

# Expressão Gênica Associada ao Estresse Oxidativo no Coração de Camundongo após Isquemia Intestinal

*Gene Expression Related to Oxidative Stress in the Heart of Mice after Intestinal Ischemia*

Frederico Somaio Neto<sup>2</sup>, Adauto Tsutomu Ikejiri<sup>2</sup>, Paulo Roberto Bertoletto<sup>2</sup>, José Carlos Bertoletto Chaves<sup>2</sup>, Roberto Teruya<sup>3</sup>, Djalma José Fagundes<sup>1</sup>, Murched Omar Taha<sup>1</sup>

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP<sup>1</sup>, São Paulo, SP; Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD<sup>2</sup>, Dourados, MS; Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS<sup>3</sup>, Campo Grande, MS - Brasil

## Resumo

**Fundamento:** O fenômeno da isquemia e reperfusão intestinal é um evento frequente na clínica e está associado a repercussões deletérias em órgãos a distância, em especial ao coração.

**Objetivo:** Investigar a expressão gênica do estresse oxidativo e defesa antioxidante no coração de camundongos isgênicos, submetidos a isquemia e reperfusão intestinal (IR).

**Métodos:** Doze camundongos (C57BL/6) foram distribuídos em dois grupos: Grupo IR (GIR) com 60 min de oclusão da artéria mesentérica superior, seguidos de 60 min de reperfusão. Grupo Controle (GC) submetidos a anestesia e a laparotomia sem o procedimento de IR observados por 120 min. As amostras de intestino e coração foram processadas pelo método (RT-qPCR / Reverse transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction) para determinar a expressão gênica de 84 genes relacionados ao estresse oxidativo (“t” de Student,  $p < 0,05$ ).

**Resultados:** Observou-se no tecido intestinal (GIR) uma expressão significativamente aumentada em 65 (74,71%) genes em relação ao tecido normal (GC), e 37 (44,04%) genes estiveram hiperexpressos (maior que três vezes o limiar permitido pelo algoritmo). No tocante aos efeitos da I/R intestinal a distância no tecido cardíaco verificou-se a expressão significativamente aumentada de 28 genes (33,33%), mas somente oito genes (9,52%) se hiperexpressaram três vezes acima do limiar. Quatro (7,14%) desses oito genes se expressaram simultaneamente nos tecidos intestinal e cardíaco. No GIR notaram-se cardiomiócitos com núcleos de menor tamanho, picnóticos, ricos em heterocromatina e raros nucléolos, indicando sofrimento cardíaco.

**Conclusão:** A I/R intestinal promoveu a hiperexpressão estatisticamente significativa de oito genes associados ao estresse oxidativo a distância no tecido miocárdico. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(2):165-174)

**Palavras-chave:** Expressão Gênica; Camundongos; Exresse Oxidativo; Intestinos / patologia.

## Abstract

**Background:** Intestinal ischemia-reperfusion is a frequent clinical event associated to injury in distant organs, especially the heart.

**Objective:** To investigate the gene expression of oxidative stress and antioxidant defense in the heart of inbred mice subjected to intestinal ischemia and reperfusion (IR).

**Methods:** Twelve mice (C57BL/6) were assigned to: IR Group (GIR) with 60 minutes of superior mesenteric artery occlusion followed by 60 minutes of reperfusion; Control Group (CG) which underwent anesthesia and laparotomy without IR procedure and was observed for 120 minutes. Intestine and heart samples were processed using the RT-qPCR / Reverse transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction method for the gene expression of 84 genes related to oxidative stress and oxidative defense (Student’s “t” test,  $p < 0.05$ ).

**Results:** The intestinal tissue (GIR) was noted to have an up-regulation of 65 genes (74.71%) in comparison to normal tissue (CG), and 37 genes (44.04%) were hyper-expressed (greater than three times the threshold allowed by the algorithm). Regarding the remote effects of intestinal I/R in cardiac tissue an up-regulation of 28 genes (33.33%) was seen, but only eight genes (9.52%) were hyper-expressed three times above threshold. Four (7.14%) of these eight genes were expressed in both intestinal and cardiac tissues. Cardiomyocytes with smaller and pyknotic nuclei, rich in heterochromatin with rare nucleoli, indicating cardiac distress, were observed in the GIR.

**Conclusion:** Intestinal I/R caused a statistically significant over expression of 8 genes associated with oxidative stress in remote myocardial tissue. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(2):165-174)

**Keywords:** Gene Expression; Mice; Oxidative Stress; Intestines / pathology.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Djalma José Fagundes •

Rua Camé, 244, conjunto 33, 3º andar, Mooca. CEP 03121-020, São Paulo, SP - Brasil

E-mail: fsomaio@cardiol.br, djfagundes.dcir@epm.br

Artigo recebido em 06/05/13; revisado em 01/09/13; aceito em 04/09/13.

DOI: 10.5935/abc.20130240

## Introdução

A Isquemia e Reperusão (IR) tecidual e as alterações celulares e humorais que se seguem têm grande impacto na homeostasia do organismo<sup>1</sup>. Embora as espécies reativas de oxigênio (EROs) estejam envolvidas na homeostase, sua presença em quantidades que ultrapassem os limites naturais de defesa celular, pelos antioxidantes e varredores, levará ao desequilíbrio conhecido como estresse oxidativo<sup>2</sup>. Embora o oxigênio seja um substrato crítico para o alívio da isquemia, paradoxalmente funciona como metabólito deletério durante o período de reperusão<sup>2-5</sup>, predispondo ao comprometimento de órgãos distantes, além das lesões locais<sup>6</sup>.

A IR, e o conseqüente estresse oxidativo, está associada a condições clínicas e cirúrgicas, tais como: sepse, trauma oclusivo arterial, parada cardíaca, trombose, embolia, vasoespasmos, tumores, transplantes e ressecções de órgãos, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio<sup>2,6-8</sup>.

O estresse oxidativo no sistema cardiovascular predispõe a lesões graves nos cardiomiócitos e vasos cardíacos, alterando os mecanismos de contração e relaxamento, tendo como consequência sua desadaptação e déficit de função<sup>6</sup>.

