	6,50±0,17 (n=11)	7,03±0,15 (n=8)	6,34±0,31 (n=6)	6,87±0,24 (n=4)	7,08±0,28 (n=4)
Rim esq./PC (mg/g)	6,38±0,15 (n=22)	6,73±0,23 (n=11)	6,87±0,24 (n=8)	6,93±0,17 (n=15)$	6,80±0,22 (n=12)	6,97±0,19 (n=8)	6,02±0,17 (n=6)	6,54±0,25 (n=4)	7,06±0,42 (n=4)
Baço/PC (mg/g)	2,41±0,07 (n=22)	2,85±0,23 (n=10)	3,22±0,18 (n=9)*	2,53±0,18 (n=15)	2,69±0,13 (n=12)	2,76±0,17 (n=8)	2,87±0,22 (n=6)	2,27±0,11 (n=4)	2,79±0,19 (n=4)
Pulmão/PC (mg/g)	5,86±0,22 (n=23)	6,15±0,36 (n=11)	6,39±0,42 (n=9)	6,72±0,51 (n=15)	5,90±0,34 (n=12)	5,41±0,22 (n=8)	6,10±0,25 (n=6)	4,86±0,29 (n=4)	5,82±0,30 (n=4)
Pulmão U/S	1,93±0,09 (n=22)	1,89±0,14 (n=11)	1,93±0,23 (n=9)	2,04±0,12 (n=15)	2,07±0,07 (n=12)	1,93±0,07 (n=8)	2,30±0,06 (n=6)	1,89±0,06 (n=4)	2,09±0,17 (n=4)
Fígado/PC (mg/g)	47,1±1,05 (n=23)	52,2±1,53 (n=11)*	48,2±2,23 (n=8)	50,3±1,54 (n=15)	52,5±0,75 (n=12)	51,5±0,70 (n=8)	52,1±0,81 (n=6)	48,6±2,80 (n=4)	46,8±1,34 (n=4)
Fígado U/S	2,53±0,05 (n=23)	2,61±0,02 (n=11)	2,55±0,04 (n=9)	2,38±0,07 (n=15)*$	2,68±0,04 (n=12)#	2,62±0,03 (n=8)	2,75±0,04 (n=6)	2,66±0,02 (n=4)	2,67±0,04 (n=4)

Peso corporal (PC). Razão úmido e seco (U/S). Média±erro padrão, p≤0,05, * vs WT controle, # vs WT IC, $ vs WT IC Alda-1. n= número de animais.

