

TATIANE DE OLIVEIRA BARRETO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS TECIDOS  
CARDÍACO, HEPÁTICO, ESQUELÉTICO E RENAL NA  
DEFICIÊNCIA EM TIAMINA**

Belo Horizonte – MG  
2012

TATIANE DE OLIVEIRA BARRETO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS TECIDOS  
CARDÍACO, HEPÁTICO, ESQUELÉTICO E RENAL NA  
DEFICIÊNCIA EM TIAMINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia  
- Programa de Pós-graduação em Bioquímica e  
Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

Co-orientador: Carolina Rosa Gioda

Belo Horizonte  
2012

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela força, coragem, sabedoria e por estar sempre iluminando minha vida.

Aos meus pais por serem meu exemplo de vida, pelo amor e incentivo e por estarem sempre presentes.

Ao meu irmão pela força, amizade, companheirismo e zelo.

Ao Daniel, uma pessoa especial em minha vida, que surgiu de repente e faz uma enorme diferença por estar sempre ao meu lado.

Aos meus queridos amigos do LAMEX pela amizade e apoio, por me proporcionarem momentos de muita aprendizagem, troca de conhecimentos e também momentos agradáveis e divertidos.

A minha co-orientadora e amiga Carolina Gioda, pelos ensinamentos, atenção e por despertar em mim a visão de novos caminhos.

Ao meu querido orientador Jader Cruz que sempre acreditou e confiou em mim por todos esses anos. Obrigada pelo apoio, paciência, amizade, oportunidades e por todos os ensinamentos científicos e profissionais.

A todas as pessoas que ao longo desta caminhada contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

## RESUMO

A tiamina (vitamina B1) é conhecida por desempenhar importantes funções no organismo. Por ser precursora da tiamina pirofosfato, grupo prostético de importantes enzimas do metabolismo, quando ausente, provoca vários distúrbios no organismo, como o estresse oxidativo, que está associado a danos celulares estruturais que comprometem a sua viabilidade. Portanto, as adaptações dos sistemas antioxidantes são essenciais para amenizar os danos causados pelos radicais livres. Na primeira parte deste estudo, ratos foram submetidos a uma dieta deficiente em tiamina durante 35 dias e a atividade e expressão protéica de enzimas antioxidantes e o nível de peroxidação lipídica no fígado, rim e no músculo esquelético foram avaliados. Os resultados demonstraram que no fígado a atividade e expressão de catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase não diferiram entre os ratos controles e deficientes em tiamina. No rim, a atividade da catalase foi diminuída em ratos deficientes em tiamina quando comparados aos controles, entretanto, não houve nenhuma mudança na peroxidação lipídica. O músculo esquelético foi o órgão que mais apresentou mudanças nos sistemas antioxidantes, mas nenhuma mudança foi verificada na peroxidação lipídica. A atividade da catalase foi aumentada e a expressão protéica da glutathione peroxidase foi diminuída em ratos deficientes quando comparados com os controles. Na segunda parte do estudo, os animais deficientes em tiamina foram submetidos a 5 dias de reposição da tiamina na dieta, para avaliar se haveria uma melhora no quadro de estresse oxidativo no coração destes animais. Tanto a atividade da catalase quanto os níveis de peroxidação lipídica, que se apresentavam alterados com a deficiência em tiamina, voltaram aos níveis dos animais controles. Neste estudo podemos concluir que alterações na atividade e expressão protéica de sistemas enzimáticos antioxidantes atuam como um mecanismo para manter a homeostase de diferentes órgãos e para evitar a peroxidação lipídica no modelo de deficiência de tiamina. Podemos concluir também que a reposição de tiamina na dieta reverte o quadro de estresse oxidativo no coração de animais deficientes.

Palavras-chave: Deficiência em tiamina, estresse oxidativo, sistemas antioxidantes, fígado, rim, músculo esquelético, coração, reversão.

## ABSTRACT

Thiamine (Vitamin B1) is known to have a major role in some body functions, once synthesized, originates important metabolic enzymes, whereas its absence can cause numerous unbalances at tissue and cellular levels, example being oxidative stress and associated cellular structure damage which can compromise integrity. In the first part of this study, rats were submitted to a thiamine deficient diet for 35 days and the antioxidant systems activity and expression as well as the lipid peroxidation levels for the liver, kidney and skeletal muscles were evaluated. The results demonstrated that in the liver the activity and expression of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase did not differ between controls and thiamine deficient rats. In the kidney, catalase activity was decreased in thiamine deficient rats when compared to controls, however no change happened in lipid peroxidation between controls and thiamine deficient rats. The skeletal muscle was the organ that presented the most changes in antioxidant system, yet no change was verify in lipid peroxidation. Catalase activity is increased and the expression was decreased in skeletal muscle of thiamine deficient when compared to controls rats. On the second part of this study, the thiamine deficient group was submitted to a 5 day thiamine reposition diet to evaluate the improvement of heart oxidative stress state. Catalase activity as well as lipid peroxidation levels, once altered in thiamine deficient rats, returned to same levels encountered in control rats. In this study is demonstrated alterations in activity and expression of enzymatic antioxidants systems as a mechanism to maintain homeostasis of different organs and to avoid lipid peroxidation in model of thiamine deficiency. Additionally, thiamine reposition reverts the oxidative stress levels in thiamine deficient animal hearts.