A avaliação da expressão gênica associada ao estresse oxidativo em órgãos a distância oferece uma nova ferramenta para esclarecer vários aspectos do fenômeno, tanto no diagnóstico, monitoramento quanto nos resultados de procedimentos terapêuticos<sup>9,10</sup>. Um recurso tecnológico de uso recente permite avaliar uma grande quantidade de genes de maneira segura e relativamente simplificada pelo método da RT- qPCR (Reverse transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction)<sup>11-14</sup>. Desse modo, tem sido descrita em modelos animais a resposta genômica do coração ao estresse oxidativo provocado por isquemia renal, hepática, mesentérica, a oclusão da aorta infrarrenal da aorta ou isquemia de membros inferiores<sup>13-14</sup>.

Considerando que a isquemia esplâncnica, em especial do intestino delgado, é um evento grave e que além de suas manifestações locais tem repercussões sistêmicas, a proposta desta pesquisa foi avaliar a expressão de 84 genes relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante no tecido cardíaco após a isquemia e reperusão intestinal em um modelo em camundongos isogênicos.

## Métodos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo vinculado à Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP sob o número (1379-1308). O projeto foi ratificado pela Comissão de ética em pesquisa da Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD (protocolo 306/08). Os procedimentos experimentais seguiram as normas internacionais de pesquisa em animal e as orientações normativas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram mantidos segundo o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Instituto de Pesquisa Animal de Laboratório, 1996).

## Amostra

Os animais permaneceram em condições ambientais controladas de temperatura, ruídos e ciclo de doze horas para luz e escuridão. Tiveram livre acesso a água e ração própria para a espécie. Os procedimentos operatórios foram efetuados nos laboratórios de Cirurgia Experimental, no Departamento de Cirurgia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Foram selecionados 12 camundongos machos (linhagem C57BL/6), adultos, com peso médio de 35 g, procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia UNIFESP (CEDEME) e aleatoriamente distribuídos em dois grupos, Grupo Isquemia e Reperusão (GIR), seis animais submetidos a 60 min de oclusão da artéria mesentérica superior seguida de 60 min de reperusão e Grupo Controle (GC), seis animais somente anestesiados, submetidos a laparotomia mediana, sem realização do clampeamento vascular do intestino e observados por 120 min.

## Procedimentos anestésico e operatório

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com solução de cloridrato de quetamina (44 mg.Kg<sup>-1</sup>, Ketamina Agener- União Química, São Paulo), cloridrato de xilasina (2,5 mg.Kg<sup>-1</sup>, Calmium- União Química, São Paulo) e acepromazina (0,75 mg.Kg<sup>-1</sup>, Acepran- Rhobifarma). A temperatura ambiente foi mantida em 38°C. O procedimento cirúrgico foi realizado com laparotomia mediana e após a abertura da cavidade peritoneal, foram afastadas as vísceras abdominais, identificadas e isoladas a artéria e a veia mesentéricas superiores e ocluídas por clampe de microcirurgia (*clip* vascular metálico). A comprovação da oclusão arterial foi verificada pela coloração pálida intestinal, ausência de batimentos arteriais. Após 60 minutos de oclusão vascular o clampe metálico foi retirado, iniciando a reperusão, caracterizada pelo retorno do batimento arterial e a mudança de coloração das alças.

## Procedimento de coleta de material

Após o término do período de reperusão do grupo (GIR) ou do período de observação do grupo (GC) os animais ainda anestesiados foram submetidos a coleta de amostras de intestino delgado para avaliação dos efeitos da isquemia e expressão gênica. Após esse procedimento foi realizada a toracotomia, retirado o coração, ainda com batimentos, que foi imediatamente seccionado transversalmente ao maior eixo, ao nível dos ventrículos. Fragmentos do coração foram mergulhados em frascos individuais com formaldeído a 10% e submetidos ao processamento histológico padronizado de microscopia óptica para a hematoxilina e eosina (HE). Outro fragmento transversal do coração e segmento com 30 mm de extensão do intestino foram cuidadosamente lavados com solução salina, envolvidos em papel de alumínio identificados e imersos em botijão criogênico contendo nitrogênio líquido (196 graus Celsius negativos). As amostras assim preservadas foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ginecologia - UNIFESP para o processamento de expressão gênica.

### Procedimentos para a determinação da expressão gênica

O RNA dos 84 genes relacionados ao efeito do estresse oxidativo e da defesa antioxidante (Tabela 1) foi extraído das amostras de intestino delgado e coração dos animais dos GC e GIR por meio da utilização do reagente TRIzol® (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e purificados por medidas inversas (Rneasy MiniKit Qiagen, Co - USA). A concentração do total de amostras de RNA foi determinada por espectrofotômetro e a qualidade dos resultados assegurada pela mesma análise em gel agarose a 2%. A primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada usando 1 µg do RNA total e o *kit* de Primeira Cadeia RT<sup>2</sup> (SABiosciences). Quantidades idênticas de cDNA e do Master Mix SYBR® Green qPCR Mastermix (SABiosciences, QIAGEN Company) foram distribuídas por cada poço do PCR *array* contendo as porções dos genes específicos anteriormente escolhidos. A PCR foi realizada segundo as instruções do fabricante em 96 poços para detectar a expressão de 84 genes ligados ao estresse oxidativo, cinco genes de controle endógeno usados para medição das informações do PCR *array* (ACTB, Gapdh, Hsp90ab1, Hprt1, Gusb), e um controle negativo para verificar possível contaminação por DNA genômico. A amostra primária do controle negativo detectou, com alto nível de sensibilidade, o DNA genômico não transcrito e repetitivo. Três poços com controles de transcrição reversas (RTCs) foram usados para verificar a eficiência da reação RT com o teste qPCR que busca detectar moldes sintetizados do RNA controle do primeiro *kit* de síntese de cadeia. A replicação dos controles PCRs positivos (PPCs) foi usada para determinar a eficiência da própria reação da cadeia de polimerase. Esses controles usam sequência de DNA artificial predefinida no processo de detecção. Os poços de controle replicado (RTCs e PPCs) também avaliam a consistência entre os poços e entre as placas. O *software* do aparelho (MxPro Equipment Real Time Systems, Stratagene, GE, Co) calculou os valores do ciclo de início (Ct) para todos os genes em análise. Por fim, realizou uma comparação em pares por meio do cálculo de mudança na expressão gênica desde o ciclo inicial puro usando o método [2<sup>-ΔΔCt</sup>]. O método usado para determinar a expressão relativa dos genes de interesse nesse estudo foram colocados na tabela de análise de dados do PCR Array v3.3 (PCR Array Data Analysis v3.3-SABiosciences – Qiagen, Company)<sup>15</sup>.