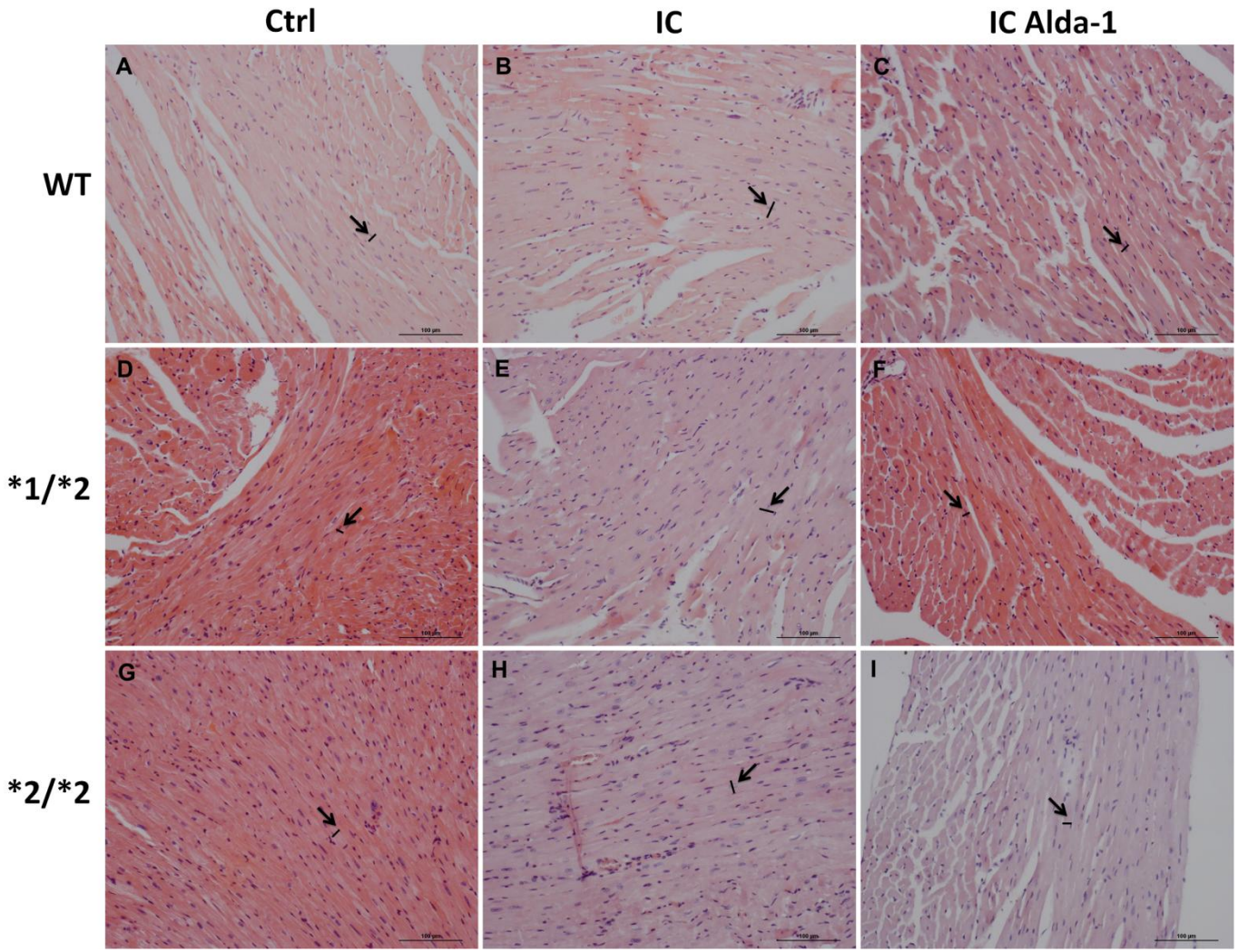

Figura 1 - Imagens representativas coradas em hematoxilina-eosina para quantificação do diâmetro do cardiomiócito (Traço evidenciado com as setas), em camundongos selvagens controles (WT ctrl) (A), com insuficiência cardíaca (WT IC) (B) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (WT IC Alda-1) (C), em camundongos mutantes heterozigotos controles (*1/*2 ctrl) (D), com insuficiência cardíaca (*1/*2 IC) (E) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (*1/*2 IC Alda-1) (F) e em camundongos mutantes homozigotos controles (*2/*2 ctrl) (G), com insuficiência cardíaca (*2/*2 IC) (H) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (*2/*2 IC Alda-1) (I).

