

**Fernando Manuel Gomes Remião**

**CARDIOTOXICIDADE DO ISOPROTERENOL  
E DOS PRODUTOS DA SUA OXIDAÇÃO**

**ESTUDOS MECANÍSTICOS EM SUSPENSÕES  
DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS DE RATO ADULTO**



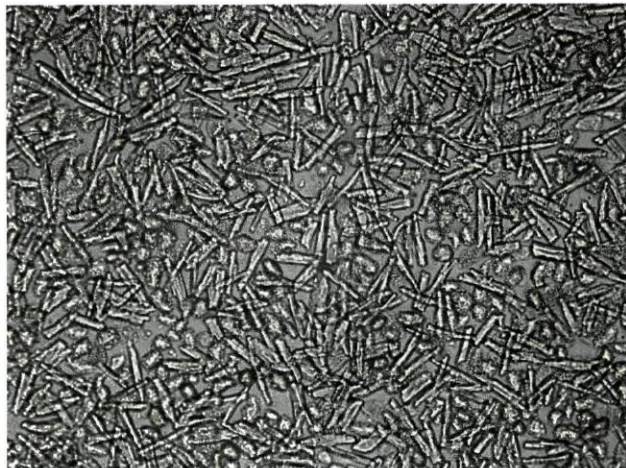
**Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

**2002**

**Fernando Manuel Gomes Remião**

**CARDIOTOXICIDADE DO ISOPROTERENOL  
E DOS PRODUTOS DA SUA OXIDAÇÃO**

**ESTUDOS MECANÍSTICOS EM SUSPENSÕES  
DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS DE RATO ADULTO**



**Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

**2002**

**Dissertação de candidatura ao grau de Doutor na área de Toxicologia  
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

Orientador:

Professora Catedrática Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

Co-orientador:

Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Os estudos apresentados nesta dissertação foram essencialmente realizados no Centro de Estudos de Química/Serviço de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (CEQUP/Toxicologia). Algumas das publicações aqui apresentadas tiveram o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia, ao abrigo do Programa PRAXIS XXI (projecto PRAXIS/PSAU/C/SAU/19/96). Os estudos realizados no Departamento de Farmacologia e Toxicologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade da Califórnia do Sul, sob a direcção do Professor Enrique Cadenas, tiveram o apoio financeiro da Fundação Luso-Americana e da Fundação Calouste Gulbenkian.

Os resultados apresentados nesta dissertação fazem parte das seguintes publicações/resumos/comunicações:

### **Publicações**

1. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML. (1999) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition* 15:47-61
2. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2000) Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* 14:468-473
3. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2001) Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 37:1-4
4. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2001) The study of oxidative stress in freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicology in Vitro* 15:283-287
5. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2001) Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovascular Toxicology* 1:195-204
6. Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2002)  $\text{Cu}^{2+}$ -Induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chemical Research in Toxicology* 15:861-869
7. Remião F, Milhazes N, Borges F, Carvalho, F, Bastos, ML, Lemos-Amado F, Domingues P and Ferrer-Correia A (2002) Synthesis and analysis of aminochromes by HPLC- photodiode array. Adrenochrome evaluation in rat blood. *Biomedical Chromatography* (In press)

## Resumos publicados

1. Remião F, Ferreira H, Ramos G, Carvalho F and Bastos ML (1998) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Toxicology Letters* 95 (Suppl 1):95
2. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2000) Isoproterenol-induced oxidative stress in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology Letters* 116 (Suppl 1):79
3. Remião F, Carmo H, Carvalho M, Carvalho, F and Bastos ML (2001) Cardiomyocyte toxic effects as a result of isoproterenol oxidation. *Toxicology Letters* 123 (Suppl 1):31

## Comunicações

1. Remião F, Ferreira H, Ramos G, Carvalho F and Bastos ML (1998) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products, in International Congress of Toxicology, Paris (França)
2. Remião F, Carmo H, Ramos G, Carvalho F and Bastos ML (1999) In vitro oxidation of isoproterenol inhibits glutathione reductase, in I Encontro do ICETA/CEQUP, Porto (Portugal)
3. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos M.L (1999) Freshly isolated cardiomyocytes suspension as a model to study cardiotoxicity of compounds. Exemplification with tert-butylhydroperoxide, in XXX Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia e XVIII Reunião de Farmacologia Clínica, Lisboa (Portugal)
4. Remião F, Carmo H, Soares ME, Carvalho F and Bastos ML (2000) Avaliação de marcadores de stress oxidativo por HPLC, in Curso de HPLC - Teoria e Aplicações, Porto (Portugal)
5. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2000) Isoproterenol-induced oxidative stress in freshly isolated rat cardiomyocytes, in European Congress of Toxicology (Eurotox 2000), Londres (Inglaterra)
6. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2000) The study of oxidative stress in freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from

adult rat, in 11th International Workshop on In Vitro Toxicology (INVITOX 2000), Alicante (Espanha)

7. Remião F, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2000) Copper-induced isoproterenol toxicity to freshly isolated rat cardiomyocytes, in XXXI Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia e XIX Reunião de Farmacologia Clínica, Porto (Portugal)
8. Remião F, Carmo H, Carvalho M, Carvalho F and Bastos ML (2001) Cardiomyocyte toxic effects as a result of isoproterenol oxidation, in European Congress of Toxicology (Eurotox 2001), Istanbul (Turquia)
9. Remião F, Carmo H, Carvalho M, Carvalho F and Bastos ML (2001) Cardiomyocyte toxic effects as a result of isoproterenol oxidation, in II Encontro do REQUIMTE, Monte da Caparica (Portugal)
10. Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2001) Role of oxidative stress in isoproterenol and isoprenochrome-induced toxicity in isolated rat cardiomyocytes, in XXXII Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia e XX Reunião de Farmacologia Clínica, Coimbra (Portugal)
11. Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F and Bastos ML (2001) Isoproterenol/ $\text{Cu}^{2+}$  oxidative effects in isolated cardiomyocytes, in V Congresso de Radicais Livres em Química, Biologia e Medicina, Porto (Portugal)
12. Remião F, Milhazes N, Borges F, Carvalho F, Bastos ML, Lemos-Amado F, Domingues P and Ferrer-Correia A (2001) Synthesis and mass spectrometry characterization of aminochromes. Extraction and quantification of isoprenochrome and adrenochrome in biological samples, in V Congresso de Radicais Livres em Química, Biologia e Medicina, Porto (Portugal)
13. Remião F, Rettori D, Han D, Carvalho F and Bastos ML (2002) Leukoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes, in Oxygen Club of California-2002: "Oxidants and Antioxidantes in Biology", Santa Barbara - Califórnia (USA)

## Agradecimentos

O Serviço de Toxicologia da FFUP, ao qual me orgulho pertencer, sempre se me demonstrou insuperável na lealdade, confiança e amizade entre os seus elementos. Não será nunca demais realçar que este trabalho só foi possível porque o ambiente humano que o rodeou era exemplar.

Quero no entanto exprimir individualmente a minha gratidão:

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, minha orientadora, pela forma sábia, paciente e generosa com que me orientou na minha vida académica e nesta dissertação em particular. A sua forma de estar na ciência e na vida será para mim sempre uma referência.

Ao Professor Doutor Félix Dias Carvalho, meu co-orientador e amigo, ao qual, nesta Faculdade, muito tenho a agradecer.

À Engenheira Maria Elisa Soares, por quem tenho a mais profunda admiração, pelo estímulo, apoio e disponibilidade que sempre me proporcionou.

À Helena Carmo e à Márcia Carvalho pela amizade, paciência, estímulo e apoio demonstrados ao longo dos últimos anos, sem cuja colaboração os estudos realizados e apresentados nesta dissertação não seriam possíveis.

Ao Nuno Milhazes, à Prof. Doutora Eduarda Fernandes, à Prof. Doutora Fernanda Borges, ao Prof. Doutor Francisco Lemos-Amado, ao Prof. Doutor Pedro Domingues, ao Prof. Doutor Daniel Rettori e ao Prof. Doutor Enrique Cadenas pela amizade e colaboração nos estudos realizados e apresentados nesta dissertação.

À Professora Doutora Maria Conceição Rangel pela disponibilidade e ajuda proporcionada na escrita do capítulo referente aos estudos com RPE.

Às funcionárias D. Júlia Caraméz e D. Graziela Fernandes pela amizade e disponibilidade que sempre demonstraram.

À Olga, ao Diogo e aos meus Pais...

## Resumo

As catecolaminas desempenham um papel fisiológico fundamental na neurotransmissão. No entanto, quando utilizadas como agentes terapêuticos, ou, então, quando os seus níveis aumentam durante fenómenos patológicos como o feocromocitoma, a isquemia-reperfusão e o *stress* psicossocial, as catecolaminas podem desenvolver toxicidade ao nível cardiovascular e, mais especificamente, ao nível cardíaco. Para o estudo experimental da cardiotoxicidade das catecolaminas, um dos compostos mais utilizados como modelo é a catecolamina sintética isoproterenol.

Estão descritos diversos mecanismos para a cardiotoxicidade exercida pelo isoproterenol. No entanto, a sua actividade  $\beta$ -adrenérgica e o *stress* oxidativo resultante da sua oxidação são as vias propostas mais referidas por diferentes autores. Esta dissertação tem como objectivo contribuir para o esclarecimento do mecanismo de cardiotoxicidade das catecolaminas, em particular do isoproterenol, quando este é mediado pelo fenómeno de oxidação destas moléculas.

Para a concretização do objectivo realizaram-se estudos *in vivo* e *in vitro*, para os quais foram desenvolvidas ou adaptadas técnicas experimentais. Nas técnicas experimentais destacam-se:

- a obtenção de suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto;
- a quantificação simultânea da glutathiona reduzida e oxidada em células isoladas, por HPLC com detecção electroquímica;
- a determinação dos níveis de catecolaminas e respectivos aminocromos em amostras biológicas, por HPLC com detecção por fotodíodos.

Nos estudos *in vivo*:

- quantificou-se o isoproterenol no plasma e coração de rato adulto, 15 minutos após terem sido injectadas doses tóxicas desta catecolamina;
- quantificou-se o adrenocromo no sangue de rato adulto, 5, 15 e 25 minutos após terem sido injectadas doses tóxicas deste aminocromo.

Nos estudos *in vitro*:

- estudou-se a oxidação do isoproterenol a isoprenocromo nas suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto. Nestes estudos determinaram-se os níveis de isoproterenol e isoprenocromo no meio extracelular e nas células. A formação de compostos intermediários como a leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona também foi avaliada;
- estudou-se a acção tóxica do isoproterenol e da sua oxidação, catalisada pelo  $\text{Cu}^{2+}$ , ao nível das suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto. Nestes estudos avaliaram-se a viabilidade celular, os níveis de glutathione (reduzida e oxidada) e a actividade das enzimas glutathione-redutase, glutathione-peroxidase e glutathione-transferase. A influência dos níveis extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  nos efeitos observados também foi avaliada;
- estudou-se o tipo de inibição enzimática da glutathione-redutase induzida pelos produtos de oxidação do isoproterenol e a acção de antioxidantes nessa inibição, utilizando, para isso, glutathione-redutase purificada da mucosa intestinal bovina.

Os resultados obtidos permitiram concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o isoproterenol exerce cardiotoxicidade celular, essencialmente na presença de agentes catalisadores da sua oxidação, como por exemplo o  $\text{Cu}^{2+}$ . A oxidação observada leva à formação de isoprenocromo e de radicais, como a leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona, que estão presentes nas células e onde, muito provavelmente, exercem a sua acção tóxica. Esta acção tóxica é dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, observando-se a depleção da glutathione, quer por oxidação quer por formação de aductos com os produtos resultantes da oxidação do isoproterenol, bem como a inibição de enzimas, tais como a da glutathione-redutase, a da glutathione-peroxidase e a da glutathione-transferase. A inibição da glutathione-redutase ocorre de um modo competitivo para a glutathione oxidada e pode ser prevenida, em parte, pela acção de antioxidantes, especialmente por tióis. Como conclusão final, os resultados obtidos demonstram que o processo de oxidação das catecolaminas e os compostos daí formados contribuem para a sua cardiotoxicidade. A catálise dessa oxidação, por exemplo, por metais de transição, parece ser fundamental para o desenvolvimento dos referidos efeitos tóxicos.

## Abstract

Catecholamines have a crucial physiological role in the neurotransmission processes. However, when used for therapeutic purposes, or when their levels increase in pathological situations, such as pheocromocytoma, ischemia-reperfusion or psychosocial stress they can induce cardiovascular toxicity, and especially cardiac toxicity. When the cardiotoxicity of catecholamines is experimentally evaluated, one of the most used model compound is the synthetic catecholamine isoproterenol.

Several mechanisms have been described to explain isoproterenol cardiotoxicity. However, its  $\beta$ -adrenergic activity and the oxidative stress induced by its oxidation are the most reported by different authors. The objective of this thesis is to contribute for the understanding of the cardiotoxicity mechanism of catecholamines, especially of isoproterenol, when it occurs through the oxidation of these compounds.

For this purpose, *in vivo* and *in vitro* studies have been performed and new experimental techniques have been developed or adapted. Some methodologies were developed in order to:

- obtain freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from adult rat;
- simultaneously quantify reduced and oxidised glutathione in isolated cells by HPLC with electrochemical detection;
- measure catecholamines and respective aminochromes in biological samples by HPLC-photodiode array.

In *in vivo* studies:

- it was quantified the isoproterenol in the plasma and in the heart of the adult rat, 15 minutes after injection of toxic doses of this catecholamine;
- it was quantified the adrenochrome in adult rat blood, 5, 10 and 15 minutes after injection of toxic doses of this aminochrome.

In *in vitro* studies:

- it was studied the isoproterenol oxidation into isoprenochrome in freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from adult rat. In these studies, the levels of isoproterenol and isoprenochrome in extracellular medium and

in the cells were determined. The intermediate compounds, such as leukoisoprenochrome-*o*-semiquinone were also evaluated;

- it was studied the toxic effects of isoproterenol and of its oxidation, catalised by  $\text{Cu}^{2+}$ , in freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from adult rat. In these studies, the cellular viability, the reduced and oxidised glutathione levels and the enzymes activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione transferase were evaluated. The influence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the observed effects was also evaluated;
- it was studied the type of enzymatic inhibition of glutathione reductase and the effects of some antioxidants in this inhibition, using purified glutathione reductase from bovine intestinal mucosa.

From the obtained results, it can be concluded that, under these experimental conditions, the isoproterenol induces cellular cardiotoxicity, essentially when its oxidation is catalised (for example by  $\text{Cu}^{2+}$ ). The observed oxidation leads to the formation of isoprenochrome and radicals, as leukoisoprenochrome-*o*-semiquinone, whose presence in cells is probably responsible for the observed toxicity. This toxicity is dependent on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. It was also observed the glutathione depletion, due to its oxidation and adducts formation with isoproterenol oxidation products, and the inhibition of enzymes, such as glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione transferase. The inhibition of glutathione reductase is competitive for oxidised glutathione and can be partially prevented by antioxidants, especially thiols. As final conclusion, the obtained results show that the process of catecholamines oxidation and the resulting products contribute to their cardiotoxicity. The catalysis of this oxidation, for example by transition metals, seems to be crucial for the development of these toxic effects.

## Résumé

Les catécholamines jouent un rôle fondamental dans la neurotransmission. Cependant quand utilisés comme agents thérapeutiques ou alors quand leur niveau augmente pendant les phénomènes pathologiques comme le feocromocytome, l'ischémie-reperfusion et le *stress* psychosocial, les catécholamines peuvent développer de la toxicité au niveau cardiovasculaire et en particulier au niveau cardiaque. Quand la cardiotoxicité des catécholamines est étudiée de façon expérimentale, la catécholamine synthétique isoproterenol est un des composés modèle les plus utilisés.

Divers mécanismes sont décrits par la cardiotoxicité exercée par l'isoproterenol. Toutefois, leur activité  $\beta$ -adrénergique et le *stress* oxydant résultant de leur oxydation sont les propositions les plus suggérées par les auteurs. Le but de cette thèse est de contribuer à éclaircir le mécanisme de la cardiotoxicité des catécholamines, en particulier de l'isoproterenol, quand celui-ci est dû au phénomène de l'oxydation de ces molécules.

Pour concrétiser cet objectif on a développé ou adapté des techniques expérimentales et on a réalisé des études *in vivo* et *in vitro*. Au niveau des techniques expérimentales on a développé des méthodologies qui ont pour fin:

- Obtenir des suspensions cardiomyocytes, tolérantes au  $Ca^{2+}$ , isolés de rat adulte;
- Quantifier simultanément la glutathione réduite et oxydée au sein des cellules isolées par HPLC avec détection électrochimique;
- Déterminer les catécholamines et leurs aminochromes respectifs dans les échantillons biologiques, par HPLC avec détection par photodiodes;

Dans les études *in vivo*:

- On a quantifié l'isoproterenol dans le plasma et le cœur de rats, 15 minutes après injection de doses toxiques de cette catécholamine;
- On a quantifié l'adrenochrome dans le sang de rats, 5, 15 et 25 minutes après leur avoir injecté des doses toxiques d'aminochrome.

Dans les études *in vitro*:

- On a étudié l'oxydation de l'isoproterenol au isoprenochrome. Dans les suspensions de cardiomyocytes, tolérants à  $Ca^{2+}$ , isolés du rat adulte.

Dans ces études on a déterminé les niveaux d'isoproterenol et isoprenocrome dans le domaine extra cellulaire et dans les cellules. La formation des composites intermédiaires comme leucoisoprenocrome-o-semiquinone a aussi été évalué;

- On a étudié l'action toxique de l'isoproterenol et de son oxydation catalysée par  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des suspensions de cardiomyocytes, tolérants au  $\text{Ca}^{2+}$ , isolés du rat adulte. Dans ces études on a évalué la viabilité cellulaire, les niveaux de glutathione (réduite et oxydée) et l'activité des enzymes glutathione-réductase, glutathione-peroxidase et glutathione-transferase. L'influence des niveaux extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les effets observés a aussi été évaluée;
- On a étudié le genre d'inhibition enzymatique de la glutathione-réductase et l'action des antioxydants dans cette inhibition en utilisant pour cela la glutathione-réductase purifié de la muqueuse intestinale bovine.

Les résultats obtenus on permet de conclure, en accord avec les conditions expérimentales utilisées, que l'isoproterenol exerce de la cardiotoxicité cellulaire en particulier quand l'oxydation est catalysés (par exemple dans la présence de  $\text{Cu}^{2+}$ ). L'oxydation observée entraîne la formation d'isoprenocromo et de radicaux comme la leucoisoprenocrome-o-semiquinone qui sont présents dans les cellules et là très probablement ils exercent leur action toxique. Cette action toxique dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire nous permet d'observer la déplétion de glutathione, soit par oxydation soit par formation d'adducteurs avec les produits résultant de l'oxydation d'isoproterenol, ainsi que l'inhibition des enzymes tels que la glutathione-réductase, glutathione-peroxidase et glutathione-transferase. L'inhibition de glutathione-réductase survient d'une façon compétitive par glutathione oxydée et peut être prévenue en partie par l'action des antioxydants et e particulièrement par les thiols. En conclusion, les résultats obtenus démontrent que le processus d'oxydation des catécholamines et leurs composés contribuent à leur cardiotoxicité. La catalyse de cette oxydation, à travers, par exemple, les métaux de transition, apparaît comme fondamentale au développement de ces effets toxiques.

## Abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico  
ADP – difosfato de adenosina  
AMP – monofosfato de adenosina  
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico  
AST – aspartato-transaminase  
ATP – trifosfato de adenosina  
AV – auriculoventricular  
COMT – catecol-o-metiltransferase  
CPK – creatina-fosfocinase  
DAD – detector de fotodíodos  
DHMI – 5,6-diidroxi-1-metilindolo  
DHMI<sub>s</sub> – 5,6-diidroxi-1-metilisatina  
DL<sub>50</sub> – dose letal 50  
DOMA – ácido 3,4-diidroxi-mandélico  
DOPEG – 3,4-diidroxi-feniletileneglicol  
DOPGAL – 3,4-diidroxi-fenilglicolaldeído  
DP – desvio padrão da média  
Fig. – figura  
GOT – glutamato-oxaloacetato-transaminase  
GPT – glutamato-piruvato-transaminase  
GR – glutationa-redutase  
GSH – glutationa na forma reduzida  
GSOH – ácido sulfénico  
GSO<sub>3</sub>H – ácido sulfónico  
GSOO<sup>•</sup> – radical peroxissulfonilo  
GS<sup>•</sup> – radical glutationilo  
GPX – glutationa-peroxidase  
GSSG – glutationa na forma oxidada  
GST – glutationa-S-transferase  
HPLC – cromatografia líquida de alta resolução  
HVA – ácido homovanílico

ICR – índice de controlo respiratório  
i.p. – intraperitoneal  
Km – constante de Michaelis-Menten  
LDH – lactato-desidrogenase  
LDL – lipoproteínas de baixa densidade  
MAO – monoamina-oxidase  
MOPEG – 3-metoxi-4-hidroxifeniletlenoglicol  
MOPGAL – 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldeído  
NAD<sup>+</sup> – nicotinamida adenina dinucleótido  
NADH – nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida  
NADP<sup>+</sup> – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida  
NMN – normetanefrina  
ROOH – hidroperóxidos orgânicos  
ROS – espécies reactivas de oxigénio  
RPE – ressonância paramagnética electrónica  
SA – sinoauricular  
s.c. – subcutânea  
SNC – sistema nervoso central  
SOD – superóxido-dismutase  
VMA – ácido vanililmandélico  
XD – xantina-desidrogenase  
XO – xantina-oxidase

# Índice Geral

Agradecimentos.....	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
Résumé.....	XIII
Abreviaturas.....	XV
1 O coração .....	6
1.1 Estrutura .....	6
1.2 Histologia.....	7
1.3 Cardiomiócitos.....	10
1.3.1 Propriedades .....	10
1.3.2 Contração .....	12
1.3.2.1 Potenciais de acção cardíacos.....	12
1.3.2.2 Acoplamento excitação-contração .....	16
1.3.2.3 Controlo da contração .....	18
1.4 Disfunções cardíacas .....	20
2 Catecolaminas e cardiotoxicidade .....	22
2.1 Catecolaminas.....	22
2.1.1 História .....	22
2.1.2 Função fisiológica das catecolaminas .....	23
2.1.2.1 Sistema nervoso autónomo simpático .....	23
2.1.2.1.1 Fisiologia.....	23
2.1.2.1.2 Receptores adrenérgicos .....	25
2.1.2.1.3 Ciclo das catecolaminas.....	26
2.1.2.1.4 Funções das catecolaminas.....	28
2.1.3 Metabolismo das catecolaminas.....	30
2.1.4 Aminas simpaticomiméticas .....	32
2.2 Cardiomiopatia induzida por catecolaminas .....	33
2.2.1 Características da cardiomiopatia induzida por catecolaminas ...	34
2.2.1.1 Alterações ultraestruturais e histológicas.....	36
2.2.1.2 Alterações bioquímicas .....	37

2.2.1.3	Alterações dos electrólitos .....	39
2.2.1.4	Alterações membranares .....	39
2.2.1.5	Espasmos coronários.....	42
2.2.2	Mecanismos de toxicidade propostos para as catecolaminas .....	43
2.2.2.1	Hipóxia parcial e alterações hemodinâmicas .....	43
2.2.2.2	Espasmos coronários e efeitos hemodinâmicos .....	43
2.2.2.3	Efeitos metabólicos .....	44
2.2.2.4	Alterações electrolíticas e sobrecarga de Ca <sup>2+</sup> intracelular....	46
2.2.2.5	<i>Stress</i> oxidativo.....	47
2.2.2.5.1	Metabolização pela MAO .....	47
2.2.2.5.2	Formação de quinonas e aminocromos .....	48
2.2.2.5.2.1	Oxidação das catecolaminas a aminocromos .....	48
2.2.2.5.2.2	Reactividade dos aminocromos.....	50
2.2.2.5.2.3	Metabolismo dos aminocromos.....	54
2.2.2.5.2.4	Toxicidade cardiovascular dos produtos resultantes da oxidação das catecolaminas.....	54
2.2.3	Conclusão.....	57
3	Objectivo da dissertação.....	58
4	Métodos experimentais .....	59
5	Resultados .....	63
5.1	Inibição da glutathiona-redutase pelos produtos de oxidação do isoproterenol.....	65
5.2	Determinação simultânea da GSH e GSSG em suspensões de hepatócitos e de cardiomiócitos isolados de rato por HPLC com detector electroquímico .....	83
5.3	Estudos de cardiotoxicidade em suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao Ca <sup>2+</sup> , isolados de rato adulto.....	91
5.4	Estudo do <i>stress</i> oxidativo em suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao Ca <sup>2+</sup> , isolados de rato adulto.....	97
5.5	Aumento da toxicidade do isoproterenol pelo Cu <sup>2+</sup> em cardiomiócitos isolados de rato: efeitos no <i>stress</i> oxidativo .....	105
5.6	Indução da oxidação do isoproterenol a isoprenocromo pelo Cu <sup>2+</sup> em cardiomiócitos, tolerantes ao Ca <sup>2+</sup> , isolados de rato adulto.....	117

5.7	Síntese e análise de aminocromos por HPLC com detecção por fotodíodos. Determinação de adrenocromo em sangue de rato.....	129
5.8	Determinação das concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol após a sua administração a ratos na dose de 80 mg.Kg <sup>-1</sup> (i.p.).....	153
5.8.1	Objectivo.....	153
5.8.2	Metodologia.....	153
5.8.2.1	Administração do isoproterenol a ratos. Recolha de amostras de sangue e coração .....	153
5.8.3	Resultados e discussão.....	154
5.9	Detecção por RPE da formação de radicais resultantes da oxidação do isoproterenol, em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato .....	155
5.9.1	Objectivo.....	155
5.9.2	Método .....	155
5.9.2.1	Cardiomiócitos de rato adulto.....	155
5.9.2.2	Tratamento das amostras para espectroscopia de RPE.....	155
5.9.3	Análise por RPE .....	157
5.9.4	Resultados e discussão.....	157
6	Discussão geral .....	167
6.1	Interesse do estudo da cardiotoxicidade das catecolaminas – isoproterenol.....	167
6.1.1	Acção terapêutica das catecolaminas .....	167
6.1.2	<i>Stress</i> psicossocial .....	169
6.1.3	Isquemia-reperfusão.....	170
6.1.4	Feocromocitoma.....	173
6.1.5	Isoproterenol.....	175
6.2	Seleção do modelo experimental a utilizar no estudo da cardiotoxicidade do isoproterenol .....	178
6.2.1	Porquê o uso de cardiomiócitos isolados .....	178
6.2.2	Porquê a escolha de cardiomiócitos tolerantes ao Ca <sup>2+</sup> .....	179
6.2.3	Ratos fetais/neonatais <i>versus</i> ratos adultos .....	181
6.2.4	Suspensões <i>versus</i> culturas.....	182

6.3	Seleção das concentrações de isoproterenol a utilizar nos estudos <i>in vitro</i> .....	183
6.3.1	Determinação das concentrações de isoproterenol no plasma e coração de ratos após a sua administração em doses tóxicas .....	183
6.3.1.1	Doses de isoproterenol usadas em estudos de cardiotoxicidade .....	183
6.3.1.2	Determinação das concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol após a sua administração a ratos na dose de 80 mg.Kg <sup>-1</sup> (i.p.).....	185
6.3.2	Concentrações de isoproterenol usadas em estudos <i>in vitro</i> para a avaliação da cardiotoxicidade do isoproterenol.....	185
6.3.3	Conclusão.....	186
6.4	Escolha do modelo de oxidação do isoproterenol .....	187
6.4.1	Processos de oxidação das catecolaminas ao nível biológico ..	187
6.4.2	Escolha do Cu <sup>2+</sup> na concentração de 20 µM .....	188
6.5	Discussão dos resultados.....	190
6.5.1	Oxidação do isoproterenol em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato .....	190
6.5.1.1	Catálise da oxidação do isoproterenol pelo Cu <sup>2+</sup> .....	191
6.5.1.2	Determinação do isoproterenol e isoprenocromo nas suspensões de cardiomiócitos .....	193
6.5.1.3	Detecção e localização dos radicais resultantes da oxidação do isoproterenol ao nível dos cardiomiócitos .....	194
6.5.1.4	Conclusão .....	195
6.5.2	Viabilidade celular .....	195
6.5.2.1	Ausência de efeito na viabilidade celular após incubação dos cardiomiócitos com isoproterenol na ausência de Cu <sup>2+</sup> ..	197
6.5.2.2	Acção citotóxica do Cu <sup>2+</sup> .....	198
6.5.2.3	Acção citotóxica do isoproterenol associado ao Cu <sup>2+</sup> .....	199
6.5.2.4	Conclusão .....	203
6.5.3	Alterações nos níveis de glutathiona .....	203
6.5.3.1	Estabilidade da glutathiona intracelular durante a incubação dos cardiomiócitos com o isoproterenol isoladamente .....	207

6.5.3.2	Oxidação da GSH intracelular após incubação com Cu <sup>2+</sup> (20 µM).....	208
6.5.3.3	Alterações nos níveis de glutathiona após incubação com isoproterenol na presença de Cu <sup>2+</sup> .....	208
6.5.3.4	Determinação simultânea de GSH e GSSG por HPLC com detector coulométrico.....	211
6.5.3.5	Conclusões.....	211
6.5.4	Inibição enzimática.....	211
6.5.4.1	Inibição das enzimas GPX, GR e GST.....	215
6.5.4.2	Tipo de inibição enzimática da GR e acção dos antioxidantes.....	216
6.5.4.3	Conclusão.....	217
7	Proposta de um mecanismo de cardiotoxicidade do isoproterenol.....	218
8	Conclusão geral.....	221
9	Proposta de estudos futuros.....	222
10	Referências.....	223

# **1 O coração**

Órgão vital do nosso organismo, o coração representa no nosso imaginário conotações tão amplas e relevantes, que se configura com a própria alma do ser humano. Porém, ao promover a circulação sanguínea, este órgão desempenha funções meramente motoras. É pela acção do coração, e através do sistema vascular, que o sangue faz chegar nutrientes, oxigénio (O<sub>2</sub>), hormonas e outras moléculas essenciais a todas as células do organismo. Ao mesmo tempo, liberta as células dos produtos resultantes do seu metabolismo e proporciona-lhes defesas contra os microorganismos invasores. O sistema cardiovascular contribui, ainda, para o controlo de aspectos tão importantes para a homeostasia interna como a temperatura corporal e o pH tecidual.

Neste capítulo serão abordados os aspectos fisiológicos do coração, não de um modo exaustivo, mas apenas com o intuito de introduzir conceitos fundamentais para o entendimento desta dissertação. Para a elaboração deste capítulo foram consultados vários livros referência na área (Midgley, 1992; Ganong, 1993; Fawcett *et al.*, 1994; Fox, 1996; Roden, 1996; Vander *et al.*, 1998).

## **1.1 Estrutura**

O coração é um órgão muscular, localizado no tórax, envolvido por um saco fibroso, o pericárdio. O tecido muscular é denominado miocárdio e é constituído por células típicas, os cardiomiócitos. Em termos estruturais é constituído por quatro câmaras, duas aurículas e dois ventrículos, e pode dividir-se, dada a presença de um septo longitudinal, em duas metades, a direita e a esquerda [figura (Fig.) 1.1]. O sangue venoso circula no lado direito do coração e o sangue arterial no lado esquerdo, não havendo a possibilidade da sua mistura. A aurícula direita recebe a veia cava inferior e a veia cava superior, e está separada do ventrículo direito pela válvula auriculoventricular tricúspide. Entre o ventrículo direito e a artéria pulmonar encontra-se a válvula semilunar pulmonar. A aurícula esquerda recebe a veia pulmonar e está

separada do ventrículo esquerdo pela válvula auriculoventricular mitral. A válvula semilunar aórtica separa o ventrículo esquerdo da artéria aorta. A irrigação sanguínea do coração dá-se pelas artérias e veias coronárias.

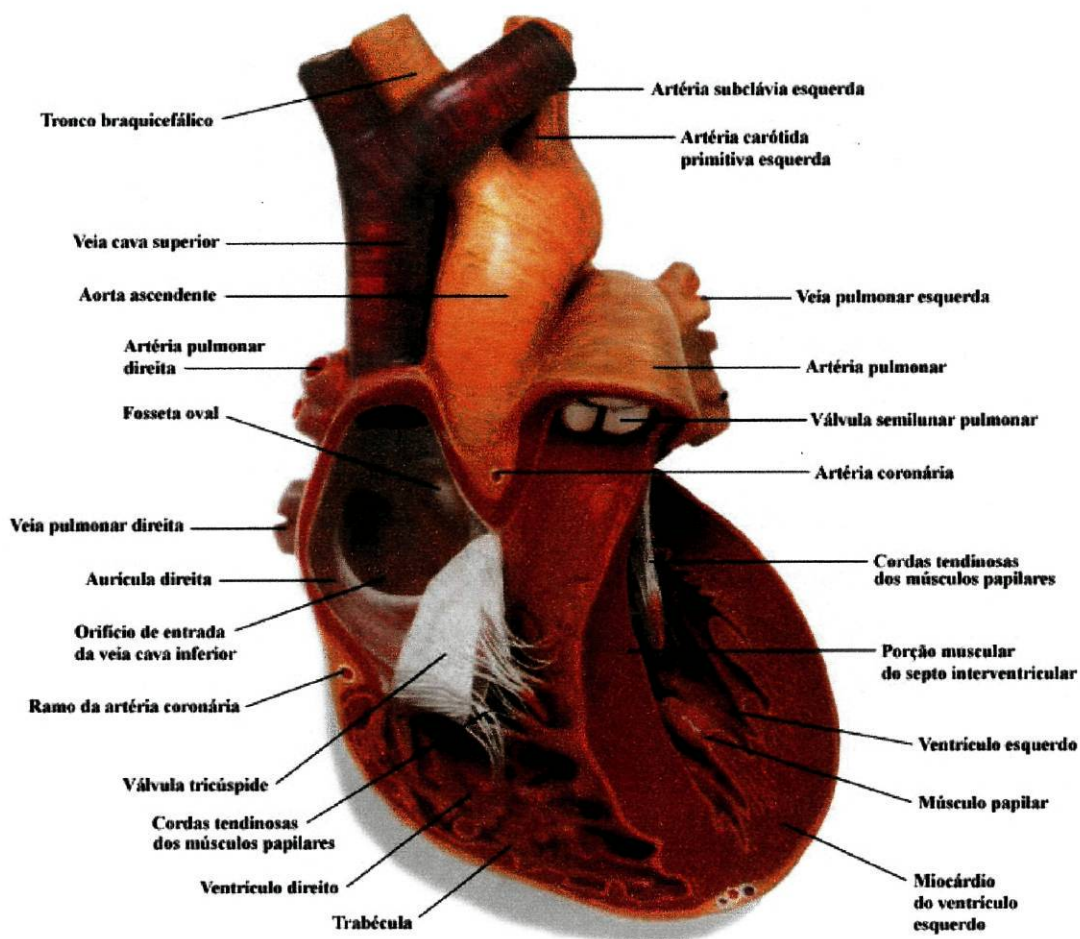


Figura 1.1 – Anatomia do coração (adaptado de Midgley, 1992).

## 1.2 Histologia

O miocárdio apresenta-se com um padrão estriado cruzado, onde se evidenciam feixes de células justapostas topo a topo (Fig. 1.2). A configuração da maioria destes feixes é paralela. No entanto, alguns cardiomiócitos ramificam e formam conexões oblíquas com feixes adjacentes. Daí resulta uma organização tridimensional complexa, diferente do arranjo paralelo e cilíndrico das fibras do músculo-esquelético.

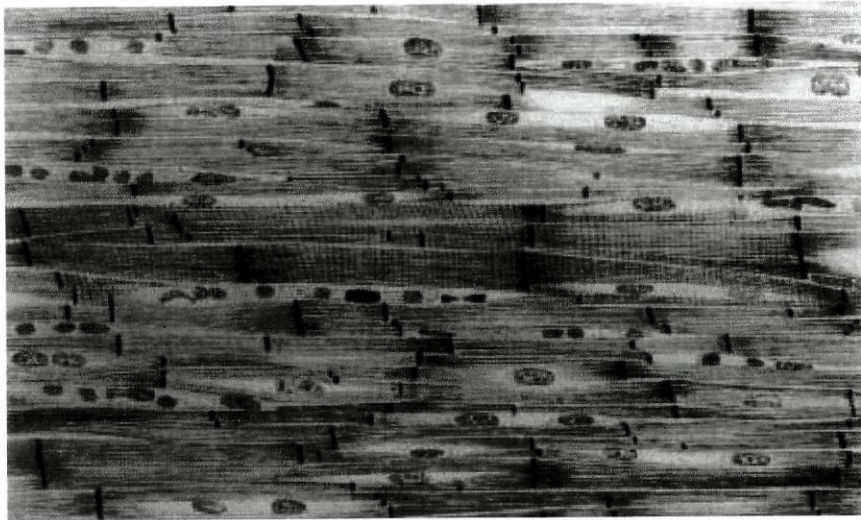


Figura 1.2 – Tecido cardíaco (adaptado de Fawcett *et al.*, 1994).

Além dos cardiomiócitos, que exercem funções contrácteis, existem células com funções endócrinas (células mioendócrinas), células especializadas na geração dos potenciais de acção (miócitos nodais) e células especializadas na condução do potencial de acção (miócitos de transição e miócitos de Purkinje).

As células mioendócrinas localizam-se essencialmente nas aurículas e distinguem-se dos outros miócitos auriculares pela presença de grânulos secretórios ligados às membranas. Estes grânulos contêm compostos de natureza polipeptídica (cardiodilatinas ou polipeptídeos natriuréticos auriculares) que se encontram envolvidos na regulação do volume sanguíneo e da composição electrolítica do fluído extracelular.

A contracção do coração é miogénica, ou seja, é independente da estimulação nervosa. Todos os cardiomiócitos são autonomamente excitáveis. No entanto, algumas células presentes na junção da veia cava superior com a aurícula direita formam um nodo denominado nodo sinoauricular (SA) e geram potenciais de acção com uma frequência de excitação superior à das outras células (Fig. 1.3). Como consequência, estas células (miócitos nodais) impõem a frequência de despolarização do coração e, por isso, são designadas o “marca passo” do coração. Estas células apresentam poucos miofilamentos e um sarcoplasma (ou citoplasma) rico em mitocôndrias.

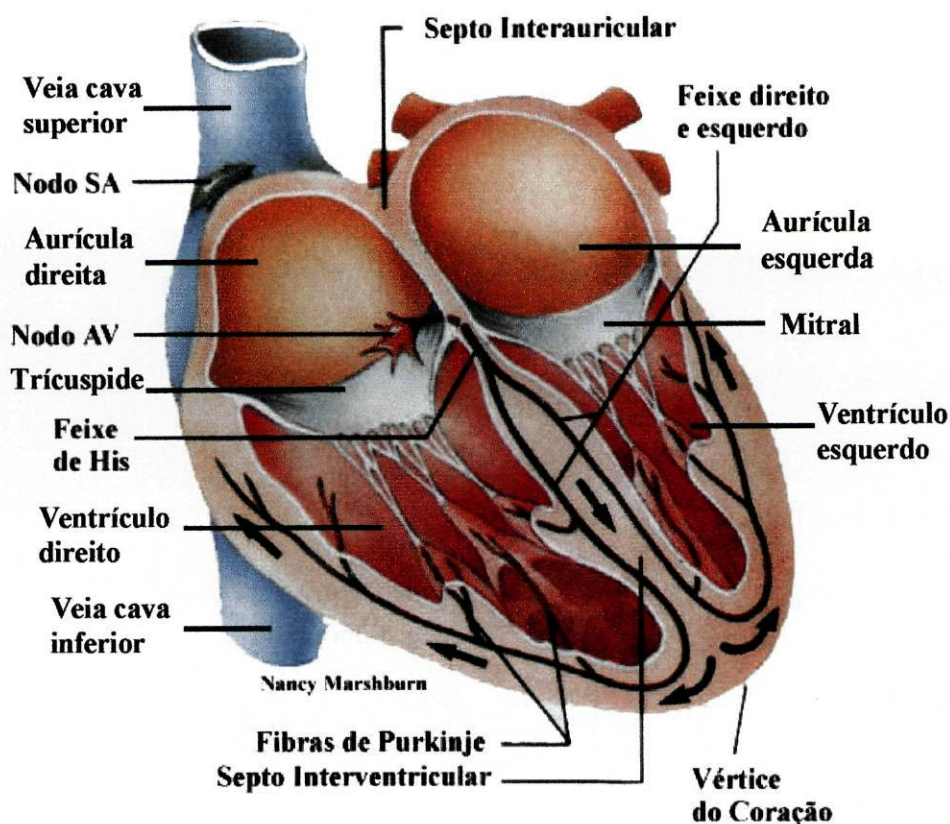


Figura 1.3 – Sistema de condução do coração (adaptado de Fox, 1996).

A condução do potencial de ação às diferentes regiões do miocárdio é assegurada por células especializadas nessa função que formam, no seu conjunto, o sistema de condução do coração (Fig. 1.3). Estas células estão localizadas no nodo auriculoventricular (AV), nas vias internodais, no feixe de His e no sistema de Purkinje. As células constituintes das vias internodais são denominadas miócitos de transição. Estes distinguem-se por serem mais delgados que os cardiomiócitos auriculares e por possuírem mais miofilamentos que as células nodais. Os miócitos de transição são, de igual modo, os principais constituintes do nodo AV, onde também se encontram alguns miócitos nodais com localização central. Na periferia do nodo, encontram-se os miócitos de Purkinje. Estes estão associados topo a topo e formam longas filas tradicionalmente designadas por fibras de Purkinje, até ser conhecida a sua natureza multicelular. Os miócitos de Purkinje são cilíndricos, uninucleados, curtos e largos, e apresentam, num corte transversal, formas

irregulares. Não se lhes visualizam discos intercalares, mas sim grandes junções estreitas nos topos e nos lados das células. Estes miócitos estão também presentes no feixe de His. Neste feixe, os miócitos de transição prolongam-se desde o nodo AV até à sua porção inicial, predominando a partir daí os miócitos de Purkinje.