### Análise Estatística

Para dados da expressão gênica cada amostra foi avaliada em triplicata. O teste “t” de Student (p < 0,05) foi aplicado para validar a homogeneidade da reação de expressão de cada gene. Para comparação entre os dois grupos o programa computacional calculou a variação do ciclo de quantificação (Ct) do grupo estudo em relação o ciclo de quantificação (Ct) grupo controle expressos na base logarítmica (2) pela fórmula 2<sup>-(ΔΔCt)</sup>. Os resultados da expressão gênica são apresentados como expressão positiva (GIR maior que GC) ou expressão negativa (GIR menor que GC). Os números representam quantas vezes cada gene se expressou, acima [sinal positivo (+)] ou abaixo [sinal negativo (-)]. O programa de *software* estabeleceu os resultados três vezes acima (hiperexpressão) ou três vezes abaixo (hipoexpressão) o limiar permitido pelo algoritmo para significância estatística (p < 0,05).

## Resultados

### Avaliação da Expressão Gênica

Em 84 genes avaliados no intestino, 65 genes (74,71%) apresentaram expressão positiva, e desses, 37 (44,04%) genes foram hiperexpressos, ou seja, expressão superior a três vezes o limiar estabelecido pelo algoritmo em comparação com o grupo controle (Gráfico 1).

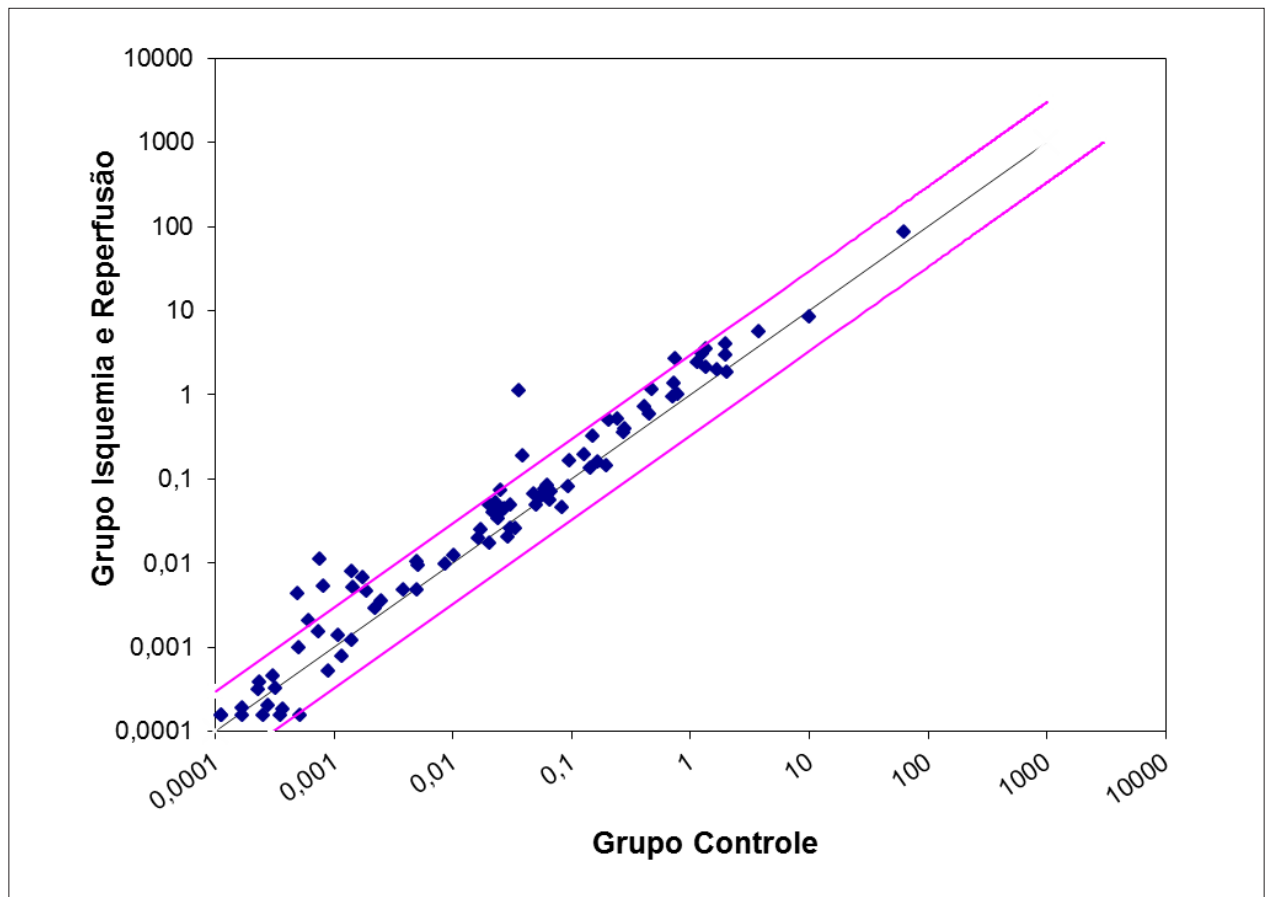
Na análise sobre o tecido cardíaco, após a I/R intestinal, ocorreu expressão positiva em 28 (33,33%) genes (Tabela 2). Apenas oito (9,52%) superaram em três vezes o limiar do algoritmo (Tabela 3 e gráfico 2). Quatro genes (4,76%) se expressaram positiva e simultaneamente nos tecidos intestinal e cardíaco (Tabela 4).

### Avaliação Histológica

Na avaliação histológica qualitativa as amostras dos tecidos do coração dos animais pertencentes aos dois grupos de estudo estavam constituídos por vários feixes de fibras musculares cardíacas separados uns dos outros por fibras colágenas do tipo I. Esses feixes estavam formados por células musculares cardíacas, de forma alongada com um ou dois núcleos em posição central, contendo no citoplasma estriações transversais. Ao redor dos cardiomiócitos nota-se a presença de células do tecido conjuntivo, fibras colágenas tipo III e capilares sanguíneos.