Keywords: Thiamine deficiency, oxidative stress, antioxidants system, liver, kidney, skeletal muscle, heart.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da tiamina livre

Figura 2 – Estrutura molecular da tiamina pirofosfato (TPP ou TDP)

Figura 3 – Metabolismo da tiamina em células de mamíferos: Transportadores de tiamina e enzimas que necessitam da tiamina como co-fator enzimático.

Figura 4 - Reação catalizada pela transcetolase.

Figura 5 – Descarboxilação oxidativa do piruvato em Acetil-CoA pela ação do complexo piruvato desidrogenase.

Figura 6 – Transformação do  $\alpha$ -cetoglutarato em succinil-CoA pela  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase.

Figura 7 – Diferença de peso corporal entre animais controles e deficientes em tiamina

Figura 8 - Formação de das espécies reativas de oxigênio nos complexos I, II e III da cadeia respiratória.

Figura 9 – Sistemas celulares de defesa antioxidantes enzimáticos.

Figura 10 – Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas superóxido-dismutase dependente de Cu/Zn e de Mn.

Figura 11 – Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da catalase. Em destaque o grupamento heme.

Figura 12 - Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo glutationala peroxidase.

Figura 13 – Atividade da enzima superóxido dismutase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 14 – Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 15 – Atividade da enzima catalase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 16 - Expressão protéica da catalase no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 17 – Atividade da enzima glutationala peroxidase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 18 - Expressão protéica da glutationala peroxidase no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 19 – Atividade da enzima superóxido dismutase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 20 - Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 21 – Atividade da enzima catalase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 22 - Expressão protéica da catalase no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 23 – Atividade da enzima glutatona peroxidase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 24 - Expressão protéica da glutatona peroxidase no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 25 – Níveis de TBARS no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 26 – Atividade da enzima superóxido dismutase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 27 - Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no músculo esquelético obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 28 – Atividade da enzima catalase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 29 - Expressão protéica da catalase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 30 – Atividade da enzima glutatona peroxidase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 31 - Expressão protéica da glutatona peroxidase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3).

Figura 32 – Níveis de TBARS no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7).

Figura 33 - Figura 33 – Níveis de TBARS no coração obtido de animais controles (n=4) e deficientes em tiamina (n=5) (Gioda et al., 2010).

Figura 34 – Níveis de TBARS no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7).

Figura 35 – Atividade da enzima superóxido dismutase no coração obtido de animais controles (n=5) e deficientes em tiamina (n=6) (Gioda et al., 2010).

Figura 36 – Atividade da enzima superóxido dismutase no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7).

Figura 37 – Atividade da enzima catalase no coração obtido de animais controles (n=5) e deficientes em tiamina (n=6) (Gioda et al., 2010).

Figura 38 – Atividade da enzima catalase no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7).

Figura 39 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no fígado na presença e ausência de tiamina.

Figura 40 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no rim na presença e ausência de tiamina.

Figura 41 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no músculo cardíaco e esquelético na presença e ausência de tiamina.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Composição química da dieta oferecida aos animais.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CAT:** catalase

**CT:** controle

**DT:** deficiente em tiamina

**GPx:** glutaciona peroxidase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**MDA:** malondialdeído

**<sup>•</sup>NO:** óxido nítrico

**<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>:** dióxido de nitrogênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** ânion superóxido

**OH<sup>•</sup>:** radical hidroxil]

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito

**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>:** peroxil

**RNS:** espécies reativas de nitrogênio

**ROS:** espécies reativas de oxigênio

**SOD:** superóxido dismutase

**TDP:** tiamina difosfato

**TMP:** tiamina monofosfato

**TPP:** tiamina pirofosfato

**TPK:** tiamina pirofosfoquinase

**TTP:** tiamina trifosfato

## SUMÁRIO

### I. REVISÃO DE LITERATURA

1. TIAMINA .....	02
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), DEFESA ANTIOXIDANTE E O ESTRESSE OXIDATIVO .....	09
3. FÍGADO, RIM E MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	17
3.1 FÍGADO .....	17
3.2 RIM .....	18
3.3 MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	19
3.4 FÍGADO, RIM E MÚSCULO ESQUELÉTICO E A DEFICIÊNCIA EM TIAMINA.....	19

### II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. JUSTIFICATIVA .....	22
2. OBJETIVOS .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. GRUPO EXPERIMENTAL .....	27
2. COMPOSIÇÃO DA DIETA .....	28
3. PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA MENSURAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E TBARS.....	29
4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS TECIDOS <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>	
5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TBARS.....	29
6. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE .....	30
7. ATIVIDADE DA CATALASE .....	30
8. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	30
9. WESTERN BLOT .....	31
10. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31

#### **IV. RESULTADOS**

1. EFEITOS NA ATIVIDADE E EXPRESSÃO PROTÉICA DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES E, NOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO, RIM E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA DIETA DEFICIENTE EM TIAMINA POR UM PERÍODO DE 35 DIAS. ....	33
2. EFEITO NOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NA ATIVIDADE DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO CARDÍACO, APÓS A REPOSIÇÃO DA VITAMINA NA DIETA DOS RATOS DEFICIENTES POR UM PERÍODO DE 5 DIAS.....	45

#### **V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

1. DISCUSSÃO.....	51
1.1 COMPORTAMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO FÍGADO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE TIAMINA .....	54
1.2 COMPORTAMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO RIM NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE TIAMINA .....	56
1.3 COMPORTAMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE TIAMINA.....	56
1.4 COMPORTAMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO CORAÇÃO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE TIAMINA .....	56
2. CONCLUSÃO .....	59

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
-------------------------	-----------