### 1.3 Cardiomiócitos

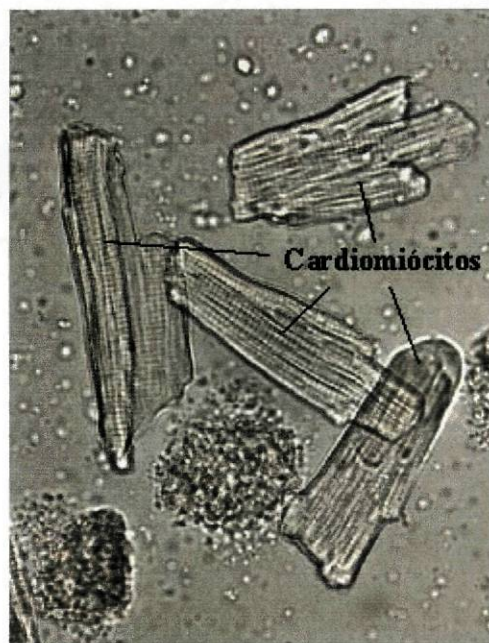


Figura 1.4 – Cardiomiócitos isolados.

#### 1.3.1 Propriedades

Sendo um órgão muscular, o coração possui na sua constituição essencialmente células musculares, denominadas cardiomiócitos. Estas células possuem a particular capacidade de se autoexcitarem, gerando potenciais de acção que levam à sua contracção.

Os cardiomiócitos apresentam uma forma rectangular, com dimensões da ordem dos 80  $\mu\text{m}$  de comprimento e 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fig. 1.4). A sua membrana celular ou plasmática é denominada sarcolema. Têm um aspecto estriado devido à presença de miofilamentos que ocupam cerca de metade do

seu espaço intracelular. Os cardiomiócitos são também ricos em mitocôndrias (muitas vezes dispostas em fila) e contêm um ou mais núcleos com localização central e forma alongada. Perto destes núcleos e junto a um dos seus pólos encontra-se o aparelho de Golgi. Outro organelo especialmente importante nestas células, dada a sua função de armazenamento de  $Ca^{2+}$ , é o retículo sarcoplasmático. Este penetra dentro da massa cilíndrica dos miofilamentos a partir da periferia destes e está associado a invaginações do sarcolema denominadas túbulos transversos (túbulos T). Também se encontram grânulos de glicogénio e gotas lipídicas que funcionam como fontes energéticas.

Os miofilamentos são estruturas intracelulares constituídas por actina (filamentos finos) e miosina (filamentos grossos). Na observação destes filamentos podem distinguir-se duas bandas, uma mais densa denominada banda A e outra menos densa denominada banda I (Fig. 1.5). No centro da banda I há uma zona perpendicular espessa, designada linha Z. O espaço entre duas linhas Z denomina-se sarcómero.

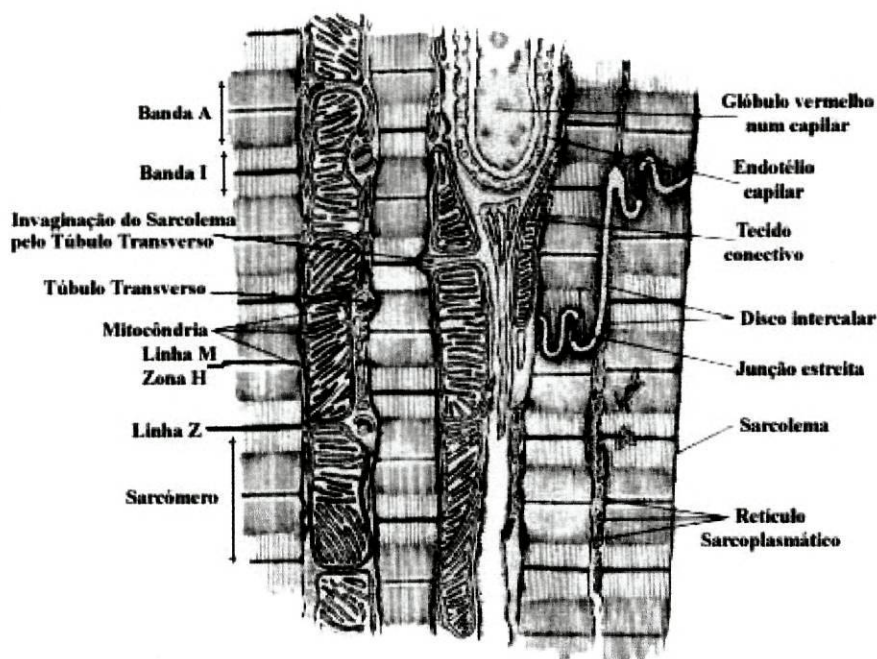


Figura 1.5 – Estrutura do tecido cardíaco (adaptado de Vander *et al.*, 1998).

Os cardiomiócitos adjacentes encontram-se unidos topo a topo por estruturas designadas por discos intercalares (Fig. 1.5). Estes discos têm, pelo menos, três funções importantes:

- procedem à ligação dos cardiomiócitos adjacentes através dos desmossomas;
- procedem à ligação dos filamentos de actina, entre miofilamentos de células adjacentes;
- contêm estruturas denominadas junções estreitas que facilitam a propagação do potencial de acção de uma célula para a outra.

### 1.3.2 Contração

#### 1.3.2.1 Potenciais de acção cardíacos

O sarcolema dos cardiomiócitos está sujeito a um gradiente eléctrico e a um gradiente iónico (Fig. 1.6). O seu potencial é positivo na sua face externa, onde existe uma maior concentração de  $\text{Na}^+$ . Na sua face interna, o sarcolema está sujeito a uma maior concentração de  $\text{K}^+$ . O sarcolema apresenta, no entanto, diversos transportadores e canais iónicos que permitem regular a permeabilidade membranar. Em função das alterações da permeabilidade iónica ocorre um fenómeno de despolarização e repolarização do sarcolema, denominado potencial de acção.

Em repouso, o potencial da membrana está compreendido entre os -80 e os -90 mV. Diz-se, nesta situação, que o sarcolema se encontra polarizado, o que corresponde a um equilíbrio resultante da permeabilidade relativa da membrana ao  $\text{K}^+$  e da acção dos transportadores iónicos, especialmente da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Este transportador retira três iões  $\text{Na}^+$  da célula ao mesmo tempo que lhe introduz dois de  $\text{K}^+$ , contribuindo não só para a remoção do  $\text{Na}^+$  do interior da célula, como também para a manutenção da polarização da membrana. Em repouso a célula é sujeita a um gradiente eléctrico e iónico favorável à entrada de  $\text{Na}^+$ , que não ocorre porque os canais de  $\text{Na}^+$  se encontram encerrados (Fig. 1.6). Em contrapartida, os canais lentos de  $\text{K}^+$

estão abertos, permitindo um fluxo de  $K^+$  através da membrana segundo o gradiente de concentração (no sentido do meio extracelular) e segundo o gradiente eléctrico (no sentido do meio intracelular). Caso não ocorram alterações na permeabilidade da membrana, o potencial manter-se-á próximo do valor do potencial de equilíbrio do  $K^+$ .

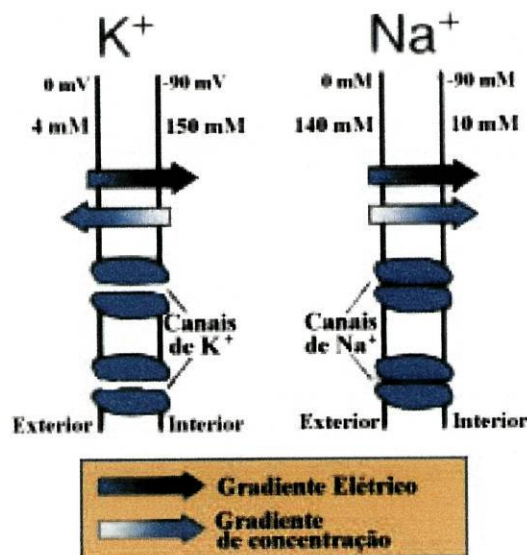


Figura 1.6 – Gradiente eléctrico e de concentração dos íons  $Na^+$  e  $K^+$ , numa situação de repouso (adaptado de Roden, 1996).

Um outro ião importante no potencial de acção é o  $Ca^{2+}$ . A concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos é da ordem dos 100 nM, valor bastante inferior à concentração deste ião no meio extracelular (cerca de 1,8 mM). Há, por isso, no estado de repouso, um gradiente eléctrico e de concentração no sentido da entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. A manutenção deste gradiente é garantida por mecanismos de controlo da concentração citoplasmática deste ião. Assim, de um modo simplificado, a exclusão do  $Ca^{2+}$  do citoplasma é directamente assegurada por bombas de  $Ca^{2+}$  ao nível do sarcolema, retículo sarcoplasmático e núcleo, por um sistema uniporte de  $Ca^{2+}$  mitocondrial dependente do potencial de membrana e por um sistema antiporte  $Na^+/Ca^{2+}$  no sarcolema. Por outro lado, o  $Ca^{2+}$  é libertado para o meio citosólico, via canais e transportadores de  $Ca^{2+}$  existentes nestas mesmas estruturas.

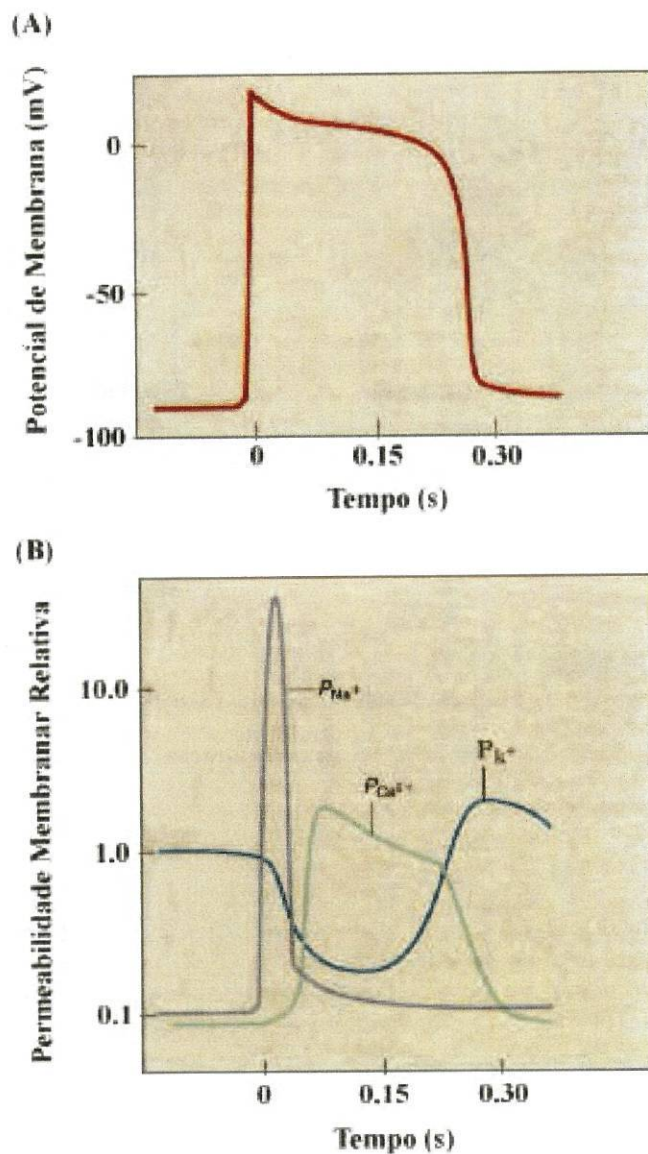


Figura 1.7 – Registo do potencial de acção em cardiomiócitos ventriculares (adaptado de Vander *et al.*, 1998).

Na figura 1.7 podemos observar o potencial de acção correlacionado com as variações da permeabilidade membrana ao  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos ventriculares. Quando o potencial de membrana aumenta, os canais de  $Na^+$  dependentes do potencial alteram a sua conformação para o estado "aberto". Neste estado, ocorre a entrada de grandes quantidades  $Na^+$  na célula. Esta alteração no gradiente eléctrico não é compensada, de imediato, pela saída de  $K^+$  e dá-se, então, a despolarização. O estado

conformacional "aberto" dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes do potencial é, no entanto, rapidamente modificado para o estado fechado e "inactivo", o qual não permite a passagem do  $\text{Na}^+$ . A passagem da conformação "inactiva" para a conformação "activa" ocorre somente após o potencial de membrana voltar para valores próximos do seu valor de repouso. Deste modo, as células passam por um período de tempo importante, denominado período refractário, em que estas não podem ser novamente excitadas enquanto o potencial de membrana não voltar para valores próximos do valor anterior à despolarização.

Atingida a despolarização ocorre o planalto, onde o potencial dos cardiomiócitos (em particular dos ventriculares) se mantém a cerca de 0 mV durante um determinado período de tempo. Este atraso na repolarização (planalto) deve-se principalmente a um aumento da permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, também, à manutenção de uma baixa permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , que tende a sair da célula. O aumento da permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  resulta da abertura dos canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (também denominados canais tipo L ou dependentes da voltagem) como consequência da despolarização. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a célula contrabalança a saída de  $\text{K}^+$ , o que leva à sustentação da despolarização.

A repolarização surge com o aumento da condutância ao  $\text{K}^+$ , devido à abertura dos canais rápidos de  $\text{K}^+$ , e com a diminuição da condutância ao  $\text{Ca}^{2+}$ , resultante do encerramento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ .

O potencial de acção induz, ao nível da face interna do sarcolema, o aumento das concentrações de  $\text{Na}^+$  e a diminuição das concentrações de  $\text{K}^+$ . As concentrações destes iões são normalizadas pela acção da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

O traçado do potencial de acção para os cardiomiócitos ventriculares não se aplica, na perfeição, a todas as células do coração (Fig. 1.8). Nos cardiomiócitos auriculares, por exemplo, o potencial de acção, apesar de semelhante ao dos cardiomiócitos ventriculares, estabelece um planalto mais curto. As maiores diferenças encontram-se, no entanto, nas células do nodo SA. Estas células possuem um potencial de repouso mais instável, com uma despolarização gradual da membrana. Este fenómeno, denominado potencial "marca passo", inicia o processo de despolarização que se irá propagar a todo o tecido cardíaco. O potencial "marca passo" resulta de uma redução

espontânea da permeabilidade da membrana ao  $K^+$ , acompanhada de um aumento da permeabilidade ao  $Na^+$  e ao  $Ca^{2+}$ .

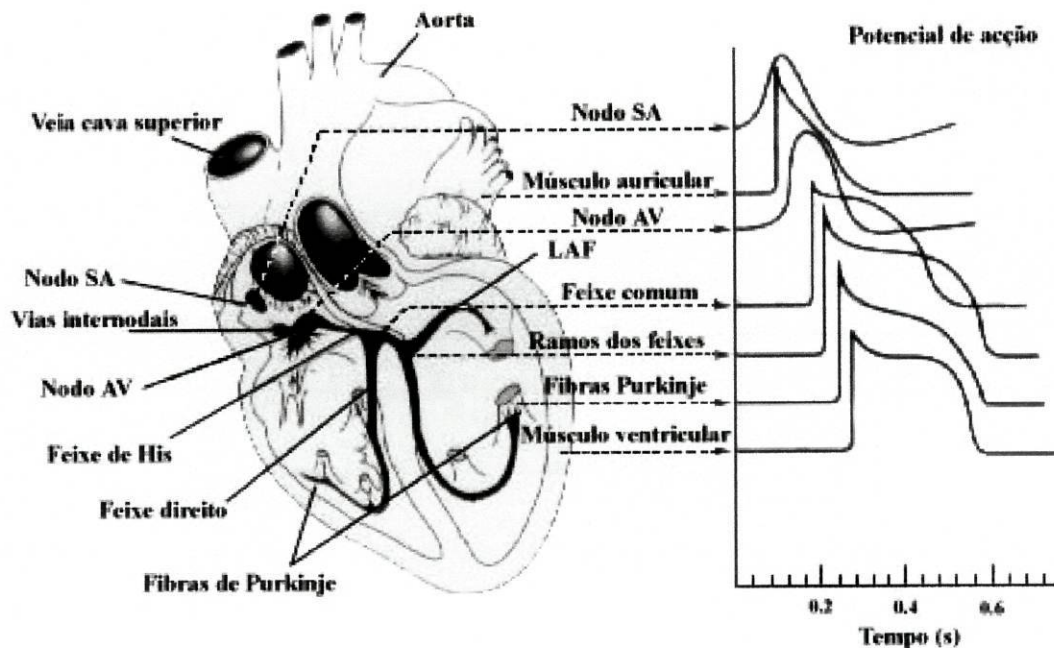


Figura 1.8 – Registo dos potenciais de acção em diferentes pontos do sistema de condução do coração (adaptado de Ganong, 1993).

### 1.3.2.2 Acoplamento excitação-contracção

O organelo que assume primordial importância no processo de excitação-contracção é o retículo sarcoplasmático. Este retículo possui duas regiões de largas dimensões, denominadas sacos laterais, interligadas por uma série de pequenos elementos tubulares (Fig. 1.9). Os sacos laterais têm como função o armazenamento do  $Ca^{2+}$ . O  $Ca^{2+}$  aí armazenado encontra-se ligado a uma proteína denominada calsequestrina. Esta proteína tem uma alta capacidade para complexar o  $Ca^{2+}$ , apesar da sua baixa afinidade para este ião.

O acoplamento excitação-contracção inicia-se com a entrada de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular durante a despolarização. Esta admissão de  $Ca^{2+}$  resulta da abertura dos canais lentos de  $Ca^{2+}$  presentes nos túbulos T do sarcolema (Fig. 1.9). O  $Ca^{2+}$  actua ao nível do retículo sarcoplasmático, onde induz a libertação de mais  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular (efeito de

amplificação). O  $\text{Ca}^{2+}$  libertado liga-se à troponina formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /troponina que altera a conformação da tropomiosina. Nesta conformação, a tropomiosina desbloqueia os locais activos da actina, permitindo o estabelecimento de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e as cabeças da miosina. A formação destas pontes cruzadas e as alterações conformacionais que geram nas cabeças da miosina levam ao deslizamento dos miofilamentos, à diminuição do tamanho do sarcómero e consequentemente à contracção.

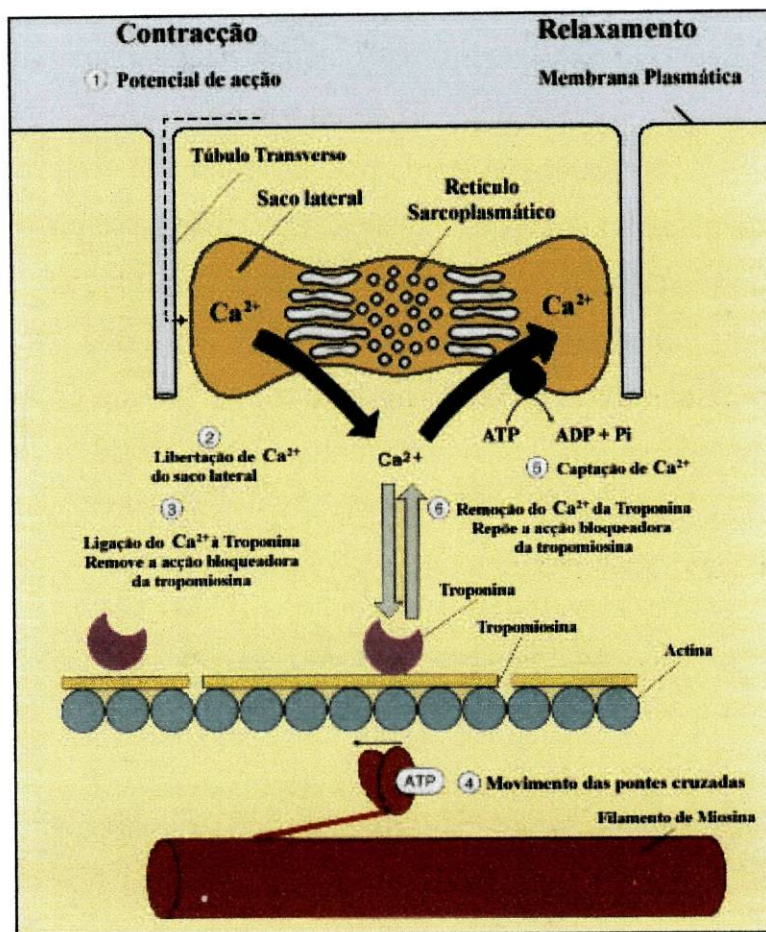


Figura 1.9 – Papel do  $\text{Ca}^{2+}$  no processo excitação-contracção. Encontra-se em evidência a sequência dos fenómenos que ocorrem neste processo (adaptado de Vander *et al.*, 1998).

O processo de contracção é revertido pela remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico, o qual ocorre por acção de dois transportadores, a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  e o sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . A bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  remove o  $\text{Ca}^{2+}$  para os depósitos presentes no retículo sarcoplasmático e o sistema antiporte

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , presente no sarcolema, capta três iões de  $\text{Na}^+$  do meio extracelular por cada ião de  $\text{Ca}^{2+}$  que exclui. A redução do  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular induz a dissociação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /troponina e ocorre o relaxamento.

Como se pode depreender do acima descrito, a força de contracção está directamente relacionada com os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Ao contrário do que se passa no músculo-esquelético, o  $\text{Ca}^{2+}$  libertado na célula cardíaca nunca é suficiente para saturar todos os locais activos da troponina. Este facto permite que a força de contracção seja aumentada mediante um incremento da condutância ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

Um fenómeno que pode ocorrer no músculo-esquelético e não acontece no músculo cardíaco é o tétano. O tétano dá-se quando o músculo é estimulado com alta-frequência sem possibilidade de relaxar antes da ocorrência de novos estímulos. A excitabilidade da célula muscular só acontece quando a conformação dos canais de  $\text{Na}^+$  está no estado "activo". Nos cardiomiócitos, o prolongamento do estado "inactivo" dos canais de  $\text{Na}^+$  (despolarização do sarcolema) dilata o período refractário até uma fase em que as células já se encontram em relaxamento. Deste modo, o fenómeno do tétano é evitado no coração. No entanto, em alguns casos patogénicos, podem ocorrer arritmias cardíacas (ver em 1.4).

### 1.3.2.3 *Controlo da contracção*

Na ausência de qualquer influência nervosa ou hormonal, o coração mantém uma frequência cardíaca de cerca de 100 batimentos/minuto. No entanto, em condições fisiológicas o sistema nervoso autónomo, simpático e parassimpático, e o sistema hormonal alteram a frequência cardíaca de forma a adaptá-la às necessidades do organismo.

As fibras parassimpáticas induzem uma diminuição da frequência cardíaca através da libertação de acetilcolina, a qual exerce os seus efeitos sobre os receptores do tipo muscarínico presentes no coração. A acetilcolina induz a abertura de mais canais de  $\text{K}^+$ , provocando uma hiperpolarização da membrana. Por isso, numa situação de repouso, em que o coração se encontra sob influência vagal, ocorre uma menor frequência cardíaca (cerca de 75

batimentos/minuto). Por outro lado, o sistema nervoso autónomo simpático liberta catecolaminas, tais como noradrenalina (ou norepinefrina) pelas fibras simpáticas e adrenalina (ou epinefrina) pela medula supra-renal. Estas catecolaminas actuam nos receptores adrenérgicos presentes no coração, os quais, neste órgão, são essencialmente do tipo  $\beta$  e dentro deste, do subtipo  $\beta_1$  (Fig. 1.10).

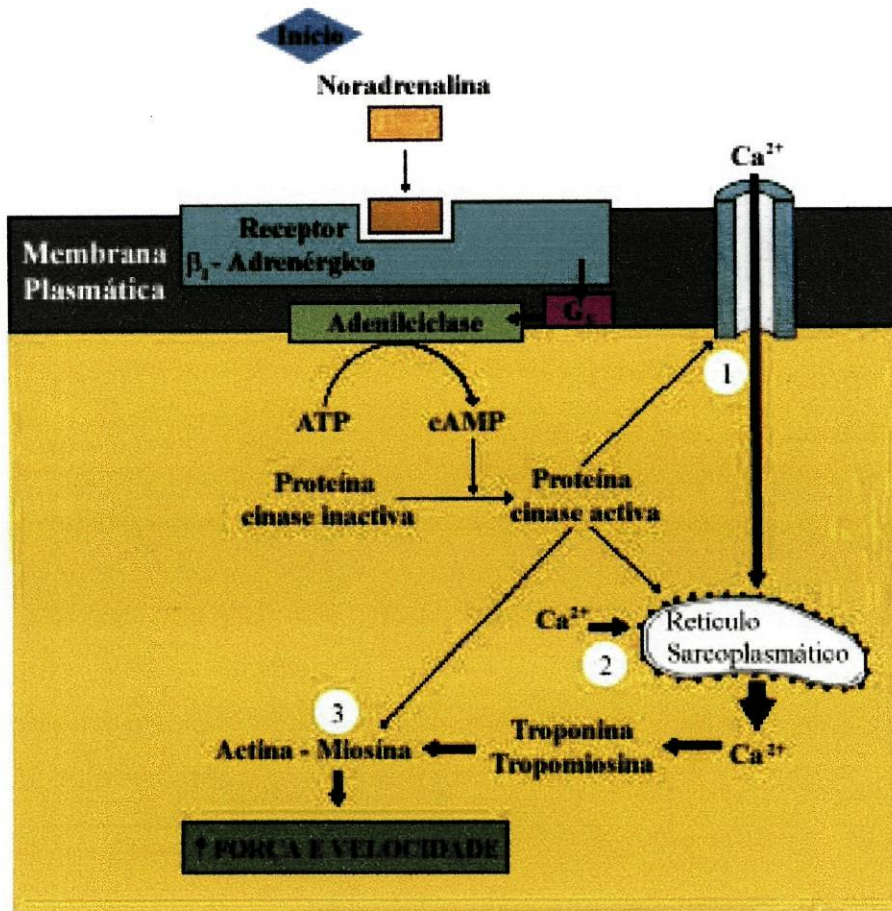


Figura 1.10 – Estimulação adrenérgica nos cardiomiócitos (adaptado de Vander *et al.*, 1998).

A activação dos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  induz o aumento da velocidade e força da contracção cardíaca pela activação de uma proteína G ( $G_s$ ). Esta proteína activa, por sua vez, a enzima adenilciclase que transforma o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). O AMPC activa a proteína cinase A. Esta última actua, pelo menos, a três níveis, activando por fosforilação:

- uma proteína (1), presente no sarcolema, que tal como a  $G_s$ , abre os canais lentos de  $Ca^{2+}$ , originando a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. Deste modo, maior será a concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico e consequentemente a força da contracção cardíaca;
- uma proteína (2) do retículo sarcoplasmático que estimula a recaptação do  $Ca^{2+}$  para o retículo, aumentando os seus níveis neste organelo para uma futura libertação. Nestas condições ocorre também uma recaptação mais rápida do  $Ca^{2+}$  citosólico, o que permite uma maior velocidade de relaxamento do coração;
- a miosina (3), o que induz uma maior velocidade na regeneração das cabeças de miosina, aumentando a velocidade da contracção cardíaca.

#### **1.4 Disfunções cardíacas**

As alterações funcionais do coração podem manifestar-se por uma alteração da frequência cardíaca (da cronotropia), da força de contracção cardíaca (da inotropia), da condutividade (da dromotropia) ou, ainda, da excitabilidade (da batmotropia). Quando a frequência cardíaca está acima dos 100 batimentos/minuto ocorre uma situação conhecida como taquicardia. Pelo contrário, quando a frequência é inferior a 60 batimentos/minuto diz-se que o coração se encontra em bradicardia.

Alterações ao nível da frequência, velocidade de condução ou, ainda, dos locais de iniciação do potencial de acção desenvolvem mudanças do ritmo cardíaco que são denominadas de arritmias. Estas são classificadas com base na sua origem, pelo que existem as supraventriculares (auriculares) e as ventriculares. As supraventriculares podem, ainda, dividir-se em duas classes: (1) a taquicardia supraventricular resultante de anomalias no nodo AV ou dos "bypass" anatómicos e (2) fibrilação auricular que é subsequente a danos auriculares. Relativamente às arritmias ventriculares, estas são mais graves e estão muitas vezes associadas a enfartes ou isquemias.

Exemplos de arritmias:

- batimento ectópico. É o tipo de arritmia mais comum e manifesta-se por um "pulo" do coração em resposta a uma excitação. Normalmente não é grave, mas pode iniciar uma taquicardia supraventricular;
- comoção auricular. Caracteriza-se por frequências cardíacas rápidas e regulares (200 a 380 batimentos/minuto) das aurículas, que, no entanto, não têm correspondência nos ventrículos por estes terem um período refractário longo;
- fibrilação auricular. Ocorre em cerca de 20% dos pacientes com falha cardíaca (Stevenson, 1995). Caracteriza-se por despolarizações rápidas, irregulares e descoordenadas das aurículas. A condução pelo nodo AV é também irregular, do que resulta o enchimento insuficiente dos ventrículos e uma diminuição do volume sanguíneo bombeado;
- fibrilação ventricular. Caracteriza-se por batimentos ventriculares rápidos e irregulares, normalmente em resultado de outros fenómenos como o batimento ectópico, a isquemia aguda, o enfarte ou a "torsade de pointes" (Stevenson, 1995). Os impulsos ventriculares tornam-se ineficientes, conduzindo à morte, a menos que o ritmo cardíaco seja normalizado;
- bloqueio cardíaco. Resulta do bloqueio do sistema de condução cardíaco. As aurículas mantêm a frequência de batimentos regular, mas os ventrículos falham ocasionalmente a despolarização. O bloqueamento cardíaco é classificado em função do grau de depressão do sistema de condução. No bloqueamento cardíaco total as aurículas mantêm a frequência cardíaca normal, mas os ventrículos têm o seu próprio batimento que é bastante mais lento;
- "torsade de pointes". É uma arritmia ventricular polimórfica (Stevenson, 1995). Ocorre em situações congénitas de prolongado intervalo QT (corresponde ao intervalo entre a despolarização e a repolarização dos ventrículos) e sob influência de *stress* adrenérgico. O tratamento preventivo inclui a administração de  $\beta$ -bloqueadores e a implantação de pacemakers.

## **2 Catecolaminas e cardiotoxicidade**

### **2.1 Catecolaminas**

As catecolaminas são compostos simpaticomiméticos constituídos por um grupo catecol (diidroxibenzeno em posição *orto*) e um grupo amina. A adrenalina é a catecolamina mais famosa e é associada a um estado de excitação, alerta, nervosismo, medo ou mesmo pânico. A adrenalina é, no entanto, apenas uma das três catecolaminas endógenas. As outras duas são a noradrenalina e a dopamina. Estas moléculas têm uma acção fundamental, ao nível fisiológico, na condução e efectivação de estímulos nervosos. Pela sua importância, várias catecolaminas sintéticas foram produzidas para serem usadas como fármacos. São exemplo deste tipo de fármacos o isoproterenol (isoprenalina), a dobutamina e a terbutalina.

#### **2.1.1 História**

O conhecimento das catecolaminas endógenas remonta a 1895 quando Oliver e Schäfer demonstraram que os extractos adrenais tinham um efeito hipertensor (Oliver e Schäfer, 1895). A ligação entre os efeitos resultantes da injeção de extractos da glândula supra-renal com a estimulação dos nervos simpáticos foi estabelecida por Lewandowsky em 1898 (Lewandowsky, 1898) e por Langley em 1901 (Langley, 1901). Em 1899, a adrenalina foi identificada por Abel e sintetizada por Stolz e Dakin (ver em Hoffman, 2001). Elliot, estudante de Langley, veio depois a descrever a adrenalina como intermediário químico no processo da transmissão simpática (ver em Hoffman e Taylor, 2001). Em 1905, Langley concluiu que a actividade excitatória ou inibitória da adrenalina nos órgãos era dependente das “substâncias receptivas” aí presentes. Em 1910, Barger e Dale estudaram a actividade farmacológica de catecolaminas sintéticas relacionadas com a adrenalina e introduziram o termo simpaticomimético para essa acção (Barger e Dale, 1910). Ao mesmo tempo

desenvolviam-se estudos com o alcalóide muscarina, com a acetilcolina e com o nervo vago que levaram à introdução do termo parassimpaticomimético (ver em Hoffman e Taylor, 2001). Em 1921, Cannon e Uridil descreveram a libertação pelos nervos hepáticos de uma substância idêntica à adrenalina que induzia o aumento da pressão sanguínea e os batimentos cardíacos (Cannon e Uridil, 1921). Esta substância veio a ser designada de “sympathin” e considerada o mediador químico libertado pelos nervos simpáticos nas junções neuroefectoras. Esta substância “sympathin” começou a ser associada à noradrenalina, mas só em 1946 von Euler provou serem a mesma substância (ver em Hoffman e Taylor, 2001). Von Euler descreveu que a noradrenalina era a substância simpaticomimética predominante nos nervos simpáticos pós-ganglionares dos mamíferos e actuava como mediadora adrenérgica após estimulação destes nervos. Outra catecolamina endógena, a dopamina, inicialmente considerada apenas precursora da noradrenalina, veio a revelar-se fundamental como neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC). Hoje sabe-se que mais de metade do conteúdo cerebral de catecolaminas é dopamina (ver em Bloom, 1996).

## **2.1.2 Função fisiológica das catecolaminas**

### *2.1.2.1 Sistema nervoso autónomo simpático*

As catecolaminas adrenalina e noradrenalina desempenham um papel fundamental como neurotransmissores do sistema nervoso autónomo simpático. Para se compreender melhor a importância destas catecolaminas, este sistema será abordado, embora de um modo resumido.

#### **2.1.2.1.1 Fisiologia**

O sistema nervoso motor divide-se em somático e autónomo (Lullmann *et al.*, 2000; Hoffman e Taylor, 2001). O sistema somático é constituído por

nervos aferentes (por exemplo, com origem nos órgãos dos sentidos) e eferentes (por exemplo, os que enervam os músculos esqueléticos). É um sistema com controlo essencialmente voluntário e consciente. O sistema nervoso autónomo é também conhecido por sistema nervoso visceral, vegetativo ou involuntário. Em termos periféricos consiste em nervos, gânglios e plexos que permitem a inervação do coração, de vasos sanguíneos, do músculo liso e outros órgãos viscerais, onde regula funções autónomas sem controlo consciente.

O sistema nervoso autónomo periférico divide-se, no que concerne aos nervos eferentes, em simpático e parassimpático. Ambos os sistemas consistem em fibras pré-ganglionares que comunicam com as fibras pós-ganglionares nos gânglios. As fibras pré-ganglionares têm origem na espinhal-medula, variando a posição dependendo do sistema. As fibras pré-ganglionares parassimpáticas têm origem na zona do sacro e no tronco cerebral da espinhal-medula e terminam em gânglios próximos dos órgãos efectores. As fibras pré-ganglionares simpáticas são mais curtas e têm origem na zona torácica e lombar terminando em gânglios cervicais e abdominais numa cadeia paravertebral ganglionar. As fibras pré-ganglionares de ambos os sistemas são colinérgicas, ou seja, o seu neurotransmissor é a acetilcolina. As fibras pós-ganglionares conduzem os estímulos desde os gânglios até aos órgãos efectores e diferenciam-se no que respeita aos neurotransmissores. As fibras parassimpáticas pós-ganglionares continuam a utilizar a acetilcolina enquanto que as simpáticas são adrenérgicas, ou seja, usam a catecolamina noradrenalina (com excepção das fibras que enervam as glândulas sudoríparas que são colinérgicas). É de referir que os diversos órgãos efectores podem sofrer influências de ambos os sistemas.

A medula adrenérgica situada na região supra-renal é uma combinação de gânglio e glândula. É enervada por fibras pré-ganglionares simpáticas e liberta catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) para a circulação sanguínea.

Os dois sistemas também se diferenciam no tipo de receptores que estimulam. Embora as fibras pré-ganglionares estimulem receptores nicotínicos nos gânglios (inclusivamente na medula adrenérgica) em ambos os sistemas, as fibras pós-ganglionares estimulam receptores muscarínicos no caso das parassimpáticas e receptores adrenérgicos no caso das simpáticas.

### 2.1.2.1.2 Receptores adrenérgicos

Existem dois tipos de receptores adrenérgicos, os  $\alpha$  e os  $\beta$  (Hoffman, 2001). Os receptores  $\alpha$  dividem-se em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e os receptores  $\beta$  dividem-se em  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Os receptores  $\alpha$  podem, ainda, subdividir-se em  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  e  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ . No entanto, as propriedades funcionais dos subtipos de receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  não estão ainda devidamente aferidas.

Todos estes receptores regulam diferentes processos fisiológicos. Além disso, têm afinidades diferentes para as diversas catecolaminas. Deste modo, a sua maior ou menor abundância em determinado órgão define o tipo de efeito que se vai observar após um estímulo adrenérgico. No coração, os efeitos das catecolaminas são essencialmente mediados pelos receptores  $\beta$ , embora também aí se encontrem receptores  $\alpha_1$  (Goldstein, 1995). A densidade dos receptores  $\beta$  no coração varia na proporção inversa da densidade da inervação simpática, estando em maior quantidade no apex do ventrículo esquerdo e em menor quantidade nas aurículas. O coração humano parece apresentar igual densidade dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (Goldstein, 1995). A estimulação destes receptores aumenta o ritmo de contracção do nodo sinus, acelera a condução do nodo AV, diminui o período refractário do nodo AV, do sistema His-Purkinje e dos ventrículos. Ocorre, assim, um aumento da contractilidade, do ritmo e da estimulação eléctrica. Os efeitos inotrópicos parecem ser mediados pelos receptores  $\beta_1$  e  $\alpha_1$  (presentes essencialmente nos ventrículos) ao passo que os efeitos cronotrópicos parecem ocorrer via receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (presentes essencialmente nas aurículas) (Goldstein, 1995).

Ao nível intracelular, a activação destes receptores origina a estimulação de segundos mensageiros ou a modulação de canais iónicos. Este processo é mediado por uma proteína acoplada ao receptor que se designa proteína G. Na figura 1.10 do capítulo anterior observou-se mais em pormenor os efeitos da activação dos receptores  $\beta$  adrenérgicos ao nível do coração. Resumidamente, a estimulação destes receptores activa uma proteína G, que origina a formação de AMPc pela activação da adenilciclase. O AMPc activa a proteína cinase A,

que por fosforilação ao nível do sarcolema, do retículo sarcoplasmático e da miosina origina um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e uma maior velocidade na regeneração das cabeças de miosina. Consequentemente ocorre um aumento da velocidade e da força de contracção cardíaca.

#### 2.1.2.1.3 Ciclo das catecolaminas

A síntese, libertação, acção e remoção das catecolaminas podem ser observadas na figura 2.1 (Hoffman e Taylor, 2001). A tirosina é transportada activamente para o axoplasma (A) e é convertida em dopa pela tirosina-hidroxilase (B). Esta reacção é determinante na formação das catecolaminas, sendo activada por estimulação adrenérgica e inibida pelos catecóis. A dopa é posteriormente convertida em dopamina pela dopa-descarboxilase. A dopamina é transportada para vesículas onde é armazenada e onde sofre uma  $\beta$ -hidroxilação originando noradrenalina (C). Na medula supra-renal existem dois tipos de células, umas com noradrenalina e outras com adrenalina. Nestas últimas, a noradrenalina abandona as vesículas e é metilada no citoplasma pela N-metiltransferase. A adrenalina formada é recolhida novamente para vesículas para ser armazenada. Cerca de 80% das catecolaminas presentes na medula supra-renal está sob a forma de adrenalina, sendo a restante praticamente só noradrenalina.

A estimulação do potencial de acção no terminal nervoso leva à fusão das vesículas com a membrana plasmática e à exocitose das catecolaminas (D). Após a sua libertação, o neurotransmissor activa os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos presentes na membrana pós-sináptica (E). A noradrenalina pode ser captada pela célula efectora (*uptake-2*) onde é metabolizada rapidamente pela catecol-*o*-metiltransferase (COMT) a normetanefrina (NMN). No entanto, o principal mecanismo de remoção e inactivação da noradrenalina no espaço juncional é a sua recaptação pelo terminal nervoso (*uptake-1*) com rearmazenamento nas vesículas (F). A noradrenalina quando presente no espaço juncional pode, ainda, actuar nos receptores adrenérgicos pré-sinápticos  $\alpha_2$  e inibir a sua libertação (G). A noradrenalina recaptada, assim como a libertada dentro do neurónio (H), pode ser metabolizada ao nível da

superfície mitocondrial pela monoamina-oxidase (MAO) (I). Outros neurotransmissores, tais como ATP e peptídeos são, também, armazenados nas mesmas ou noutras vesículas, das quais são libertados por um processo semelhante ao descrito para as catecolaminas (J).

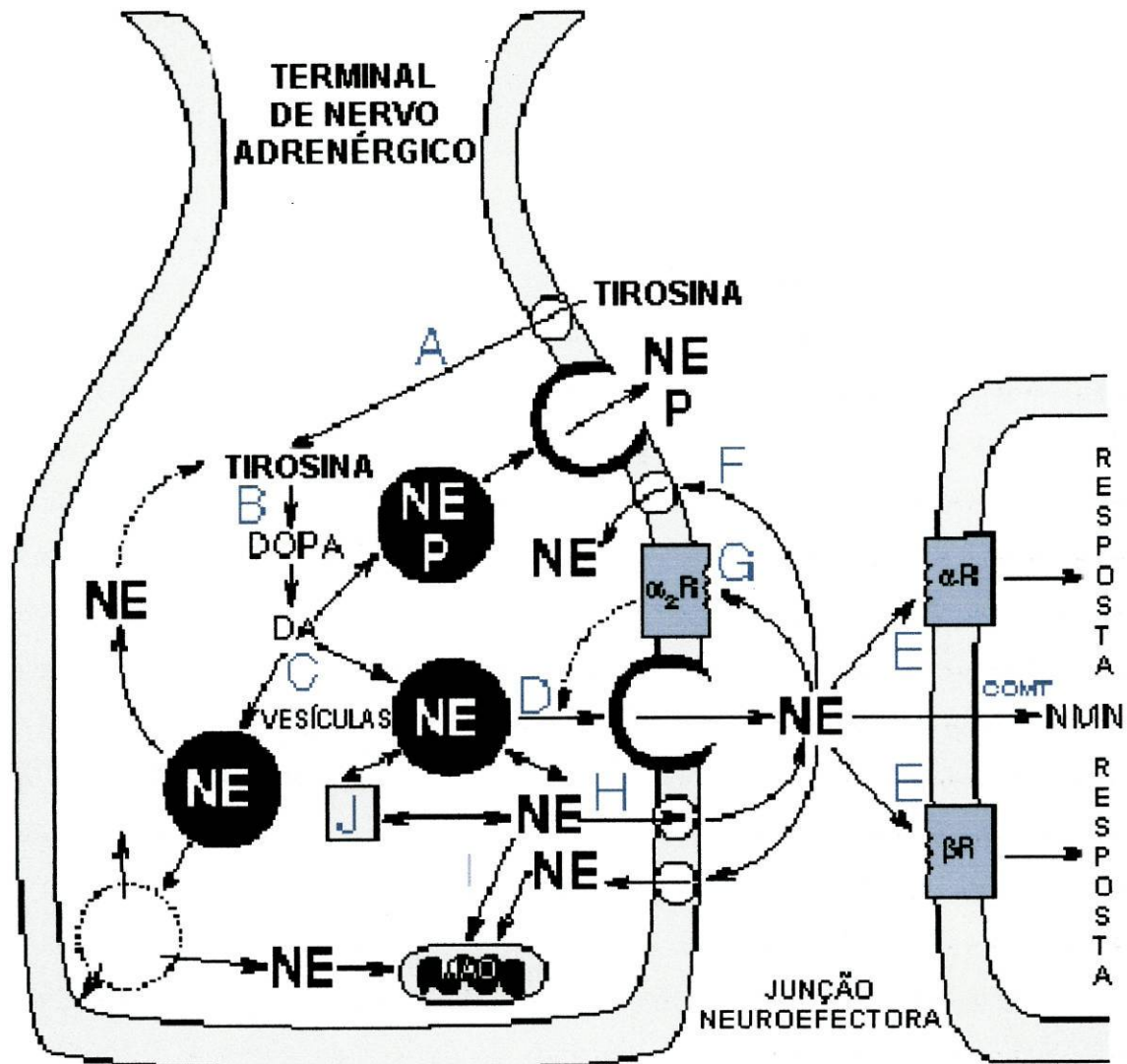


Figura 2.1 – Resumo do circuito das catecolaminas ao nível do terminas nervoso (adaptado de Hoffman e Taylor, 2001). DA: dopamina; NE: noradrenalina; NMN: normetanefrina; P: ATP e peptídeos; R: receptor. Ver explicação mais pormenorizada no texto.