**Tabela 1 - Distribuição dos genes pesquisados segundo o agrupamento em famílias com funções similares e suas respectivas siglas de identificação no banco de genes**

#	Famílias	No. de genes	Genes pesquisados
1	Glutationa Peroxidases (GPX):	10	Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx5, Gpx6, Gpx7, Gpx8, Gstk1, Gsr.
2	Peroxiredoxinas (TPX):	8	Ehd2, Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prdx4, Prdx5, Prdx6, Prdx1rs1.
3	Peroxidases	16	Aass, Apc, Cat, Ctsb, Duox1, Epx, Lpo, Mpo, Ptgs1, Ptgs2, Rag2, RGD1560658 (Serp1b), RGD1565187 (Kif9), Slc41a3, Tmod1, Tpo.
4	Espécies Reativas de Oxigênio	16	Ccs, Cyba, Fmo2, Il19, Il22, Ncf2, Nos2, Nox1, Nox4, Noxa1, Noxo1, Reql4, Sod1, Sod2, Sod3.
5	Estresse Oxidativo	22	Als2, Apoe, Ercc2, Ercc6, Gab1, Idh1, Mpp4, Nqo1, Nudt15, Nxn, Park7, Ppp1r15b, Prnp, Psmb5, Srxn1, Txnip, Txnrd1, Txnrd2, Txnrd3, Ucp3, Xpa, Zmynd17.
6	Transportadores de Oxigênio	12	Aqr, LOC367198 (Atr), Cygb, Dnm2, Fanc, Hbq1, Slb (Ift172), Mb, Ngb, Slc38a1, Vim, Xirp1.



**Gráfico 1** - Dispersão da expressão dos 84 genes no tecido cardíaco relacionados com o fenômeno de isquemia e reperfusão intestinal nos animais do grupo GC e GIR; a linha preta indica a expressão do nível de normalidade; as linhas rosa indicam o limiar de três vezes da expressão gênica permitida pelo algoritmo.

No GC observaram-se cardiomiócitos contendo um ou dois núcleos volumosos e nucléolos bem evidentes (Figura 1). No grupo GIR (uma hora de isquemia e uma hora de reperfusão) notaram-se cardiomiócitos de menor tamanho com núcleos picnóticos mais escuros, ricos em heterocromatina e raros nucléolos, indicando sofrimento cardíaco (Figura 2).

## Discussão

Os dados coletados na pesquisa sobre estresse oxidativo e resposta antioxidante celular mostraram que, num modelo de isquemia intestinal em curto prazo (uma hora de isquemia seguida de uma hora de reperfusão) em camundongos isogênicos, ocorreu a expressão positiva de determinados genes no tecido cardíaco (Tabela 2 e gráfico 1).

A análise global permite afirmar que a isquemia intestinal seguida de reperfusão é um fenômeno intimamente relacionado à geração e modulação das espécies reativas de oxigênio. As alterações locais no intestino promoveram respostas humorais e celulares que, disseminadas pela corrente sanguínea, afetaram o aparato genômico do tecido cardíaco induzindo respostas de expressão gênica relacionadas à geração e modulação de EROs.

O gene Amino adipate-semialdehyde synthase (Aass) codifica uma proteína peroxidase com atividade catalisadora cujos substratos são o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos orgânicos. Está presente na maioria dos tecidos, funcionando como uma enzima bifuncional degradando a lisina até acetilcoenzima A (acetil-CoA) por duas vias metabólicas distintas (sacropina e ácido pipecólico)<sup>16,17</sup>. A lisina causa lipoperoxidação diminuindo a concentração de glutatona peroxidases e comprometendo as defesas antioxidantes celulares. Atua causando a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com alterações dos mecanismos de troca iônica na membrana celular, sendo indutora do estresse oxidativo<sup>18,19</sup>. A degradação da lisina pela acetilação atua na motilidade do miocárdio, aumentando a velocidade de deslizamento da actina-miosina em comparação com as suas respectivas isoformas não acetiladas<sup>19</sup>. Em razão das atividades conhecidas da enzima codificada pelo gene Aass é possível inferir que a sua hiperexpressão no tecido cardíaco esteve associada à proteção do tecido cardíaco da ação deletéria das EROs.

A prostaglandina-endoperóxido sintetase (Ptgs-2) é uma peroxidase com a função de converter o ácido araquidônico

**Tabela 2 - Distribuição de 28 genes dentre os 84 genes investigados no coração com expressão positiva (+) ou expressão negativa (-) 2<sup>Δ</sup>(- Delta Delta Ct) nos animais submetidos a 60 min de isquemia do intestino delgado e 60 min de reperfusão em comparação ao grupo controle sem isquemia / reperfusão; (\* = valor significante p < 0,05)**

#	Base do Gene	Símbolo do Gene	Nome do Gene	GIR Intestino	P- valor	GIR Coração	P- valor
1	NM_013930	Aass	Aminoacidpate-semialdehyde synthase	+19,63*	0,000001	+6,65*	0,01209
2	NM_009696	ApoE	Apolipoprotein E	+1,76*	0,002533	+3,60*	0,01737
3	NM_007985	Fancc	Fanconi anemia. complementation group C	+7,42*	0,000015	+1,87*	0,04313
4	NM_018881	Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2	+1,52*	0,019633	+4,93*	0,00772
5	NM_010343	Gpx5	Glutathione peroxidase 5	+5,10*	0,001774	+0,50*	0,03717
6	NM_027127	Gpx8	Glutathione peroxidase 8 (putative)	+1,43	0,072334	+2,19*	0,01271
7	NM_010344	Gsr	Glutathione reductase	+1,64	0,149896	+2,34*	0,02997
8	NM_080420	Lpo	Lactoperoxidase	+23,88*	0,00002	-2,28*	0,00326
9	NM_010877	Ncf2	Neutrophil cytosolic factor 2	+4,31*	0,000018	+2,43*	0,02876
10	NM_010927	Nos2	Nitric oxide synthase 2. inducible	+4,71*	0,000117	+1,31*	0,00129
11	NM_015760	Nox4	NADPH oxidase 4	+12,47*	0,000005	+5,73*	0,02561
12	NM_172204	Noxa1	NADPH oxidase activator 1	+3,06*	0,000083	+1,49*	0,00072
13	NM_027988	Noxo1	NADPH oxidase organizer 1	+1,33*	0,000177	+2,10*	0,03623
14	NM_008750	Nxn	Nucleoredoxin	+1,98*	0,002268	+2,53*	0,036
15	NM_133819	Ppp1r15b	Protein phosphatase 1. regulatory (inhibitor) subunit 15b	+1,06	0,962143	+1,99*	0,04908
16	NM_012021	Prdx5	Peroxiredoxin 5	-1,54*	0,008534	+2,14*	0,01926
17	NM_011186	Psmb5	Proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type 5	+1,21	0,078442	+1,32*	0,00488
18	NM_008969	Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	+1,56*	0,012124	+2,94*	0,00004
19	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	+10,07*	0,000003	+3,94*	0,00691
20	NM_009020	Rag2	Recombination activating gene 2	+15,79*	0,000293	+3,42*	0,04444
21	NM_009127	Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	+6,85*	0,00042	+31,73*	0,000099
22	NM_134086	Slc38a1	Solute carrier family 38. member 1	+4,59*	0,000106	+8,86*	0,01516
23	NM_013671	Sod2	Superoxide dismutase 2. mitochondrial	+1,47*	0,009249	-1,80*	0,02156
24	NM_011435	Sod3	Superoxide dismutase 3. extracellular	+2,51*	0,002347	+1,28*	0,00081
25	NM_021883	Tmod1	Tropomodulin 1	+15,01*	0,000161	-1,05*	0,00619
26	NM_023719	Txnip	Thioredoxin interacting protein	+1,87*	0,00026	+2,02*	0,00127
27	NM_009464	Ucp3	Uncoupling protein 3 (mitochondrial. proton carrier)	+15,85*	0,000102	+1,62*	0,01441
28	NM_011701	Vim	Vimentin	+2,20*	0,000155	+2,59*	0,01509