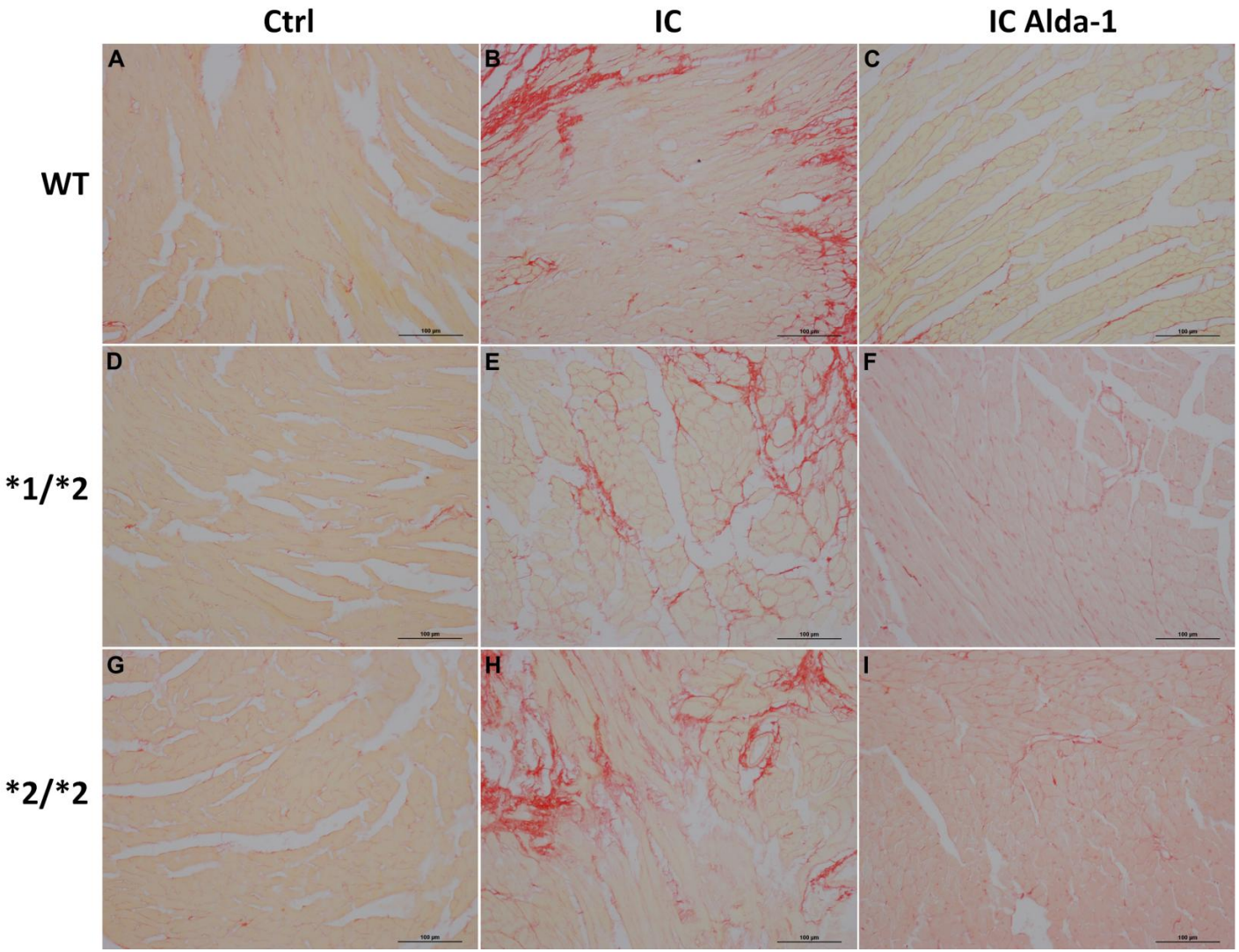

Figura 2 - Imagens representativas coradas em picrossírius para quantificação do colágeno total (corado em vermelho), em camundongos selvagens controles (WT ctrl) (A), com insuficiência cardíaca (WT IC) (B) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (WT IC Alda-1) (C), em camundongos mutantes heterozigotos controles (*1/*2 ctrl) (D), com insuficiência cardíaca (*1/*2 IC) (E) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (*1/*2 IC Alda-1) (F) e em camundongos mutantes homozigotos controles (*2/*2 ctrl) (G), com insuficiência cardíaca (*2/*2 IC) (H) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (*2/*2 IC Alda-1) (I).