O sistema de captação neuronal *uptake-1* é fundamental na inactivação das catecolaminas. Tem uma grande afinidade para a noradrenalina, uma menor afinidade para a adrenalina e é incapaz de captar o isoproterenol (catecolamina sintética). Pode ser inibido pela cocaína ou por antidepressivos tricíclicos (por exemplo, a imipramina). O sistema *uptake-2* está presente em

todas as células não neuronais, sendo sugerido que terá apenas um papel importante na remoção das catecolaminas em circulação. Este sistema tem como ordem crescente de afinidades, a noradrenalina, a adrenalina e o isoproterenol.

#### 2.1.2.1.4 Funções das catecolaminas

A activação do sistema nervoso simpático tem como função, de um modo simplista, a aquisição do máximo de capacidades para o organismo se debater com uma situação de risco, como uma luta física ou mesmo uma fuga (Fig. 2.2) (Lullmann *et al.*, 2000; Hoffman e Taylor, 2001). Ou seja, foi um sistema desenvolvido, ao longo da evolução, no sentido de preparar e defender os nossos antepassados nas inúmeras situações de perigo a que estavam diariamente sujeitos na sua luta pela sobrevivência. É, por isso, um sistema de emergência, que suprime os gastos energéticos e actividades desnecessárias, e mobiliza as energias e a capacidade de trabalho para combater o perigo que se manifesta ou se avizinha. Consequentemente, por acção simpática ocorre uma adaptação do organismo em função do aumento de actividade da musculatura esquelética, de modo a lhe proporcionar o fornecimento adequado de O<sub>2</sub>, nutrientes e fluxo sanguíneo. Assim, ao libertar as catecolaminas, o sistema nervoso simpático induz o aumento do ritmo e contractilidade cardíaca, o desvio da circulação sanguínea para as áreas musculares, a dilatação dos brônquios e a libertação para a corrente sanguínea de glucose e de ácidos gordos pelo fígado e tecido adiposo, respectivamente. O efeito adrenérgico induz, ainda, outros efeitos, tais como o aumento da actividade e vigilância cerebral, a dilatação das pupilas e a diminuição da actividade digestiva. Por acção simpática ocorrem também alterações ao nível da bexiga e das glândulas sudoríparas (esta, por acção colinérgica).

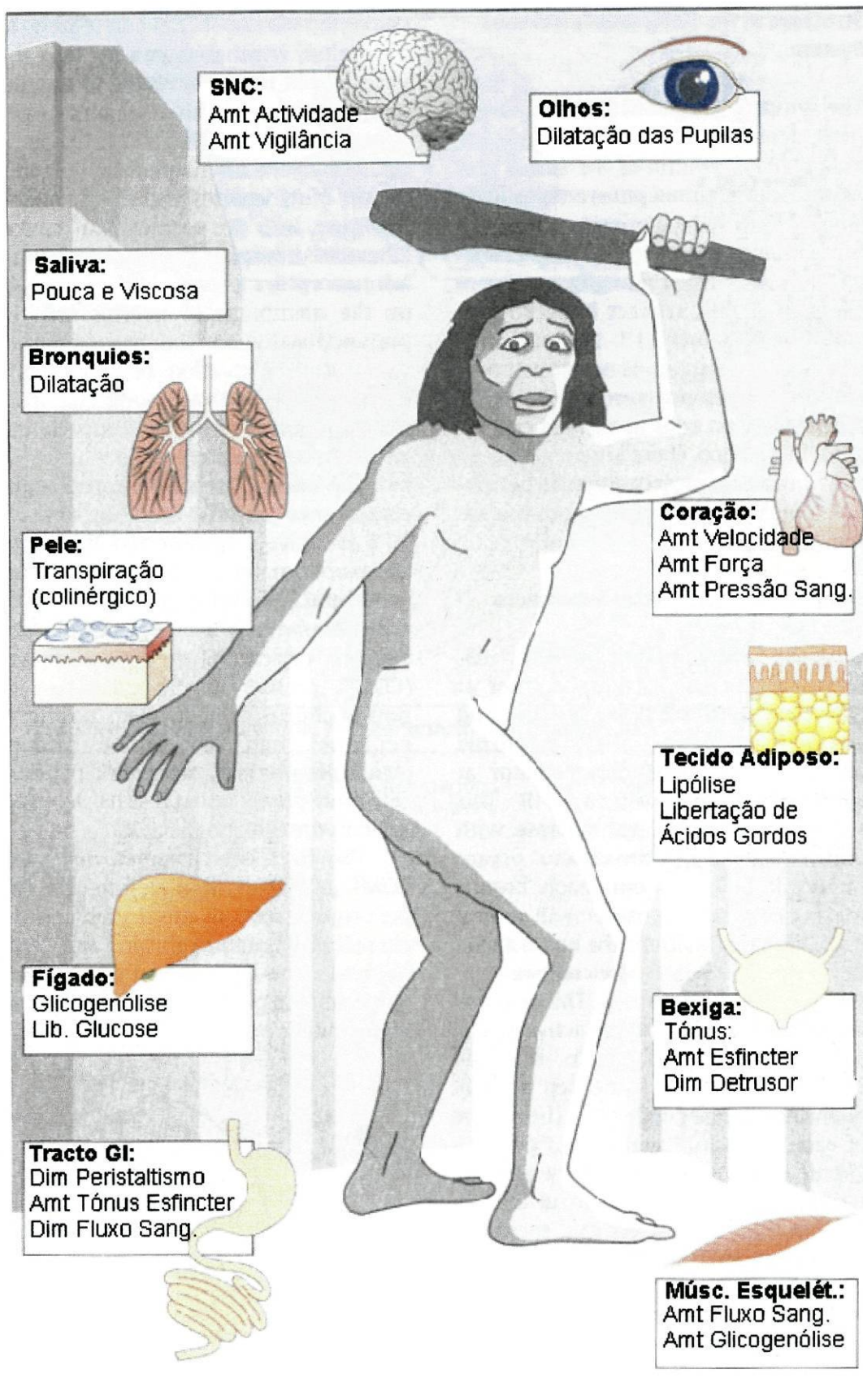


Figura 2.2 – Respostas resultantes da activação do sistema nervoso autónomo simpático (adaptado de Lullmann *et al.*, 2000). Amt – aumento; Dim – diminuição; Lib – libertação.

### 2.1.3 Metabolismo das catecolaminas

As catecolaminas são essencialmente metabolizadas por duas enzimas: MAO e COMT (Fig. 2.3) (Hoffman e Taylor, 2001).

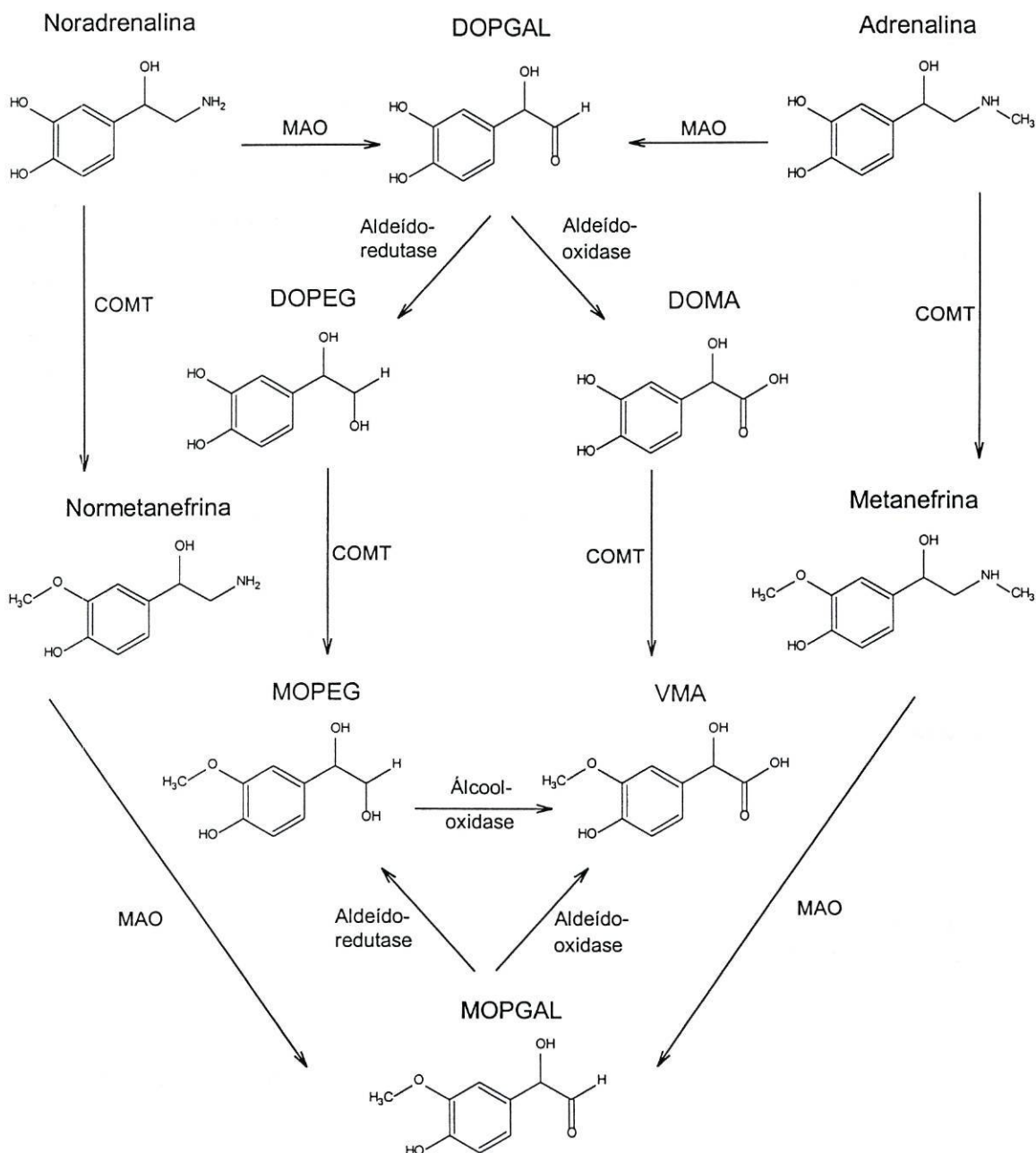


Figura 2.3 – Metabolismo das catecolaminas (adaptado de Hoffman e Taylor, 2001).

A MAO e a COMT distribuem-se ubiquamente no organismo, apesar da COMT praticamente não existir nos neurónios adrenérgicos. A acção destas enzimas sobre as catecolaminas parece ter pouca importância ao nível neuronal se o sistema *uptake-1* estiver activo. No entanto, as catecolaminas captadas (ou libertadas) para o interior dos neurónios podem ser metabolizadas pela MAO. Por outro lado, a COMT tem uma acção mais preponderante no fígado e no rim, metabolizando as catecolaminas, endógenas e administradas, presentes na circulação sanguínea.

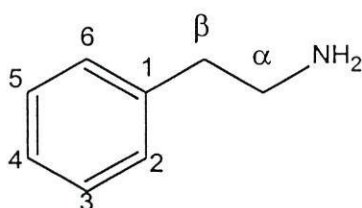
Estas duas enzimas têm localizações diferentes dentro da célula. A MAO está agregada à superfície exterior da membrana mitocondrial enquanto a COMT está localizada no citoplasma. Existem duas isoenzimas da MAO; MAO-A que tem preferência pela serotonina e é inibida pela clorgilina e a MAO-B que tem maior afinidade para a feniletilamina e é inibida pela selegenina. A inibição destas enzimas pode ter efeitos farmacológicos, pois induz o aumento da concentração de noradrenalina, de dopamina e de serotonina, em especial no cérebro. Por outro lado, a inibição da COMT não parece produzir efeitos farmacológicos marcados.

Por acção da MAO a noradrenalina e a adrenalina são desaminadas a 3,4-diidroxifenilglicolaldeído (DOPGAL) e depois reduzidas a 3,4-diidroxifeniletilenoglicol (DOPEG) (pela acção da aldeído-redutase) ou oxidadas a ácido 3,4-diidroximandélico (DOMA) (pela acção da aldeído-oxidase). Alternativamente, podem ser metiladas pela COMT a normetanefrina e metanefrina, respectivamente. A normetanefrina e a metanefrina podem posteriormente ser oxidadas pela MAO originando o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldeído (MOPGAL), o qual, por sua vez, pode ser reduzido pela aldeído-redutase a 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol (MOPEG) ou oxidado pela aldeído-oxidase a ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (ácido vanililmandélico, VMA). Estes dois últimos também podem formar-se pela acção da COMT sobre o DOPEG e DOMA, respectivamente. O MOPEG livre converte-se em grande extensão, pela acção de uma álcool-oxidase, em VMA, sendo este o principal metabolito das catecolaminas encontrado na urina. Para a dopamina, o metabolito correspondente ao VMA é o ácido homovanílico (HVA). As catecolaminas, assim como os seus correspondentes glicóis e o-

metilaminas, podem também sofrer conjugação, dando origem aos respectivos sulfatos e glucuronídeos para serem eliminados como tal.

#### 2.1.4 Aminas simpaticomiméticas

A designação de aminas simpaticomiméticas refere-se ao conjunto de aminas, naturais ou sintéticas, que possuem actividade simpática (Hoffman, 2001). Estes compostos têm, por isso, actividade farmacológica e a sua acção pode ser modulada por alterações na sua estrutura base, a  $\beta$ -feniletilamina. Assim, a substituição no anel aromático, nos carbonos do grupo etilo e na amina permite variar a intensidade e a especificidade dos efeitos adrenérgicos destes compostos. A relação estrutura-actividade destas moléculas será abordada com base na molécula do isoproterenol no ponto 6.1.5. Na figura 2.4 são descritas as estruturas de várias aminas simpaticomiméticas.



$\beta$ -FENILETILAMINA

	2	3	4	5	$\beta$	$\alpha$	N
<b>Adrenalina</b>	H	OH	OH	H	OH	H	CH <sub>3</sub>
<b>Noradrenalina</b>	H	OH	OH	H	OH	H	H
<b>Dopamina</b>	H	OH	OH	H	H	H	H
<b>Isoproterenol</b>	H	OH	OH	H	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Metaproterenol</b>	H	OH	H	OH	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Terbutalina</b>	H	OH	H	OH	OH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<b>Fenilefrina</b>	H	OH	H	H	OH	H	CH <sub>3</sub>
<b>Metoxamina</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
<b>Albuterol</b>	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	OH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<b>Anfetamina</b>	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H
<b>Efedrina</b>	H	H	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Figura 2.4 – Estruturas químicas de aminas simpaticomiméticas (adaptado de Hoffman, 2001).

## **2.2 Cardiomiopatia induzida por catecolaminas**

A acção cardiotóxica das catecolaminas é conhecida desde longa data. As primeiras referências surgem em 1905 e 1906 para a adrenalina (Ziegler, 1905; Pearce, 1906), em 1958 para a noradrenalina (Szakacs e Cannon, 1958) e em 1959 para o isoproterenol (Rona *et al.*, 1959). Os efeitos desde então observados, de hipertrofia cardíaca e de lesão do miocárdio, são hoje no seu conjunto denominados de “cardiomiopatia induzida por catecolaminas” (Dhalla *et al.*, 2001).

As catecolaminas induzem, por via directa e indirecta, vários efeitos hemodinâmicos e metabólicos ao nível cardiovascular. A complexidade desses efeitos torna difícil estabelecer o processo pelo qual as catecolaminas exercem cardiotoxicidade. Como consequência, diferentes mecanismos foram propostos ao longo dos últimos anos para explicar a cardiomiopatia induzida por catecolaminas, embora nenhum tenha sido, por enquanto, definitivamente estabelecido. Nos pontos seguintes aborda-se os efeitos cardiotóxicos das catecolaminas, em especial do isoproterenol, e os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos, com especial ênfase para o resultante da oxidação das catecolaminas. Para tal, recorre-se essencialmente a uma revisão recente de Naranjan S. Dhalla e colaboradores (Dhalla *et al.*, 2001). Naranjan S. Dhalla é um reconhecido investigador nesta área e seguramente o maior especialista mundial da cardiotoxicidade induzida pela oxidação das catecolaminas. Muitos dos estudos que são referidos na sua revisão são, no entanto, anteriores aos anos 80, período de maior pesquisa da cardiotoxicidade das catecolaminas. Dada a data de publicação dos trabalhos, procede-se apenas a uma abordagem geral sem referenciar os artigos em questão, que poderão ser encontrados na referida revisão. No entanto, são citadas as referências dos estudos não mencionados na revisão, dos estudos considerados importantes do ponto de vista histórico e dos estudos essenciais para a interpretação dos resultados a apresentar nesta dissertação.

### 2.2.1 Características da cardiomiopatia induzida por catecolaminas

As catecolaminas induzem hipertrofia e necrose do miocárdio. A hipertrofia cardíaca corresponde a um aumento da massa celular, sem aumento do número de células, e é caracterizada pelo aumento do septo intraventricular, pela obstrução variável do fluxo ventricular, pela hipercontractilidade miocárdica e pelo menor enchimento diastólico do ventrículo esquerdo (Goldstein, 1995). A administração repetida das catecolaminas noradrenalina (King *et al.*, 1987) e isoproterenol (Benjamin *et al.*, 1989; Grimm *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1999; Leenen *et al.*, 2001; Ocaranza *et al.*, 2002) induzem a hipertrofia cardíaca sem alterar a pressão arterial ou mesmo em doses subpressoras. Adicionalmente, animais com maior expressão simpática desenvolvem rapidamente hipertrofia cardíaca (Sole e Liew, 1988). Este fenómeno parece ocorrer por estimulação  $\beta_1$ -adrenérgica (Morisco *et al.*, 2001), sendo mediado pelo factor de crescimento TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) (Schluter *et al.*, 1995; Taimor *et al.*, 2001). O sistema renina-angiotensina parece também estar envolvido neste fenómeno (Grimm *et al.*, 1998; Gallego *et al.*, 2001; Ocaranza *et al.*, 2002). Curiosamente, o *stress* oxidativo também pode induzir uma acção hipertrófica (Amin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

Relativamente à necrose cardíaca, esta pode ser classificada em dois tipos, I) a necrose por coagulação e II) a necrose com bandas de contracção ("contraction band necrosis") (Goldstein, 1995). A primeira ocorre essencialmente nas áreas de enfarte do miocárdio e é caracterizada por miócitos mortos em estado de relaxamento, com infiltração polimorfonuclear e calcificação tardia, não sendo detectável ao final de horas ou mesmo dias. A segunda ocorre ao final de minutos, ou mesmo segundos, com aparecimento de células mortas num estado de hipercontractão, de infiltrações mononucleares e de calcificação. Microscopicamente, este tipo de necrose apresenta bandas eosinófilas (bandas de contracção) entre áreas de granulosidade (degeneração das miofibrilhas), podendo ocorrer, ao nível celular, depósitos mitocondriais de  $Ca^{2+}$ , perda de glicogénio e marginalização da cromatina nuclear. A necrose com bandas de contracção parece ocorrer

quando largas quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  entram para as células vivas, através das membranas danificadas. Após enfarte, estas lesões ocorrem nas regiões externas do miocárdio e no subendocárdio.

Curiosamente, a injeção de catecolaminas, a estimulação do sistema nervoso central, a combinação de esteróides e *stress*, a reperfusão do miocárdio e o feocromocitoma induzem necrose com bandas de contracção (Goldstein, 1995; Dhalla *et al.*, 2001). Este tipo de necrose é também observada na maioria dos casos de morte cardíaca súbita (Goldstein, 1995). Em conclusão, as catecolaminas parecem ter um papel preponderante neste tipo de necrose.

Em conformidade com o descrito anteriormente, o tipo de lesões cardíacas provocadas pela adrenalina, noradrenalina e isoproterenol é similar (Dhalla *et al.*, 2001). No entanto, as lesões induzidas pelo isoproterenol são mais acentuadas do que as provocadas pela adrenalina ou pela noradrenalina. A dose letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) do isoproterenol em ratos é cerca de 680 mg/Kg, mas doses de 0,02 mg/Kg são suficientes para induzir focos de necrose microscópicos no coração destes animais. E, apesar da  $\text{DL}_{50}$  da adrenalina e noradrenalina nos ratos ser cerca de 100 vezes menor que a do isoproterenol, este é entre 29 a 72 vezes mais potente do que aquelas a provocar idênticas lesões do miocárdio. A necrose induzida pelo isoproterenol nos ratos é normalmente localizada no vértice e no subendocárdio do ventrículo esquerdo e menos frequente no músculo papilar e no ventrículo direito. No entanto, em cães, a administração de isoproterenol pode originar necroses focais disseminadas que são frequentemente mortais. A necrose é normalmente seguida por um fenómeno de fibrose, cuja intensidade é gradual e paralela à necrose (Benjamin *et al.*, 1989; Grimm *et al.*, 1998). Está também descrito um fenómeno apoptótico pela acção do isoproterenol ou da noradrenalina em estudos com cardiomiócitos adultos (Communal *et al.*, 1998; Olivetti *et al.*, 2000). Este efeito parece ocorrer por activação  $\beta_1$ -adrenérgica, sendo inibido por estimulação  $\beta_2$ -adrenérgica (Communal *et al.*, 1999) Curiosamente, a dopamina também parece exercer o mesmo efeito ao nível neuronal, mas por um mecanismo que envolve a sua oxidação (Luo *et al.*, 1998).

### 2.2.1.1 Alterações ultraestruturais e histológicas

A administração a ratos, por via injectável, de doses tóxicas (superiores a 40 mg.Kg<sup>-1</sup>) de isoproterenol induz rápidas alterações ao nível da célula e tecidos cardíacos (tabela 2.1). Estas alterações levam numa fase final à degeneração e necrose das fibras cardíacas, a edemas intersticiais, à acumulação de leucócitos e de depósitos de lípidos no miocárdio e a hemorragias endocardiais.

Tabela 2.1 – Relação tempo/efeito das alterações estruturais e histológicas que ocorrem após a injeção [(intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.)] de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.

Tempo	Efeitos
4-6 min	Desorientação dos miofilamentos pelo aumento da largura e densidade da banda-Z. Desregularização do comprimento e alinhamento dos sarcómeros. Ruptura dos miofilamentos. Dilatação do retículo sarcoplasmático.
10 min	Turgescência da mitocôndria. Desorganização e fragmentação das miofibrilhas.
30-60 min	Aparecimento de depósitos granulares na mitocôndria. Acumulação intracelular de lípidos. Desaparecimento dos grânulos de glicogénio. Marginalização da cromatina nuclear. Turgescência e ruptura dos túbulos longitudinais e transversais.
1-24 horas	Edemas intersticiais e intercelulares resultantes de hemorragias subendocardiais e subepicardiais. Turgescência das fibras musculares. Inflamação extensa. Hernização dos discos celulares. Vacuolização extensa. Agregação de células linfomononucleares.

Em termos comparativos a adrenalina, noradrenalina e o isoproterenol induzem alterações semelhantes ao nível celular. As excepções serão a diminuição de glicogénio e o aumento de depósitos lipídicos que ocorrem, de um modo mais extenso, por acção da adrenalina, e o edema intersticial e a inflamação que ocorrem, de um modo mais proeminente, após injeção de adrenalina ou noradrenalina.

#### 2.2.1.2 Alterações bioquímicas

A adrenalina, noradrenalina e o isoproterenol induzem alterações bioquímicas em ratos, as quais estão descritas na tabela 2.2. Além das alterações referidas nesta tabela, verifica-se também uma redução dos níveis energéticos, quer de ATP quer de fosfatos de creatina, no miocárdio, a qual parece resultar de uma diminuição da produção energética (Dhalla *et al.*, 1996; Sánches *et al.*, 1997). É também sugerido o aumento do consumo energético pelo miocárdio de animais tratados com doses tóxicas de catecolaminas, no entanto, os resultados são contraditórios e necessitam de maior esclarecimento.

**Tabela 2.2 – Alterações bioquímicas após a injeção (i.p. ou s.c.) de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.**

Parâmetro	Efeitos
Actividade das enzimas oxidativas cardíacas	<p>Efeito bifásico na actividade das enzimas oxidativas, aumento da actividade 5 minutos após a administração da catecolamina e diminuição gradual entre as 6 e 12 horas: succinato-, lactato- (LDH), isocitrato-, mátrato-, <math>\beta</math>-hidroxibutirato-, <math>\alpha</math>-glicerofosfato-, glutamato- e álcool- desidrogenases. A actividade da citocromo-oxidase diminui após evidências de necrose.</p>
Conteúdo sanguíneo (soro)	<p>Aumento dos níveis das aspartato- (AST), da glutamato-oxaloacetato- (GOT) e da glutamato-piruvato- (GPT) transaminases, assim como da LDH e da creatina-fosfocinase (CPK) durante o processo necrótico.</p> <p>Aumento da glucose, triglicéridos e dos ácidos gordos não esterificados com manutenção do colesterol.</p> <p>Diminuição do conteúdo total de proteínas e de esteróides.</p>
Conteúdo no miocárdio	<p>Diminuição rápida do glicogénio após injeção do isoproterenol e aumento nas 5 horas posteriores para níveis acima do controlo.</p> <p>Manutenção dos níveis de ácidos gordos livres e de fosfolípidos, e aumento, por captação, dos níveis de triglicéridos no ventrículo esquerdo (adrenalina).</p> <p>Diminuição das actividades da AST, GOT e LDH.</p>

### 2.2.1.3 Alterações dos electrólitos

As alterações dos electrólitos no miocárdio e no soro após administração de isoproterenol estão resumidas na tabela 2.3. A determinação do conteúdo de electrólitos no miocárdio é, no entanto, comprometida por dois factores: I) o aumento do volume de fluido intersticial que acompanha a necrose e II) a mistura de tecido não danificado com tecido danificado que caracteriza a necrose multifocal disseminada. Tal facto origina, por vezes, a observação de resultados contraditórios. Ao nível do soro, as alterações parecem reflectir as observadas no miocárdio e desaparecem ao fim de 24 horas, com excepção de uma ligeira diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Tabela 2.3 – Relação tempo/efeito das alterações electrolíticas após a injeção (i.p. ou s.c.) de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.**

Tempo (horas)	Alterações dos electrólitos	
	Miocárdio	Soro
3 – 24	Diminuição do $\text{Mg}^{2+}$ Diminuição dos fosfatos e $\text{K}^+$	Aumento do $\text{Mg}^{2+}$ Diminuição do $\text{Na}^+$ e $\text{Ca}^{2+}$
6 – 7	Aumento do $\text{Ca}^{2+}$ e da sua captação	Diminuição do $\text{Na}^+$ e $\text{Ca}^{2+}$ Aumento do $\text{K}^+$
24	Manutenção ou ligeiro aumento de $\text{Na}^+$	Normalização dos electrólitos Diminuição do $\text{Ca}^{2+}$

### 2.2.1.4 Alterações membranares

As alterações membranares por acção das catecolaminas podem ser observadas ao nível da constituição membranar, da actividade dos transportadores, da densidade dos receptores e da actividade das enzimas a estes associadas. Os estudos que são descritos referem-se às observações realizadas após administração de isoproterenol ( $40 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) a ratos. Nesta dosagem, o isoproterenol induz necrose 9 e 24 horas após a sua administração, assim como hipertrofia cardíaca e depressão da força contráctil.

As alterações ao nível da constituição membranar estão resumidas na tabela 2.4. De um modo geral observa-se um rápido aumento de fosfolípidos nas membranas assim como a sua metilação. A metilação ocorre ao nível da fosfatidiletanolamina (dando origem à fosfatidilcolina) e está associada a um aumento da actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dhalla *et al.*, 1996).

**Tabela 2.4 – Relação tempo/efeito das alterações ao nível dos fosfolípidos membranares após a injeção (i.p. ou s.c.) de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.**

Fosfolípidos		Tempo (horas)		
		3	9	24
Sarcolema	Conteúdo	Aumento	Aumento	Sem alteração
	Metilação	Aumento	Sem alteração	Diminuição
Retículo sarcoplasmático	Conteúdo	Aumento	Aumento	Aumento
	Metilação	Aumento	Sem alteração	Diminuição
Mitocôndria	Conteúdo	Aumento	Aumento	Sem alteração
	Metilação	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

As alterações induzidas pelo isoproterenol nos mecanismos de controlo de  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do sarcolema estão resumidas na tabela 2.5.

**Tabela 2.5 – Relação tempo/efeito das alterações nos mecanismos de controlo de  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do sarcolema após a injeção (i.p. ou s.c.) de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.**

Sarcoplasma	Tempo (horas)		
	3	9	24
Bomba de $\text{Ca}^{2+}$	Aumento	Sem alteração	Diminuição
Sistema antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	Diminuição	Diminuição	Diminuição
Reservatórios superficiais de $\text{Ca}^{2+}$	Sem alteração	Aumento	Aumento
Canais de $\text{Ca}^{2+}$	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+$	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

No sarcolema, a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  tem a sua actividade aumentada após 3 horas da administração do isoproterenol, o que parece reflectir a necessidade das células em retirar o  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma. No entanto, o aumento dos reservatórios de  $\text{Ca}^{2+}$  na superfície da membrana ao final de 9 e 24 horas, indicados pelo aumento de conteúdo de ácido siálico (que se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$ ) e pelo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado à membrana, e a posterior diminuição da actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como do sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , contribuem para a ocorrência da sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O isoproterenol não parece alterar a quantidade de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e a actividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (ver em Dhalla *et al.*, 2001). Alguns estudos *in vitro*, no entanto, parecem indicar a estimulação desta bomba pelo isoproterenol (Désilets e Baumgarten, 1986).

As alterações induzidas pelo isoproterenol nos mecanismos de controlo de  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do retículo sarcoplasmático e da mitocôndria, na actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e na interacção do  $\text{Ca}^{2+}$  e do  $\text{Mg}^{2+}$  com as miofibrilhas estão resumidas na tabela 2.6.

**Tabela 2.6 – Relação tempo/efeito das alterações nos mecanismos de controlo de  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do mitocondrial e do retículo sarcoplasmático após a injeção (i.p. ou s.c.) de doses tóxicas de isoproterenol em ratos.**

	Tempo (horas)		
	3	9	24
Bomba de $\text{Ca}^{2+}$ do retículo sarcoplasmático	Aumento	Sem alteração	Diminuição
Captção mitocondrial de $\text{Ca}^{2+}$	Sem alteração	Aumento	Aumento
Bomba de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Bomba de $\text{Ca}^{2+}$ da miofibrilha	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Bomba de $\text{Mg}^{2+}$ da miofibrilha	Sem alteração	Diminuição	Diminuição

As alterações observadas parecem também reflectir a tentativa de contrariar o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela activação da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e o incremento da captação deste ião para a

mitocôndria. A actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e a contractilidade das miofibrilhas estimuladas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  não parecem sofrer alterações.

Em conclusão, parece observar-se uma tentativa das células em contrariar o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelo aumento inicial da actividade das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmáticas e reticulares, assim como da captação deste íon pela mitocôndria. No entanto, a diminuição da actividade do sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema e a posterior diminuição da actividade das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema e do retículo sarcoplasmático acabam por se reflectir no desenvolvimento da sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

#### 2.2.1.5 Espasmos coronários

A ocorrência de elevados níveis circulatórios de catecolaminas origina espasmos e arritmias cardíacas que induzem isquemia cardíaca e dano celular. Este fenómeno depende da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e é prevenido pela administração de bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos e antagonistas do  $\text{Ca}^{2+}$ . A administração de  $\beta$ -bloqueadores (propranolol) durante a perfusão do coração com noradrenalina induz o aumento da resistência coronária e subsequente espasmo. Tais factos parecem comprometer os receptores  $\alpha$  neste fenómeno. Compostos que interferem com o metabolismo das prostaglandinas (indometacina ou ácido acetilsalicílico) não produzem qualquer efeito. No entanto, o pré-tratamento com antioxidantes diminui marcadamente a incidência de arritmias induzidas pela adrenalina em ratos (Singal *et al.*, 1981a). Este resultado é indicativo do envolvimento de radicais livres no desenvolvimento deste fenómeno.

## 2.2.2 Mecanismos de toxicidade propostos para as catecolaminas

### 2.2.2.1 Hipóxia parcial e alterações hemodinâmicas

A hipóxia parcial associada a alterações hemodinâmicas é uma hipótese veiculada essencialmente para a cardiotoxicidade do isoproterenol. As catecolaminas, pela activação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, aumentam o ritmo cardíaco. Tal facto origina um aumento drástico da necessidade miocárdica de  $O_2$ , o que pode induzir uma situação de hipóxia. Esta situação fica agravada no caso do isoproterenol. Enquanto que as catecolaminas, de uma forma geral, elevam a pressão sistólica, o isoproterenol diminui a pressão diastólica originando uma situação de hipotensão. Este fenómeno aliado à constatação de que o isoproterenol exerce maior cardiotoxicidade comparativamente às outras catecolaminas, levou a crer que a diminuição do fluxo coronário provocada pela hipotensão era essencial para o mecanismo de toxicidade do isoproterenol. No entanto, estudos posteriores parecem desvalorizar a acção da hipotensão neste fenómeno. Um deles reporta o facto de doses tóxicas e doses farmacológicas do isoproterenol induzirem reduções idênticas da tensão aórtica (Rosenblum *et al.*, 1965). Outro estudo descreve, ainda, que o verapamil (antagonista dos canais de  $Ca^{2+}$ ) quando associado a doses tóxicas de isoproterenol induz uma maior hipotensão apesar de prevenir a necrose do miocárdio (Strubelt e Siegers, 1975).

### 2.2.2.2 Espasmos coronários e efeitos hemodinâmicos

Uma das hipóteses descritas para o mecanismo de toxicidade das catecolaminas sugere uma isquemia parcial, resultante dos espasmos coronários provocados pelas catecolaminas. É referido que os espasmos coronários induzem uma oclusão dos vasos e uma diminuição da drenagem venosa. Alguns estudos relativos à eficácia da perfusão coronária são contraditórios em termos de resultados. No entanto, foi descrito que o isoproterenol provoca necrose em endocárdios avasculares (coração da

tartaruga), o que parece desvalorizar os factores vasculares como primeira causa da necrose cardíaca induzida pelo isoproterenol (Ostadal *et al.*, 1968).

### 2.2.2.3 Efeitos metabólicos

Um outro mecanismo proposto para explicar a cardiotoxicidade das catecolaminas envolve alterações ao nível do consumo de O<sub>2</sub>, produção energética e metabolismo lipídico.

Um aspecto salientado na cardiotoxicidade das catecolaminas é o denominado “desperdício de oxigénio” (“oxygen-wasting”). A administração de catecolaminas aumenta o consumo de O<sub>2</sub>, o qual só em parte se fica a dever a um aumento da sua utilização em resultado das alterações hemodinâmicas e da função cardíaca. O restante O<sub>2</sub> consumido justifica a designação de “desperdício de oxigénio”, sendo sugerido que resulta, em parte, do fenómeno de oxidação das catecolaminas, como por exemplo da adrenalina em adrenocromo (ver em Dhalla *et al.*, 2001). Outra hipótese recentemente descrita parece implicar a activação dos receptores  $\beta_2$  nesta menor rentabilização do O<sub>2</sub> (Nikolaidis *et al.*, 2002). A activação destes receptores pelo isoproterenol mantém a preferência pela oxidação dos ácidos gordos livres em detrimento da glicólise. Tal facto leva a uma manutenção da taxa de consumo de O<sub>2</sub>, apesar do menor rendimento cardíaco (Nikolaidis *et al.*, 2002).

Um outro aspecto que parece estar envolvido na cardiotoxicidade das catecolaminas é o desacoplamento mitocondrial. Foi já observada uma boa correlação entre o aumento de conteúdo de catecolaminas no miocárdio e a diminuição da razão P/O mitocondrial [indica a quantidade de O<sub>2</sub> consumida na produção de ATP pela mitocôndria e é calculada pela razão entre o difosfato de adenosina (ADP) adicionado à mitocôndria e o O<sub>2</sub> consumido] (Sobel *et al.*, 1966). Esta alteração da razão P/O foi atribuída à formação de aminocromos e outros metabolitos oxidativos. Por outro lado, estudos realizados em mitocôndrias cardíacas de ratos tratados com isoproterenol permitiram verificar a diminuição do índice de controlo respiratório [ICR, indica o grau de acoplamento mitocondrial e é calculado pela razão da velocidade de consumo de O<sub>2</sub> pela mitocôndria na presença (estado 3) e ausência (estado 4) de ADP]

sem qualquer alteração da razão P/O (Stanton e Schwartz, 1967). Num estudo mais recente, observou-se, pela administração de  $67 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de isoproterenol a ratos, a diminuição do ICR e a depressão da razão P/O após 6 e 24 horas, respectivamente (Sánchez *et al.*, 1997). Em conformidade, foi descrita a depressão do ritmo de fosforilação mitocondrial, da razão P/O e dos valores de ICR após a perfusão do coração de rato com isoproterenol oxidado (Dhalla *et al.*, 1978). Em conclusão, o desacoplamento mitocondrial, que parece ocorrer por acção das catecolaminas, pode explicar o referido “desperdício de oxigénio” que se observa na acção destes compostos.

O isoproterenol induz também um fenómeno de lipólise, que parece estar relacionado com o efeito necrótico desta catecolamina (Grynberg *et al.*, 1996; Mohan e Bloom, 1999). O desacoplamento mitocondrial pode ser, em parte, atribuído a alterações lipídicas originadas pela acção das catecolaminas, embora o descrito aumento de ácidos gordos livres não pareça ser a primeira causa deste efeito (ver em Dhalla *et al.*, 2001). Por outro lado, as alterações no metabolismo lipídico podem influenciar, de um modo decisivo, a composição das membranas celulares, ao aumentar o seu conteúdo em ácido araquidónico e, assim, afectar a actividade das proteínas membranares (Grynberg *et al.*, 1996). Adicionalmente, a peroxidação dos lípidos libertados pode igualmente contribuir para a necrose associada a estes compostos (Mohan e Bloom, 1999).

Outro efeito proposto resulta do aumento da secreção de lactato pelos cardiomiócitos sujeitos à acção do isoproterenol (Marjomaki *et al.*, 1994). A resultante diminuição do pH pode induzir a fragmentação dos lisossomas, levando à libertação das suas enzimas e aos consequentes efeitos tóxicos (Marjomaki *et al.*, 1994). Mais recentemente foi proposto que o aumento de poliaminas ao nível intracelular, induzido pelo isoproterenol, contribui para os efeitos tóxicos observados (Tipnis *et al.*, 2000). É sugerido que este fenómeno resulta da oxidação destas aminas (Tipnis *et al.*, 2000).

#### 2.2.2.4 Alterações electrolíticas e sobrecarga de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Um dos aspectos importantes na cardiotoxicidade das catecolaminas é a alteração do conteúdo celular de electrólitos e a transferência de catiões nas membranas celulares. É sugerido que em situações de deficiência de  $\text{O}_2$  ou de energia ocorre a perda de  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  pelo miocárdio, a qual contribui para o desenvolvimento de várias cardiomiopatias. A depleção de  $\text{Mg}^{2+}$  leva à inibição da acção de diversas enzimas importantes nas reacções de transferência de fosfatos, inclusivamente na utilização de ATP. O aumento de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria, induzido pela depleção de  $\text{Mg}^{2+}$ , poderá também levar ao desacoplamento mitocondrial.

Um outro catião que está definitivamente envolvido na cardiotoxicidade das catecolaminas é o  $\text{Ca}^{2+}$ . Em 1971 foi proposto por Fleckenstein que a cardiotoxicidade do isoproterenol se devia a um fenómeno de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver em Opie *et al.*, 1985 e Rona, 1985). Por acção do isoproterenol, ao nível dos receptores  $\beta$ , ocorre a formação de AMPc que induz o aumento drástico da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (Fig. 1.10). O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular parece ocorrer em duas fases (Bloom e Davis, 1972). Numa primeira fase, um aumento rápido, logo após a administração do isoproterenol, e numa segunda fase um aumento gradual atingindo um pico máximo após 4 horas. A sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  é altamente tóxica para a célula, na medida em que induz I) a diminuição dos níveis energéticos por inactivação mitocondrial e por activação excessiva das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , II) a alteração do citoesqueleto por dissociação dos filamentos de actina ou quebras proteolíticas (levando à formação de vesículas na membrana), III) a activação exacerbada das fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases e IV) a produção de ROS (Orrenius *et al.*, 1989). A importância do  $\text{Ca}^{2+}$  na cardiotoxicidade das catecolaminas é confirmada pelo facto de esta ser prevenida por tratamentos que diminuam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para as células, como, por exemplo, pela administração do verapamil (bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Adicionalmente, a taurina reduz a cardiotoxicidade e o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos pelo isoproterenol (Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988). O mecanismo de protecção parece envolver a existência de um sistema

cotransportador taurina/Na<sup>+</sup> que protege a célula de um aumento exagerado deste catião ao nível intracelular (Suleiman e Chapman, 1993; Suleiman, 1994). Pelo sistema antiporte Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> a concentração de Ca<sup>2+</sup> é, assim, mais controlada ao nível celular. No entanto, outros mecanismos parecem estar envolvidos na cardiotoxicidade das catecolaminas, para além da sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> induzida pela activação dos receptores  $\beta$ . O tratamento com propranolol (antagonista dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) não previne completamente a cardiotoxicidade do isoproterenol, apesar de suprimir o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Bloom e Davis, 1972; Benjamin *et al.*, 1989; Mohan e Bloom, 1999). Adicionalmente, foi descrito que o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular pela acção do isoproterenol não é directamente proporcional ao efeito necrótico observado (Bloom e Davis, 1972).