**Tabela 3 - Distribuição de oito genes hiperexpressos 2<sup>Δ</sup>(- Delta Delta Ct) dentre os 84 genes investigados no coração de comparados aos genes expressos no intestino de animais submetidos a 60 min de isquemia do intestino delgado e 60 min de reperfusão em comparação ao grupo controle sem isquemia / reperfusão; (\* = valor p < 0,05)**

#	Base do Gene	Símbolo do Gene	Nome do Gene	GIR Intestino	Valor de p	GIR Coração	Valor de p
1	NM_013930	Aass	Aminoacidpate-semialdehyde synthase	+19,64	0,000001*	+6,65	0,012092*
2	NM_009696	ApoE	Apolipoprotein E	+1,94	0,002533*	+3,6	0,017365*
3	NM_018881	Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2	+1,6	0,019633*	+4,93	0,007719*
4	NM_015760	Nox4	NADPH oxidase 4	+3,13	0,000005*	+5,73	0,025614*
5	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	+14,6	0,000003*	+3,94	0,006908*
6	NM_009020	Rag2	Recombination activating gene 2	+10,76	0,000293*	+3,42	0,044442*
7	NM_009127	Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	+1,62	0,000420*	+31,73	0,000099*
8	NM_134086	Slc38a1	Solute carrier family 38, member 1	-1,29	0,000106*	+8,86	0,015159*

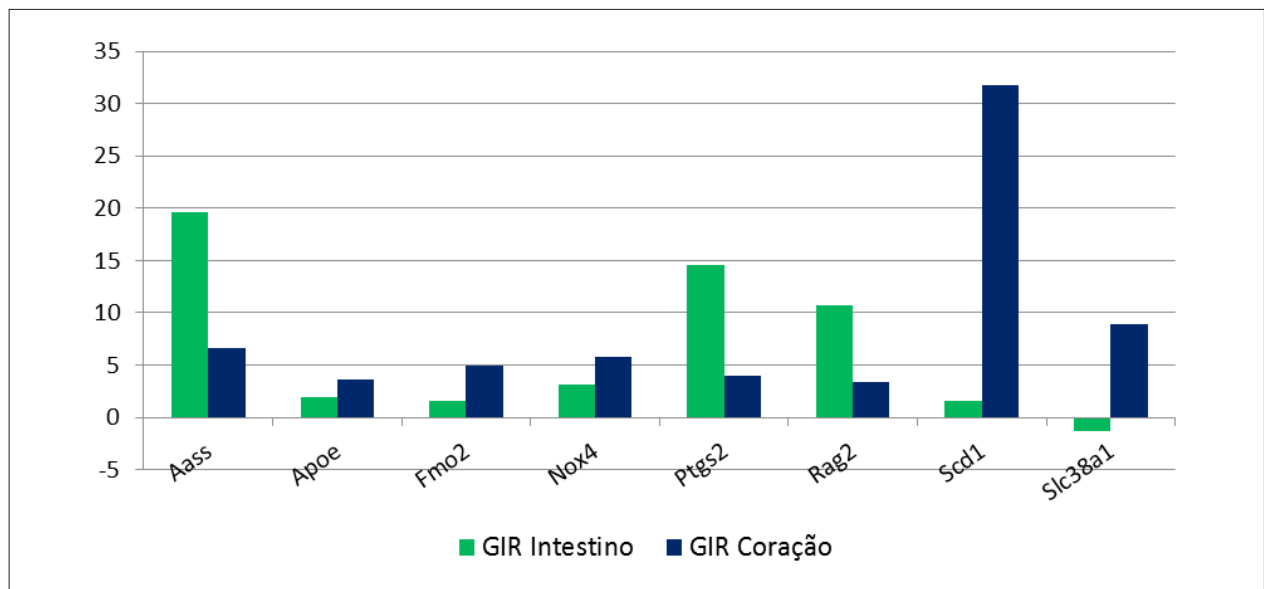


Gráfico 2 - Oito genes relacionados ao estresse oxidativo e com expressão três vezes acima do limiar da permitido pelo algoritmo nos tecidos intestinal e cardíaco.

Tabela 4 - Quantidade e porcentagem da ocorrência de genes hiperexpressos com valores estatisticamente significantes e suas ocorrências simultânea nos tecidos intestinal e cardíaco