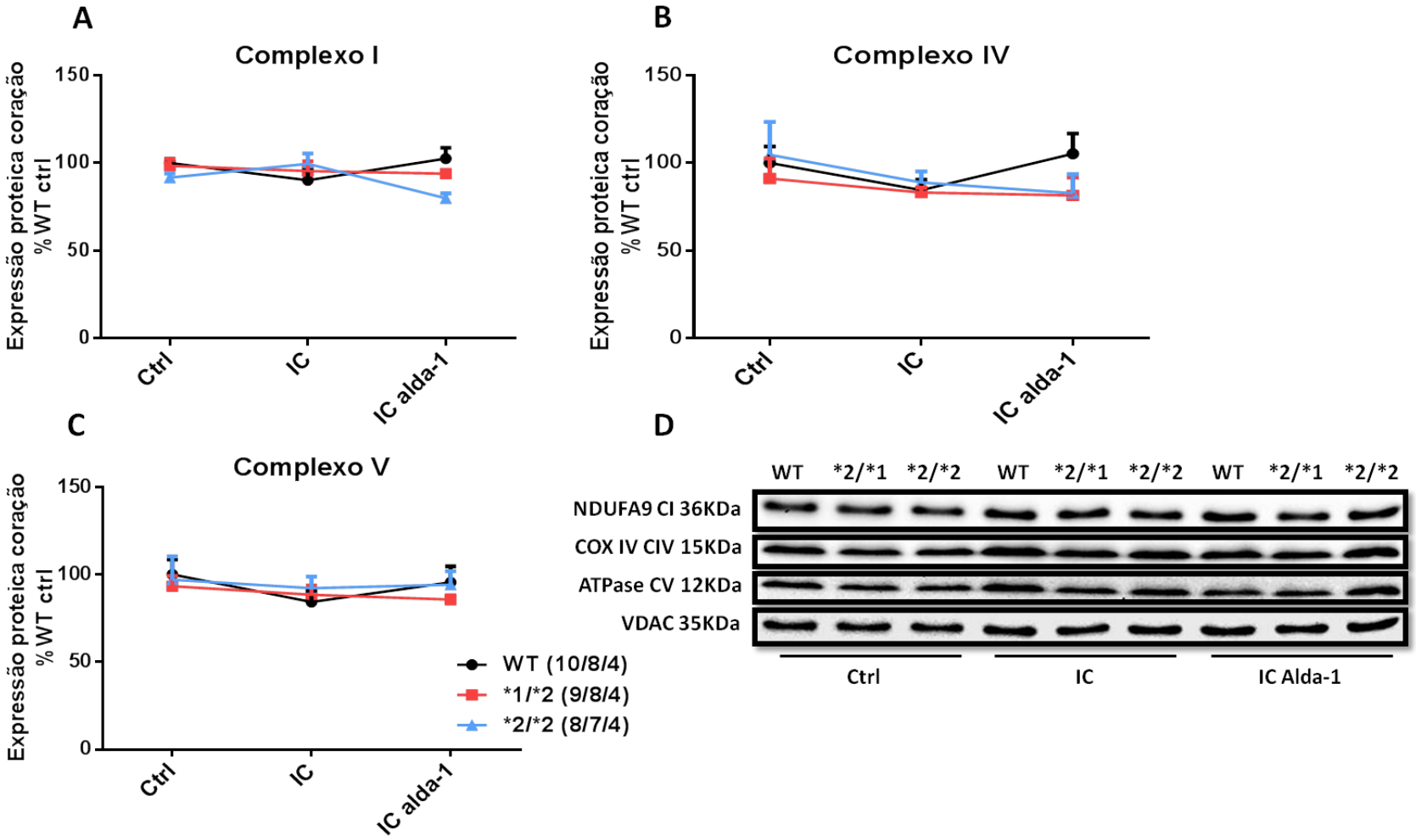

Figura 3 - Complexos mitocondriais I (A), IV (B) e V (C) avaliados em mitocôndria isolada cardíaca. *Western blotting* representativo dos complexos I (NDUFA9), IV (COX IV) e V (ATPase) e o normalizador VDAC (D), em camundongos WT (selvagem), *1/*2 (mutante heterozigoto) e *2/*2 (mutante homozigoto) nos grupos controle (Ctrl), com insuficiência cardíaca (IC) e com insuficiência cardíaca tratados com Alda-1 (IC Alda-1). Média±erro padrão, p≤0,05, número de animais expresso entre parênteses.