#### 2.2.2.5 *Stress oxidativo*

Um dos mecanismos descritos para a cardiotoxicidade das catecolaminas envolve o *stress* oxidativo em resultado da sua oxidação. Este fenómeno pode ocorrer de dois modos, via MAO e/ou via formação de quinonas e aminocromos.

##### 2.2.2.5.1 Metabolização pela MAO

Uma das vias metabólicas das catecolaminas decorre da acção da MAO, que catalisa a desaminação oxidativa destes compostos. Existem indícios de que a cardiotoxicidade das catecolaminas pode resultar, em parte, da actividade desta enzima. O facto de: I) ocorrer a formação de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na metabolização das catecolaminas pela MAO (Carvalho *et al.*, 1999), II) a cardiotoxicidade das catecolaminas ser reduzida pelo pré-tratamento com inibidores da MAO (Muller, 1966) e III) da toxicidade do isoproterenol ser superior em ratos mais velhos, onde a actividade da MAO é também superior (Muller, 1966), sugere que a acumulação de produtos

metabólicos, tais como  $H_2O_2$ , resultantes da acção desta enzima contribui para essa toxicidade.

#### 2.2.2.5.2 Formação de quinonas e aminocromos

Uma outra via de indução de *stress* oxidativo decorre da oxidação das catecolaminas a quinonas e aminocromos (por exemplo, adrenocromo se resulta da oxidação da adrenalina ou isoprenocromo se resulta da oxidação do isoproterenol) com a formação de ROS (Bindoli *et al.*, 1989; Bindoli *et al.*, 1992; Behonick *et al.*, 2001; Dhalla *et al.*, 2001). O estudo deste mecanismo é a base da presente dissertação. Assim, nos pontos seguintes este fenómeno será abordado de um modo particular.

##### 2.2.2.5.2.1 Oxidação das catecolaminas a aminocromos

O processo de oxidação das catecolaminas a aminocromos leva à formação de vários compostos intermédios (Fig. 2.5) (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1989). Num primeiro passo as catecolaminas são oxidadas a *o*-semiquinonas, as quais, por exemplo, por dismutação, rapidamente dão origem a *o*-quinonas. As catecolamina-*o*-quinonas são instáveis e após desprotonação do grupo amina pode ocorrer um ataque nucleofílico do átomo de azoto à posição 6 do anel quinónico, de onde resulta a ciclização 1,4-intramolecular irreversível da molécula. O leucoaminocromo assim formado é oxidado a *o*-semiquinona e esta, por sua vez, a aminocromo.

A velocidade de ciclização das catecolaminas é dependente dos seus grupos substituintes (Hawley *et al.*, 1967; Chavdarian *et al.*, 1978; Rupp *et al.*, 1994). A presença de grupos dadores de electrões (por exemplo, grupos metilo) nos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  e sobretudo no átomo de azoto facilita a ciclização (Hawley *et al.*, 1967; Chavdarian *et al.*, 1978). No caso do isoproterenol, no entanto, o impedimento estérico do grupo isopropilo contrabalança o seu efeito indutor da ciclização (Hawley *et al.*, 1967). Ter-se-á assim, em ordem crescente de velocidade de ciclização, a dopamina, a noradrenalina, o isoproterenol e a

adrenalina. Em termos comparativos, a velocidade de ciclização da adrenalina é 6 vezes mais rápida que a do isoproterenol e 140 vezes mais rápida que a da noradrenalina (Hawley *et al.*, 1967).

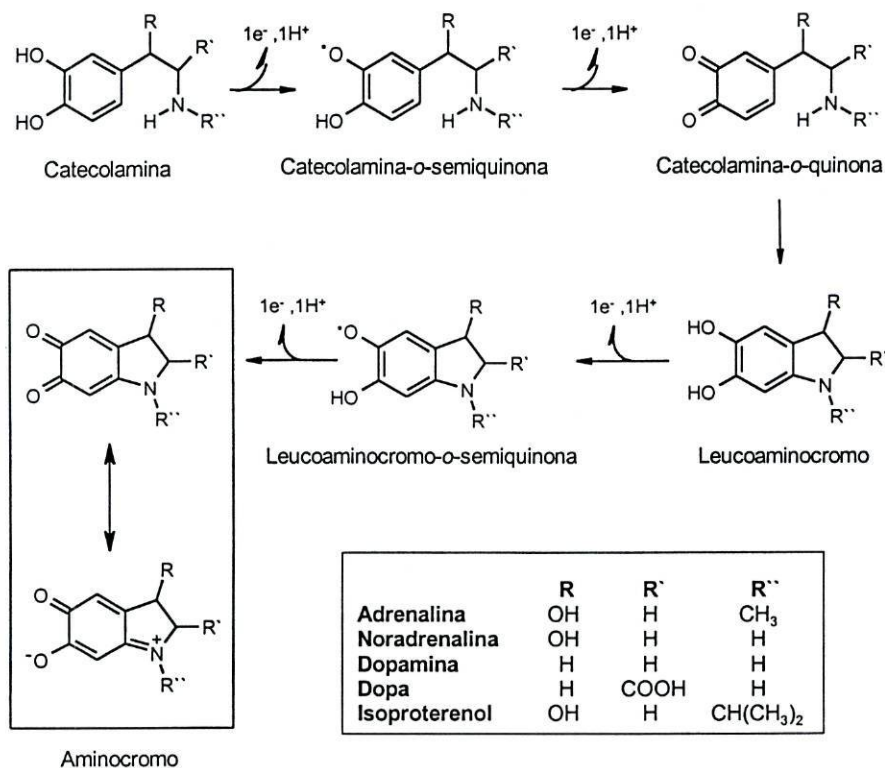


Figura 2.5 – Mecanismo proposto para a oxidação das catecolaminas a aminocromos (adaptado de Bindoli *et al.*, 1989).

A oxidação das catecolaminas pode ocorrer por um fenómeno de autooxidação. Esta reacção é favorecida em meio alcalino, mas a pH fisiológico é extremamente lenta (Jewett *et al.*, 1989; Schweigert *et al.*, 2001). No entanto, em meio fisiológico, a oxidação das catecolaminas pode ser catalisada por enzimas, metais de transição e por radicais (ver em Bindoli *et al.*, 1992). Este tema será desenvolvido mais em pormenor no ponto 6.4.1.

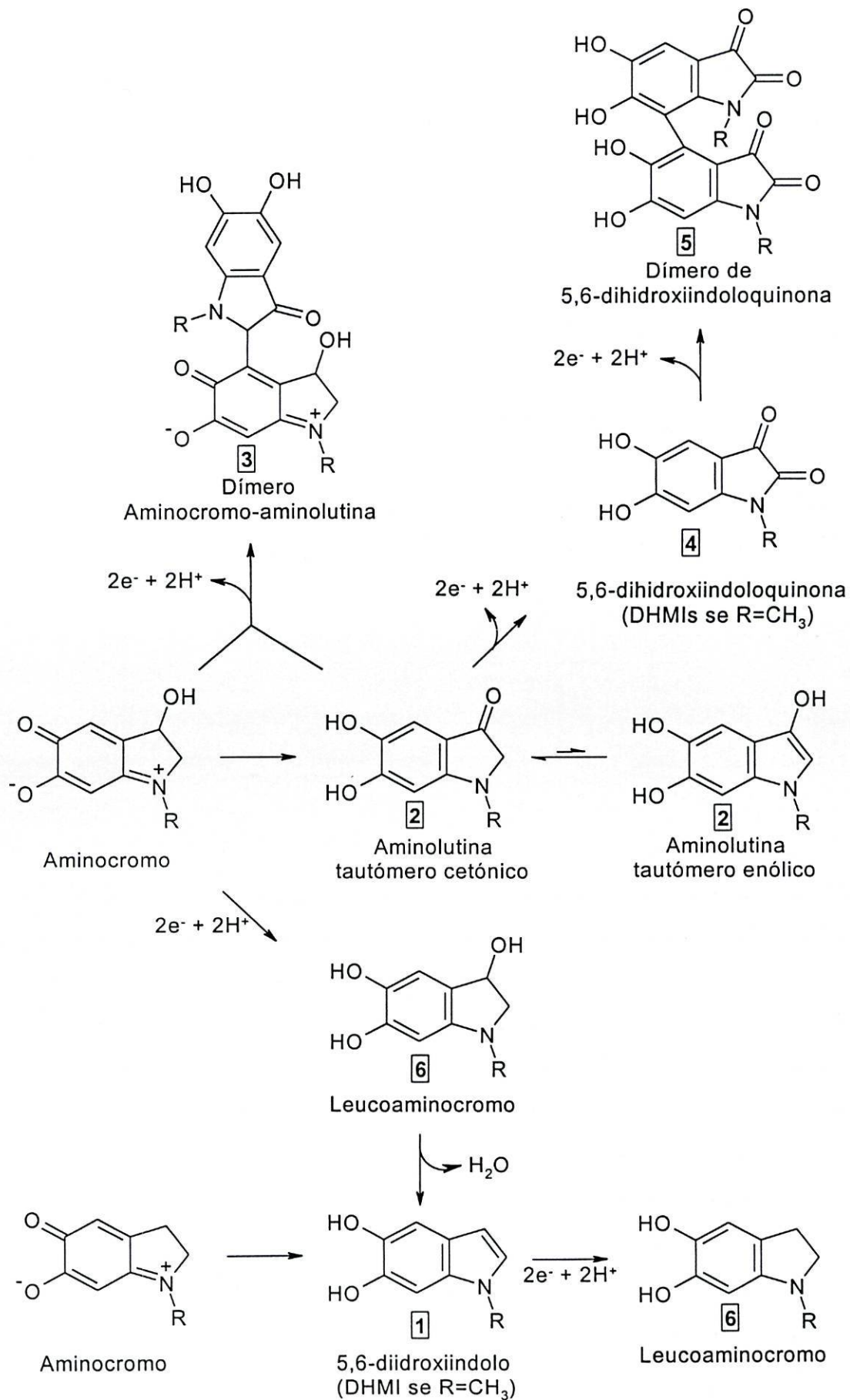
Um aspecto importante da oxidação das catecolaminas é a possibilidade dos produtos de oxidação poderem originar a redução do O<sub>2</sub> levando à formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Bindoli *et al.*, 1992; Dhalla *et al.*, 2001). Posteriormente, este radical, por acção da superóxido-dismutase (SOD) forma o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual por redução pode originar o radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) (ver Fig. 6.3) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estas espécies, designadas de espécies

reactivas de oxigénio (ROS), são potencialmente tóxicas via *stress* oxidativo e podem catalisar elas próprias a oxidação das catecolaminas (Bindoli *et al.*, 1992). A capacidade dos radicais oxidarem as catecolaminas é extremamente importante, pois todos os processos que levem à sua formação podem induzir esta oxidação.

#### 2.2.2.5.2.2 Reactividade dos aminocromos

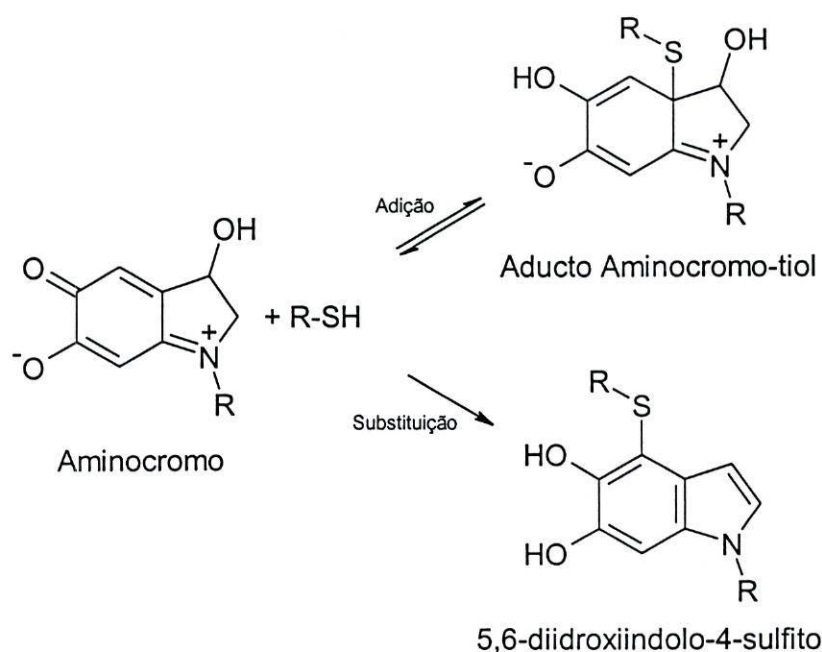
Os aminocromos são substâncias instáveis de cor avermelhada, que podem sofrer alterações, tais como rearranjos, oxidações e reduções (Fig. 2.6) (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1992). Os rearranjos intramoleculares dos aminocromos dão origem ao 5,6-diidroxiindolo [5,6-diidroxi-1-metilindolo (DHMI) se provier do adrenocromo] (1) ou ao 5,6-diidroxiindoxilo (2). O primeiro ocorre em aminocromos sem o substituinte hidroxilo na posição 3, ao passo que o segundo, também designado de aminolutina, corresponde a um tautómero dos aminocromos com o substituinte hidroxilo na posição 3. Este último rearranjo corresponde a uma reacção redox intramolecular e é catalisada em meio alcalino ou na presença de metais, especialmente  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  (Palumbo *et al.*, 1989). As aminolutinas não têm cor, exibindo, no entanto, uma fluorescência amarelo esverdeada. Estas podem reagir com os aminocromos formando dímeros aminocromo-aminolutina (3) ou, ainda, podem oxidar a 5,6-diidroxiindoloquinona [5,6-diidroxi-1-metilistatina (DHMIIs) se provier do adrenocromo] (4) originando posteriormente dímeros de aminolutinas (5) (d'Ischia *et al.*, 1988; Palumbo *et al.*, 1989; Rupp *et al.*, 1994). A polimerização destes compostos dá origem a pigmentos escuros insolúveis, de composição ainda não totalmente esclarecida, que são denominados de melaninas (Rupp *et al.*, 1994; Hegedus, 2000; Pattison *et al.*, 2002).

**Figura 2.6 – (página seguinte) Mecanismos propostos para a reactividade dos aminocromos (Heacock, 1959; d'Ischia *et al.*, 1988; Palumbo *et al.*, 1989; Bindoli *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994).**



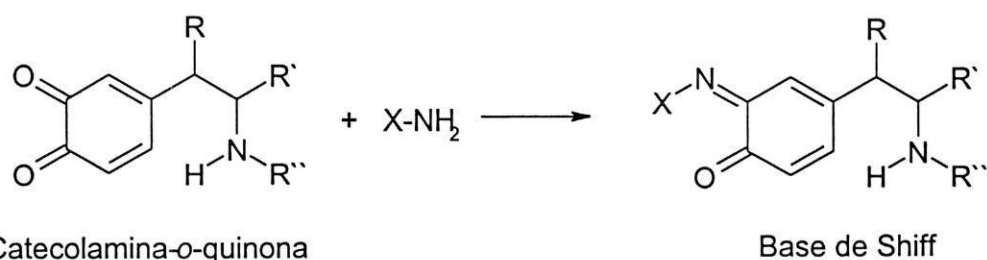
Os aminocromos podem também sofrer reduções, originando novamente os incolores leucoaminocromos (6) (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1992). Estas reacções de redução ocorrem na presença de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, glutatona ou cisteína e levam à formação de uma semiquinona intermédia. A formação desta semiquinona pode ocorrer também via enzimática pela acção da NADPH-citocromo-b<sub>5</sub>-reductase, da NADPH-citocromo-P450-reductase ou da cadeia respiratória na presença de NADH (Brunmark e Cadenas, 1989; Bindoli *et al.*, 1990a; Baez e Segura-Aguilar, 1994; Segura-Aguilar *et al.*, 1998). Enzimas presentes na superfície externa das membranas, tais como algumas flavoenzimas e a ferricianeto-reductase, são também capazes de reduzir com um electrão as quinonas e os aminocromos (Giulivi e Cadenas, 1998a; Arriagada *et al.*, 2000). Adicionalmente, a redução dos aminocromos a leucoaminocromos pode ocorrer pela acção da flavoproteína DT-diaforase (presente no fígado e no cérebro) num processo de transferência simultânea de 2 electrões do NAD(P)H, evitando assim a formação de semiquinonas (Segura-Aguilar e Lind, 1989; Bindoli *et al.*, 1990b). Os leucoaminocromos com substituinte hidroxilo na posição 3 desidratam espontaneamente a 5,6-diidroxiindolo (1), o qual posteriormente se reduz à nova forma de leucoaminocromo (6) (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1992).

Os aminocromos são compostos electrofílicos e, por isso, podem interagir com nucleófilos formando aductos estáveis. Os nucleófilos mais susceptíveis são do grupo dos tióis, onde se encontram a glutatona e a cisteína, esta última muitas vezes presente em proteínas. Estas reacções podem ocorrer por substituição ou por adição (Fig. 2.7) (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1992). A adição é reversível, o que torna possível que os tióis actuem como transportadores de aminocromos. A reacção de substituição é irreversível e parece estar envolvida na formação da melanina (Bindoli *et al.*, 1992). As melaninas são também referidas como indutoras de cardiotoxicidade e associadas aos efeitos de diferentes patologias, tais como alcaptonúria, artrite, feocromocitoma, hipertensão primária, carcinogenicidade, doença renal crónica, diabetes *mellitus*, doença de Parkinson e de Alzheimer e até ao fenómeno de envelhecimento (Hegedus, 2000).



**Figura 2.7** – Reacção de substituição e de adição entre aminocromos e tióis (Bindoli *et al.*, 1992).

Este tipo de reacções está também descrito para as catecolaminas-*o*-quinonas (Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Pattison *et al.*, 2002). Além dos grupos tióis, as quinonas podem reagir com grupos amina formando bases de Schiff (Fig. 2.8). Embora as aminas sejam nucleófilos mais fracos que os tióis, a sua alta concentração ao nível biológico pode tornar este processo significativo (Pattison *et al.*, 2002).



**Figura 2.8** – Formação de bases de Schiff a partir das catecolaminas-*o*-quinonas (adaptado de Pattison *et al.*, 2002).

Estas reacções levam à formação de aductos entre as quinonas e as proteínas, que, no entanto, não impede a continuação do processo oxidativo

destas quinonas ligadas, como por exemplo, a ciclização da catecolamina-o-quinona em aminocromo (Pattison *et al.*, 2002).

#### 2.2.2.5.2.3 Metabolismo dos aminocromos

Em estudos apresentados nesta dissertação demonstrou-se que o adrenocromo desaparece rapidamente do sangue após a sua administração (i.p.) a ratos (ver em 5.7). Estes resultados estão de acordo com a descrição do rápido aparecimento de adrenolutina, após administração de adrenocromo, na urina e tecidos de coelhos (Fischer e Landtsheer, 1950), assim como no sangue e urina de ratos (Dhalla *et al.*, 1989). Adicionalmente, foi referida, num estudo idêntico em ratos, ratinhos, cobaias e coelhos, a eliminação, por via urinária, de conjugados de sulfato com adrenolutina e DHMI, assim como de glucuronídeos deste último (Noval *et al.*, 1962). Curiosamente, em cães e gatos, o adrenocromo parece ser eliminado praticamente sem alterações ou na sua forma reduzida (DHMI) (Noval *et al.*, 1962). Como referido, os aminocromos podem, ainda, conjugar-se, directa ou indirectamente, de um modo irreversível com proteínas dos tecidos (Bindoli *et al.*, 1992) e, por outro lado, sofrer polimerizações, dando origem a melaninas (Hegedus, 2000).

#### 2.2.2.5.2.4 Toxicidade cardiovascular dos produtos resultantes da oxidação das catecolaminas

Os efeitos cardiovasculares descritos para os produtos resultantes da oxidação das catecolaminas são variados e extensos. A administração intra-amniótica de uma solução de isoproterenol (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) ou de isoproterenol oxidado a embriões de galinha induz um desenvolvimento anormal do coração, com aumento do conteúdo de água e distúrbios na vascularização, que provoca, em última instância, a morte dos embriões (Janatová *et al.*, 1986). Curiosamente este efeito não ocorre pela administração, em iguais circunstâncias, de adrenocromo, o que parece relacionar a oxidação do isoproterenol, mas não o isoprenocromo, com os efeitos observados (Janatová

*et al.*, 1986). Por outro lado, a administração de igual dose de adrenocromo (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) em ratos adultos induz arritmias cardíacas e, para doses superiores a 40 mg.Kg<sup>-1</sup>, a morte dos animais (Beamish *et al.*, 1981). O coração dos animais administrados com adrenocromo (32 mg.Kg<sup>-1</sup>) apresenta hipercontração das miofibrilhas, turgescência mitocondrial e edema intracelular (Singal *et al.*, 1982). Ao nível cardiovascular, o adrenocromo (16 mg.Kg<sup>-1</sup>) reduz, *in vivo*, a pressão sanguínea e o ritmo cardíaco (Beamish *et al.*, 1981; Singal *et al.*, 1982).

Curiosamente, em preparações de corações isolados, o adrenocromo aumenta a pressão coronária, por constrição das artérias, provocando a diminuição do fluxo coronário relativo (razão entre o fluxo coronário geral e o produto da pressão e ritmo cardíaco) e, por consequência, o fornecimento de O<sub>2</sub> para as necessidades cardíacas (Karmazyn *et al.*, 1981; Rump e Klaus, 1994; Rump e Klaus, 1995; Rump *et al.*, 2001). A constrição coronária demonstrou ser dependente da concentração de Ca<sup>2+</sup> disponível (Karmazyn *et al.*, 1981). Relativamente ao ritmo cardíaco, o adrenocromo demonstrou aumentá-lo em concentrações inferiores a 100 µg.L<sup>-1</sup> (Karmazyn *et al.*, 1981; Rump e Klaus, 1994; Rump e Klaus, 1995) e diminuí-lo para concentrações superiores (Yates *et al.*, 1980; Beamish *et al.*, 1981; Karmazyn *et al.*, 1981; Takeo *et al.*, 1981; Yates *et al.*, 1981; Singal *et al.*, 1982; Taam *et al.*, 1986). A diminuição do ritmo cardíaco também foi observada após perfusão do coração com uma solução de isoproterenol (10-100 mg.L<sup>-1</sup>) oxidado (Yates e Dhalla, 1975; Dhalla *et al.*, 1978). A perfusão do coração de ratos com adrenocromo ou soluções oxidadas de isoproterenol induz a necrose do miocárdio (Yates e Dhalla, 1975; Dhalla *et al.*, 1978; Yates *et al.*, 1980; Takeo *et al.*, 1981; Yates *et al.*, 1981; Taam *et al.*, 1986) associada à dissolução dos filamentos contrácteis, turgescência da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático, ocorrência de bandas de contração e de edemas intracelulares (Yates e Dhalla, 1975; Dhalla *et al.*, 1978; Yates *et al.*, 1981). Estes efeitos necróticos dos aminocromos *in vitro* demonstraram ser, em parte, prevenidos, tal como ocorre na toxicidade das catecolaminas, pela administração de β-bloqueadores, inibidores da MAO e antagonistas do Ca<sup>2+</sup> (Yates *et al.*, 1980). O adrenocromo demonstrou aumentar a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Tappia *et al.*, 2001), a qual parece ocorrer em consequência da acção inibitória do adrenocromo ao nível

da actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmática (Takeo *et al.*, 1980b; Tappia *et al.*, 2001), da actividade do sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Tappia *et al.*, 2001), da capacidade de acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria (Takeo *et al.*, 1981) e da actividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no sarcolema (Takeo *et al.*, 1980a).

Foi também descrito que o adrenocromo inibe a fosforilação oxidativa mitocondrial, com reflexo no declínio no valor de ICR e na razão ATP/AMP no miocárdio (Taam *et al.*, 1986). Em conformidade, foi descrita a depressão do ritmo de fosforilação mitocondrial, da razão P/O e dos valores de ICR após a perfusão do coração de rato com isoproterenol oxidado (Dhalla *et al.*, 1978). O adrenocromo inibe também a fosforilação da glucose e a glicólise, enquanto estimula a síntese de glicogénio e o ciclo das pentoses (Dhalla *et al.*, 2001).

O adrenocromo pode, adicionalmente, afectar a actividade muscular pelo facto de inibir a miosina-ATPase (Dhalla *et al.*, 2001). As inibições enzimáticas ocorrem também ao nível da MAO e da fosfatase alcalina e várias outras enzimas podem ser afectadas pelo facto de o adrenocromo ter a capacidade de oxidar grupos sulfidrilo ou, ainda, de desaminar aminas e aminoácidos (Dhalla *et al.*, 2001).

Além dos aminocromos, as catecolaminas-o-quinonas também podem exercer efeitos tóxicos (Rupp *et al.*, 1994; Terland *et al.*, 1997). As quinonas de um modo geral são extremamente reactivas, podendo reagir com grupos amina e sulfidrilo presentes, por exemplo, em proteínas (Brunmark e Cadenas, 1989; Bolton *et al.*, 2000). Podem ainda formar aductos com a glutatona e a cisteína, os quais expressam com frequência toxicidade (Brunmark e Cadenas, 1989; Bolton *et al.*, 2000). Adicionalmente, os radicais formados durante a oxidação das catecolaminas parecem, também, estar envolvidos na cardiotoxicidade das catecolaminas (Dhalla *et al.*, 2001). As semiquinonas, como por exemplo, a aminocromo-o-semiquinona (Singal *et al.*, 1981b; Bindoli *et al.*, 1990a; Segura-Aguilar *et al.*, 1998; Paris *et al.*, 2001) e as ROS (Singal *et al.*, 1981a; Miller *et al.*, 1996; Terland *et al.*, 1997; Dhalla *et al.*, 2001) poderão exercer *stress* oxidativo ao nível celular. A corroborar esta hipótese foi descrito que o pré-tratamento de ratos com vitamina E previne arritmias, peroxidação lipídica e necrose induzidas pelo isoproterenol (Singal *et al.*, 1981a; Haggendal *et al.*, 1987; Dhalla *et al.*, 1996; Tappia *et al.*, 2001). De igual modo, estudos em culturas de cardiomiócitos permitiram verificar efeitos protectores dos

antioxidantes contra a toxicidade do isoproterenol (Ramos e Acosta, 1983; Ramos *et al.*, 1983; Acosta *et al.*, 1984; Persoon-Rotherth *et al.*, 1989).

### **2.2.3 Conclusão**

A exposição prolongada do coração a níveis elevados de catecolaminas induz arritmias, disfunções contrácteis, danos celulares e a necrose do miocárdio. Estes efeitos parecem envolver um fenómeno de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Vários mecanismos de toxicidade das catecolaminas são propostos, tais como hipóxia parcial, insuficiência coronária e alterações hemodinâmicas e metabólicas. Mais recentemente, tem sido sugerido que o *stress* oxidativo, resultante da formação de radicais durante a oxidação das catecolaminas, e os produtos dessa oxidação, tais como os aminocromos, poderão ter um papel fundamental na toxicidade das catecolaminas.

### **3 Objectivo da dissertação**

Contribuir para o esclarecimento do mecanismo de cardiotoxicidade das catecolaminas, em particular do isoproterenol, quando aquele é mediado pelo fenómeno de oxidação destas moléculas.

## 4 Métodos experimentais

Nos estudos apresentados nesta dissertação foram utilizadas diferentes técnicas laboratoriais que estão descritas juntamente com os resultados no capítulo a estes dedicado. Neste capítulo mencionam-se, de um modo resumido e sistemático, as principais técnicas utilizadas nos estudos realizados.

### Isolamento de cardiomiócitos, tolerantes ao $\text{Ca}^{2+}$ , de rato adulto

A técnica de isolamento de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , de rato adulto está descrita nos pontos 5.3 (Remião *et al.*, 2001a) e 5.4 (Remião *et al.*, 2001c). De um modo simplificado, os cardiomiócitos foram isolados a partir de ratos adultos machos *Wistar*, com peso compreendido entre 175-225 g. Após abertura da cavidade torácica, o coração foi removido, lavado e perfundido a 37°C com uma solução modificada de “Krebs-Henseleit” (composição descrita nos pontos 5.3 e 5.4) isenta de  $\text{Ca}^{2+}$ , a pH 7,2 e saturada em carbogénio. Seguidamente, o coração foi perfundido com a mesma solução de “Krebs-Henseleit” adicionada das enzimas colagenase e protease. Após a digestão do coração, este foi cortado em pequenos fragmentos e por agitação procedeu-se à desagregação das células. As células foram seguidamente lavadas 3 vezes com soluções modificadas de “Krebs-Henseleit” com concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalmente, as células foram suspensas na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> em solução modificada de “Krebs-Henseleit” adicionada de 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  e incubadas a 37°C. As experiências realizaram-se nesta suspensão após um período de 30 minutos de pré-incubação.

### Avaliação da viabilidade dos cardiomiócitos isolados de rato

A viabilidade celular foi avaliada nos diferentes estudos por: observação da morfologia celular, avaliação da integridade da membrana plasmática pela libertação da LDH e avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste de exclusão do azul tripano.

A técnica da observação da morfologia celular está descrita no ponto 5.5 (Remião *et al.*, 2001b) e baseia-se na observação microscópica dos cardiomiócitos, em “câmara de Neubauer”. Os cardiomiócitos viáveis apresentam-se na forma rectangular (“rod-shaped cells”) e os inviáveis na forma arredondada (“round-shaped cells”). A contagem das células permite o cálculo da percentagem de viabilidade celular.

A técnica de avaliação da integridade da membrana plasmática pela libertação da LDH está descrita no ponto 5.5 (Remião *et al.*, 2001b). A determinação da actividade desta enzima intracelular no meio extracelular, antes e após a destruição completa das células por sonicação, dá uma indicação da viabilidade celular. A actividade desta enzima foi avaliada espectrofotometricamente à temperatura ambiente, em tampão fosfato (0,05 M a pH 7,4), pela monitorização, a 340 nm, da oxidação do NADH (0,3 mM) durante a redução do piruvato (0,3 mM) a lactato pela LDH. Estas determinações foram realizadas em triplicado, com cinéticas de 3 minutos, em leitor de placas de 96 poços. As concentrações descritas referem-se às concentrações finais na placa de 96 poços.

A técnica da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste de exclusão do azul tripano está descrita no ponto 5.9. O azul tripano é um corante azul que não entra nas células viáveis. A contagem, por microscopia óptica em “câmara de Neubauer”, das células permeáveis e não permeáveis ao corante permite o cálculo da percentagem de viabilidade celular.

#### Determinação dos níveis de glutathiona em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato

A técnica de determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato está descrita no ponto 5.2 (Remião *et al.*, 2000). Resumidamente, os níveis de GSH e GSSG foram determinados simultaneamente por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detector coulométrico, após precipitação proteica das amostras com ácido perclórico.

### Determinação da actividade das enzimas glutathiona-reductase (GR), glutathiona-peroxidase (GPX) e glutathiona-transferase (GST)

A determinação da actividade das enzimas GR, GPX e GST em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato está descrita nos pontos 5.5 (Remião *et al.*, 2001b) e 5.6 (Remião *et al.*, 2002a). A determinação da actividade da GR purificada da mucosa intestinal bovina, nos estudos da inibição desta enzima pelos produtos de oxidação do isoproterenol, está descrita no ponto 5.1 (Remião *et al.*, 1999).

A actividade da GR foi determinada espectrofotometricamente pela monitorização, a 340 nm, da oxidação do NADPH durante a redução da GSSG a GSH por esta enzima. Na suspensão de cardiomiócitos, a GR foi determinada, a 30°C, em tampão fosfatos (0,1 M a pH 7,0) adicionado de EDTA (1 mM). A GSSG (1 mM) é reduzida pela GR presente na amostra após adição de NADPH (0,1 mM em Tris-HCl 1 mM).

A actividade da GPX foi determinada espectrofotometricamente a 37°C, em tampão fosfatos (0,1 M a pH 7,0) adicionado de EDTA (1 mM) e  $\text{NaN}_3$  (1 mM), pela monitorização, a 340 nm, da oxidação do NADPH (0,15 mM em  $\text{NaHCO}_3$  0,01%) durante a redução da GSSG a GSH pela GR ( $0,25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A GSSG determinante para a cinética da reacção foi formada após oxidação de GSH (1 mM) pela GPX da amostra na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,15 mM).

A actividade da GST foi determinada a 30°C, em tampão fosfatos (0,1 M a pH 7,0) adicionado de EDTA (1 mM), pela monitorização, a 340 nm, da formação, catalisada por esta enzima, de um conjugado da GSH (1 mM) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (1 mM).

Todas estas determinações foram realizadas em triplicado, com cinéticas de 3 minutos, em leitor de placas de 96 poços. As concentrações descritas referem-se às concentrações finais na placa de 96 poços.

### Determinação dos níveis de isoproterenol e isoprenocromo em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato

A técnica de determinação dos níveis de isoproterenol e isoprenocromo em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato e nas amostras biológicas em geral está descrita nos pontos 5.6 (Remião *et al.*, 2002a) e 5.7 (Remião *et*

*al.*, 2002b). A determinação simultânea destes dois compostos foi efectuada por HPLC com detector de fotodíodos (DAD), após precipitação das proteínas nas amostras com ácido perclórico, seguida de rápida neutralização do sobrenadante com  $\text{KHCO}_3$  e centrifugação para remoção dos percloratos. O isoproterenol foi determinado a 279 nm e o isoprenocromo a 490 nm.

#### Estudos de espectrometria de massa

As condições experimentais para os estudos de espectrometria de massa estão descritas no ponto 5.7 (Remião *et al.*, 2002b). Em termos gerais, os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Q-TOF 2 após tratamento das amostras conforme descrito. Os estudos envolvendo a ligação HPLC e espectrómetro de massa permitiram identificar, em absoluto, o pico cromatográfico do adrenocromo no sangue de ratos administrados com este composto (ver em 5.7).

#### Estudos de ressonância paramagnética electrónica (RPE) em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato

Os estudos efectuados por RPE em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato estão descritos no ponto 5.9. Foram preparados diferentes tipos de amostras para a análise dos espectros de RPE. Estes espectros foram obtidos num espectrómetro Bruker ECS 106 equipado com uma cavidade TM110. Para tal, transferiram-se alíquotas de sensivelmente 150  $\mu\text{L}$  das amostras para pipetas *Pasteur* (seladas nas pontas), as quais se introduziram de seguida na cavidade do espectrómetro para a obtenção do espectro.

## 5 Resultados

Os resultados desta dissertação, assim como a sua discussão, são apresentados na língua inglesa e sob a forma de publicações. São também descritos alguns resultados ainda não publicados, tais como I) a determinação dos níveis de isoproterenol no plasma e coração de rato após a administração de doses tóxicas desta catecolamina e II) a localização, a nível celular, da leucoisoprenocromo-o-semiquinona por ressonância paramagnética electrónica (RPE).

Uma discussão geral dos resultados é apresentada em português no capítulo 6.

A decisão de apresentar na dissertação os resultados obtidos na forma de publicações, prende-se com dois aspectos: I) a maioria dos resultados obtidos foi descrita nos artigos em causa, publicados ou em publicação em revistas internacionais arbitradas e II) as técnicas implementadas para a execução da parte experimental também foram alvo de publicação. Neste contexto, este capítulo é composto pelas seguintes publicações:

- 5.1 – Remião *et al.*, 1999
- 5.2 – Remião *et al.*, 2000
- 5.3 – Remião *et al.*, 2001a
- 5.4 – Remião *et al.*, 2001c
- 5.5 – Remião *et al.*, 2001b
- 5.6 – Remião *et al.*, 2002a
- 5.7 – Remião *et al.*, 2002b

## 5.1 Inibição da glutathiona-redutase pelos produtos de oxidação do isoproterenol

## INHIBITION OF GLUTATHIONE REDUCTASE BY ISOPROTERENOL OXIDATION PRODUCTS

FERNANDO REMIÃO\*, HELENA CARMO,  
FÉLIX D. CARVALHO and MARIA L. BASTOS

*ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy,  
Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal*

*(Received 12 February 1999)*

Oxidative stress induced by catecholamines is a well recognized toxic event. This effect has been extensively observed in the heart, where high levels of catecholamines cause enzyme inhibition, lipid peroxidation, energy depletion and myocardial necrosis. Catecholamines can be converted into *o*-quinones and undergo cyclization into aminochromes. This process can occur enzymatically or through autoxidation and involves the formation of free radicals. Aminochromes are highly reactive molecules that can cause oxidation of protein sulfhydryl groups and deamination catalysis, among other deleterious effects; in addition, inhibition of some enzymes has been also reported.

We have studied the effects of isoproterenol oxidation products (IOP) on glutathione reductase (GR) activity *in vitro*. Isoproterenol (ISO) autoxidation was conducted at 37°C in the dark, for 4 h at pH 7.0 and this process was monitored by UV spectrophotometry at both 340 and 490 nm. Addition of the autoxidized solution to GR in the presence of oxidized glutathione (GSSG) and NADPH showed that IOP inhibits GR in a competitive mode and that this effect increases during the 4 h incubation period. This inhibitory effect of IOP was partially prevented by the addition of reduced glutathione (GSH), L-cysteine and ascorbic acid to the reaction mixtures.

**Keywords:** Glutathione reductase; Catecholamines; Oxidative stress; Aminochromes; Isoproterenol; Antioxidants

**Abbreviations:** ISO, isoproterenol; IOP, isoproterenol oxidation products; GR, glutathione reductase; abs, absorbance; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione

---

\* Corresponding author. Tel.: 351-2-2078908. Fax: 351-2-2003977.  
E-mail: remiao@mail.ff.up.pt.

## INTRODUCTION

Glutathione in its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms is the major thiol redox system of the cell, providing protection against oxidative stress. The GSH/GSSG balance in the cell is an important parameter, since it gives a good indication of the thiol oxidative status.<sup>1</sup> During conditions of optimal metabolism, the *in vivo* ratio of reduced GSH to GSSG can exceed 100:1.<sup>2</sup> To maintain a high cellular GSH/GSSG ratio, glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2), a dimeric FAD-containing enzyme with a redox active disulphide at its active site, catalyses the NADPH-dependent reduction of GSSG to GSH:



In this redox reaction the enzyme cycles between reduced and oxidized states, involving reversible disulphide bond formation.<sup>3</sup> GR is known to be sensitive to chemical modification of its active thiol groups.<sup>3</sup> Thus, the activity of GR can be modulated by the redox conditions of the reaction environment. Under extreme oxidizing conditions aggregates of GR may be formed which decrease GR activity.<sup>4</sup> In addition, incubation of GR in the presence of high concentrations of NADPH or NADH produces an almost complete inactivation of the enzyme.<sup>5</sup>

The  $\beta$ -agonist isoproterenol (isoprenaline, ISO) is a synthetic catecholamine which can be used in the treatment of asthma and shock,<sup>6,7</sup> and in emergencies to stimulate heart rate in patients with bradycardia or heart block.<sup>6,7</sup> Nevertheless, it has been replaced by other sympathomimetic drugs for these purposes. Notwithstanding, ISO can be related to the natural occurring catecholamines epinephrine, norepinephrine and dopamine. Epinephrine and dopamine also have therapeutic use.<sup>6,7</sup> Therefore, ISO is useful in experimental toxicology as a model compound for the study of catecholamine toxicity.<sup>8-12</sup> At high doses, catecholamines produce disturbance of heart function and metabolism as well as myocardial necrosis.<sup>9</sup> In fact, several myocardial toxic effects related to high levels of circulating ISO have been reported. These include alterations in calcium homeostasis resulting in extensive myocardial necrosis,<sup>10</sup> lipid peroxidation,<sup>8,11</sup> and decrease in ATP and creatine phosphate stores.<sup>9</sup> A decrease in the activity of superoxide dismutase, catalase, GR and glutathione-S-transferase in myocardial mitochondria has also been reported.<sup>12</sup> Although it is generally believed that excess catecholamines exert cardiotoxic effects primarily via

binding to adrenoceptors and causing intracellular calcium overload, oxidative stress is, more probably, one of the main mechanisms through which catecholamines exert their toxic effects. Spontaneous oxidation of catecholamines results in the formation of catecholamine-*o*-quinones, which generate aminochromes through cyclization.<sup>9</sup> Adrenochrome (which results from the cyclization of epinephrine-*o*-quinone) can be oxidized to several other compounds such as adrenolutin, 5,6-dihydroxy-1-methylindole (DHMI) or adrenochrome–adrenolutin dimer.<sup>9</sup> All these redox reactions generate free radicals. Consequently, catecholamine-*o*-quinones, aminochromes and the radical species resulting from the oxidation of catecholamines are thought to be involved in catecholamine-related toxicity.<sup>11</sup> Adrenochrome and oxidized ISO have been reported to produce cell damage and contractile failure in the isolated perfused rat heart.<sup>9</sup> It has also been reported that aminochromes oxidize protein sulfhydryl groups, catalyse the deamination of a variety of amines and amino acids, induce uncoupling of the mitochondria and inhibit monoamine oxidase and alkaline phosphatase.<sup>9</sup> A study conducted by Bironaite *et al.*,<sup>13</sup> shows that certain quinones, including some which are naturally occurring, may act as potent inhibitors of GR.

The occurrence of intracellular catecholamine oxidation does not always induce toxicity because the cell has multiple protective agents that limit free radical damage, namely free cysteine and GSH which are very important nucleophiles within the cell.<sup>14</sup> Ascorbate is another protective compound which is thought to exert direct antioxidant effects by acting as a one-electron reductant for many biologically relevant oxidants.<sup>15</sup> Thus, GSH, L-cysteine and ascorbic acid play essential roles in the defence against oxidative stress generated by free radicals. Considering that IOP may inhibit GR activity through an oxidative stress mechanism it would be expected that these antioxidants would prevent this effect. The aim of the present study was to evaluate GR activity in the presence of IOP and the influence of the antioxidants GSH, L-cysteine and ascorbic acid on the observed effects.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

L-Ascorbic acid, L-cysteine hydrochloride monohydrate, ( $\pm$ )-isoproterenol hydrochloride,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form ( $\beta$ -NADPH) tetrasodium salt, glutathione oxidized form (GSSG)

disodium salt, glutathione reduced form (GSH), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate and glutathione reductase (Type VII, from bovine intestinal mucosa, EC 1.6.4.2) were obtained from Sigma Chemical Company (Madrid, Spain). Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) was obtained from Merck (Lisbon, Portugal). All the chemicals were of analytical grade. The water used was deionized and tridistilled.