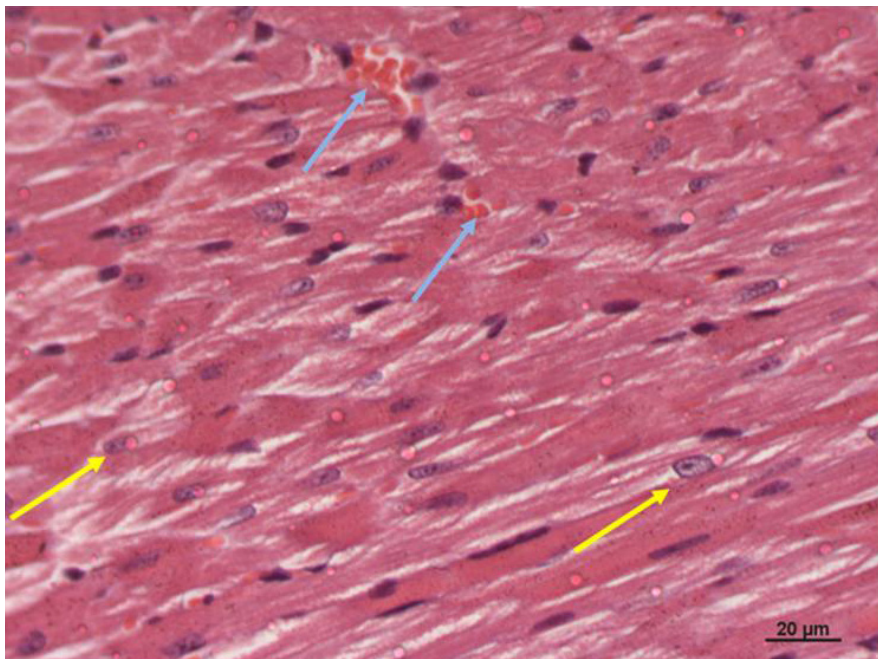
	GIR Intestino	GIR Coração	Ocorrência simultânea
Genes considerados significantes ( $p < 0,05$ )	65 (74,71%)	28 (33,33%)	24 (28,57%)
Genes considerados hiperexpressos	37 (44,04%)	8 (9,52%)	4 (4,76%)

em prostaglandina e está associada às lesões causadas pelo processo inflamatório e proliferação celular<sup>20</sup>. Ela tem duas funções no processo inflamatório: inicialmente contribui para o aparecimento da inflamação e posteriormente atua na resolução do processo<sup>21,22</sup>. A Ptgs2 não é detectável nas células em condições normais, porém está presente em resposta a citocinas inflamatórias em diferentes tipos celulares e situações de estresse oxidativo. Há relato de sua presença no miocárdio em várias doenças concorrendo para a falência cardíaca. No contexto desta pesquisa a hiperexpressão do gene Ptgs2 mostrou que o tecido miocárdio é sensível a isquemia intestinal respondendo de modo defensivo contra o estresse oxidativo<sup>22</sup>.

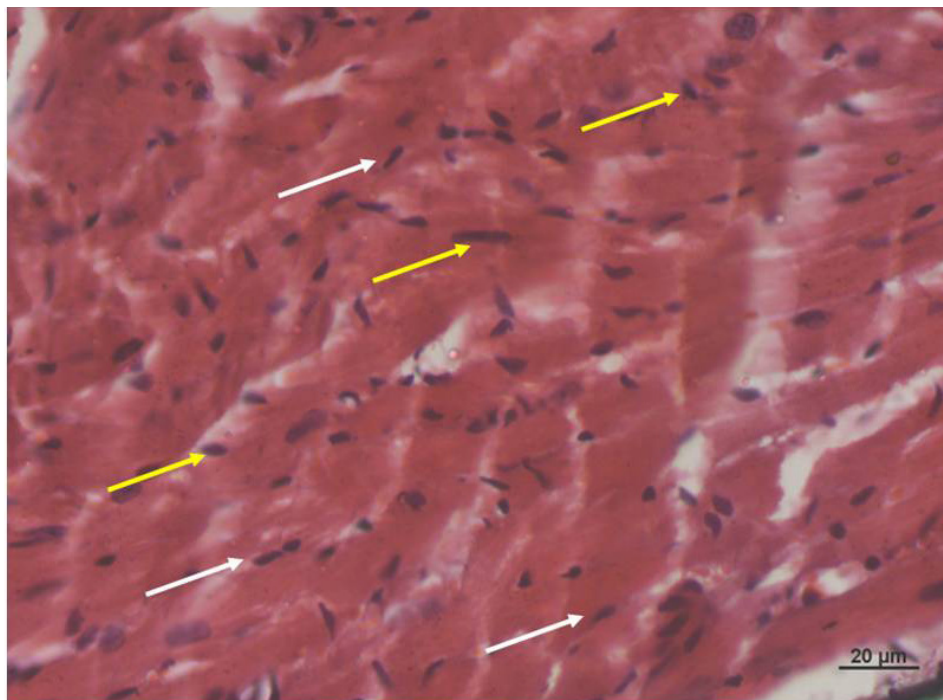
Os processos de neutralização de xenobióticos, entre eles aminas, sulfuretos e alguns compostos de fósforo e selênio, são executados por uma enzima da família das mono-oxigenases (Fmo2) que contém o nucleotídeo flavina. A reação é dependente da presença do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase). Na ausência de NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) a Fmo2 funcionaria como uma NADPH-oxidase que consome NADPH e causa estresse oxidativo, mediante a produção excessiva de peróxido de hidrogênio<sup>23</sup>. Mamíferos expressam cinco diferentes mono-oxigenases, e a isoforma Fmo2 é a mais prevalente. Estudo em humanos associou a

Fmo2 com a maior resistência ao estresse oxidativo causado por fatores ambientais<sup>24,25</sup>. Nesta pesquisa a hiperexpressão do gene Fmo2 sugere que a isquemia intestinal induziu a codificação da proteína para a defesa antioxidante do tecido cardíaco.

A NADPH oxidase (Nox) é um grupo de sete enzimas oxidases com manifestação intracelular, perinuclear e presente em diversos tecidos. É relevante sua presença no tecido cardiovascular, embora sem distinção clara entre miócitos e demais componentes vasculares. A Nox4 é a isoforma envolvida na produção de EROs, predominantemente de peróxido de hidrogênio e em menor escala do ânion superóxido<sup>26</sup>. Está envolvida na detecção de oxigênio, controle vasomotor, proliferação celular, diferenciação, migração, apoptose, senescência, fibrose e angiogênese<sup>27</sup>. Citocinas inflamatórias, entre elas a TNF-alfa, funcionam como moduladoras da expressão do gene Nox4<sup>28</sup>. Ambas desempenham um papel relevante na patogênese das doenças cardiovasculares estimulando a via extrínseca na formação de um complexo de sinalização indutor de morte celular, conduzindo à ativação da cascata de caspases. Fica evidente a correlação delas em doenças cardiovasculares (aterosclerose, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral isquêmico)<sup>26,28,29</sup>. A sua hiperexpressão evidencia que a isquemia/reperfusão



**Figura 1** - Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de camundongo pertencente ao Grupo Controle (GC). Notar os núcleos de cardiomiócitos centralizados na célula, volumosos e eucromáticos (setas amarelas); vasos íntegros sem extravasamento de hemácias (setas azuis); fibras cardíacas dispostas regularmente. (HE 400x).