L-ascorbic acid,  $\beta$ -NADPH and L-cysteine were prepared in 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 2 mM EDTA (pH 7.0) buffer. ISO was prepared in 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) buffer.

The racemic form of isoproterenol was used as it is included as such in some medicinal formulae.

### GR Stock Solution

The pure enzyme was stored at  $-20^\circ\text{C}$ , at a concentration of 0.15 U/mL in 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA.

### ISO Oxidation

An aqueous solution of ISO, 3 mM, was left to oxidize in 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.0) saturated with carbogen at  $37^\circ\text{C}$  in the dark for a maximum period of 4 h. During this time, the oxidation of 1 : 3 buffer diluted ISO solution 1 mM ISO (final concentration) was monitored by spectrophotometry at 340 and 490 nm in a 96 well plate reader (Ceres 9000).

Spectra of ISO and IOP were obtained over the 200–800 nm wavelength range (Shimadzu UV-160).

$^1\text{H}$ NMR spectra were taken on a Bruker AMX 300 instrument operating at 300.13 MHz, at ambient temperature, using a coaxial tube with deuterated water, which also served as reference. At the same time, it was made the saturation of the water signal.

### GR Assay

The activity of GR was evaluated by following the oxidation of NADPH consumed during the reduction of GSSG at 340 nm, at a constant temperature of  $30^\circ\text{C}$ , using a 96 well plate reader (Ceres 9000). The incubation mixture contained 0.025 units of GR, 0.1 mM GSSG and 1 mM EDTA in 0.17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) buffer. After 2 min pre-incubation, the reaction was initiated by the addition of NADPH (final concentration 0.1 mM). The

final volume of the assay mixture was 300  $\mu$ L. The kinetics of the reaction were monitored for 5 min at 20 s intervals. A blank assay containing all components of the reaction mixture except the enzyme was performed to evaluate the non-enzymatic oxidation of NADPH and this value was subtracted from the assay values. Seven determinations were performed for all experimental conditions.

The effect of IOP on the inhibition of GSH reductase was evaluated by performing the assay as described above except that the product of ISO oxidation was added to the reaction mixture (and diluted 1 : 3), just prior to the 2 min incubation. Control assays were performed in the absence of IOP.

The effects of GSH (0.01–2 mM), L-cysteine (0.01–2 mM) and ascorbic acid (0.01–80 mM) on the IOP-mediated inhibition of GSH reductase were studied by their addition to the reaction mixture just before IOP addition.

The mode of inhibition by IOP was investigated by conducting the assay at different concentrations of GSSG (0.1–1 mM). Double-reciprocal plots of enzymatic velocity versus substrate (GSSG) concentration were used to assess the nature of the interaction between GR and ISO oxidation products.

### Statistical Analysis

Data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan Test. All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (M  $\pm$  SD).

## RESULTS

The oxidation of ISO was monitored every hour for 4 h by using UV spectroscopy. The ISO spectrum ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.0) shows maximum absorption at 279 nm. During the 4 h period, the maximum absorption at 279 nm remained but the absorption levels increased between 300 and 650 nm (Figure 1), a higher increase in absorbance being observed near 300 nm rather than at 650 nm. However, no new independent absorption maximum of the ISO oxidized solution was observed. Oxidation of the ISO solution was then monitored at 340 nm, the wavelength at which we monitored GR activity, and at 490 nm, the wavelength band at which aminochromes have been monitored by others.<sup>16-19</sup> The study was performed with only a single ISO concentration (pH, light, temperature, ionic strength, carbon saturation and oxidation time variables always being controlled) and showed a variation in absorption at 340 and 490 nm with in the same

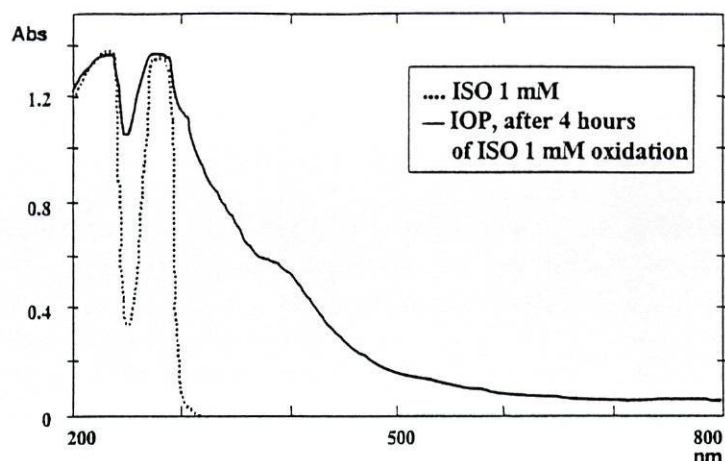


FIGURE 1 Absorbance spectrum of ISO (1 mM) and IOP solution after 4 h of ISO (1 mM) oxidation in 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.0) saturated with carbogen, at 37°C and in the dark.

oxidation time for different ISO solutions (data not shown). Monitoring of the ISO oxidation reaction during a 4 h period by NMR was not possible because most of the ISO remained unoxidized and interfered with the spectra.

GR activity was determined after treatment with ISO oxidized to different extents. Figure 2 shows the extent of GR inhibition versus IOP absorption levels at 340 and 490 nm obtained with the same ISO solution at different oxidation times. A high polynomial correlation (order 2) ( $R^2 = 0.9644$  for 340 nm and  $R^2 = 0.9842$  for 490 nm) was obtained between the increase in GR inhibition and the increase in IOP absorption levels (Figure 2). On the other hand, only a poor polynomial correlation (order 2) ( $R^2 = 0.212$  for 340 nm and  $R^2 = 0.2613$  for 490 nm) was obtained between absorbance at 340 or 490 nm and extent of GR inhibition in the presence of IOP, obtained with different ISO oxidized solutions at different extents of oxidation (Figure 3). An assay was performed with a freshly prepared ISO solution and no enzymatic inhibition was detected (data not shown). The smallest extent of GR inhibition was  $8.5 \pm 4.4\%$  of the control value, obtained with ISO oxidized solutions with low absorbances (abs. 0.024 at 340 nm; abs. 0.003 at 490 nm) after only 15 min of ISO oxidation. The greatest extent of GR obtained was 64.5% of the control value after 4 h of ISO oxidation (abs. 0.558 at 340 nm; abs. 0.077 at 490 nm).

In order to investigate the mode of the GR inhibition by IOP, a double-reciprocal plot of  $1/V_0$  versus  $1/[\text{GSSG}]$  was performed at different levels of ISO oxidation and a control assay (Figure 4). There was no difference in the

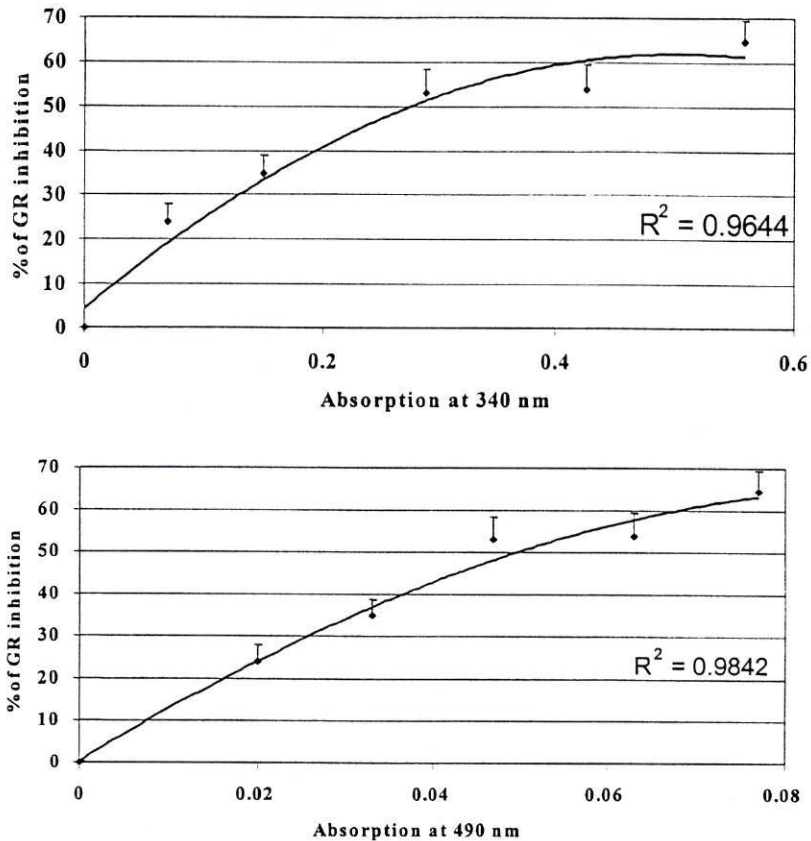


FIGURE 2 Rate of IOP-induced GR inhibition versus IOP absorption at 340 and 490 nm obtained with the same ISO solution at different oxidation times. Each data point is the  $M \pm SD$  of 7 determinations.

maximum velocity ( $V_{max}$ ) for GR, but the Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ) increased with increasing ISO oxidized solution absorbance. These results suggest that the inhibition was competitive with respect to GSSG.

The protective effect of three different antioxidants, GSH, L-cysteine and ascorbic acid against the IOP-induced GR inactivation was investigated. Figure 5 shows the effect of GSH concentration (0.01, 0.1, 1.0, 1.5 and 2.0 mM) on GR activity in the presence and absence of IOP. As expected, GSH by itself reduced GR activity at concentrations of 1.0, 1.5 and 2.0 mM [GR activity:  $84.8 \pm 8.9\%$  ( $p \leq 0.001$ ),  $75.9 \pm 9.3\%$  ( $p \leq 0.001$ ) and  $68.3 \pm 8.6\%$  ( $p \leq 0.001$ ) of control values, respectively]. However, in an assay where IOP (abs. 0.498 at 340 nm; abs. 0.060 at 490 nm) reduced GR activity to  $55.6 \pm 1.7\%$  ( $p \leq 0.001$ ), although 0.01 and 2.0 mM of GSH did not

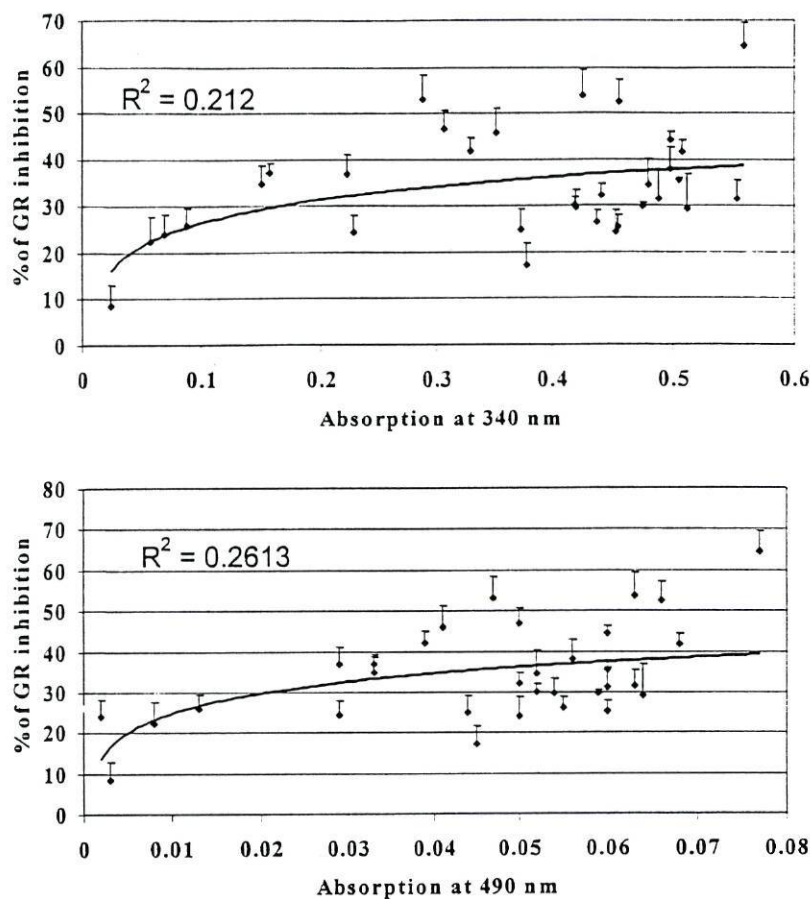


FIGURE 3 Rate of IOP-induced GR inhibition versus IOP absorption at 340 and 490 nm obtained with several ISO solutions at different oxidation times. Each data point is the  $M \pm SD$  of 7 determinations.

affect significantly the GR activity, concentrations of 0.1, 1.0 and 1.5 mM of GSH enhanced GR activity to  $65.0 \pm 1.6\%$  ( $p \leq 0.05$ ),  $66.0 \pm 2.4\%$  ( $p \leq 0.01$ ) and  $64.2 \pm 1.8\%$  ( $p \leq 0.05$ ), respectively. Nevertheless, all these three GR activities were still significantly lower than those obtained with the same concentrations of GSH but in the absence of IOP.

In Figure 6 the effect of L-cysteine on GR activity and on IOP-induced GR inhibition is presented. L-cysteine by itself reduced GR activity at all the studied concentrations: 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mM [GR activity:  $91.7 \pm 13.7\%$  ( $p \leq 0.05$ ),  $82.9 \pm 7.9\%$  ( $p \leq 0.001$ ),  $87.0 \pm 9.9\%$  ( $p \leq 0.01$ ),  $80.7 \pm 7.3\%$  ( $p \leq 0.001$ ) and  $75.2 \pm 8.8\%$  ( $p \leq 0.001$ ) respectively]. However, in an assay where IOP (abs. 0.498 at 340 nm: abs. 0.056 at 490 nm)

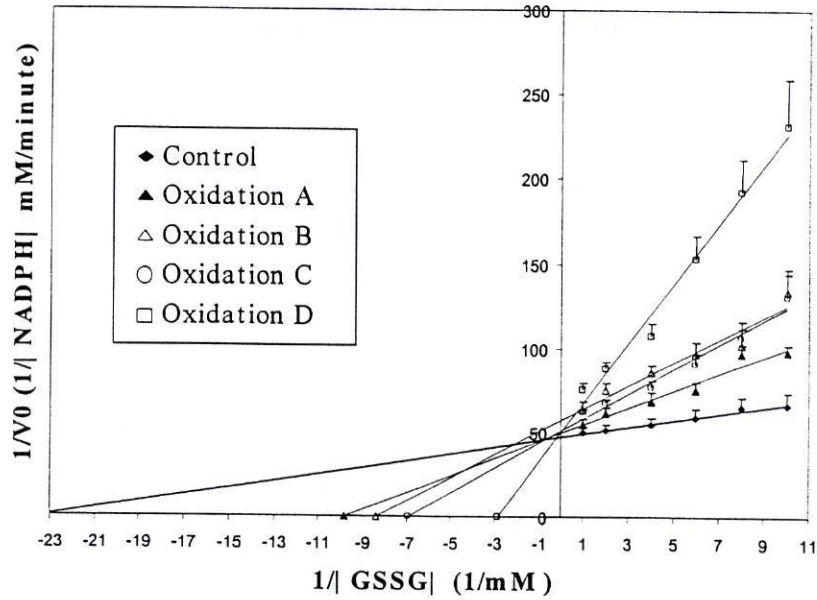


FIGURE 4 Double-reciprocal plots of  $1/V_0$  versus  $1/[GSSG]$  at 4 different ISO oxidation levels and control. Oxidation A: abs. 0.153 at 340 nm and 0.033 at 490 nm; Oxidation B: abs. 0.298 at 340 nm and 0.049 at 490 nm; Oxidation C: abs. 0.441 at 340 nm and 0.065 at 490 nm and Oxidation D: abs. 0.569 at 340 nm and 0.078 at 490 nm. Each data point is the  $M \pm SD$  of 14 determinations.

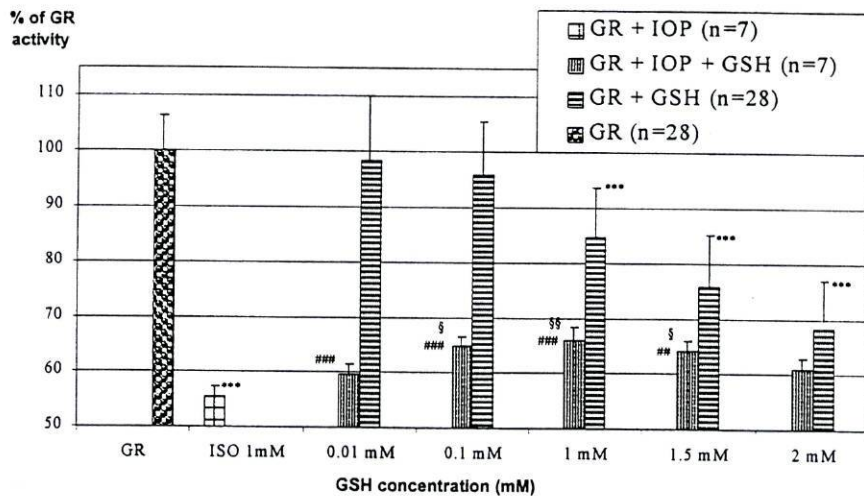


FIGURE 5 GSH effect on GR activity and on IOP-induced GR inhibition. The IOP absorption at 340 nm was 0.498 and at 490 nm was 0.060. The symbols \*, § and # indicate the significance level. One symbol:  $p \leq 0.05$ ; two symbols:  $p \leq 0.01$ ; three symbols:  $p \leq 0.001$ . \* compares GR + IOP and GR + GSH with GR. § compares GR + IOP + GSH with GR + IOP. # compares GR + IOP + GSH with GR + GSH. Data are expressed as  $M \pm SD$ .

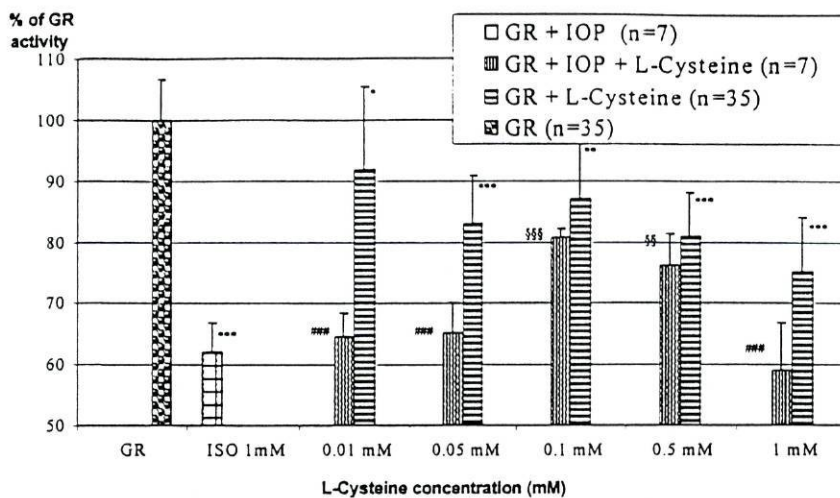


FIGURE 6 L-cysteine effect on GR activity and on IOP-induced GR inhibition. The IOP absorption at 340 nm was 0.498 and at 490 nm was 0.056. The symbols \*, § and # indicate the significance level. One symbol:  $p \leq 0.05$ ; two symbols:  $p \leq 0.01$ ; three symbols:  $p \leq 0.001$ . \* compares GR + IOP and GR + L-cysteine with GR. § compares GR + IOP + L-cysteine with GR + IOP. # compares GR + IOP + L-cysteine with GR + L-cysteine. Data are expressed as  $M \pm SD$ .

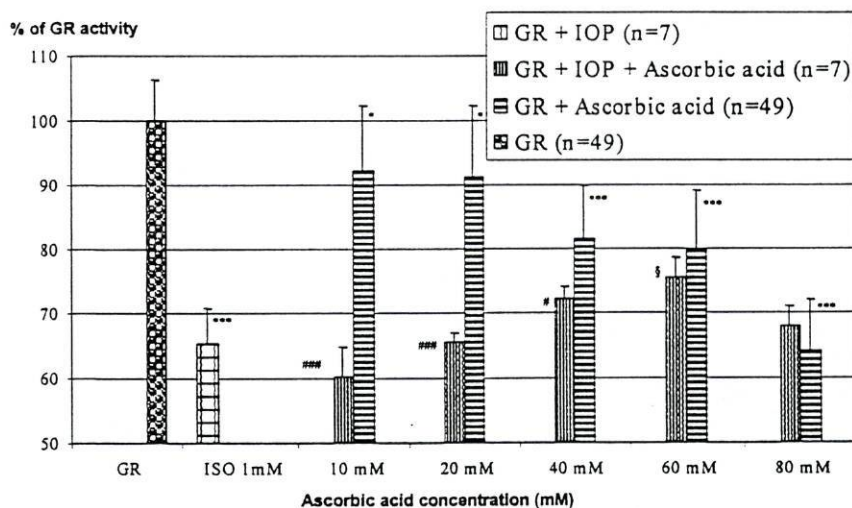


FIGURE 7 Effect of ascorbic acid on GR activity and on IOP-induced GR inhibition. The IOP absorption at 340 nm was 0.498 and at 490 nm was 0.056. The symbols \*, § and # indicate the significance level. One symbol:  $p \leq 0.05$ ; two symbols:  $p \leq 0.01$ ; three symbols:  $p \leq 0.001$ . \* compares GR + IOP and GR + Ascorbic acid with GR. § compares GR + IOP + Ascorbic acid with GR + IOP. # compares GR + IOP + Ascorbic acid with GR + Ascorbic acid. Data are expressed as  $M \pm SD$ .

reduced GR activity to  $62.0 \pm 4.7\%$  ( $p \leq 0.001$ ), although 0.01, 0.05 and 1.0 mM of L-cysteine did not affect significantly the GR activity, concentrations of 0.1 and 0.5 mM of L-cysteine enhanced the GR activity to  $80.6 \pm 1.5\%$  ( $p \leq 0.001$ ) and  $76.1 \pm 5.1\%$  ( $p \leq 0.01$ ), respectively. In contrast to that observed with GSH, the activity of GR in the simultaneous presence of IOP and 0.1 or 0.5 mM of L-cysteine was not significantly different from GR activity in the presence of the same L-cysteine concentration but in the absence of IOP.

The results of the same assay conducted with ascorbic acid are shown in Figure 7. In this assay, ascorbic acid reduced GR activity at all the concentrations studied: 10, 20, 40, 60 and 80 mM [GR activity:  $92.1 \pm 10.2\%$  ( $p \leq 0.05$ ),  $91.1 \pm 11.2\%$  ( $p \leq 0.05$ ),  $81.4 \pm 8.4\%$  ( $p \leq 0.001$ ),  $79.7 \pm 9.2\%$  ( $p \leq 0.001$ ) and  $64.2 \pm 7.9\%$  ( $p \leq 0.001$ ) respectively]. In the presence of IOP (abs. 0.480 at 340 nm; abs. 0.052 at 490 nm), although 10, 20, 40 and 80 mM of ascorbic acid did not affect significantly the GR activity, a concentration of 60 mM of ascorbic acid enhanced GR activity from  $65.4 \pm 5.5\%$  to  $75.5 \pm 3.1\%$  ( $p \leq 0.05$ ), which is not significantly different from GR activity in the presence of 60 mM of ascorbic acid only.

## DISCUSSION

Solutions of ISO at pH 7.0 and 37°C rapidly become coloured red due to oxidation of ISO to aminochrome (Figure 8). In fact isoproterenol as well as epinephrine, norepinephrine and dopamine oxidize to the catecholamine-*o*-quinone. According to Hawley *et al.*<sup>20</sup> the rate of internal cyclization of catecholamine-*o*-quinone to respective aminochrome varies for the different catecholamines. It seems that dopamine has the lowest internal cyclization rate, while isoproterenol has a six-fold lower internal cyclization rate when compared to epinephrine, although 20 times higher than norepinephrine.<sup>20</sup> The aminochrome can also undergo further oxidation similarly to that shown for adrenochrome. In fact adrenochrome isomerizes to adrenolutin which can oxidize to 5,6-dihydroxy-1-methylisatin (DHMI) or to adrenochrome-adrenolutin dimer.<sup>8</sup> All these oxidative reactions produce free radicals.<sup>8</sup> In our study a broad increase in the absorption levels was observed between 300 and 650 nm during oxidation of ISO solution (Figure 1). The higher increase in absorbance observed near 300 nm rather than 650 nm is most probably due to oxidation products of aminochrome in accordance with the study of Misra and Fridovich, who observed that oxidation of adrenochrome decreases its absorbance at 480 nm and increases

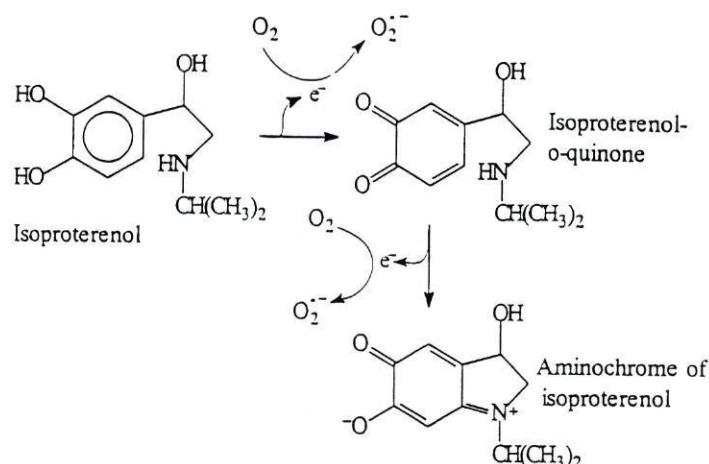


FIGURE 8 Proposed mechanism for oxidation of isoproterenol (Adapted from Rupp *et al.*<sup>8</sup> and Dhalla *et al.*<sup>11</sup>).

the respective absorbance at 300 nm.<sup>16</sup> The characteristic absorption maximum between 475 and 483 nm of aminochromes has been used for monitoring these compounds.<sup>16,17</sup> Dopaminochrome has been monitored by dual-wavelength spectrophotometry at 485 and 580 nm<sup>18</sup> or 305 and 475 nm.<sup>19</sup> In our study, ISO oxidation was monitored at 490 nm, and at 340 nm where GR activity was measured.

Although during the 4 h oxidation period the ISO absorption maximum at 279 nm was always seen in the spectrum, only ISO could be detected by NMR, which means that only a small amount of ISO undergoes oxidation; freshly prepared ISO solutions did not show any inhibitory effect on GR. Thus it was concluded that GR was inhibited by IOP and that this inhibition appeared to be dependent on ISO oxidation levels (Figures 2 and 3). These results are in agreement with a study conducted by Ithayarasi and Devi,<sup>12</sup> who reported a decrease in the activity of mitochondrial superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase and GR in the myocardium of ISO-treated rats. In the same study,  $\alpha$ -tocopherol pre-treated rats administered ISO had antioxidant enzyme activities at near normal levels.<sup>12</sup> Further evidence of the importance of oxidative stress on ISO toxic effects is presented in a study by Ramos and Acosta<sup>10</sup> where a decrease in myocytes GSH content caused by toxic concentrations of ISO was shown. At the enzyme level, although to our knowledge no study with IOP has been previously performed, the inhibition of GR<sup>13,21</sup> and glutathione-S-transferase<sup>22,23</sup> by quinones, as well as monoamine oxidase,<sup>24</sup> alkaline phosphatase,<sup>25</sup> Type V adenylyl cyclase,<sup>26</sup> catechol-*O*-methyltransferase<sup>27</sup>

and heart sarcolemmal  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase<sup>28</sup> by different aminochromes have all been reported. GR activity is also inhibited by Fenton systems like  $\text{Cu(II)}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{catecholamine}$ .<sup>29</sup> Thus, it seems likely that the inhibition of GR is due to isoproterenol-*o*-quinone, aminochrome, oxidation products of the aminochrome or reactive oxygen species generated during these oxidation reactions.

The data presented in Figure 2 result from an inhibition study that was conducted with the same ISO solution, but at different extents of oxidation. In this study, there is a good correlation between inhibitory effect and the absorption values at 340 and 490 nm. The polynomial curves (order 2) show a plateau at higher levels of oxidation, which could represent enzyme saturation. Data obtained from different extents of ISO oxidation obtained from various ISO solutions are shown in Figure 3. The correlation is poorer than that observed in the preceding study, since for similar absorption values at 340 and 490 nm different inhibitory effects are observed in the diverse ISO solutions. These results occur due to a broad spectrum of oxidized products resulting from ISO autoxidation, to the difficulty in controlling this process and to the fact that the wavelength monitored may not correspond to a maximum of absorption for IOP. Thus, the introduction of two variables, different times of ISO incubation and different concentrations or components of IOP, can explain the poor correlation obtained. The best correlation between inhibitory effect and absorbance was obtained at 490 nm. This observation and the fact that aminochromes have a maximum of absorption at this wavelength could indicate a direct involvement of the aminochrome resulting from ISO oxidation in GR inhibition. It is noteworthy that the rate of isoproterenol-*o*-quinone internal cyclization is six-fold lower than that of adrenaline<sup>8</sup> and that catecholamine-*o*-quinones have been shown to induce nucleophilic attacks on thiol groups of proteins.<sup>8,11</sup>

Although previous reports for  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase inhibition by adrenochrome or GR inhibition by quinones describe non-competitive inhibition,<sup>28,13</sup> the results shown in Figure 4 suggest that the IOP-induced GR inhibition is competitive with respect to GSSG. This fact is in accordance with a competitive inhibition to GSSG involving the disulphide active site in GR. The catalytic activity of GR requires two steps, the first is the reduction of the Cys58–Cys63 disulphide bridge and the second step involves the interaction of the reduced enzyme with GSSG to produce two molecules of GSH and the oxidized enzyme.<sup>4,30</sup> Thus, we studied the GR inhibition by IOP in the presence of two thiol antioxidants (GSH and L-cysteine) and a non-thiol antioxidant (ascorbic acid).

GSH and L-cysteine began to inhibit GR activity at a concentration of 1 and 0.01 mM, respectively. This inhibitory effect has also been reported by

other authors<sup>6,31</sup> and appears to be related to the high reducing conditions which can produce thiols at the active sites that can be oxidized by air to disulphides or interact with, and block, a site on a second enzyme molecule.<sup>4,5</sup> In the presence of IOP, GSH and L-cysteine enhanced GR activity. L-Cysteine appears to have the higher protective effect. It increases GR activity and this effect occurs at lower antioxidant concentrations. Additionally, GR activity, after inhibition by IOP, in the presence of 0.1 or 0.5 mM of L-cysteine was similar to the GR activity obtained with only the antioxidant. These results seem to indicate that the targets for the inhibitory effect of IOP are the sulfhydryl groups of cysteine residues in the GSSG active site of GR, which could be oxidized by IOP.

Ascorbic acid, which also had a GR inhibitory effect in concentrations higher than 10 mM, enhanced GR activity in the presence of IOP, but only at a 60 mM concentration. This concentration is very high when compared to the sulfhydryl antioxidants and is consistent with the importance of the thiol group at the enzyme active site.

The proposed mechanism for GR inhibition by IOP is the oxidation of sulfhydryl groups present at the GSSG enzyme active site, possibly mediated by aminochromes. The protein sulfhydryl oxidation by aminochromes as an enzyme inhibition mechanism has already been proposed by Dhalla *et al.*<sup>9</sup> for monoamine oxidase and alkaline phosphatase.

These results suggest that the inhibition of GR by IOP can increase the oxidative stress resulting from isoproterenol oxidation. In fact, the inhibition of GR reduces the capacity of the cell to restore the physiological levels of GSH, which may be depleted as a result of its antioxidant activity against free radicals and quinone products of ISO oxidation (Figure 8).

In conclusion, the present study shows that IOP inhibit GR activity. This inhibition appears to result from a partial ISO autoxidation and seems to increase with increasing ISO oxidation levels until enzyme saturation occurs. This inhibitory effect appears to be competitive with respect to GSSG and the GR sulfhydryl groups at the GSSG active site seem to be crucial to this effect. The inhibitory GR effect of IOP is a toxic effect, which may be related to catecholamine autoxidation.

#### *Acknowledgements*

This work received financial support from "Fundação para a Ciência e Tecnologia" and was conducted under the PRAXIX XXI Program (Project PRAXIX/PSAU/C/SAU/19/96).

## References

- [1] N. Kaplowitz, T.Y. Aw and M. Ookhtens (1985) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 715.
- [2] H. Sies, R. Brigelius and T.P.M. Akerboom (1983) In *Function of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects* (Ed. Larrson, A.) pp. 51–65. New York; Raven Press.
- [3] D.J. Vander Jagt, L.A. Hunsaker, T.J. Vander Jagt, M.S. Gomez, D.M. Gonzales, L.M. Deck and R.E. Royer (1997) *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1133.
- [4] D.J. Worthington and M.A. Rosemeyer (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 231.
- [5] J. Lopez-Barea and C. Lee (1979) *Eur. J. Biochem.*, **98**, 487.
- [6] E.F. Reynolds (1993) *Martindale, The Extra Pharmacopoeia*. London: The Pharmaceutical Press.
- [7] B.B. Hoffman and R.J. Lefkowitz (1996) In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Eds. Hardmann, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G.) pp. 199–248. New York; McGraw-Hill.
- [8] H. Rupp, K.S. Dhalla and N.S. Dhalla (1994) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **24**, S16.
- [9] N.S. Dhalla, J.C. Yates, B. Naimark, K.S. Dhalla, R.E. Beamish and B. Ostadal (1992) In *Cardiovascular Toxicology* (Ed. Acosta, D.) pp. 239–281. New York; Raven Press.
- [10] K. Ramos and D. Acosta (1989) In *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (Eds. Miquel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H.) Vol. 2, pp. 177–185. Florida; CRC.
- [11] K.S. Dhalla, H. Rupp, R.E. Beamish and K.S. Dhalla (1996) *Cardiovas. Drugs Ther.*, **10**, 231.
- [12] A.P. Ithayarasi and C.S.S. Devi (1997) *Med. Sci. Res.*, **25**, 333.
- [13] D.A. Bironaite, N.K. Cenas and J.J. Kuly (1991) *Z. Naturf.*, **46c**, 966.
- [14] T.G. Hastings, D.A. Lewis and M.J. Zigmond (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **93**, 1956.
- [15] D.C. Liebler and D.J. Reed (1997) In *Free Radical Toxicology* (Ed. Wallace, K.B.) pp. 141–171. Washington; Taylor & Francis.
- [16] H.P. Misra and I. Fridovich (1972) *J. Biol. Chem.*, **217**, 3170.
- [17] S. Baez, J. Segura-Aguilar, M. Widersten, A. Johanson and B. Mannervik (1997) *Biochem. J.*, **324**, 25.
- [18] O. Terland, T. Flatmark, A. Tangeras and M. Gronberg (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 1731.
- [19] C. Foppoli, R. Coccia, C. Cini and M.A. Rosei (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 200.
- [20] M.D. Hawley, S.V. Tatawawadi, S. Piekarski and R.N. Adams (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 447.
- [21] D.A. Bironaite, N.K. Cenas and V.V. Lutsenko (1993) *UkrainskII BiokhimicheskII Zhurnal*, **65**, 97.
- [22] B. Van Ommen, J.H.T.M. Ploemen, J.J.P. Bogaards, T.J. Monks, S.S. Gau and P.J. Van Bladeren (1991) *Biochem. J.*, **276**, 661.
- [23] T.J. Monks and S.S. Lau (1992) *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 243.
- [24] J.S. Friedenwald and H. Heniz (1942) *J. Biol. Chem.*, **146**, 411.
- [25] A.B. Anderson (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 110.
- [26] T. Ebina, Y. Toya, N. Oka, C. Schwencke, J. Kawabe and Y. Ishikawa (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 1247.
- [27] H.L. White and J.C. Wu (1975) *Biochem. J.*, **145**, 135.
- [28] S. Takeo, L. Fliegel, R.E. Beamish and N.S. Dhalla (1980) *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 559.
- [29] J. Gutierrezcorrea and A.O.M. Stoppani (1997) *Free Rad. Res.*, **27**, 543.
- [30] G.L. Gilliland (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 875.
- [31] M. Styblo, S.V. Serves, W.R. Cullen and D.J. Thomas (1997) *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 27.

**5.2 Determinação simultânea da GSH e GSSG em suspensões de hepatócitos e de cardiomiócitos isolados de rato por HPLC com detector electroquímico**

# Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection

Fernando Remião, Helena Carmo, Félix Carvalho and Maria L. Bastos

ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050/047 Porto, Portugal

Received 14 February 2000; accepted 3 March 2000

**ABSTRACT:** Glutathione and glutathione disulphide constitute an essential thiol redox system present in the cell. The balance in favour of the latter is an indication of oxidative stress. Glutathione and glutathione disulphide quantification in isolated cells may therefore be essential for the evaluation of mechanistic and comparative studies of toxic xenobiotics. In this study, a rapid and sensitive isocratic reverse-phase high-performance liquid chromatographic method using coulometric detection was implemented for the simultaneous detection of glutathione and glutathione disulphide, in freshly isolated hepatocytes and cardiomyocytes of the rat. The method implemented proved to be effective for the measurement of glutathione and glutathione disulphide in control conditions and for the detection of variations in this redox system, induced by *tert*-butylhydroperoxide. *tert*-Butylhydroperoxide is an organic peroxide, which has been used as a model molecule for inducing oxidative stress in isolated cells. A comparative study with a previously published HPLC-electrochemical detection method was performed. Copyright © 2000 John Wiley & Sons, Ltd.

## INTRODUCTION

Glutathione is a tripeptide composed of glutamate, cysteine and glycine. Its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms constitute the major thiol redox system of the cells, providing protection against electrophilic species and oxidative stress. The GSSG/GSH balance in the cell is an important parameter, which gives a good indication of the thiol oxidative status, since cellular glutathione is maintained mainly in its reduced form (Kaplowitz *et al.*, 1985). Thus, the simultaneous determination of GSH and GSSG can be of major importance for the study of the pro-oxidant effects of xenobiotics and/or disease states.

Although numerous methods have been developed for the quantification of thiols, reports on GSH and GSSG simultaneous determination in biological samples are less common. The majority are HPLC methods with UV/vis (Mertens *et al.*, 1991; Jayatilleke and Shaw, 1993), fluorescent (Leroy *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995) or amperometric detection (Morier-Teissier *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1994). However, most of these methods have the disadvantage of requiring pre- or post-column derivatization (Mertens *et al.*, 1991; Leroy *et al.*, 1993;

Yang *et al.*, 1995), GSSG indirect evaluation after reduction to GSH (Carvalho *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995) or poor sensitivity for GSSG (Mertens *et al.*, 1991; Jayatilleke and Shaw, 1993).

Electrochemical detectors are usually operated in the amperometric mode, in which the eluent flows by the electrode surface and typically only between 5 and 15% of the analyte is electrolysed. However, in the coulometric mode, the eluent flows through a porous electrode resulting in a higher fraction of the analyte being electrolysed (10–20 times more). By using the coulometric detector, a larger amount of the analyte is electrolysed without a corresponding increase in background noise, which results in enhanced sensitivity. Furthermore, most of the oxidizable contaminants can be eliminated by placing a guard-cell and a coulometric cell in series before the analytical cell. Thus, the use of HPLC with coulometric dual-channel detectors provides the high sensitivity and specificity required for thiol analysis in biological samples (Sofic *et al.*, 1991), and selection of the appropriate potentials in the flow cells eliminates many of the interferences caused by electroactive components present in complex samples (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994). Although there are some reports of GSH and GSSG simultaneous determination with HPLC-coulometric detection (Harvey *et al.*, 1989; Sofic *et al.*, 1991; Krien *et al.*, 1992; Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995; Lakritz *et al.*, 1997), to our knowledge this is the first time it has been reported in isolated cells, an important achievement for mechanistic studies.

\*Correspondence to: F. Remião, ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050/047 Porto, Portugal.  
E-mail: remiao@mail.ff.up.pt

**Abbreviations used:** GSH; GSSG; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide.  
Contract/grant sponsor: Fundação para a Ciência e Tecnologia.

*tert*-Butylhydroperoxide (*t*-BHP) is an organic peroxide, which is similar to short-chain lipidic peroxides produced as a result of normal cellular metabolism or oxidative injury elicited by xenobiotics. Oxidative stress induced by *t*-BHP has been widely studied in isolated hepatocytes (Eklow *et al.*, 1984; Jewell *et al.*, 1986; Joyeux *et al.*, 1990; Shertzer *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1995) as well as in isolated cardiomyocytes (Timerman *et al.*, 1990; Daly *et al.*, 1991; Vlessis *et al.*, 1991; Castro and Bhatnagar, 1993; Andersson *et al.*, 1996). Loss of cell viability, increase of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$ , nucleotide degradation, GSH oxidation and lipid peroxidation are the highlights of *t*-BHP effect. In the present paper *t*-BHP-induced changes in GSH and GSSG status are evaluated by the HPLC-coulometrical detection method implemented in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes. GSSG was also assayed using a previously published methodology (Carvalho *et al.*, 1994).

## EXPERIMENTAL

**Isolation of adult rat cardiomyocytes.** The isolation apparatus used was very similar to that described by Moldéus *et al.*, in 1978, for the isolation of hepatocytes. A P100 pipette tip with a rim fixed by heat was used as cannula. The system was prepared to provide a perfusion efflux from the cannula at a rate of 10 ml/min and at 37°C.

The perfusion buffer was a modified Krebs–Henseleit solution containing (mM) 102 NaCl, 4.2 KCl, 1.0  $\text{MgSO}_4$ , 10 glucose, 11 HEPES, 12.5  $\text{NaHCO}_3$  and 0.9  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . All the solutions were bubbled with carbogen gas (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) before and during the isolation procedure. pH was corrected to  $7.2 \pm 0.05$ .

Male Wistar rats weighing 175–225 g (8–10 weeks) were used. 500 IU heparin/100 g body weight were administered (i.p.) 10 min before diethylether induction of anaesthesia. The thoracic cavity was opened and the heart rapidly removed and bathed in the modified Krebs–Henseleit solution supplemented with heparin (50 IU/mL) and 0.6 mM  $\text{CaCl}_2$ , at 37°C for 30 s to expel the blood. The heart was cannulated through the aorta and the perfusion was initiated with the modified Krebs–Henseleit solution for 5–7 min in open circuit. Following this first step a perfusion with the modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 45 mg/50 mL collagenase B (Roche, batch 12379944) and 7 mg/50 mL protease type XIV (Sigma, batch 78H0985) was carried out in closed circuit. This perfusion ends usually after 7–10 min when the heart appears soft, pale and with a drop shape. At this point the heart was removed from the perfusion system and gently cut into small pieces with scissors and forceps. The digestion was completed with gentle suction, using a plastic Pasteur pipette until no pieces of tissue were visible in suspension. The suspension was then filtered and centrifuged at 300g for 2 min. After discarding the supernatant the cells were washed with modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . Two more centrifugations were done. Finally the cells were diluted to  $2.5 \times 10^5$  rod-shaped cells/mL and incubated with this last solution. Incubations were carried out in flat-bottom plastic flasks at 37°C in a carbogen atmosphere

with occasional shaking. A 30 min preincubation of cells was performed before *t*-BHP addition. *t*-BHP was assayed at 0.1, 0.5 and 1 mM, during a 30 min incubation period.

**Isolation of adult rat hepatocytes.** Isolation of hepatocytes was performed by collagenase perfusion as previously described (Moldéus *et al.*, 1978). Adult male Wistar rats, weighing 250–300 g, were used. Incubations were performed in a oscillating water bath (90 oscillations/min) at 37°C, using  $1 \times 10^6$  cells/mL in Krebs–Henseleit buffer supplemented with 25 mM HEPES (pH 7.4) and saturated with carbogen. A 30 min preincubation of cells was performed before *t*-BHP addition. *t*-BHP was assayed at 0.1, 0.5 and 1 mM, during a 30 min incubation period.

**HPLC-electrochemical detection apparatus and procedure.** HPLC analysis was performed using an autosampling injector Gilson model 231–401, a pump Knauer K-1001, a Waters Spherisorb S5 ODS2 column  $250 \times 4.6$  mm, a Waters Spherisorb S5 ODS2 guard-column  $30 \times 4.6$  mm and an electrochemical detector Esa Coulochem II, equipped with a guard cell (ESA 5020) and an analytical cell (ESA 5010). The potential settings of the Coulochem II multidetector were: guard cell, +1.0 V; detector 1, +0.45 V and detector 2, +0.95 V. A current of 1–10  $\mu\text{A}$  full-scale was used.

The mobile phase consisted of 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 mM 1-octanesulfonic acid and 2.2% acetonitrile adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid, and degassed daily with a helium stream. An isocratic elution was performed at 1 mL/min, at room temperature. A Compaq computer fitted with Millennium<sup>32</sup> software from Waters processed the chromatographic data. Occasionally an elution overnight with 80% acetonitrile at 0.2 mL/min was done to clean the electrodes. This procedure was done between two elutions with water at 1 mL/min for at least 1 h in order to avoid precipitations within the HPLC system.

Linearity of the detector response was verified by injecting GSH and GSSG standard solutions freshly prepared in 5% perchloric acid. Detector response for each compound was assessed daily from standard curves and regular standard injections between samples.

**GSH and GSSG assay-proposed method.** Aliquots of cell suspensions were precipitated with perchloric acid (5% final acid concentration) and centrifuged for 10 min at 16,000g in a refrigerated centrifuge. The supernatant (20  $\mu\text{L}$ ) was injected into the HPLC system for GSH and GSSG determination.

**GSSG assay-glutathione reductase treatment method.** GSSG was measured after enzymatic reduction to GSH as previously implemented (Carvalho *et al.*, 1994) and applied (Fernandes *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1996, 1997, 1999; Appell *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 1997). Briefly, cell suspension aliquots were sonicated (Vibracell 375 W sonicator, Sonics & Materials, Danbury, USA) for 12 s at medium intensity in order to disrupt the cells. These aliquots were then incubated with glutathione reductase (GR; six units) and NADPH (0.2 mM) during 3 min for reduction of GSSG to GSH. This incubation was stopped by addition of perchloric acid (5% final acid concentration). After centrifugation (16,000g/10 min), the supernatant (20  $\mu\text{L}$ ) was injected into the HPLC system for total glutathione (GSH +

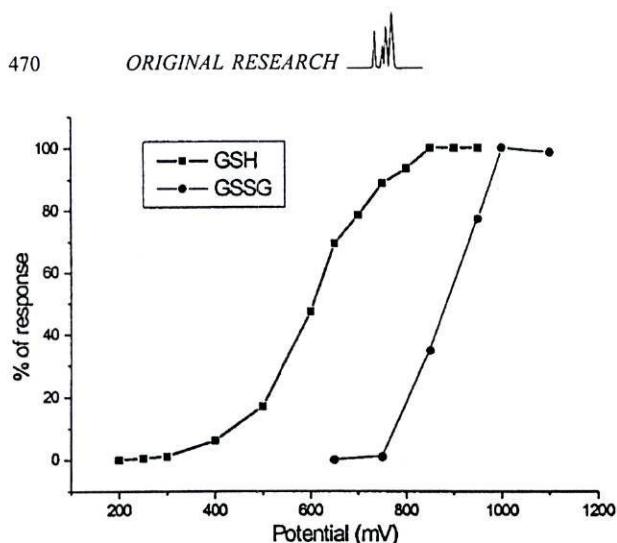


Figure 1. Hydrodynamic voltammograms for GSH and GSSG.

GSSG) determination. GSSG was then calculated by subtracting GSH from total glutathione.

**N-Ethylmaleimide treatment of cell suspension.** The assays were performed as previously described (Carvalho *et al.*, 1994). Cell suspensions were treated with *N*-ethylmaleimide in a final concentration of 5 mM and incubated for 2 min. The incubation was stopped by addition of perchloric acid (5% final acid concentration). After centrifugation, the supernatant (20  $\mu$ L) was injected into the HPLC system.

**Standard addition method.** Hepatocyte suspension aliquots were spiked with GSH and GSSG in final concentrations of 1, 2 and 4  $\mu$ g/mL. Cardiomyocyte suspension aliquots were spiked with GSH and GSSG in final concentrations of 0.5, 1 and 2  $\mu$ g/mL. Extraction and injection into HPLC were made as described before.

**Statistical analysis.** Data were analysed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Scheffe test. All

results were assumed to be significantly different when  $P \leq 0.05$ . All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD).

## RESULTS

### Chromatographic analysis

The hydrodynamic voltammograms for GSH and GSSG are shown in Fig. 1. A response due to GSH oxidation was observed for potentials higher than +0.25 V and reached a plateau at +0.85 V. However, just before the electrochemical response reached saturation it showed a further voltage-dependent increase. This behaviour of the GSH response curve has already been described (Krien *et al.*, 1992). For GSSG the initial response was observed at +0.75 V and the plateau was reached at +1 V.

The standard curves for GSH and GSSG at 0, 10, 20 and 40 ng in column showed correlation coefficients higher than 0.99. The limit of detection was 40 and 300 pg in column for GSH and GSSG, respectively.

In order to confirm the identity of the GSH and GSSG peaks, two different cell treatments were made. Treatment of hepatocytes with *N*-ethylmaleimide resulted in the disappearance of GSH peak as can be seen in Fig. 2(A), and treatment of these cells with GR and NADPH resulted in the almost complete disappearance of the GSSG peak as can be seen in Fig. 2(B). Similar results were observed for cardiomyocytes (data not shown).

In the accuracy study, which was carried out by the standard addition method, the mean of recovery in four assays is described in Table 1.

### Effect of *t*-BHP in cell thiol status

In Fig. 3 the GSH and GSSG status in hepatocytes is presented after 30 min of *t*-BHP incubation at 0.1, 0.5 and

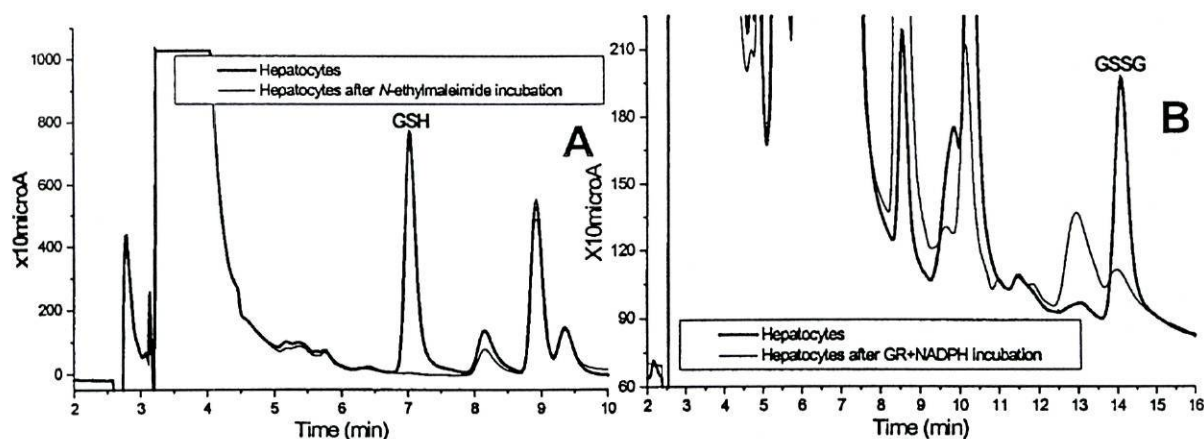


Figure 2. Typical chromatograms of isolated cell samples. (A) GSH peak of control hepatocytes and *N*-ethylmaleimide treated hepatocytes. (B) GSSG peak of control hepatocytes and GR + NADPH treated hepatocytes.

**Table 1. Recovery of GSH and GSSG in hepatocytes and in cardiomyocytes (n = 4)**

Cardiomyocytes			Hepatocytes		
Spiked final concentration (µg/2.5 × 10 <sup>5</sup> )	GSH recovery (%)	GSSG recovery (%)	Spiked final concentration (µg/1 × 10 <sup>6</sup> )	GSH recovery (%)	GSSG recovery (%)
2	103.5 ± 7.0	99.4 ± 2.7	4	95.5 ± 6.5	103.2 ± 14.3
1	99.2 ± 4.1	101.5 ± 3.5	2	103.0 ± 5.1	98.6 ± 18.0
0.5	95.4 ± 1.4	79.7 ± 1.1	1	117.8 ± 11.0	100.2 ± 13.8
Mean ± SD	99.3 ± 5.5	93.5 ± 10.6	Mean ± SD	105.4 ± 12.0	100.4 ± 14.1

1 mM vs control. As expected, the GSH was significantly depleted and the GSSG increased in a concentration-dependent manner after 30 min of *t*-BHP incubation. GSSG quantification was performed by both methods and no significant differences in GSSG values for the two methods were observed. However, a tendency for lower GSSG levels was observed when determined by the indirect method with GR treatment.

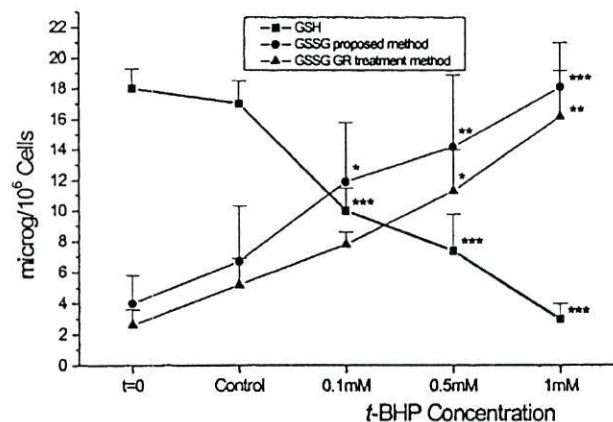
The same study in cardiomyocytes is presented in Fig. 4. A drastic depletion in the GSH content was observed at all *t*-BHP concentrations studied. Accordingly, the GSSG content was also increased at all concentrations. No differences were observed in the results obtained with the two methods. However, at 1 mM of *t*-BHP a decrease in GSSG content was observed when determined by the GR treatment method. As this value was calculated by subtraction of GSH content after reduction of GSSG by GR, it can be presumed there is an impairment of GSSG reduction by the medium conditions. In fact, some residual peaks of GSSG could be observed in GR treated samples, mainly in 0.5 and 1 mM *t*-BHP samples. Additionally, total glutathione decreased in 1 mM *t*-BHP treated cells. Assuming that total glutathione in

1 mM *t*-BHP treated cells is the same as in control, 0.1 and 0.5 mM of *t*-BHP, the GSSG value of 1 mM *t*-BHP treated cells can be corrected to a value similar to that obtained with the proposed method.

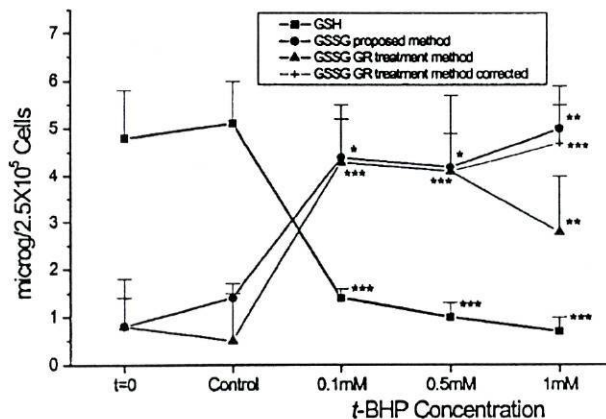
The GSSG/GSH balance in cardiomyocytes and in hepatocytes in the *t*-BHP assay is shown in Fig. 5. As expected, an increased ratio of GSSG/GSH was observed at all *t*-BHP concentrations studied both in the hepatocyte and in the cardiomyocyte suspensions but only at 1 mM of *t*-BHP a significant difference from the control was observed.

**DISCUSSION**

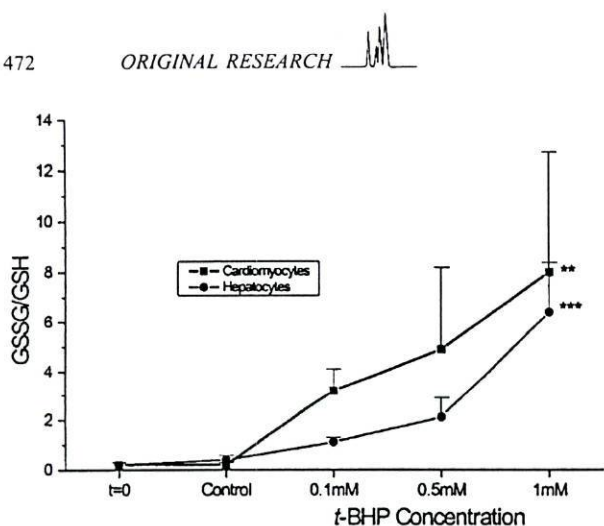
The analysis of the GSH and GSSG voltammograms (see Fig. 1) suggests that, in the present conditions, the thiol group of GSH is oxidized by the electrode at potentials above +0.25 V and the amine group(s) oxidation of GSH and GSSG occurs at a potential above +0.75 V. In fact, an inflection of the GSH voltammogram curve is observed from +0.8 to +0.85 V, which is the starting point



**Figure 3.** GSH and GSSG status in control and *t*-BHP treated hepatocytes (0.1, 0.5 and 1 mM) before and after 30 min of incubation. \*Values of *t*-BHP treated hepatocytes compared with control. One symbol, *P* ≤ 0.05; two symbols, *P* ≤ 0.01; three symbols, *P* ≤ 0.001. Data are expressed as mean ± SD.



**Figure 4.** GSH and GSSG status in control and *t*-BHP treated cardiomyocytes (0.1, 0.5 and 1 mM) before and after 30 min of incubation. \*Values of *t*-BHP treated cardiomyocytes compared with control. One symbol, *P* ≤ 0.05; two symbols, *P* ≤ 0.01; three symbols, *P* ≤ 0.001. Data are expressed as mean ± SD.



**Figure 5.** GSSG/GSH status in control and *t*-BHP treated hepatocytes and cardiomyocytes (0.1, 0.5 and 1 mM), before and after 30 min of incubation. \* Values of *t*-BHP treated hepatocytes and cardiomyocytes compared with control. One symbol,  $P \leq 0.05$ ; two symbols,  $P \leq 0.01$ ; three symbols,  $P \leq 0.001$ . Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

potential for GSSG detection. Therefore, the potential in detector 1 was set at the base of the GSH voltammogram (+0.45 V) to reduce sample background currents and reduce sample interferences in the chromatogram. The potential in detector 2 was set near the potential at which the GSSG voltammogram reached the plateau providing maximum sensitivity for GSH and GSSG (+0.95 V). The guard cell placed between the pump and the injector was set at +0.05V higher than detector 2 to oxidize the mobile phase, thereby decreasing the background current measured by the analytical cell.

Linearity of the detector was verified daily from standard curves. When a high number of samples were analysed, a decay in detector response was sometimes observed during the week. This occurs as result of thiol adsorption on the electrode. In order to prevent this phenomenon, samples were diluted for thiol levels lower than 40 ng in column. A simple sequential electrode cleaning with water, acetonitrile 80% and finally water again restored the efficiency of the system.

The standard addition method and the treatment of hepatocytes and cardiomyocytes with both *N*-ethylmaleimide and GR and NADPH, confirmed the identity of GSH and GSSG chromatographic peaks. The addition of GSH and GSSG to the cells resulted in the increase of the respective peaks. *N*-Ethylmaleimide, which reacts with free sulfhydryl groups (Carvalho *et al.*, 1994), caused the disappearance of the GSH peak [see Fig. 2(A)], and treatment of cells with GR and NADPH, which catalyses the reduction of GSSG to GSH, caused the almost complete disappearance of the GSSG peak [see Fig. 2(B)] with the correspondent increase of the GSH peak. The addition method confirmed a good recovery (from  $79.7 \pm 1.1$  to  $117.8 \pm 11.0$ ) for the concentrations tested, which

were similar to the normal concentrations found in the cells.

GSH is easily measured by electrochemical detection. Since the thiol group is oxidised at a relative low potential, a good sensitivity and few interferences characterise GSH determination. However, electrochemical determination of GSSG is more difficult. The GSSG amine group(s) oxidation seems to occur only at high potentials (Krien *et al.*, 1992), which results in a lower signal/noise balance for GSSG detection and more probability of interferences. The coulometric detector, by its characteristics of high oxidation surface, ameliorates the signal/noise balance, enabling GSSG detection with good sensitivity. Since GSSG determination is critical in electrochemical glutathione status evaluation, a previously published methodology was used to compare results. No significant differences were found in GSSG determination between the two methods. However, a tendency to obtain lower levels of GSSG occurs with the GR treatment method. This was more evident at higher levels of GSSG, which occurs in hepatocytes. Also, the incubation of cardiomyocytes with 1 mM of *t*-BHP resulted in lower concentration of GSSG when determined by the GR treatment method. These results may be explained by a decreased activity of GR by aggregation in extremely oxidative conditions (Worthington and Rosemeyer, 1976; Remião *et al.*, 1999). Another explanation is a competition between GR activity for the reduction of GSSG and the GSH oxidation by *t*-BHP in the medium during GR + NADPH incubation. It seems that the GSSG enzymatic reduction to GSH for GSSG quantification may have some pitfalls. In fact, in very stressful conditions or in the presence of GR inhibitors the indirect methodology can result in lower calculated levels of GSSG. On the other hand, the use of a coulometric detector proved to be a better methodology. It produces comparable results with the previously published methodology, it is easier, quicker and less expensive to perform and finally it is independent of enzymatic activities, which can interfere in GSSG reduction for posterior detection.

*t*-BHP is an organic peroxide model molecule, which induces oxidative stress. In cells it can be reduced to the respective alcohol by glutathione peroxidase (Eklow *et al.*, 1984). Also, in the presence of cytochrome P450 or iron it can form peroxy and alkoxy radicals (Cadenas and Sies, 1982). Both the activity of glutathione peroxidase and radicals induce GSH oxidation. All studies in hepatocytes (Jewell *et al.*, 1986; Shertzer *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1995) or cardiomyocytes (Timerman *et al.*, 1990) with *t*-BHP report depletion of GSH and GSSG production. Thus, the observed GSH oxidation and the increased GSSG/GSH balance are in accordance with the literature and reflect the *t*-BHP oxidative action.

In conclusion, the proposed methodology for thiol quantification with coulometric detection proved to be

sensitive, specific and adequate for GSH and GSSG simultaneous determination in isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes. The sample treatment described in this method was simple, rapid and produced good analyte recovery, which allows it to be used in routine analysis. *t*-BHP, as expected, induced rapid and dramatic oxidative stress at concentrations higher than 0.1 mM in isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes.

## Acknowledgements

This work received financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia and was conducted under the PRAXIS XXI Program (project PRAXIS/PSAU/C/SAU/19/96).

## REFERENCES

- Andersson B, Vidal R, Sundberg M, Rajs J, Sótonyi P. 1996. Hydroperoxide-induced nucleotide degradation and adenosine formation in isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* **106**:39.
- Appell H-J, Duarte JA, Gloser S, Remião F, Carvalho F, Bastos ML, Soares JMC. 1997. Administration of tourniquet. II Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema. *Archives in Orthopedic Trauma Surgery* **116**:101.
- Bastos ML, Carvalho F, Remião F, Mendes ME, Ferreira MA, Soares ME, Timbrell JA. 1997. Changes in taurine levels in response to repeated administration of the beta-2-agonist salbutamol in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* **20**:33.
- Cadenas E, Sies H. 1982. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by *tert*-butyl hydroperoxide. *European Journal of Biochemistry* **124**:349.
- Carvalho F, Fernandes E, Remião F, Bastos ML. 1999. Effect of *d*-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defences. *Archives in Toxicology* **73**:83.
- Carvalho F, Remião F, Amado F, Domingues P, Correia AJF, Bastos ML. 1996. *d*-Amphetamine interaction with glutathione in freshly isolated rat hepatocytes. *Chemical Research and Toxicology* **9**:1031.
- Carvalho F, Remião F, Soares ME, Catarino R, Queiroz G, Bastos ML. 1997. *d*-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Archives in Toxicology* **71**:429.
- Carvalho FD, Remião F, Vale P, Timbrell JA, Bastos ML, Ferreira MA. 1994. Glutathione and cysteine measurement in biological samples by HPLC with a glassy carbon working detector. *Biomedical Chromatography* **8**:134.
- Castro GJ, Bhatnagar A. 1993. Effect of extracellular ions and modulators of calcium transport on survival of *tert*-butyl hydroperoxide exposed cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* **27**:1873.
- Daly MJ, Young RJ, Britnell SL, Nayler WG. 1991. The role of calcium in the toxic effects of *tert*-butyl hydroperoxide on adult rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* **23**:1303.
- Duarte JA, Gloser S, Remião F, Bastos ML, Soares JMC, Appell H-J. 1997. Administration of tourniquet. I Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperused skeletal muscle? *Archives of Orthopedic Trauma Surgery* **116**:97.
- Eklow L, Moldéus P, Orrenius S. 1984. Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *European Journal of Biochemistry* **138**:459.
- Fernandes E, Carvalho F, Remião F, Bastos ML, Pinto M, Gottlieb O. 1995. Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against *tert*-butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated rat hepatocytes-comparison with silybin. *Pharmaceutical Research* **12**:1756.
- Harvey PRC, Ilson RG, Strasberg SM. 1989. The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clinica Chimica Acta* **180**:203.
- Jayatilke E, Shaw S. 1993. A high-performance liquid chromatographic assay for reduced and oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* **214**:452.
- Jewell SA, Monte DD, Richelmi P, Bellomo G, Orrenius S. 1986. *tert*-Butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated hepatocytes: contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *Journal of Biochemical Toxicology* **1**:13.
- Joyeux M, Rolland A, Fleurentin J, Mortier F, Dorfman P. 1990. *tert*-butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Medica* **56**:171.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* **25**:715.
- Krien PM, Margov V, Kermici M. 1992. Electrochemical determination of femtomole amounts of free reduced and oxidized glutathione. *Journal of Chromatography B* **576**:255.
- Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. 1997. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Analytical Biochemistry* **247**:63.
- Leroy P, Nicolas A, Thioudellet C, Oster T, Wellman M, Siest G. 1993. Rapid liquid-chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomedical Chromatography* **7**:86.
- Mertens K, Rogiers V, Sonck W, Vercautere A. 1991. Measurement of reduced and oxidized glutathione in cultures of adult rat hepatocytes. *Journal of Chromatography B* **103**:149.
- Moldéus P, Hogberg J, Orrenius S. 1978. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymology* **52**:60.
- Morier-Teissier E, Mestdagh N, Bernier JL, Hénichart JP. 1993. Reduced and oxidized glutathione ratio in tumor cells: comparison of two measurement methods using HPLC and electrochemical detection. *Journal of Liquid Chromatography* **16**:573.
- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. 1999. Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition* **15**:47.
- Rodríguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J. 1994. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **656**:311.
- Shertzer HG, Bannenberg GL, Zhu H, Liu R-M, Moldéus P. 1994. The role of thiols in mitochondrial susceptibility to iron and *tert*-butyl hydroperoxide-mediated toxicity in cultured mouse hepatocytes. *Chemical Research and Toxicology* **7**:358.
- Smith NC, Dunnett M, Mills PC. 1995. Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* **673**:35.
- Sofic E, Riederer P, Burger R, Gsell W, Heuschneider G. 1991. Determination of glutathione, glutathione disulphide, ascorbic acid and dihydroascorbic acid in tissues by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **339**:258.
- Timerman AP, Altschuld RA, Hohl CM, Brierley GP, Merola AJ. 1990. Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* **22**:565.
- Vlössis AA, Muller P, Bartos D, Trunkey D. 1991. Mechanism of peroxide-induced cellular injury in cultured adult cardiac myocytes. *FASEB Journal* **5**:2600.
- Worthington DJ, Rosemeyer MA. 1976. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *European Journal of Biochemistry* **67**:231.
- Yang C-S, Chou S-T, Lin-Liu, Tsai P-J, Kuo J-S. 1995. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B* **674**:23.

### 5.3 Estudos de cardiotoxicidade em suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao Ca<sup>2+</sup>, isolados de rato adulto

## Letter to the Editor

### CARDIOTOXICITY STUDIES USING FRESHLY ISOLATED CALCIUM-TOLERANT CARDIOMYOCYTES FROM ADULT RAT

Dear Editor:

Cardiotoxicity studies using isolated heart cells are becoming increasingly advocated as a supplement to, and sometimes as a replacement for, whole heart or whole animal experimentation (Haworth et al., 1990). Different procedures have been developed in order to obtain calcium-tolerant cardiomyocytes, in which the most important step is the enzymatic digestion. Different perfusion solutions for enzymatic digestion have been reported either with collagenase alone (in fact, there is always some contamination with other proteases) (Andersson et al., 1996) or in association with other enzymes, such as trypsin (Haworth et al., 1980) and nonspecific proteases (El-Shenawy and Abdel-Rahman, 1993). In 1993, Le Guennec et al. reported an association of crude collagenase with a nonspecific protease (pronase E) which seemed to be very effective in the isolation of viable cells (Guennec et al., 1993); however, the yield of isolated cells was still very low. The present letter describes a cardiomyocyte isolation procedure modified from that reported by Le Guennec et al. in 1993. The introduced modifications allowed one to obtain a higher number of viable cells required to conduct toxicological studies. The principal changes introduced were the extension of the enzymatic perfusion and the inclusion of a mechanical digestion.

The isolation apparatus was similar to that described by Moldéus et al. (1978) for the isolation of hepatocytes. A P100 pipette tip with a rim fixed by heat was used as cannula. The system was adjusted to provide a perfusion efflux from the cannula at a rate of 10 ml/min at 37° C. The perfusion buffer was a modified Krebs–Henseleit solution containing 102 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 10.0 mM glucose, 12.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (all Merck, Darmstadt, Germany), and 11.0 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane-sulfonic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). All the solutions were bubbled with carbogen gas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) before and during the isolation procedure. The pH was corrected to 7.2 ± 0.05. Male Wistar rats, weighing 175–225 g (8–10 wk) (Instituto Gulbenkian, Lisbon, Portugal) were used. About 500 IU heparin (Sigma)/100 g body weight were administered (intraperitoneally) 10 min before diethylether induction of anesthesia. The thoracic cavity was opened and the heart rapidly removed and bathed in the modified Krebs–Henseleit solution supplemented with heparin (50 IU/ml) and 0.6 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck), at 37° C for at least 30 s to expel the blood. The heart was cannulated through the aorta and immediately perfused with the modified Krebs–Henseleit solution for 5–7 min in open circuit. Following this first step, a perfusion with the modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 45 mg/50 ml collagenase B (batch 12379944, Roche, Carnaxide, Portugal) and 7 mg/50 ml protease type XIV (batch 78H0985, Sigma) was carried out in closed circuit. This perfusion is interrupted usually after 7–10 min when the heart appears soft, pale,

and with a drop shape. At this point the heart was removed from the perfusion system and gently cut into small pieces with scissors and forceps. The digestion was completed with gentle suction movements using a plastic Pasteur pipette until no pieces of tissue remained in suspension. The suspension was then filtered (350 mesh) and centrifuged at 300 × *g* for 2 min. After discarding the supernatant, the cells were washed and centrifuged with modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 0.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, and finally 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. The cells were then diluted to 2.5 × 10<sup>5</sup> rod-shaped cells/ml and incubated in Krebs–Henseleit solution supplemented with 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. Incubations were carried out in flat-bottom plastic flasks at 37° C in a carbogen atmosphere with occasional shaking. The cells were preincubated for 30 min before the assays.

Using this isolation procedure, a high number of rod-shaped cells was obtained (6–7 × 10<sup>6</sup>/heart). The rod-shaped cells corresponded to 70 ± 3% of the total cells in suspension. After 30 min of preincubation, a small decrease of rod-shaped cells to 66 ± 3% was observed. Figure 1 shows the change in cardiomyocyte viability during 4 h of incubation evaluated by two methods: morphological evaluation and lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay (*n* = 7 isolations). The number of rod-shaped cells decreased during the assay from 66 ± 3%, in the beginning, to 55 ± 7%, after 4 h of incubation; cell viability evaluated by the LDH leakage assay decreased from 86 ± 4% to 67 ± 6%. These data are consistent with the results obtained by others (Haworth et al., 1980; Farmer et al., 1983; Timerman et al., 1990; Viko et al., 1995; Andersson et al., 1996), but some of them used complex incubation solutions with amino acids, namely cysteine and taurine (Timerman et al., 1990; Viko et al., 1995), low levels of calcium in incubation solutions (Andersson et al., 1996), or different enzymes for heart digestion (Haworth et al., 1980; Farmer et al., 1983; Viko et al., 1995; Andersson et al., 1996).

The assessment of cardiotoxicity *in vivo* is often complicated by the presence of humoral, neuronal, and endocrine influences (Ramos and Acosta, 1994). Therefore, in the present *in vitro* model, no amino acids, hormones, or albumin were added to cell isolation or incubation solutions, preventing any interference of these compounds with those under study. Specially, amino acids like cysteine and taurine must be avoided because they can alter the results of toxicological studies. In fact, cysteine has a sulfhydryl group which can react as an antioxidant or be conjugated with electrophilic compounds (Remião et al., 1999). Taurine seems to protect the heart from calcium overload (Kramer et al., 1981) through the existence of a taurine/sodium cotransport system (Suleiman and Chapman, 1993; Suleiman, 1994). The use of low levels of calcium in the incubation medium of cardiomyocytes undermines the calcium role in toxic effects. Thus, it is important to use physiological calcium

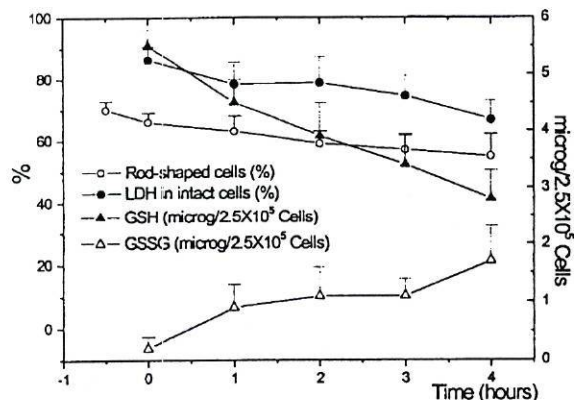


FIG. 1. Cardiomyocyte viability, and GSH and GSSG levels during 4 h of incubation at 37°C in a modified Krebs-Henseleit solution supplemented with 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>. The cardiomyocyte viability was determined by morphological evaluation and LDH leakage (results are presented as LDH in intact cells, % of total LDH). Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  isolations). LDH leakage was calculated as before (Fernandes et al., 1995). The rate of change in absorbance at 340 nm due to NADH oxidation was recorded, in triplicate, in a 96-well plate reader. GSH and GSSG were quantified by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (Remião et al., 2000).

concentration. The choice of the digestive enzymes was based on their previous use in isolations for electrophysiological studies (Guenec et al., 1993; Cazorla et al., 1997; Pascarel et al., 1998; Pascarel et al., 1999). For the electrophysiological studies, these enzymes should not injure the membrane receptors, which can also be very important for the evaluation of the cardio toxic mechanisms.

In Fig. 1 is also represented the cardiomyocyte glutathione content during the 4 h of incubation ( $n = 7$  isolations). The reduced form of glutathione (GSH) decreased from  $5.5 \pm 0.3 \mu\text{g}/2.5 \times 10^5$  cells to  $2.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/2.5 \times 10^5$  cells after 4 h of incubation, and oxidized form of glutathione (GSSG) increased from  $0.2 \pm 0.2 \mu\text{g}/2.5 \times 10^5$  cells to  $1.7 \pm 0.6 \mu\text{g}/2.5 \times 10^5$  cells in the same period of time. These results seem to indicate the existence of some degree of oxidative stress during the incubation. One may consider that after 4 h of incubation the cells become extremely vulnerable as can be expected after the GSH depletion; consequently, the toxicological results after this point in time may be unreliable.

In order to test our system, *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) was used. *t*-BHP is an organic peroxide similar to short chain lipidic peroxides, which are the outcome of normal cellular metabolism or oxidative injury elicited by xenobiotics. Oxidative stress induced by *t*-BHP has been widely studied on isolated rat hepatocytes (Eklow et al., 1984; Jewell et al., 1986; Joyeux et al., 1990; Shertzer et al., 1994; Fernandes et al., 1995). However, fewer studies were performed on isolated rat cardiomyocytes with this model molecule. Some studies concerning the oxidative stress induced by *t*-BHP in rat cardiomyocytes report thiol depletion (Andersson et al., 1996), GSH oxidation (Timerman et al., 1990; Bhatnagar, 1994), and lipid peroxidation (Timerman et al., 1990; Bhatnagar, 1994; Andersson et al., 1996; Gorbunov et al., 1998). However, some questions remain on the exact progression of events leading to myocyte hypercontracture in the presence of *t*-BHP, which can result from loss of sarcolemmal integrity (Timerman et

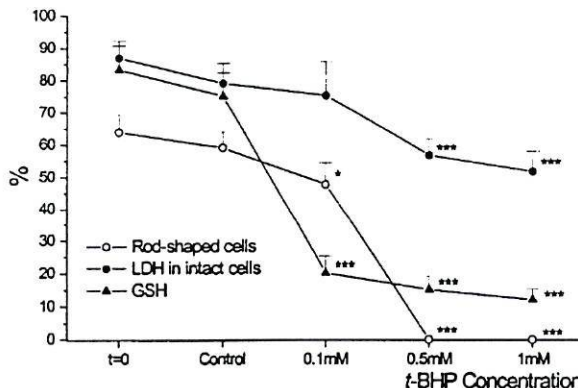


FIG. 2. Cardiomyocyte viability (morphological evaluation and LDH leakage) and percentage of GSH content from total glutathione in the control and *t*-BHP-treated cardiomyocytes (0.1, 0.5, and 1.0 mM), before and after 30 min of incubation. \* Compares values of *t*-BHP-treated cardiomyocytes with the control. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ . Data (mean  $\pm$  SD;  $n = 4$ ) were analyzed by one-way analysis of variance, followed by the Scheffé test.

al., 1990), ATP depletion (Bhatnagar, 1994), calcium overload (Daly et al., 1991), or ferrous-catalyzed free radical reactions (Castro and Bhatnagar, 1993).

Figure 2 shows the *t*-BHP-induced change in cardiomyocyte viability as determined by two methods: morphological evaluation and LDH leakage assay ( $n = 4$ ). *t*-BHP at 0.1 mM decreased the percentage of rod-shaped cells from  $59 \pm 5\%$  in the control to  $48 \pm 7\%$  ( $P < 0.05$ ), and at 0.5 and 1.0 mM all the cells became round-shaped (hypercontracture) ( $P < 0.001$ ). The viability, assessed by the LDH leakage, decreased from  $79 \pm 6\%$  in the control to  $57 \pm 5\%$  ( $P < 0.001$ ) and  $52 \pm 6\%$  ( $P < 0.001$ ) for *t*-BHP at 0.5 and 1.0 mM, respectively. No significant difference from control was observed at 0.1 mM of *t*-BHP. Figure 2 also represents the percentage of GSH content. GSH decreased from  $75 \pm 7\%$  for the control to  $20 \pm 5\%$  ( $P < 0.001$ ),  $15 \pm 4\%$  ( $P < 0.001$ ), and  $12 \pm 3\%$  ( $P < 0.001$ ) for *t*-BHP 0.1, 0.5, and 1.0 mM, respectively. The GSH was oxidized to GSSG since total glutathione (GSH + GSSG) was not modified for all *t*-BHP concentrations assayed (data not shown). Figure 3 exhibits the GSSG/GSH ratio for the three assayed concentrations. A very clear concentration-response relationship was obtained, with an increment of the GSSG/GSH ratio for increasing concentrations of the *t*-BHP. The GSSG/GSH ratio increased from  $0.2 \pm 0.1$  in the control to  $2.1 \pm 0.7$  ( $P < 0.05$ ),  $3.1 \pm 1.2$  ( $P < 0.01$ ), and  $3.9 \pm 1$  ( $P < 0.001$ ) in the 0.1, 0.5, and 1.0 mM *t*-BHP, respectively. Figure 3 also shows the effects on lipid peroxidation elicited by the *t*-BHP. Malondialdehyde equivalents content increased at 0.5 mM *t*-BHP ( $1.43 \pm 0.71 \text{ nmol}/2.5 \times 10^5$  cells) ( $P < 0.01$ ) and at 1.0 mM ( $1.44 \pm 0.63 \text{ nmol}/2.5 \times 10^5$  cells) ( $P < 0.01$ ) from the control ( $0.44 \pm 0.27 \text{ nmol}/2.5 \times 10^5$  cells). No significant difference from control was observed at 0.1 mM *t*-BHP.

The observed GSH oxidation at all *t*-BHP concentrations studied, the increased GSSG/GSH ratio in a very clearly *t*-BHP concentration-dependent manner, and the observed lipid peroxidation at 0.5 and 1.0 mM of *t*-BHP reflect the *t*-BHP oxidative effect. Hypercontracture of myocytes represents an irreversible disruption of myo-

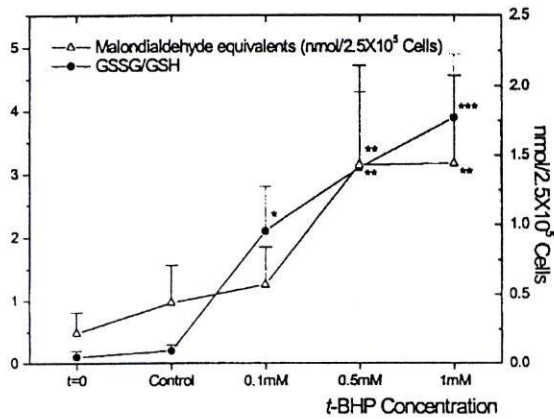


FIG. 3. GSSG/GSH status and lipid peroxidation measured by the thiobarbituric acid reactive substances assay in the control and *t*-BHP-treated cardiomyocytes (0.1, 0.5, and 1.0 mM), before and after 30 min of incubation. The extent of lipid peroxidation was measured at 535 nm as previously described (Fernandes et al., 1995). Results are expressed as nanomoles of malondialdehyde equivalents calculated using an extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5/M \text{ cm}$ . For comparisons made, see legend of Fig. 2.

fibril alignment and as such must be regarded as an indication of malfunction ultimately leading to cell and tissue death (Timerman et al., 1990). This malfunction is clearly distinct from sarcolemma disruption, which is assessed in our study by the LDH leakage assay. Considering the viability results (Fig. 2), all the cardiomyocytes treated with 0.5 and 1.0 mM *t*-BHP suffered hypercontraction. Nevertheless, sarcolemma integrity remained above 50%. These results eliminate the possibility of sarcolemma disruption as the reason for cell hypercontraction. GSH depletion in cells treated with 0.1 mM *t*-BHP was similar to that in cells treated with 0.5 and 1.0 mM *t*-BHP (Fig. 2). Notwithstanding, values of hypercontraction (Fig. 2) were higher in 0.5 and 1.0 mM than in 0.1 mM *t*-BHP-treated cells. Also, sarcolemma disruption and lipid peroxidation (Fig. 3) occur only in the 0.5 and 1.0 mM *t*-BHP-treated cells. These results seem to indicate that sarcolemma disruption induced by *t*-BHP occurs only when oxidative stress is high enough to produce lipid peroxidation. These results are consistent with those reported by Timerman et al. (1990), who reported a high correlation between lipid peroxidation and sarcolemma disruption. Furthermore, the poor correlation between GSH oxidation and hypercontraction seems to indicate a lower possibility of a direct effect of an oxidative mechanism in myofibril alignment for inducing cell hypercontraction. To our knowledge, this is the first report of a *t*-BHP study in isolated calcium-tolerant cardiomyocytes, in the absence of hormone or amino acids in the incubation medium. Thus, those possible interferences on the expression of the *t*-BHP toxic effects are prevented.

In conclusion, the method proposed for the isolation of freshly calcium-tolerant cardiomyocytes from the adult rat seems to be adequate for toxicological studies. A high number of rod-shaped cells is obtained, the cells are acceptably stable for 4 h in a medium free of amino acids or hormones and with a physiological calcium concentration. Studies with a model compound, which induces oxidative stress, produced results consistent with those found in the literature, enabling us to recommend the procedure as a model for

cardiotoxicological studies. *t*-BHP induces cardiomyocyte hypercontraction, which seems to be independent of sarcolemma disruption and not directly correlated with the presence of reactive oxidative species. The *t*-BHP-induced cell death by sarcolemma disruption seems to be correlated with the induction of lipid peroxidation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from "Fundação para a Ciência e Tecnologia" and was conducted under the PRAXIS XXI Program (Project PRAXIS/PSAU/C/SAU/19/96).