**Figura 2** - Fotomicrografia mostrando ventrículo esquerdo de camundongo pertencente ao grupo isquemia e reperfusão (GIR). Notar núcleos dos cardiomiócitos na periferia celular (seta branca), de volume diminuído e picnóticos (setas amarelas); células edemaciadas e desestruturação da direção das fibras cardíacas. (HE 400x).

intestinal teve um efeito deletério sobre o coração. O efeito pôde ser constatado morfológicamente pelas alterações identificadas nas lâminas coradas pela HE (Figura 2).

A apolipoproteína E (ApoE) é fundamental para o metabolismo normal dos componentes lipoprotéicos de triglicérides e colesterol. Primariamente produzida pelo fígado e macrófagos, atua no transporte do colesterol, proteção às células endoteliais dos vasos, tem aparente ação em doenças neurológicas, e exerce funções imunomoduladoras *in vitro* diminuindo proliferação de linfócitos após o estímulo mitogênico<sup>30</sup>. Há relatos da sua ação ante a isquemia aguda como antioxidante, protegendo células de diferentes tecidos, como o endotélio contra o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio<sup>31-34</sup>. Considerando as atividades da ApoE nos diferentes tecidos, pode-se levantar a hipótese de que ante o estresse oxidativo do nosso modelo experimental houve uma resposta de proteção dos efeitos deletérios das EROs sobre o coração.

O gene Rag2 (*recombination-activating gene 2*) codifica uma das peroxidases que desempenham papel importante no rearranjo e recombinação dos genes das imunoglobulinas e dos receptores moleculares de células T<sup>27</sup>. É uma multiproteína complexa, mediadora da fase de clivagem de DNA durante recombinação. As proteínas RAG1 e RAG2 são essenciais para a maturação dos linfócitos bursa (B) e timo (T) dependentes. Os dois tipos celulares são fundamentais na adaptação do sistema imunológico<sup>35</sup>. As peroxidases são conhecidas por desempenhar um papel na modulação do estresse oxidativo<sup>35,36</sup>. A hiperexpressão da Rag2 pode estar associada à necessidade de ajustes na replicação celular cardíaca devido à presença de excessiva quantidade de EROs, em especial o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos orgânicos, mostrando uma ação de proteção aos efeitos deletérios das EROs.

A proteína codificada pelo gene Scd1 (*Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*) catalisa a síntese de ácidos graxos insaturados e seu principal produto é o ácido oleico, formado pela dessaturação do ácido esteárico, e está agrupada na família de enzimas relacionadas às espécies reativas de oxigênio<sup>37</sup>. A deficiência de Scd1 aumenta a taxa de oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético. Quanto maior essa taxa, maior é a probabilidade de que a deficiência de Scd1 venha a alterar o metabolismo cardíaco invertendo a proporção do substrato energético entre ácidos graxos e glicose disponível para o coração<sup>38</sup>. A incompatibilidade entre a absorção e utilização de ácidos graxos de cadeia longa pelo miocárdio leva a concentração anormalmente elevada de ácido graxo intracelular, induzindo a disfunção do miocárdio<sup>37</sup>. Na presente pesquisa, a hiperexpressão do gene no tecido cardíaco pode estar relacionada à necessidade de maior aproveitamento das gorduras em substituição ao substrato oxidável dependente da glicose, na tentativa de reparar o desequilíbrio metabólico cardíaco.

A proteína codificada pelo gene Slc38a1 (*Solute carrier family 38*) é transportadora de aminoácidos de ocorrência predominante no coração, no cérebro e na

placenta. Transportadores de soluto são proteínas da membrana eucariótica que controlam a absorção e efluxo de diferentes solutos, incluindo aminoácidos, açúcares e fármacos<sup>39</sup>. Os aminoácidos são necessários para uma ampla variedade de importantes processos biológicos celulares como na produção do tiol glutationa (GSH) catalisada pela presença da cisteína também necessária para outras reações no tecido do miocárdio e fornecida pela proteína transportadora Slc38a1<sup>40</sup>. A vigência do estresse oxidativo estimula sua captação provocando aumentos de expressão Slc38a1 no miocárdio de mamíferos, consequentemente com maior presença de (GSH)<sup>39,40</sup>. No presente estudo a hiperexpressão do gene Slc38a1 corrobora a afirmação de sua ação similar em outros tecidos e mostra que sua presença pode implicar uma ação protetora no mecanismo de transporte energético da célula miocárdica.

O racional desta pesquisa foi traçar o perfil de resposta gênica do tecido cardíaco quando submetido a estímulos provenientes de órgãos a distância atingidos pelo estresse oxidativo. Dados o ineditismo dos resultados e a complexidade da expressão gênica, a ratificação dos resultados fica na dependência de confirmação posterior através da proteômica, onde a identificação e a quantificação da proteína no tecido poderão fornecer subsídios que permitam verificar se a expressão gênica funcionou como estímulo real de codificação proteica ou se a expressão está relacionada à sinalização ou modulação de outras vias metabólicas de resposta ao estresse oxidativo. Como ponto de partida para futuras pesquisas o mapeamento realizado permitiu identificar oito genes que se mostraram mais responsáveis ao estresse oxidativo que, portanto, devam ser inicialmente focados como novo objeto de estudo. A linha de pesquisa é promissora, pois o entendimento da expressão gênica poderá produzir procedimentos de monitoramento da evolução e tratamento da síndrome de falência de múltiplos órgãos e especificamente na participação do tecido cardíaco nesse fenômeno.

## Conclusões

No perfil traçado para a resposta gênica associada ao estresse oxidativo foram identificados oito genes no tecido cardíaco que respondem com hiperexpressão quando o intestino é submetido a isquemia e reperfusão. O estudo abre perspectiva de organizar um protocolo de monitoramento em situações clínicas de isquemia e reperfusão a partir da expressão gênica em tempo real.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, Ginecologia Molecular da UNIFESP, o suporte logístico e de laboratório. Ao Prof. Dr. Marcos Azevedo Junior, o suporte e realização dos procedimentos de determinação da expressão gênica. Ao Prof. Manuel de Jesus Simões, o suporte nos procedimentos de avaliação histológica.



### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Somaio Neto F, Fagundes DJ; Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados e Redação do manuscrito: Somaio Neto F, Ikejiri AT, Bertolotto PR, Chaves JCB, Teruya R, Fagundes DJ, Taha MO; Análise estatística: Somaio Neto F, Teruya R, Fagundes DJ; Obtenção de financiamento: Somaio Neto F, Ikejiri AT, Bertolotto PR, Chaves JCB, Taha MO; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Fagundes DJ.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Referências

1. Pashkow FJ. Oxidative stress and inflammation in heart disease: do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? *Int J Inflamm.* 2011;2011:514623.
2. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-50.
3. Ondiveeran HK, Fox-Robichaud A. New developments in the treatment of ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2(6):783-91.
4. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 2000;5:E103-9.
5. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006;70(2):181-90.
6. Cantor EJ, Mancini EV, Seth R, Yao XH, Netticadan T. Oxidative stress and heart disease: cardiac dysfunction, nutrition, and gene therapy. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5(3):215-20.
7. Asyali MH, Colak D, Demirkaya O, Inan MS. Gene expression profile classification: a review. *Current Bioinformatics.* 2006;1(1):55-73.
8. Santos-Silva MA, Nagato AC, Trajano ET, Alves JN, Bandeira AC, Porto LC, et al. A resposta oxidativa em corações de camundongos é modulada por background genético. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(2):157-63.
9. Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(5):1326-32.
10. Bertolotto PR, Ikejiri AT, Somaio Neto F, Chaves JC, Teruya R, Bertolotto ER, et al. Oxidative stress gene expression profile in inbred mouse after ischemia/reperfusion small bowel injury. *Acta Cir Bras.* 2012;27(11):773-82.
11. Huda R, Chung DH, Mathru M. Ischemic preconditioning at a distance: altered gene expression in mouse heart and other organs following brief occlusion of the mesenteric artery. *Heart Lung Circ.* 2005;14(1):36-43.
12. Colombo J, Rahal P. A tecnologia de microarray no estudo do câncer de cabeça e pescoço. *R Bras Bioci.* 2010;8(1):64-72.
13. Moore-Olufemi SD, Olufemi SE, Lott S, Sato N, Kozar RA, Moore FA, et al. Intestinal ischemic preconditioning after ischemia/reperfusion injury in rat intestine: profiling global gene expression patterns. *Dig Dis Sci.* 2010;55(7):1866-77.
14. O'Donnell CJ, Nabel EG. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2098-109.
15. Deepak SA, Kottapalli KR, Rakwal R, Oros G, Rangappa KS, Iwashita H, et al. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics.* 2007;8(4):234-51.
16. Sacksteder KA, Biery BJ, Morrell JC, Goodman BK, Geisbrecht BV, Cox RP, et al. Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1736-43.
17. Struys EA, Jakobs C. Metabolism of lysine in alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-deficient fibroblasts: evidence for an alternative pathway of pipercolic acid formation. *FEBS Lett.* 2010;584(1):181-6.
18. Seminotti B, Leipnitz G, Amaral AU, Fernandes CG, da Silva Lde B, Tonin AM, et al. Lysine induces lipid and protein damage and decreases reduced glutathione concentrations in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26(7):693-8.
19. Cleveland BM. The effect of alpha-aminoadipate delta-semialdehyde synthase knockdown on the lysine requirement and urate oxidase knockdown on oxidative stress in a murine hepatic cell line. [thesis]. Morgantown, (WV): West Virginia University; 2007.
20. Buetler TM, Leclerc E, Baumeier A, Latado H, Newell J, Adolfsson O, et al. N (epsilon)-carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind to RAGE and activate an inflammatory response. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(3):370-8.
21. Mason RP, Kalyanaraman B, Tainer BE, Eling TE. A carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthetase oxidation of arachidonic acid. Spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem.* 1980;255(11):5019-22.
22. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999;5(6):698-701.
23. Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998;98(2):100-3.
24. Yueh MF. Identification and characterization of flavin-containing monooxygenase isoform 2 (FMO2) in Rhesus monkey and examination of a human FMO2 polymorphism. [thesis]. Corvallis (OR): Oregon State University; 1999.
25. Krueger SK, Siddens LK, Martin SR, Yu Z, Pereira CB, Cabacungan ET, et al. Differences in FMO2\*1 allelic frequency between Hispanics of Puerto Rican and Mexican descent. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(12):1337-40.
26. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol.* 2012;3:412.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD - Mato Grosso do Sul.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Frederico Somaio Neto pela Universidade Federal de São Paulo.

27. Yin FF, Bailey S, Innis CA, Ciubotaru M, Kamtekar S, Steitz TA, et al. Structure of the RAG1 nonamer binding domain with DNA reveals a dimer that mediates DNA synopsis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(5):499-508.
28. Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C422-32.
29. Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(7):777-93.
30. Zhou S, Wu H, Zeng C, Xiong X, Tang S, Tang Z, et al. Apolipoprotein E protects astrocytes from hypoxia and glutamate-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2013;587(2):254-8.
31. Laskowitz DT, Sheng H, Bart RD, Joyner KA, Roses AD, Warner DS. Apolipoprotein E-deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(7):753-8.
32. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet.* 1996;14(1):55-61.
33. Tarnus E, Wassef H, Carmel JF, Rondeau P, Roche M, Davignon J, et al. Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS Lett.* 2009;583(12):2042-8.
34. Yue L, Bian JT, Grizelj I, Cavka A, Phillips SA, Makino A, et al. Apolipoprotein E enhances endothelial-NO production by modulating caveolin 1 interaction with endothelial NO synthase. *Hypertension.* 2012;60(4):1040-6.
35. Arbuckle JL, Rahman NS, Zhao S, Rodgers W, Rodgers KK. Elucidating the domain architecture and functions of non-core RAG1: the capacity of a non-core zinc-binding domain to function in nuclear import and nucleic acid binding. *BMC Biochem.* 2011;12:23.
36. Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL. The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology.* 2012;217(11):1026-33.
37. Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, Iijima D, Sunaga H, Maniwa M, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes. *PLoS One.* 2012;7(3):e33283.
38. Dobrzyn P, Sampath H, Dobrzyn A, Miyazaki M, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase 1 inhibits fatty acid oxidation and increases glucose utilization in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(2):E357-64.
39. Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, Pieper U, Yee SW, Kelly L, et al. Comparison of human solute carriers. *Protein Sci.* 2010;19(3):412-28.
40. King N, Lin H, Suleiman MS. Oxidative stress increases SNAT1 expression and stimulates cysteine uptake in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Amino Acids.* 2011;40(2):517-26.