#### REFERENCES

- Andersson, B.; Vidal, R.; Sundberg, M.; Rajs, J.; Sótönyi, P. Hydroperoxide-induced nucleotide degradation and adenosine formation in isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* 106:39-48; 1996.
- Bhatnagar, A. Biochemical mechanism of irreversible cell injury caused by free radical-initiated reactions. *Mol. Cell. Biochem.* 137(1):9-16; 1994.
- Castro, G. J.; Bhatnagar, A. Effect of extracellular ions and modulators of calcium transport on survival of tert-butyl hydroperoxide exposed cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 27(10):1873-1881; 1993.
- Cazorla, O.; Pascarel, C.; Garnier, D.; Guennec, J. Y. L. Resting tension participates in the modulation of active tension in isolated guinea pig ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29(6):1629-1637; 1997.
- Daly, M. J.; Young, R. J.; Britnell, S. L.; Nayler, W. G. The role of calcium in the toxic effects of tert-butyl hydroperoxide on adult rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23:1303-1312; 1991.
- Eklow, L.; Moldéus, P.; Orrenius, S. Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Eur. J. Biochem.* 138:459-463; 1984.
- El-Shenawy, N.; Abdel-Rahman, M. Evaluation of chloroform cardiotoxicity utilizing a modified isolated rat cardiac myocytes. *Toxicol. Lett.* 69:249-256; 1993.
- Fernandes, E.; Carvalho, F.; Remião, F.; Bastos, M. L.; Pinto, M.; Cottlieb, O. Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated rat hepatocytes—comparison with silybin. *Pharm. Res.* 12(11):1756-1760; 1995.
- Gorbunov, N. V.; Tyurina, Y. Y.; Salama, G.; Day, B. W.; Claycamp, H. G.; Argyros, G.; Elsayed, N. M.; Kagan, V. E. Nitric oxide protects cardiomyocytes against tert-butyl hydroperoxide-induced formation of alkoxyl and peroxy radicals and peroxidation of phosphatidylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244(3):647-651; 1998.
- Guennec, J.-Y. L.; Peineau, N.; Esnard, F.; Lacampagne, A.; Gannier, F.; Argibay, J.; Gauthier, F.; Garnier, D. A simple method for calibrating collagenase/pronase E ratio to optimize heart cell isolation. *Biol. Cell* 79:161-165; 1993.
- Haworth, R.; Goknur, A.; Cook, M.; Decker, R. Use of isolated adult myocytes to evaluate cardiotoxicity. I. Sugar uptake and protein synthesis. *Toxicol. Pathol.* 18(4) (Part 1):511-520; 1990.
- Haworth, R.; Hunter, D.; Berkoff, H. The isolation of Ca<sup>2+</sup>-resistant myocytes from the adult rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12:715-723; 1980.
- Jewell, S. A.; Monte, D. D.; Richelmi, P.; Bellomo, C.; Orrenius, S. tert-Butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated hepatocytes: contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 1(3):13-22; 1986.
- Joyeux, M.; Rolland, A.; Fleurentin, J.; Mortier, F.; Dorfman, P. tert-Butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Med.* 56:171-174; 1990.
- Kramer, J. H.; Chovan, J. P.; Schaffer, S. W. Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *Am. J. Physiol.* 240:H238-H246; 1981.
- Moldéus, P.; Hogberg, J.; Orrenius, S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* 52:60-71; 1978.

- Pascarel, C.; Brette, F.; Cazorla, O.; Guenec, J. Y. L. Effects on L-type calcium current of agents interfering with the cytoskeleton of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 84(6):1043-1050; 1999.
- Pascarel, C.; Cazorla, O.; Guenec, J. Y. L.; Orchard, C. H.; White, E. Different effects of gadolinium on I(KR), I(KS) and I(K1) in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 124(2):356-360; 1998.
- Ramos, K.; Acosta, D. Application of in vitro model systems to the study of cardiovascular toxicity. In: Gad, S. C., ed. *In vitro toxicology*. New York: Raven Press; 1994:221-230.
- Remião, F.; Carmo, H.; Carvalho, F.; Bastos, M. L. Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J. Enzyme Inhibition* 15:47-61; 1999.
- Remião, F.; Carmo, H.; Carvalho, F.; Bastos, M. L. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* 14:468-473; 2000.
- Shertzer, H. C.; Bannenberg, G. L.; Zhu, H.; Liu, R.-M.; Moldéus, P. The role of thiols in mitochondrial susceptibility to iron and *tert*-butyl hydroperoxide-mediated toxicity in cultured mouse hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 7:358-366; 1994.
- Suleiman, M.-S. New concepts in the cardioprotective action of magnesium and taurine during the calcium paradox and ischaemia of the heart. *Magnesium Res.* 7:295-312; 1994.
- Suleiman, M.-S.; Chapman, R. A. Changes in the principal free intracellular amino acids in the langendorf perfused guinea pig heart during arrest with calcium-free or high potassium media. *Cardiovasc. Res.* 27:1810-1814; 1993.
- Timerman, A. P.; Altschuld, R. A.; Hohl, C. M.; Brierley, G. P.; Merola, A. J. Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22(5):565-575; 1990.
- Viko, H.; Osnes, J.-B.; Sjetnan, A. E.; Skomedal, T. Improved isolation of cardiomyocytes by trypsination in addition to collagenase treatment. *Pharmacol. Toxicol.* 76:68-71; 1995.

Fernando Remião<sup>1</sup>  
Helena Carmo

Félix Carvalho  
Maria L. Bastos

ICETA/CEQUP  
Toxicology Department  
Faculty of Pharmacy  
University of Porto  
Rua Aníbal Cunha, 164  
4050/047 Porto  
Portugal

(Received 27 March 2000)

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at E-mail: remiao@mail.ff.up.pt

5.4 Estudo do *stress* oxidativo em suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao Ca<sup>2+</sup>, isolados de rato adulto



# The study of oxidative stress in freshly isolated $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat

F. Remião\*, H. Carmo, F. Carvalho, M.L. Bastos

ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050/047 Porto, Portugal

## Abstract

Cardiotoxicity studies using isolated heart cells are becoming increasingly advocated as a supplement to, and sometimes as a replacement for, whole heart or whole animal experimentation. In fact, the use of isolated cardiomyocytes has the great advantage of enabling mechanistic and comparative studies of compounds, which are directly toxic to cardiomyocytes. Since the 1970s, different procedures have been developed in order to obtain  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes. The advances in this field will be reviewed and an optimised method to obtain freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat for use in toxicological studies will be described. With this procedure, a high number of rod-shaped cells can be obtained ( $6\text{--}7 \times 10^6$ /heart corresponding to 70% of total number of cells). It is also possible to maintain cell viability, glutathione content and enzymatic activity of glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione *S*-transferase (GST) in acceptable levels for 4 hours. Cardiotoxicity studies performed with isoproterenol (ISO) in the presence of copper and with the model toxic substance *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) demonstrate the importance of oxidative stress as a cardiotoxic mechanism elicited by these molecules. The results obtained are also good indicators for future applications of this methodology to other cardiotoxicity studies. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Isolated cardiomyocytes; Oxidative stress; Glutathione; Isoproterenol; *tert*-Butylhydroperoxide

## 1. Introduction

### 1.1. Cardiomyocytes isolation techniques

Cardiotoxicity studies using isolated heart cells are becoming increasingly advocated as a supplement to, and sometimes as a replacement for, whole heart or whole animal experimentation (Haworth et al., 1990). The first study concerning the isolation of heart cells was published in 1952, in which the authors reported the isolation of cardiomyocytes from chicken embryos (Moscona and Moscona, 1952). The first isolation of cardiomyocytes from mammals was reported in 1960 (Harary and Farley, 1960). However, the first isolations

of cardiomyocytes from the adult rat were reported only in 1969 (Kono, 1969) and 1970 (Vahouny et al., 1970; Berry et al., 1970).

Owing to hypersensitivity of the isolated cells to  $\text{Ca}^{2+}$ , a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium was then used for cardiomyocytes incubation. In fact, obtaining isolated adult cardiomyocytes tolerant to physiological  $\text{Ca}^{2+}$  requires sophisticated techniques to (i) preserve the glycocalyx, (ii) promote the healing of the gap junctions and (iii) prevent the  $\text{Na}^+$  loading in the cardiomyocytes (Farmer et al., 1983). Only in 1976 was the first technique reported for the isolation of  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat (Powell and Twist, 1976a). Since then, different procedures have been developed, which are summarized in Table 1. Recently, our group modified the Le Guennec et al. (1993) procedure in order to obtain a higher number of isolated cells, therefore enabling their use in toxicological studies (Remião et al., 2001).

### 1.2. Evaluation of oxidative stress parameters in cardiotoxic studies

Oxidative stress seems to be an essential mechanism of toxicity involved in many heart pathologies. The oxygen

**Abbreviations:** CK, creatine phosphokinase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidised glutathione; GR, glutathione reductase; GPX, glutathione peroxidase; GST, glutathione *S*-transferase; ISO, isoproterenol; LDH, lactate dehydrogenase; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide.

\* Corresponding author. Tel.: +351-222078908; fax: +351-222003977.

E-mail address: remiao@ff.up.pt (F. Remião).

paradox, catecholamine oxidation and drug-induced cardiotoxicity (e.g. doxorubicin) are some examples.

The toxicity studies in isolated cardiomyocytes are performed through the evaluation of several parameters. To assess the cell viability by membrane permeability changes, the creatine phosphokinase (CK) or lactate dehydrogenase (LDH) leakage and the trypan blue exclusion techniques are commonly used. Additionally, the morphologic cell-shape evaluation reflects the hypercontracture phenomenon. Hypercontracture of myocytes represents an irreversible disruption of myofibril alignment and must be regarded as an indication of malfunction ultimately leading to cell and tissue death (Timerman et al., 1990).

For the evaluation of the oxidative degree, the assessment of oxidative status parameters such as reduced (GSH) and oxidised (GSSG) glutathione is essential. Also, selenium-dependent GSH peroxidase (GPX), glutathione *S*-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) activities are important indications of the cellular capacity of protection against the oxidative stress.

This paper gives a contribution of the application of a methodology using isolated cardiomyocytes for the study of inducers of oxidative stress.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of cardiomyocytes from the adult rat

The isolation procedure was performed as previously reported by Remião et al. (2001). Briefly, male Wistar rats weighing 175–225 g were used. Heparin (500 IU/

100 g body weight) was administered ip, 10 min before diethylether induction of anaesthesia. After removal and washing the heart was perfused with a modified Krebs–Henseleit solution, followed by a perfusion with the same solution supplemented with 45 mg/50 ml collagenase B (Roche) and 7 mg/50 ml protease type XIV (Sigma). The heart was then gently minced into small pieces and the digestion was completed with gentle suction movements using a plastic pasteur pipette. The suspension was filtered and centrifuged at 300 *g* for 2 min. After discarding the supernatant, the cells were washed and centrifuged with modified Krebs–Henseleit solution sequentially supplemented with 0.6, 1.2 and 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. Finally, the cells were diluted to 2.5 × 10<sup>5</sup> rod-shaped cells/ml and incubated in Krebs–Henseleit solution supplemented with 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. The cells were pre-incubated for 30 min before the assays. For enzyme activity determination, samples were collected each hour for 4 h. For the study of isoproterenol (ISO) plus Cu<sup>2+</sup> oxidative stress effects, ISO 0, 0.1, 0.5 and 1 mM and/or Cu<sup>2+</sup> 20 μM were added to the cell suspension, and the incubation was performed for 4 h.

### 2.2. Biochemical analysis

GSH and GSSG were quantified as before (Remião et al., 2000), by HPLC using electrochemical detection.

For measuring the activity of selenium-dependent GPX, GR and GST, cell suspension aliquots were sonicated for 12 sec at medium intensity and then centrifuged (16,000 *g*/5 min). The activity of GPX, GR and GST was determined in the supernatant in a 96-well plate reader (Ceres 900C) as previously described (Carvalho et al., 1999).

Table 1

Highlights of isolation procedures to obtain Ca<sup>2+</sup>-tolerant cardiomyocytes from the adult rat

Reference	Highlights of isolating procedures
Powell and Twist (1976b)	Control of the osmolality at 260.7 mosM, maintaining the isolated cardiomyocytes at 20°C and omission of chelants
Clark et al. (1978)	Cannulation in situ and addition of DMSO, EDTA and taurine to the solutions
Kao et al. (1980)	Enrichment of the media with amino acids and hormones, mincing of the heart before incubation, omission of chelants, use of 50 μM Ca <sup>2+</sup> solution after a Ca <sup>2+</sup> -free solution and incubation of the cardiomyocytes at 25°C
Haworth et al. (1980)	Addition of 0.001% trypsin and 1.0 mM Ca <sup>2+</sup> in the final phase of digestion
Bustamante et al. (1982)	Use of non-specific protease in digestion
Isenberg and Klockner (1982)	Pre-incubation of myocytes in an amino acid-rich medium
Farmer et al. (1983)	Careful control of the perfusion, use of 50 μM Ca <sup>2+</sup> after a Ca <sup>2+</sup> -free solution, gently mince of the heart during incubations with moderate agitation, temperatures above 25°C
Bkaily et al. (1984)	Substitution of the Ca <sup>2+</sup> by Sr <sup>2+</sup> and Ba <sup>2+</sup>
Haworth et al. (1990)	Haworth procedure (1980) modifications: substitution of the bicarbonate by HEPES, addition of amino acids, replacement of Ca <sup>2+</sup> (1 mM) 15 min after the addition of the enzyme and withdrawal of trypsin treatment
Welder et al. (1991)	Modification of the isolation apparatus to an optimised system
Le Guennec et al. (1993)	Combination of pronase E and collagenase during the digestion phase, which did not include Ca <sup>2+</sup> addition
Viko et al. (1995)	Digestion with trypsin before and during the digestion with collagenase
Andersson et al. (1996)	Addition of amino acids to the perfusion solutions and additional digestion of the cardiac tissue in suspension for 10 min

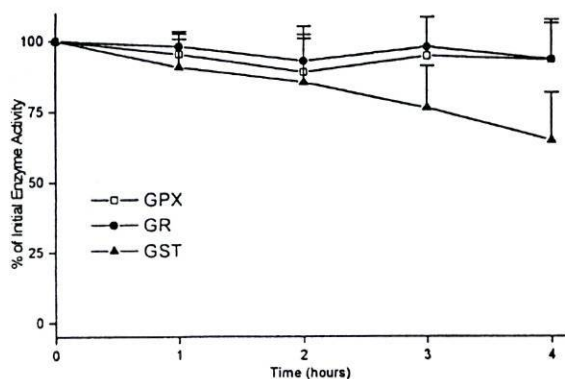


Fig. 1. GPX, GR and GST activities in freshly isolated cardiomyocytes for 4 h of incubation at 37°C in a modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$  ( $n=7$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Cell stability studies

The essential step in the isolation procedure in order to obtain adult  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes seems to be the enzymatic digestion. Le Guennec et al., in 1993, reported an association of crude collagenase with a non-specific protease (pronase E) to perform this enzymatic digestion, in which a contaminant proteolytic activity present in the crude collagenase seemed to be an important factor in the isolation of viable cells. Although the yield of isolated cells obtained was high, the number of isolated rod-shaped cells per heart was low. To increase the number of rod-shaped cells, mechanical digestion was introduced after the enzymatic digestion and  $\text{Ca}^{2+}$  was gradually increased in the washing and incubation mediums (Remião et al., 2001).

Using this isolation procedure, a high number of isolated rod-shaped cells was obtained ( $6-7 \times 10^6/\text{heart}$ ). The rod-shaped cells corresponded to  $70 \pm 3\%$  of the total cells in suspension. A decrease of 11% of rod-shaped cells and an increase of 19% in LDH leakage was observed after 4 h of cardiomyocyte incubation (Remião et al., 2001). As to what concerns the glutathione redox system, a GSH decrease of about 50% occurred after 4 h. This decrease results from GSSG formation and probably by GSH reaction with protein sulfhydryl groups.

Figure 1 shows the activity of the enzymes GPX, GR and GST for 4 h of cardiomyocyte incubation. The activity of GPX and GR seems to remain unchanged during this period and the activity of GST seems to decrease 35% after 4 h of incubation. The maintenance of these enzyme activities is an important factor that allows oxidative stress studies in these cells. However, these results indicate the existence of some degree of oxidative stress during cardiomyocytes incubation. The presence of compounds that can prevent oxidative stress

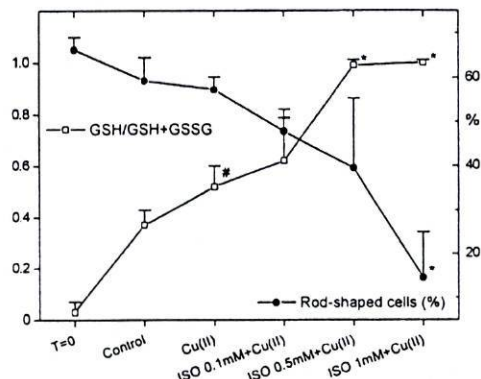


Fig. 2. Cardiomyocyte viability by morphological evaluation and GSH/GSH + GSSG status was measured in the control,  $\text{Cu}^{2+}$  ( $20 \mu\text{M}$ ) treated cardiomyocytes and  $\text{Cu}^{2+}$  ( $20 \mu\text{M}$ )/ISO (0.1, 0.5 and 1.0 mM) treated cardiomyocytes, before and after 4 h of incubation. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Scheffé Test. All results were assumed to be significantly different when  $P \leq 0.05$ . All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  S.D.). \*Compares values of ISO/ $\text{Cu}^{2+}$ -treated cardiomyocytes with the  $\text{Cu}^{2+}$ -treated cardiomyocytes. # Compares values of  $\text{Cu}^{2+}$ -treated cardiomyocytes with the control cardiomyocytes ( $n=4$ ).

during the cell isolation and incubation was avoided because they can interfere in toxicological studies. Furthermore, the assessment of cardiotoxicity is often complicated by the presence of humoral, neuronal and endocrine influences (Ramos and Acosta, 1994). Therefore, in this procedure, no antioxidants, amino acids, hormones or albumin were used during cell isolation or incubation.

#### 3.2. Oxidative stress studies

Although excess catecholamines exert cardiotoxic effects primarily via binding to adrenoceptors and causing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload, there is increasing evidence that catecholamine cardiotoxicity may also occur through oxidative mechanisms (Dhalla et al., 1992). It has been reported that catecholamines can be oxidised to the respective aminochromes non-enzymatically, an effect catalysed by metallic cations as  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  (Bindoli et al., 1992). Ceruloplasmin and  $\text{Cu}^{2+}$  chelates are also able to catalyse the oxidation of catecholamines (Bindoli et al., 1992). Aminochromes oxidise protein sulfhydryl groups, catalyse the deamination of a variety of amines and amino acids, induce uncoupling of the mitochondria and inhibit enzymes (Bindoli et al., 1992; Dhalla et al., 1992; Remião et al., 1999).

After incubation of freshly isolated rat cardiomyocytes with ISO/ $\text{Cu}^{2+}$  for 4 h, the incubation medium became coloured as the result of ISO oxidation. The GSH was drastically oxidised to GSSG by ISO 0.5 and 1 mM (Fig. 2) although the total glutathione was not changed. The  $\text{Cu}^{2+}$  itself leads to some GSSG formation.

Considering the viability results, most of the cardiomyocytes treated simultaneously with 1.0 mM ISO and 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  suffered hypercontracture, with only 15% of rod-shaped cells remaining after 4 h (Fig. 2).

Similar oxidative stress results had already been obtained with the organic peroxide *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) (Remião et al., 2001). The incubation of freshly isolated rat cardiomyocytes with *t*-BHP (0.1, 0.5 and 1.0 mM) for 30 min induced a dose-dependent GSH oxidation and a decrease in cell viability at all *t*-BHP concentrations. All the cardiomyocytes treated with 0.5 and 1.0 mM *t*-BHP suffered hypercontracture, which seems to be correlated with an oxidative stress effect (Remião et al., 2001).

These results are in accordance with a possible contribution of oxidative stress resulting from catecholamine oxidation to the catecholamine-induced cardiotoxicity mechanism, since the induction of ISO oxidation by copper increases the GSH oxidation and induces loss of cardiomyocyte viability.

#### 4. Conclusion

With the proposed modified method for the isolation of freshly  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat, a high number of rod-shaped cells per heart is obtained. The GR, GPX and GST activities as well as viability of cells and glutathione levels are acceptably stable for 4 h in a medium free of amino-acids or hormones. Studies with compounds that induce oxidative stress produced results consistent with those found in the literature, enabling us to recommend the model for oxidative stress studies in isolated cardiomyocytes.

#### Acknowledgements

This work received financial support from “Fundação para a Ciência e Tecnologia” and was conducted under the PRAXIS XXI Program (Project PRAXIS/PSAU/C/SAU/19/96).

#### References

- Andersson, B., Vidal, R., Sundberg, M., Rajs, J., Sötönyi, P., 1996. Hydroperoxide-induced nucleotide degradation and adenosine formation in isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* 106, 39–48.
- Berry, M., Friend, D., Scheuer, J., 1970. Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circulation Research* 26, 679–687.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Deeble, D.J., 1992. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 391–405.
- Bkaily, G.N., Sperelakis, N., Doane, J., 1984. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *American Journal of Physiology* 247, H1018–H1026.
- Bustamante, J., Watanabe, T., McDonald, T., 1982. Nonspecific proteases: a new approach to the isolation of adult cardiocytes. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 60, 997–1002.
- Carvalho, F., Fernandes, E., Remião, F., Bastos, M.L., 1999. Effect of *l*-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defences. *Archives of Toxicology* 73, 83–89.
- Clark, M.G., Gannon, B.J., Bodkin, N., Patten, G.S., Berry, M.N., 1978. An improved procedure for the high-yield preparation of intact beating heart from the adult rat biochemical and morphologic study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10, 1101–1121.
- Dhalla, N.S., Yates, J.C., Naimark, B., Dhalla, K.S., Beamish, R.E., Ostadal, B. In: Daniel Acosta, J. (Ed.), *Cardiotoxicity of catecholamines and related agents*. In: *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York, pp. 239–281.
- Farmer, B.B., Mancina, M., Williams, E.S., Watanabe, A.M., 1983. Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method. *Life Sciences* 33, 1–18.
- Harary, I., Farley, B., 1960. *In vitro* studies of single isolated beating heart cells. *Science* 131, 1674–1675.
- Haworth, R., Hunter, D., Berkoff, H., 1980. The isolation of  $\text{Ca}^{2+}$ -resistant myocytes from the adult rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 12, 715–723.
- Haworth, R., Goknur, A., Cook, M., Decker, R., 1990. Use of isolated adult myocytes to evaluate cardiotoxicity. I. Sugar uptake and protein synthesis. *Toxicologic Pathology* 18, 511–520.
- Isenberg, G., Klockner, U., 1982. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium”. *Pflügers Archives* 395, 6–18.
- Kao, R.L., Christman, E.W., Luh, S.L., Krauhs, J.M., Tyers, G.F.O., Williams, E.H., 1980. The effects of insulin and anoxia on the metabolism of isolated mature rat cardiac myocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 203, 587–599.
- Kono, T., 1969. Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 178, 397–400.
- Le Guennec, J.-Y., Peineau, N., Esnard, F., Lacampagne, A., Gannier, F., Argibay, J., Gauthier, F., Garnier, D., 1993. A simple method for calibrating collagenase/pronase E ratio to optimize heart cell isolation. *Biologie Cellulaire* 79, 161–165.
- Moscona, A., Moscona, H., 1952. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy* 86, 287–301.
- Powell, T., Twist, V., 1976a. Isoprenaline stimulation of cyclic AMP production by isolated cells from adult rat myocardium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72, 1218–1225.
- Powell, T., Twist, V., 1976b. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having reservoir control and a tolerance to calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72, 327–333.
- Ramos, K., Acosta, D., 1994. Application of *in vitro* model systems to the study of cardiovascular toxicity. In: Gad, S.C. (Ed.), *In Vitro Toxicology*. Raven Press, New York, pp. 221–230.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M.L., 1999. Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition* 15, 47–61.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2000. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* 14, 468–473.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2001. Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Animal* 37, 1–4.

Timerman, A.P., Altschuld, R.A., Hohl, C.M., Brierley, G.P., Merola, A.J., 1990. Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22, 565–575.

Vahouny, G., Wei, R., Starkweather, R., Davis, C., 1970. Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* 167, 1616–1618.

Viko, H., Osnes, J.-B., Sjetnan, A.E., Skomedal, T., 1995. Improved isolation of cardiomyocytes by trypsinization in addition to collagenase treatment. *Pharmacology and Toxicology* 76, 68–71.

Welder, A.A., Grant, R., Bradlaw, J., Acosta, D., 1991. A primary culture system of adult rat heart cells for the study of toxicologic agents. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27A, 921–926.

**5.5 Aumento da toxicidade do isoproterenol pelo Cu<sup>2+</sup> em cardiomiócitos isolados de rato: efeitos no *stress* oxidativo**

---

## Copper Enhances Isoproterenol Toxicity in Isolated Rat Cardiomyocytes

### *Effects on Oxidative Stress*

Fernando Remião, Helena Carmo,  
Félix Carvalho, and M. Lourdes Bastos

Toxicology Department, ICETA/CEQUP, Faculty of Pharmacy,  
University of Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050/047 Porto, Portugal

---

### Abstract

Sustained high levels of circulating catecholamines may result in cardiotoxicity. Although cardiotoxicity could occur primarily via adrenoceptor activation, there is increasing evidence that it may also occur through oxidative mechanisms. In fact, catecholamines can be converted into aminochromes by auto-oxidation, enzymatically or metal catalyzed, with the concomitant production of reactive intermediates and free radicals. Nevertheless, there is only scarce information concerning the effects of the catecholamine oxidation process on isolated cardiomyocytes.

The aim of this work was to evaluate the cardiotoxic effects of isoproterenol (ISO) and its oxidation process in freshly isolated adult rat cardiomyocytes by assessing the cell shape, lactate dehydrogenase leakage, reduced and oxidized glutathione content, and glutathione reductase, peroxidase, and transferase activities. ISO was incubated at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mM in cardiomyocyte suspensions at subphysiological and physiological  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations for 4 h. The same study was repeated in the presence of 20  $\mu\text{M}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ . The levels of ISO in the incubation medium were monitored throughout the assays.

Isoproterenol (1 mM) induced both glutathione oxidation and conjugation, but this effect decreased at subphysiological  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. The concomitant incubation with  $\text{Cu}^{2+}$  increased ISO oxidation and increased the glutathione oxidation but decreased the extent of glutathione conjugation. Although only a partial ISO oxidation was observed for all studied ISO concentrations in the presence of copper, the underlying oxidative process or its oxidation products, or both, were sufficient to induce a loss of cardiomyocyte viability and a decrease in the glutathione reductase, peroxidase, and transferase activities. Thus, the results suggest that the oxidation of catecholamines could be a major mechanism for catecholamine-induced cardiotoxicity.

**Key Words:** Isoproterenol; cardiotoxicity; oxidative stress; cardiomyocytes; quinone; aminochrome; catecholamines; heart; copper; glutathione.

---

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Dr. Fernando Remião, ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050/047 Porto, Portugal. E-mail: [remiao@ff.up.pt](mailto:remiao@ff.up.pt)

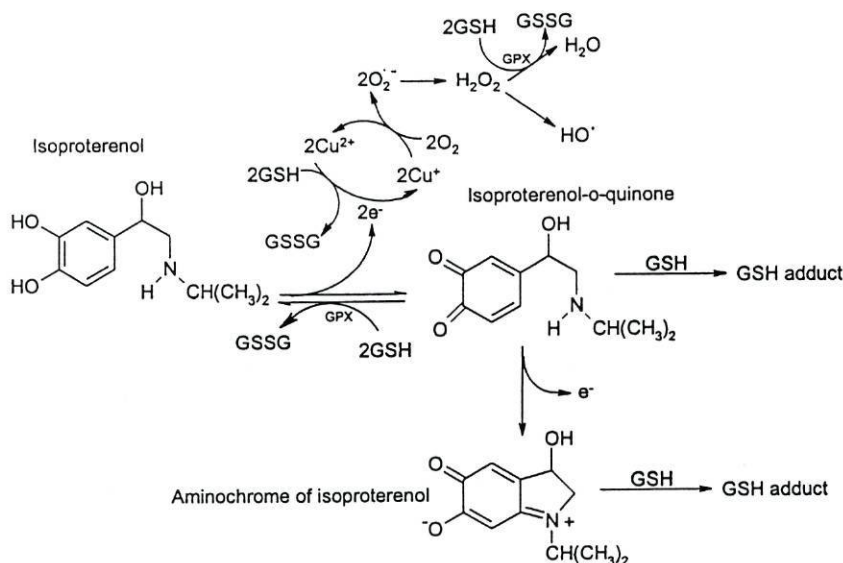


Fig. 1. Proposed mechanism for the oxidation of ISO in the presence of copper and glutathione.

## Introduction

The excessive release of catecholamines is often associated with stress resulting from the lifestyle of Western societies (1). Sympathetic activity can be increased by reduced physical activity and hypercaloric nutrition (2). Furthermore, pathologic conditions such as pheochromocytoma lead to enormous quantities of catecholamines released into the circulation (3). High doses of catecholamines produce the impairment of heart function and metabolism, as well as myocardial necrosis (4). The  $\beta$ -agonist isoproterenol (or isoprenaline, ISO) is a synthetic catecholamine used in experimental toxicology as a model compound for the study of catecholamine-related toxicity (1,2,4,5). In fact, several myocardial toxic effects related to high levels of circulating ISO have been reported. These effects include alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, resulting in extensive myocardial necrosis (5), lipid peroxidation (1,2), and a decrease in ATP and creatine phosphate stores (4).

Although a sustained excess of catecholamines exerts cardiotoxic effects primarily via binding to adrenoceptors and subsequent intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload, there is increasing evidence that catecholamine cardiotoxicity may also occur through oxidative mechanisms. Catecholamines can be converted

into *o*-quinones and undergo cyclization into the red-colored aminochromes (4,6) (Fig. 1). This process can occur by auto-oxidation, enzymatically or metal catalyzed, and involves the formation of reactive intermediates and free radicals. Aminochromes can be further oxidized to several other reactive compounds (2,7). Overall, catecholamine-*o*-quinones, aminochromes, reactive intermediates, and the radical species resulting from these oxidation processes are thought to be involved in catecholamine toxicity (1,2,5,7,8).

It is known that catecholamine-*o*-quinones are likely to attack external nucleophilic groups such as  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$ , and  $-\text{NH}_2$  of amino acids present in the microenvironment in which the oxidation occurs (1, 2). It has also been reported that aminochromes oxidize protein sulfhydryl groups, catalyze the deamination of a variety of amines and amino acids, induce uncoupling of the mitochondria, and inhibit enzymes (4,7). Recently, glutathione reductase inhibition by isoproterenol oxidation products has been reported (8). Adrenochrome and ISO oxidation products have been reported to induce cell damage, contractile failure, and the impairment of energy production by mitochondria in the isolated, perfused rat heart (4,9). Adrenochrome may be capable of functioning as an oxidative hydrogen carrier, acting on either meta-

bolic substrates or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form, (NADP<sup>+</sup>) and thus altering or disrupting essential metabolic pathways (4).

In the present study, it was our aim to contribute to the understanding of the cardiotoxic effects induced by ISO and its oxidation process in freshly isolated adult rat cardiomyocytes.

## Materials and Methods

### Adult Rat Cardiomyocytes

The isolation of cardiomyocytes was done by collagenase and protease perfusion as previously described (10). Adult male Wistar rats weighing 175–225 g were used. Incubations were done at 37°C, using  $2.5 \times 10^5$  cells/mL in modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 50  $\mu$ M (subphysiological concentration) or 1.8 mM (physiological concentration) CaCl<sub>2</sub> (pH 7.2) and saturated with an airstream of carbogen. The cells were preincubated for 30 min before the assays. ISO (0.1, 0.5, and 1 mM) and/or Cu<sup>2+</sup> (20  $\mu$ M) were added to the cell suspension, and the incubation was done for 4 h. A control group that was ISO- and Cu<sup>2+</sup>-free was always assayed.

### Biochemical Analysis

Reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were quantified as previously (11). Briefly, aliquots of cell suspensions were precipitated with perchloric acid (5% final acid concentration) and centrifuged at 16,000g for 10 min. The supernatant (20  $\mu$ L) was injected into a high-performance liquid chromatography (HPLC) system with electrochemical detection. A Waters Spherisorb S5 ODS2 column, 250  $\times$  4.6 mm, and a mobile phase consisting of 25 mM of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mM of 1-octanesulfonic acid, and 2.2% of acetonitrile, adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid, were used. An isocratic elution was done at 1 mL/min at room temperature.

Isoproterenol was quantified by HPLC with ultraviolet (UV) detection at 279 nm. Samples were precipitated with perchloric acid (5% final concentration) and centrifuged to remove proteins and stop ISO oxidation. The supernatant (20  $\mu$ L) was then injected into the HPLC system. The analytical column was a commercially prepacked reverse-phase cartridge of 244 mm  $\times$  4 mm inner diameter containing LiChrospher 100 RP-8 (5  $\mu$ m) from Merck. The mobile

phase used was 95% of 10 mM aqueous ammonium acetate (pH 2.5) and 5% acetonitrile. An isocratic elution was performed at a flow rate of 1 mL/min at room temperature.

Lactate dehydrogenase (LDH) leakage was assessed as previously (12) by measuring the rate of change in absorbance at 340 nm as a result of NADH oxidation.

For measuring the activity of selenium-dependent GSH peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST), cell-suspension aliquots were sonicated for 12 s at medium intensity and then centrifuged (16,000g for 5 min). The GPX, GR, and GST activities were determined in the supernatant as previously described (13). Briefly, GR was determined by following nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) oxidation at 340 nm. GPX was determined by following NADPH oxidation at 340 nm during GSSG reduction by GR. Finally, GST was determined by the formation of GSH conjugate with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, which was monitored also at 340 nm.

In each experiment, all enzymes were determined in triplicate in a 96-well plate reader.

### Morphological Evaluation

The percentage of rod-shaped cells was determined using a Neubauer chamber. Cells with a length/width ratio greater than 4 and with no or only very low spontaneous contractile activity (fewer than five contractions/min) were considered as rod-shaped cells.

### Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD) from four to six experiments for each cell treatment and were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Scheffé test. Results with  $p < 0.05$  were considered statistically different.

## Results

The oxidative stress induced by the incubation of the cardiomyocyte suspension with ISO (0.1, 0.5, and 1 mM) at 50  $\mu$ M (subphysiological concentration) or 1.8 mM of Ca<sup>2+</sup> (physiological concentration) was evaluated by measuring the GSSG/GSH+GSSG ratio and the GSH+GSSG content. The GSSG/GSH+GSSG ratio significantly increased for 1 mM of ISO

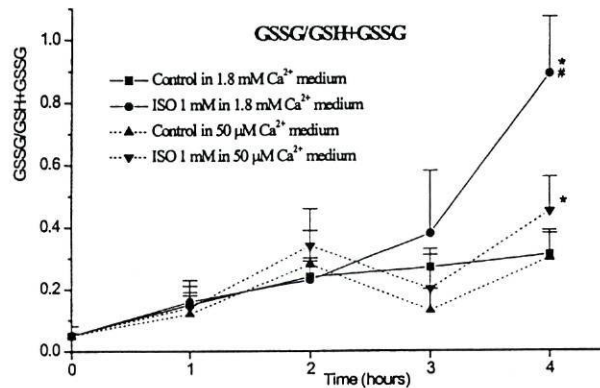


Fig. 2. GSSG/GSH+GSSG ratio after ISO incubation in cardiomyocyte suspensions with 50  $\mu\text{M}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n = 4$ ) and with 1.8  $\text{mM}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n = 5$ ) (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to the respective control; # $p < 0.05$ , compared to 1  $\text{mM}$  ISO in 50  $\mu\text{M}$  of  $\text{Ca}^{2+}$ .

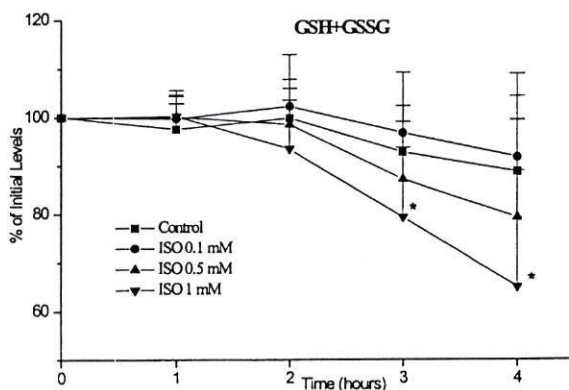


Fig. 3. Total glutathione (GSH + GSSG) after ISO incubation in cardiomyocyte suspensions with 1.8  $\text{mM}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to control ( $n = 6$ ).

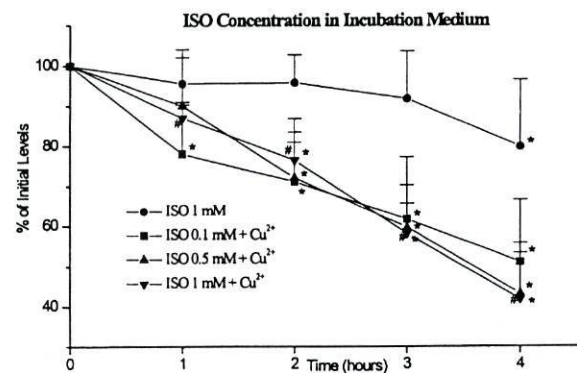


Fig. 4. ISO concentration in incubation medium in presence or absence of 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in cardiomyocyte suspensions with 1.8  $\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to time zero; # $p < 0.05$ , compared to 1  $\text{mM}$  ISO ( $n = 4$ ).

after 4 h of incubation at both  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (50  $\mu\text{M}$  and 1.8  $\text{mM}$ ) (Fig. 2). However, the level of GSH oxidation induced by 1  $\text{mM}$  ISO in the presence of 1.8  $\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  was significantly higher than in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2). No significant differences from control were observed in this ratio for 0.1 and 0.5  $\text{mM}$  ISO at both  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (data not shown). In the presence of 1.8  $\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  and after 3 and 4 h of incubation with 1  $\text{mM}$  ISO, the GSH + GSSG content was significantly depleted to 79% and 65%, respectively (Fig. 3). A tendency for a decrease in GSH + GSSG was also observed for 0.5  $\text{mM}$  ISO. Similar results were obtained in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown).

The assessment of cardiomyocyte viability by the quantification of LDH leakage and rod-shaped cells did not show any significant alterations for the studied ISO levels at either  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. The same results were obtained for GR and GST activities (data not shown).

The measurement of ISO concentrations in the incubation medium treated with ISO (1  $\text{mM}$ ) alone showed a slow ISO depletion along with incubation time (Fig. 4). This slow depletion seems to result from ISO oxidation, as can be deduced by the increasing red color in the medium, characteristic of aminochrome. After incubation of 1  $\text{mM}$  ISO in cell suspensions, its levels significantly decreased by 20%

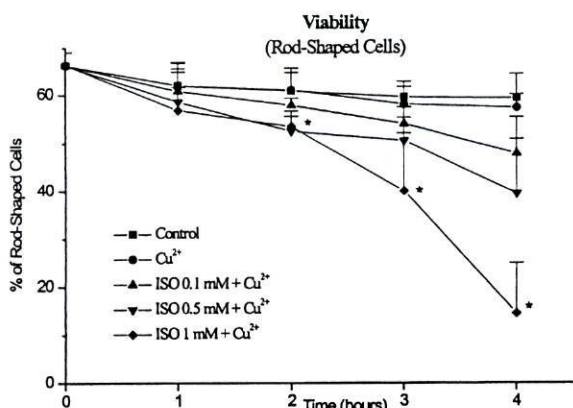


Fig. 5. Viability measured as rod-shaped cells after ISO incubation in presence of 20 μM Cu<sup>2+</sup> in cardiomyocyte suspensions with 1.8 mM Ca<sup>2+</sup> (mean ± SD). \**p* < 0.05, compared to Cu<sup>2+</sup> alone (*n* = 4).

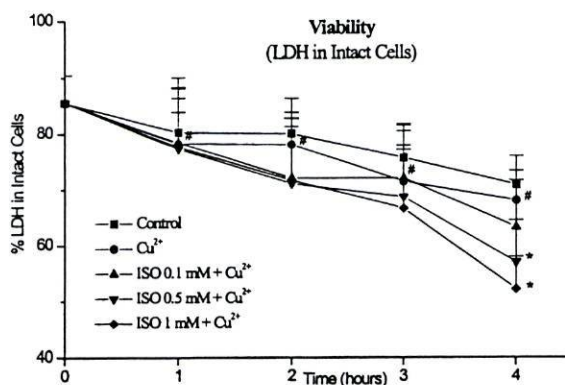


Fig. 6. Viability measured as percentage of LDH in intact cells after ISO incubation in presence of 20 μM Cu<sup>2+</sup> in cardiomyocyte suspensions with 1.8 mM Ca<sup>2+</sup> (mean ± SD). \**p* < 0.05, compared to Cu<sup>2+</sup> alone; #*p* < 0.05, compared to control (*n* = 5).

after 4 h in the cardiomyocyte suspension at both Ca<sup>2+</sup> concentrations used. The addition of 20 μM Cu<sup>2+</sup> to the cell suspensions induced a rapid and time-dependent depletion of ISO. After 4 h, 50–60% of the initial ISO concentrations had been oxidized (Fig. 4).

The cardiotoxic effects of ISO in cardiomyocytes incubated at the physiological Ca<sup>2+</sup> concentration were drastically enhanced with the addition of 20 μM Cu<sup>2+</sup>. Considering the viability evaluated by monitoring the cell shape, only 1 mM ISO induced a significant decrease in the number of rod-shaped cardiomyocytes in the presence of Cu<sup>2+</sup> (Fig. 5). The percentage of rod-shaped cells decreased from 61% in 20 μM Cu<sup>2+</sup> to 54% in 1 mM ISO plus Cu<sup>2+</sup>, from 58% in 20 μM Cu<sup>2+</sup> to 40% in 1 mM ISO plus Cu<sup>2+</sup>, and from 57% in 20 μM Cu<sup>2+</sup> to 15% in 1 mM ISO plus Cu<sup>2+</sup> at 2, 3, and 4 h of incubation, respectively. The concomitant use of 0.1 and 0.5 mM ISO with Cu<sup>2+</sup> did not induce a significant decrease in the number of rod-shaped cells, but showed a tendency for a decrease mainly after 4 h of incubation. Regarding the membrane permeability, Cu<sup>2+</sup> itself induced a slight but significant increase of LDH leakage at all times studied (Fig. 6). In the presence of Cu<sup>2+</sup> and after 4 h of incubation, a significant decrease of viability was observed, as measured by LDH leakage, from 68% in Cu<sup>2+</sup> alone to 57% in 0.5 mM ISO and to 52% in 1.0 mM ISO (Fig. 6).

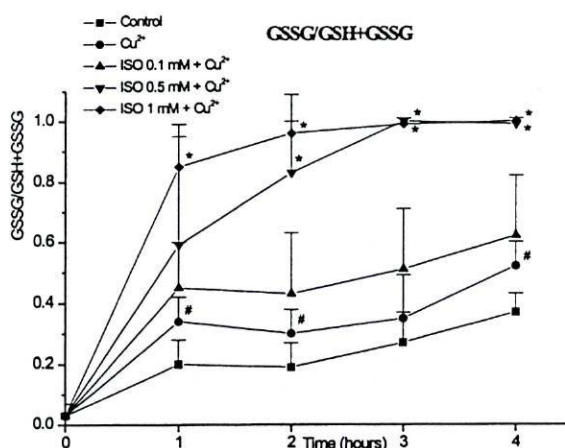
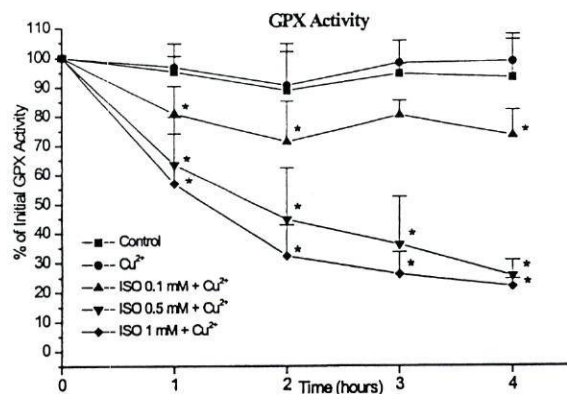
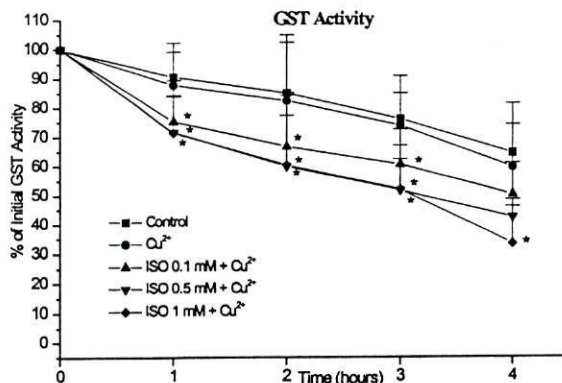


Fig. 7. GSSG/GSH+GSSG ratio after ISO incubation in presence of 20 μM Cu<sup>2+</sup> in cardiomyocyte suspensions with 1.8 mM Ca<sup>2+</sup> (mean ± SD). \**p* < 0.05, compared to Cu<sup>2+</sup> alone; #*p* < 0.05, compared to control (*n* = 5).

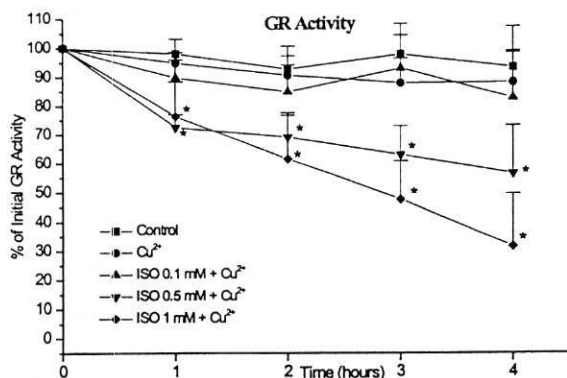
The presence of Cu<sup>2+</sup> in the cell suspensions drastically enhanced the GSH oxidation induced by ISO (Fig. 7) because GSH was completely oxidized to GSSG by ISO at 0.5 and 1 mM after 3 h of incubation. Cu<sup>2+</sup> itself slightly but significantly induced GSH oxidation. However, total glutathione (GSH+GSSG) levels were not modified by ISO in the presence of Cu<sup>2+</sup>, although it occurred with 1 mM ISO alone (Fig. 3).



**Fig. 8.** GPX activity after ISO incubation in presence of  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in cardiomyocyte suspensions with  $1.8 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to  $\text{Cu}^{2+}$  alone ( $n = 5$ ).



**Fig. 10.** GST activity after ISO incubation in presence of  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in cardiomyocyte suspensions with  $1.8 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to  $\text{Cu}^{2+}$  alone ( $n = 5$ ).

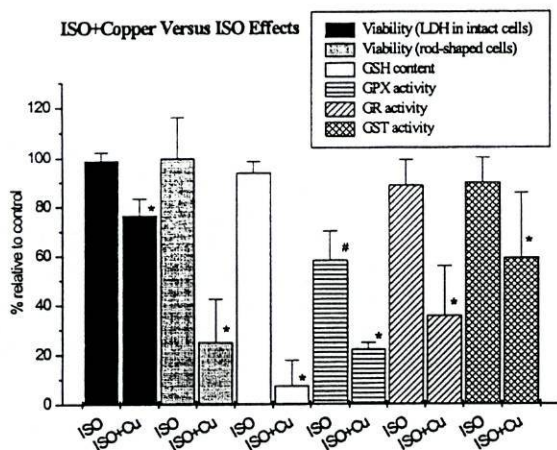


**Fig. 9.** GR activity after ISO incubation in presence of  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in cardiomyocyte suspensions with  $1.8 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  (mean  $\pm$  SD). \* $p < 0.05$ , compared to  $\text{Cu}^{2+}$  alone ( $n = 5$ ).

The activities of the enzymes GPX (Fig. 8), GR (Fig. 9), and GST (Fig. 10) decreased after incubation of ISO in the presence of  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . The GPX activity was the most affected. After 1 h of incubation, all studied ISO concentrations significantly decreased GPX activity in a concentration-dependent manner (Fig. 8). GPX activity suffered maximal inhibition to 73%, 26%, and 22% of the initial activity for 0.1, 0.5, and 1 mM ISO, respectively, after 4 h of incubation. At the same time of incubation, the control and  $\text{Cu}^{2+}$  samples showed GPX activity above 90%. The GR activity was also affected after 1 h in 0.5 and 1 mM ISO incubation (Fig. 9). The maximal inhibition occurred after 4 h of incuba-

tion: 56% of the initial GR activity at 0.5 mM ISO and 32% at 1 mM ISO. Control and  $\text{Cu}^{2+}$  samples had GR activity values that remained above 88% during the 4 h of assay. The GST activity was also affected (Fig. 10). Although GST activity decreased in the control and in the  $\text{Cu}^{2+}$  samples, the inhibition of GST occurred for all ISO plus  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations at 1, 2, and 3 h of incubation. The lowest GST activity was 33% from initial activity and was obtained for 1 mM of ISO after 4 h of incubation. The control and  $\text{Cu}^{2+}$  values showed a decrease in the GST activity: 65% and 60%, respectively, after 4 h of incubation.

Figure 11 shows a comparison between ISO (1 mM) alone and the control and between ISO (1 mM) alone and ISO (1 mM) plus  $\text{Cu}^{2+}$  ( $20 \mu\text{M}$ ) for cardiomyocyte viability (LDH in intact cells and rod-shaped cells), GSH content, GPX activity, GR activity, and GST activity after incubation in cardiomyocyte suspensions with  $1.8 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ . The results are presented as a percentage of ISO relative to the control and a percentage of ISO+ $\text{Cu}^{2+}$  relative to  $\text{Cu}^{2+}$  samples. The ISO (1 mM) alone was different from the control only for GPX activity, which decreased to 58% after 4 h of incubation. For all of the parameters, the results of ISO+ $\text{Cu}^{2+}$  are significantly different from ISO alone. In the presence of ISO+ $\text{Cu}^{2+}$ , cardiomyocyte viability decreased from 99% to 77% (LDH in intact cells) and from 100% to 25% (rod-shaped cells) after 4 h of incubation. After 2 h of ISO incubation, the presence of copper induced a depletion of the GSH content from 94% to 7%. ISO+ $\text{Cu}^{2+}$  decreased



**Fig. 11.** Percentage of cardiomyocytes viability, GPX activity, GR activity, and GST activity after 4 h of ISO (1 mM) incubation in absence or presence of 20  $\mu$ M of Cu<sup>2+</sup> relative to control or Cu<sup>2+</sup> alone. Percentage of GSH content after 2 h of ISO (1 mM) incubation in the absence or presence of 20  $\mu$ M of Cu<sup>2+</sup> relative to the control or Cu<sup>2+</sup> alone. All incubations were performed in cardiomyocyte suspensions with 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>. \* $p < 0.05$ , compared to ISO. # $p < 0.05$ , compared to control or Cu<sup>2+</sup> alone ( $n = 4$  or 5).

the activity of GPX from 100% to 22%, of GR from 89% to 36%, and of GST from 90% to 59% after 4 h of incubation.

## Discussion

Isoproterenol was shown to be cardiotoxic in the tested conditions. The GSH oxidation induced by ISO occurred at both Ca<sup>2+</sup> concentrations used in the suspension medium (Fig. 2). Accordingly, a depletion of thiols induced by ISO has also been observed in *in vivo* studies in rats (14). However, it seems that the extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration influences the degree of oxidative stress induced by ISO. In the presence of physiological Ca<sup>2+</sup> concentration in the incubation medium, the ISO-induced GSH oxidation increased. This could be explained by a sustained high intracellular free-Ca<sup>2+</sup> level, resulting from the impairment of Ca<sup>2+</sup> homeostasis induced by oxidative stress. In accordance with these results, it has been shown that the formation of radicals decreases in isolated cardiomyocytes submitted to ischemia/reperfusion by lowering total extracellular Ca<sup>2+</sup> (15). Also, it was already demonstrated that the progressive Ca<sup>2+</sup> accumulation in cardiomyocytes exposed

to toxic concentrations of ISO is prevented by antioxidants (16). It is also postulated that oxidative stress induces an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> by the dysfunction of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, membrane lipid peroxidation, and thiol and NAD depletion (17). The presence of higher intracellular Ca<sup>2+</sup> levels leads to the activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes such as proteases and phospholipases that magnify oxidative damage (17).

Another oxidative stress indicator is the total glutathione content (GSH+GSSG), which was depleted by 1 mM ISO (Fig. 3). This indicates the possible formation of thiol adducts with the quinones resulting from ISO oxidation (7,18), as has been reported for dopamine oxidation products (19–21).

It has been reported that catecholamines can be oxidized to the respective aminochromes nonenzymatically in the presence of metallic cations such as Cu<sup>2+</sup> (Fig. 1), manganese, nickel, cobalt, and Fe<sup>3+</sup>, as well as several Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> chelates (7). Ferrylmyoglobin, a product formed by the oxidation of myoglobin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, has been more recently reported to oxidize adrenaline (22). Also, ceruloplasmin, a plasma protein containing copper, and several copper-containing catechol oxidases present in both plant and animal tissues are able to initiate the oxidation of catecholamines (7). It is noteworthy that an association has been reported between serum ceruloplasmin and copper and cardiovascular disease (23). The catechol group of catecholamines is also oxidized by enzymes such as xanthine oxidase (24) and tyrosinase (25). In order to stimulate ISO oxidation, Cu<sup>2+</sup> was introduced in the incubation medium. Interestingly, 20  $\mu$ M of copper is approximately in the normal range of serum copper levels (26).

The presence of Cu<sup>2+</sup> in the incubation medium increased the rate and extent of ISO oxidation, as can be inferred by the monitoring of ISO levels in the cell medium (Fig. 4).

Considering the cell viability results, the cardiomyocytes treated with 1 mM ISO in the presence of 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> suffered hypercontracture after 2 h of incubation (Fig. 5). Hypercontracture of myocytes, shown by a decrease in the number of rod-shaped cells, represents an irreversible disruption of myofibril alignment and, consequently, must be regarded as an indication of malfunction, ultimately leading to cell and tissue death (27). This malfunction is clearly distinct from sarcolemma disruption, which was

determined in our study by LDH leakage. The sarcolemma integrity decreased with 0.5 and 1 mM ISO in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  after 4 hours of incubation (Fig. 6). These effects seem to be the final consequence of a group of effects induced by the oxidative stress.

In the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  in the incubation medium, ISO induced a greater GSH oxidation (Fig. 7) than that produced by ISO alone (Fig. 2). This could be explained by ISO oxidation catalysis by  $\text{Cu}^{2+}$ , with the formation of free radicals and quinones (Fig. 1).  $\text{Cu}^{2+}$  itself leads to a significant increase in GSSG formation. This last effect can be explained by the promotion of free-radical reactions by  $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 1). In fact, the presence of copper induces the production of the hydroxyl radical by the Fenton reaction (28). The oxidative stress induced by  $\text{Cu}^{2+}$  can explain the slight decrease of cell viability observed by the LDH leakage assay in  $\text{Cu}^{2+}$  alone compared to that of control (Fig. 6). The total glutathione level did not change in the presence of ISO with  $\text{Cu}^{2+}$ , in contrast to what happened with ISO alone. One possible explanation is that the great and rapid extent of GSH oxidation induced by ISO in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  lowers the availability of GSH for the formation of adducts with the ISO oxidation products. The first step of ISO oxidation to isoproterenol-*o*-quinone is highly induced in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  with the formation of free radicals (7) (Fig. 1). Both free radicals and isoproterenol-*o*-quinone induce GSH oxidation, which can lead to a decrease in adduct formation. Accordingly, GSH was completely oxidized at 0.5 mM and at 1 mM ISO after 3 h of incubation (Fig. 7).

The activities of the enzymes GPX, GR, and GST were decreased by ISO incubation in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  (Figs. 8–10, respectively). However, GPX activity decreased in the presence of ISO (1 mM) alone after 4 h of incubation (Fig. 11). GPX is a tetrameric selenoenzyme in which each monomer contains a single selenocysteine essential for catalytic activity (29). GR is a dimeric flavin adenine dinucleotide (FAD)-containing enzyme with a redox active disulfide at its active site (29). GST comprises a family of enzymes in which some classes seem to be dependent on cysteine residues for their activity (30). Aminochromes were found to inactivate the SH-dependent enzymes either through the formation of a covalent adduct or by oxidation (4,7). Some *in vivo* studies have reported the reduction of activity of GST (31, 32), GPX (32), and GR (32) after ISO injection in

rats. *In vitro* studies with purified enzymes have also reported the inhibition of GR by ISO oxidation products (8) and the inhibition of GST by quinones (33). To the best of our knowledge, this is the first report on the reduction of the activity of GR, GPX, and GST induced by catecholamine oxidation in isolated cardiomyocytes. The inhibition of these enzymes not only reflects an oxidative stress effect but also exposes the cells to further oxidative damage because GR, GPX, and GST are essential enzymes in cell protection against reactive oxygen species and electrophilic compounds.

The results presented in Fig. 11 indicate the enhancement of ISO-induced cardiac toxicity by copper. The induction of an ISO effect on cardiomyocyte viability, GR activity and GST activity and the copper potentiation of an ISO effect on GPX activity and GSSG/GSH+GSSG constitute evidence for the oxidative mechanism of cardiac toxicity induced by ISO oxidation. The partial oxidation of the studied ISO concentrations is enough to induce an appreciable inhibition of the studied enzymes in cardiomyocytes in suspension. Probably, the concentration of the ISO oxidation products responsible for this inhibition is very low. It is noteworthy that adrenolutin, an oxidation product resulting from adrenaline, was found in rat blood in a relatively large concentration (0.1 mM) (34). These results seem to indicate an important role of the catecholamine oxidation process in cardiotoxicity. Accordingly, a decrease of cardiomyocyte viability and an increase in mitochondrial fragility have been reported in cultured rat cardiomyocytes treated with ISO. These effects were prevented by the presence of L-ascorbic acid (35–37) but not by a  $\beta$ -blocker (35).

## Conclusion

Isoproterenol oxidation or the direct effect of ISO oxidation products, or both, in cardiomyocytes seems to be one major mechanism for catecholamine-induced cardiotoxicity. In the presence of subphysiological  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, the severity of oxidative stress induced by ISO oxidation decreases. Copper-induced ISO oxidation or its products, or both, seem to be important for GSH oxidation, the loss of cardiomyocyte viability, and a decrease in the activity of GR, GST, and GPX at all of the ISO concentrations studied.

## Acknowledgments

This work received financial support from "Fundação para a Ciência e Tecnologia" and was conducted under the PRAXIS XXI Program (Project PRAXIS/PSAU/C/SAU/19/96).

## References

- Dhalla, K.S., Rupp, H., Beamish, R.E., and Dhalla, N.S. (1996). Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca<sup>2+</sup> transport due to excess catecholamines. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **10**:231–238.
- Rupp, H., Dhalla, K.S., and Dhalla, N.S. (1994). Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**(Suppl. 1):S16–S24.
- Hoffman, B.B. and Lefkowitz, R.J. (1996). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists, in Goodman & Gilman's, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, and A.G. Gilman, eds), pp. 199–248, McGraw-Hill, New York.
- Dhalla, N.S., Yates, J.C., Naimark, B., Dhalla, K.S., Beamish, R.E., and Ostadal, B. (1992). Cardiotoxicity of catecholamines and related agents, in *Cardiovascular Toxicity* (J. Daniel Acosta, ed), pp. 239–281, Raven, New York.
- Ramos, K. and Acosta, D. (1989). Cytotoxic actions of isoproterenol in cardiac cells: protective effects of antioxidants, in *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (J. Miquel, A.T. Quintanilha, and H. Weber, eds), pp. 177–185, CRC, Boca Raton, FL.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., and Galzigna, L. (1989). Toxicity of aminochromes. *Toxicol. Lett.* **48**:3–20.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., and Deeb, D.J. (1992). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic. Biol. Med.* **13**:391–405.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M.L. (1999). Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J. Enzym. Inhib.* **15**:47–61.
- Taam, G.M., Takeo, S., Ziegelhoffer, A., Singal, P.K., Beamish, R.E., and Dhalla, N.S. (1986). Effect of adreno-chrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Can. J. Cardiol.* **2**(2):88–93.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M.L. (2001). Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **37**:1–4.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M.L. (2000). Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* **14**:468–473.
- Fernandes, E., Carvalho, F., Remião, F., Bastos, M.L., Pinto, M., and Gottlieb, O. (1995). Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated rat hepatocytes-comparison with silybin. *Pharm. Res.* **12**(11):1756–1760.
- Carvalho, F., Fernandes, E., Remião, F., and Bastos, M.L. (1999). Effect of *d*-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defences. *Arch. Toxicol.* **73**:83–89.
- Ondrejickova, O., Dzurba, A., Sedlák, J., Tokárová, J., Macicková, T., and Benes, L. (1991). Processes linked to the formation of reactive oxygen species are not necessarily involved in the development of isoproterenol-induced hypertrophy of the heart. The effect of stobadine. *Biomed. Biochim. Acta.* **50**(12):1251–1254.
- Sharikabad, M.N., Hagelin, E.M., Hagberg, I.A., Lyberg, T., and Brors, O. (2000). Effect of calcium on reactive oxygen species in isolated rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**(3):441–452.
- Ramos, K., Combs, A.B., and Acosta, D. (1984). Role of calcium in isoproterenol cytotoxicity to cultured myocardial cells. *Biochem. Pharmacol.* **33**(12):1989–1992.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M., and Doelman, C.J.A. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 3C):2S–13S.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., and Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **13**(3):135–160.
- Kalyanaraman, B., Premovic, P.I., and Sealy, R.C. (1987). Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. *J. Biol. Chem.* **262**(23):11,080–11,087.
- Spencer, J.P.E., Jenner, P., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., and Halliwell, B. (1998). Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **71**:2112–2122.
- Byington, K.H. (1998). Detection of dopamine-tissue adducts. *Life Sci.* **63**(1):41–44.
- Giulivi, C. and Cadenas, E. (1998). Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* **25**(2):175–183.
- Fox, P.L., Mazumder, B., Ehrenwald, E., and Mukhopadhyay, C.K. (2000). Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **28**(12):1735–1744.
- Foppoli, C., Coccia, R., Cini, C., and Rosei, M.A. (1997). Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**:200–206.
- Heacock, R.A. (1959). The chemistry of adrenochrome and related compounds. *Chem Rev.* **59**:181–237.
- Jacobs, D.S., Kasten, B.L., DeMott, W.R., and Wolfson, W.L. (1990). *Laboratory Test Handbook*, Lexi-Comp Inc., Hudson, USA.
- Timerman, A.P., Altschuld, R.A., Hohl, C.M., Brierley, G.P., and Merola, A.J. (1990). Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* **22**(5):565–575.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 3C):14S–22S.
- Gilliland, G.L. (1993). Glutathione proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**:875–884.

30. Vega, M.C., Walsh, S.B., Mantle, T.J., and Coll, M. (1998). The three-dimensional structure of Cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1. Carboxymethylation dramatically decreases the affinity for glutathione and is associated with a loss of electron density in the alphaB-310B region. *J. Biol. Chem.* **273**(5):2844–2850.
31. Rathore, N., John, S., Kale, M., and Bhatnagar, D. (1998). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol. Res.* **38**(4):297–303.
32. Ithayarasi, A.P. and Devi, C.S. (1997). Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **41**(4):369–376.
33. Ommen, B.V., Ploemen, J.H.T.M., Bogaards, J.J.P., Monks, T.J., Gau, S.S., and Bladeren, P.J.V. (1991). Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. *Biochem. J.* **276**:661–666.
34. Dhalla, K.S., Ganguly, P.K., Rupp, H., Beamish, R.E., and Dhalla, N.S. (1989). Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Mol. Cell. Biochem.* **87**:85–92.
35. Persoon-Rothert, M., Valk-Kokshoorn, E.J.M.V.D., Egas-Kenniphaas, J.M., Mauve, I., and Laarse, A.V.D. (1989). Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**:1285–1291.
36. Ramos, K., Combs, A.B., and Acosta, D. (1983). Cytotoxicity of isoproterenol to cultured heart cells: effects of antioxidants on modifying membrane damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **70**:317–323.
37. Ramos, K. and Acosta, D. (1983). Prevention by L(-) ascorbic acid of isoproterenol induced cardiotoxicity in primary cultures of rat myocytes. *Toxicology* **26**:81–90.

**5.6 Indução da oxidação do isoproterenol a isoprenocromo pelo  $\text{Cu}^{2+}$  em cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto**

## Cu<sup>2+</sup>-Induced Isoproterenol Oxidation into Isoprenochrome in Adult Rat Calcium-Tolerant Cardiomyocytes

Fernando Remião,\* Márcia Carvalho, Helena Carmo, Félix Carvalho, and Maria L. Bastos

CEQUP/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,  
Rua Anibal Cunha, 164, 4050/047 Porto, Portugal

Received February 6, 2002

Sustained high levels of circulating catecholamines may induce cardiotoxicity. There is increasing evidence that this could result from catecholamine oxidation into aminochromes, which is catalyzed by transition metals. In fact, it has already been shown that copper-induced oxidation of the  $\beta$ -agonist isoproterenol decreases the viability of isolated cardiomyocytes. Thus, the aim of this work was to contribute for the clarification of the mechanisms underlying the toxic effects of isoproterenol, Cu<sup>2+</sup> and their concomitant effect in isolated rat cardiomyocytes. Freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat were incubated with 1 mM isoproterenol, 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> or with both during 4 h. Isoproterenol and its aminochrome (isoprenochrome), and reduced and oxidized glutathione were measured at each hour in the incubation medium and in the cells. The intracellular activities of the selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase were determined after 4 h of incubation. Isoprenochrome was found in both cells and incubation medium in samples incubated with isoproterenol alone. However, in the isoproterenol plus Cu<sup>2+</sup> samples, a greater depletion of isoproterenol accompanied by a proportional increase of isoprenochrome was observed. This higher ISO oxidation resulted in the depletion of intracellular glutathione and in the release of oxidized glutathione to the incubation medium. The content of total glutathione (intra- and extracellular) and the intracellular activity of the selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase were also decreased in the isoproterenol plus Cu<sup>2+</sup> samples. These results seem to indicate that the oxidative stress resulting from catecholamine/transition metal association may contribute to catecholamine cardiotoxicity.

### Introduction

The excessive release of catecholamines is often associated with stress due to the lifestyle of Western societies (1). Sympathetic activity can be increased by reduced physical activity and hypercaloric nutrition (2). Furthermore, pathologies such as ischemia (3) and pheochromocytoma (4) lead to the release of enormous quantities of catecholamines into the interstitial space and circulation, respectively. The  $\beta$ -agonist isoproterenol (or isoprenaline, ISO)<sup>1</sup> is a synthetic catecholamine, which is used in experimental toxicology as a model compound for the study of catecholamine-related toxicity (1, 2, 5). In fact, several myocardial toxic effects related to high levels of circulating ISO have been reported. These effects include myocardial necrosis (1, 2), which could result from alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis (1), lipid peroxidation (1, 2, 6), and decrease in ATP and creatine phosphate stores (1).

Although a sustained excess of catecholamines exerts cardiotoxic effects primarily via binding to adrenoceptors and subsequent intracellular Ca<sup>2+</sup> overload (1, 7), there is increasing evidence that catecholamine-induced cardiotoxicity may also occur through oxidative mechanisms (5, 8, 9). Furthermore, it was reported that catecholamine oxidation occurs in the brain (10) and that the oxidation of dopamine is involved in the Parkinson's disease (11, 12). The oxidative stress induced by catecholamines results from their capacity to oxidize into *o*-quinones, which are reactive intermediates that can undergo an irreversible 1,4-intramolecular cyclization leading to the formation of aminochromes (2,3-dihydroindole-5,6-diones) (2, 13). Isoproterenol is oxidized to isoproterenol-*o*-quinone, which cyclizes and oxidizes to isoprenochrome. This process can occur by autoxidation, enzymatically or metal-catalyzed, and involves the formation of reactive intermediates and free radicals. Aminochromes can be further transformed into several other compounds, such as aminolutins that were detected in plasma of normal rats (14) and in plasma of rats pretreated with lipopolysaccharide (15), aminochrome-aminolutin dimers, and melanins (2, 8). Aminochromes can also be reduced to leucoaminochrome-*o*-quinone, which was reported to be extremely reactive (16).

It is known that catecholamine-*o*-quinones are likely to attack external nucleophilic groups such as -SH,

\* Correspondence should be addressed to this author at CEQUP/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, 4050/047 Porto, Portugal. Tel: 351-222078908; FAX: 351-222003977; E-mail: remiao@ff.up.pt.

<sup>1</sup> Abbreviations: ISO, isoproterenol; GPX, selenium-dependent glutathione peroxidase; GST, glutathione-S-transferase; GR, glutathione reductase; DAD, diode-array-detection; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HO<sup>•</sup>, hydroxyl radical; MAO, monoamine oxidase; COMT, catechol-*O*-methyltransferase.

-OH, and -NH<sub>2</sub> of amino acids (1, 2). Similarly, aminochromes oxidize protein sulfhydryl groups and catalyze the deamination of a variety of amines and amino acids (8, 9). Adrenochrome and ISO oxidation products have been reported to induce cell damage, contractile failure, and impairment of mitochondrial energy production in perfused rat heart (9). Also, adrenochrome and oxidized epinephrine solutions were reported to inhibit monoamine oxidase (9), alkaline phosphatase (9), and adenylyl cyclase (17) in a variety of tissues. In the same way, dopa and dopamine oxidation products (18), and isoproterenol oxidation products (19) were reported to inhibit *in vitro* creatine kinase and glutathione reductase, respectively. We have recently shown that Cu<sup>2+</sup> induces ISO oxidation in isolated cardiomyocyte suspensions by measuring ISO depletion after incubation with Cu<sup>2+</sup> (5). This ISO oxidation process and/or the products of oxidation induced the loss of cardiomyocyte viability, the oxidation of glutathione in the suspension (cells plus incubation medium), and the decrease of the activities of selenium-dependent glutathione peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST), and glutathione reductase (GR) in the suspension (5). The present study attempts to deepen the significance of these results by measuring one product of isoproterenol oxidation and by independently evaluating the intracellular and extracellular biomarkers. Thus, not only the ISO depletion but also the isoprenochrome formation was measured, and these parameters were correlated with the levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) separately, in the incubation medium and in the cells. The intracellular activities of the GPX, GST, and GR of viable cells were also determined in the present study but only after discarding the extracellular products of isoproterenol oxidation, which could impair enzyme kinetics during the measurements.

Noteworthy, copper is an essential trace element, which plays an important role in cell physiology as a component of several metalloenzymes, namely, lysyl oxidase, CuZn-superoxide dismutase, and cytochrome *c* oxidase (20). The association between Cu<sup>2+</sup> and dopamine was reported to be neurotoxic in rat substantia nigra neuronal cell line (16). Copper is transported in serum essentially bound to ceruloplasmin, which was also reported to oxidize catecholamines (8).

Overall, catecholamine-*o*-quinones, aminochromes, reactive intermediates, and the radical species resulting from these oxidation processes are thought to be involved in catecholamine cardiotoxicity (5, 8, 9). The presence of transition elements such as copper seems to enhance catecholamine toxicity by promoting their oxidation (5, 16, 21). Thus, the aim of the present study was to contribute for the better understanding of the oxidation mechanism and toxic effects induced by ISO, Cu<sup>2+</sup> and their concomitant effect in isolated cardiomyocytes.

## Materials and Methods

**Caution:** The following chemicals are hazardous and should be handled carefully: perchloric acid, acetonitrile, and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene should be handled with a lab coat, eye protection, gloves, and under the hood; collagenase, protease, and NADPH should be handled with a lab coat, eye protection, and gloves.

**Adult Rat Cardiomyocytes.** Isolation of calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat was performed by collagenase and protease perfusion as previously described (22, 23). Adult

male Wistar rats, weighing 175–225 g, were used. Incubations were performed at 37 °C, using 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL in modified Krebs–Henseleit solution supplemented with 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.2) and saturated with an air stream of carbogen. After 30 min of preincubation, 1 mM ISO and/or 20 μM Cu<sup>2+</sup> (final concentrations) was added to the cell suspensions. Incubations were performed for 4 h. A control group that was ISO- and Cu<sup>2+</sup>-free was also assayed.

**Biochemical Analysis.** Aliquots of cell suspensions were collected and immediately centrifuged at 300g for 2 min at time zero and at each hour of the 4 h of incubation. The supernatant was used for the incubation medium determinations. The cells were washed with fresh incubation solution, centrifuged at 300g for 2 min, and removed from supernatant. After repeating this step 2 more times, the cells were used for cellular determinations.

GSH and GSSG were quantified as before (24). Briefly, perchloric acid (5% final acid concentration) was added to aliquots of cells (2.5 × 10<sup>4</sup>) or supernatant (100 μL). After centrifugation at 16000g for 10 min in refrigerated centrifuge, the supernatant was injected into a HPLC system with electrochemical detection.

ISO and isoprenochrome were quantified as before (5, 25), with some modifications, by HPLC with diode-array-detection (DAD) at 279 and 220 nm, respectively. The UV spectrum was processed to corroborate peak identification of ISO and isoprenochrome present in the samples. Perchloric acid (5% final acid concentration) was added to aliquots of cells (2.5 × 10<sup>5</sup>) or supernatant (100 μL) and immediately centrifuged for 15 s. The supernatant was neutralized with KHCO<sub>3</sub>, centrifuged for 15 s, and injected into the HPLC-DAD system. A RP-8 (5 μm) column was used. The mobile phase was 95% of 10 mM aqueous ammonium acetate (pH 2.5) and 5% acetonitrile in an isocratic elution at a flow rate of 1 mL/min and at room temperature.

The standard curve of isoprenochrome was estimated by oxidation of known concentrations of ISO with 2 mM NaIO<sub>4</sub> in a 0.1 mM aqueous ammonium acetate buffer (pH 5.8). The reactions were conducted at room temperature with vigorous shaking for 1 min. Samples were immediately injected into the HPLC-DAD system. The total oxidation of ISO into isoprenochrome was assumed since (i) the ISO peak in the chromatograms at 279 nm was absent, and (ii) the same treatment applied to known concentrations of epinephrine produced similar concentrations of adrenochrome (confirmed by injection of adrenochrome standards).

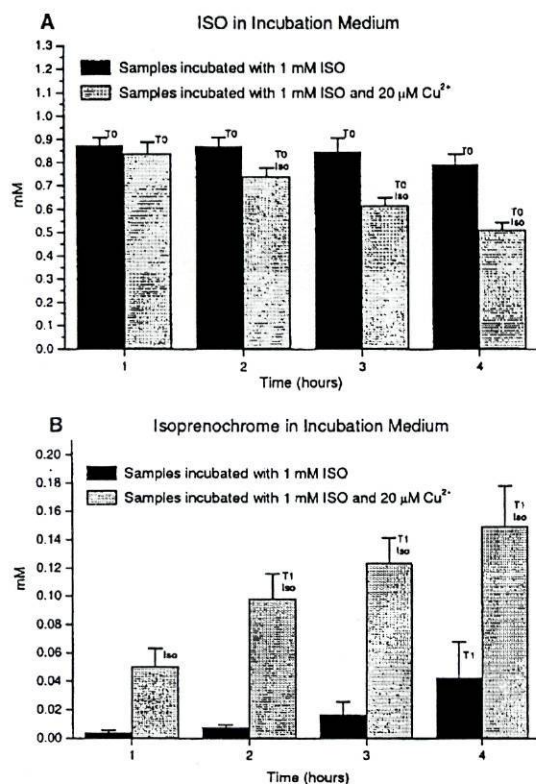
For the determination of GPX, GR, and GST activities, cell aliquots were resuspended in adequate buffers, sonicated for 12 s at medium intensity, and then centrifuged (16000g for 5 min). The GPX, GR, and GST activities were determined in the supernatant as previously described (5). Briefly, GR was determined by following NADPH oxidation at 340 nm during the reduction of GSSG to GSH. GPX was determined by following NADPH oxidation at 340 nm after GSSG reduction by GR. Finally, GST was determined by following the formation of the GSH conjugate with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, which was also monitored at 340 nm. All enzymes were determined in triplicate in a 96 well plate reader.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as mean ± standard deviation (mean ± SD) and were analyzed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Scheffé Test. Results with *p* ≤ 0.05 were considered as statistically different.

## Results

To correlate the toxicological responses at the intracellular level with the ISO oxidation process, ISO and its oxidation product isoprenochrome were separately quantified in both incubation medium (extracellular medium) and cells.

Measurement of ISO concentrations in the incubation medium during the incubation of samples with 1 mM ISO showed an ISO depletion relative to the initial level

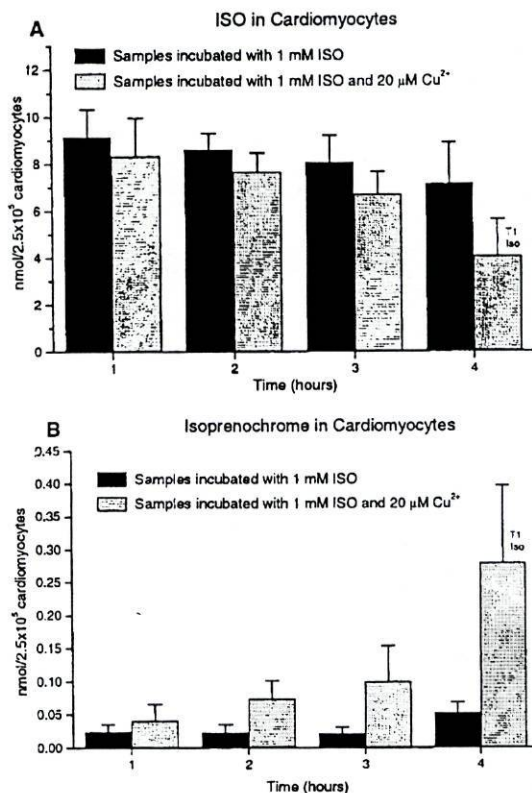


**Figure 1.** ISO (A) and isoprenochrome (B) concentration in incubation medium after 1 mM ISO and 1 mM ISO plus 20 μM Cu<sup>2+</sup> incubation in cardiomyocyte suspensions during 4 h (mean ± SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 6$ ). ISO, compared to 1 mM ISO at the same time. T0, compared to time zero (A). T1, compared to time 1 h (B).

(Figure 1A). The ISO levels significantly decreased from 1 mM at time zero to 0.87, 0.87, 0.85, and 0.79 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively. The addition of 20 μM Cu<sup>2+</sup> to the ISO-treated cell suspensions induced a faster and time-dependent depletion of ISO. Isoproterenol levels significantly decreased from 1 mM at time zero to 0.84, 0.74, 0.62, and 0.51 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 1A). Furthermore, at 2, 3, and 4 h of incubation, the ISO concentrations in the presence of Cu<sup>2+</sup> were significantly lower than those in the absence of Cu<sup>2+</sup> (Figure 1A).

The depletion of ISO seems to result from ISO oxidation, as suggested by the appearance of a red coloration in the incubation medium, which is characteristic of aminochromes. In fact, isoprenochrome appears in incubation medium after 1 h of incubation, and its concentration significantly increased along the incubation time in the presence or absence of Cu<sup>2+</sup> (Figure 1B). In ISO alone samples, isoprenochrome concentration was 0.004, 0.008, 0.017, and 0.043 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 1B). In the presence of Cu<sup>2+</sup>, the concentrations of isoprenochrome were significantly higher (0.05, 0.10, 0.12, and 0.15 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively) (Figure 1B).

The presence of ISO in the incubation medium leads to the ISO uptake by cells (Figure 2A). The concentration of ISO in cells, after 1 h of incubation, was 9.2 and 8.3 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes in ISO alone and in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples, respectively. These concentrations show a tendency to decrease along the incubation time

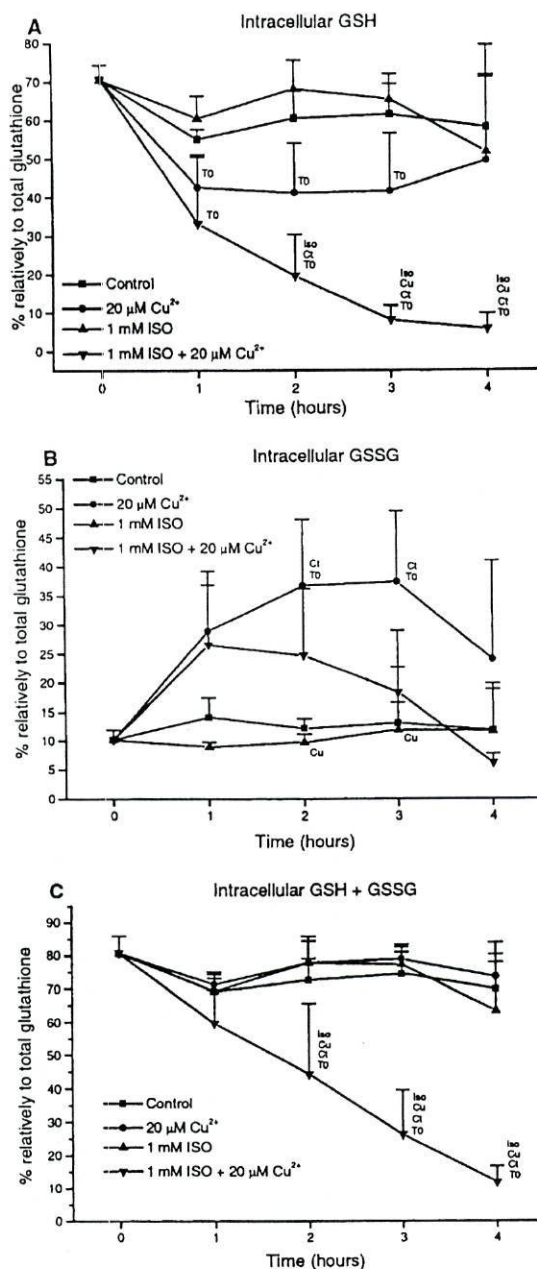


**Figure 2.** ISO (A) and isoprenochrome (B) concentration in cardiomyocytes after 1 mM ISO and 1 mM ISO plus 20 μM Cu<sup>2+</sup> incubation in cardiomyocyte suspensions during 4 h (mean ± SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 6$ ). ISO, compared to 1 mM ISO at the same time. T1, compared to time 1 h.

for both samples, but this depletion is only significant in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples after 4 h of incubation (Figure 2A). At this time, the intracellular concentration of ISO in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples was 4.0 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes and was significantly lower than the ISO concentration in samples incubated with ISO alone (7.1 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes).

Isoprenochrome was also detected in cells (Figure 2B). In ISO alone samples, the concentration of isoprenochrome was 0.02 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes between 1 and 3 h of incubation and 0.05 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes after 4 h of incubation. In ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples, the concentration of isoprenochrome was 0.04, 0.07, 0.10, and 0.28 nmol/2.5 × 10<sup>5</sup> cardiomyocytes after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 2B). The concentration of isoprenochrome in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples after 4 h of incubation was significantly higher than after 1 h of incubation and also significantly higher than the values found for ISO alone samples after 4 h of incubation (Figure 2B). The observed increasing content of isoprenochrome in cells is in accordance with the decrease of ISO also measured in the cells.

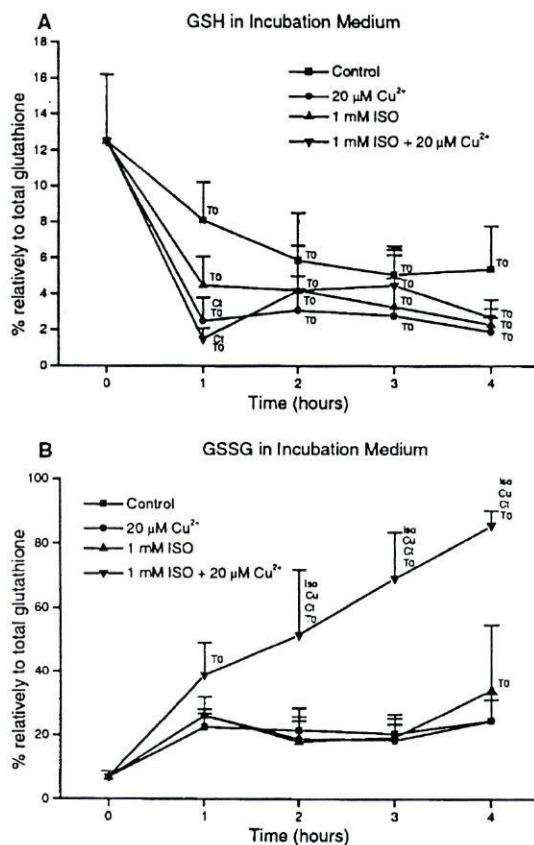
The oxidative stress induced by 1 mM ISO and/or 20 μM Cu<sup>2+</sup> in the cardiomyocyte suspensions was evaluated by measuring the intra- and extracellular GSH and GSSG contents. Figure 3 shows the percent of the intracellular content of GSH, GSSG, and GSH + GSSG relative to total glutathione (intra- and extracellular). Figure 4 shows the percent of extracellular content of GSH and GSSG relative to total glutathione. Figure 5 shows the percent of total glutathione content during the



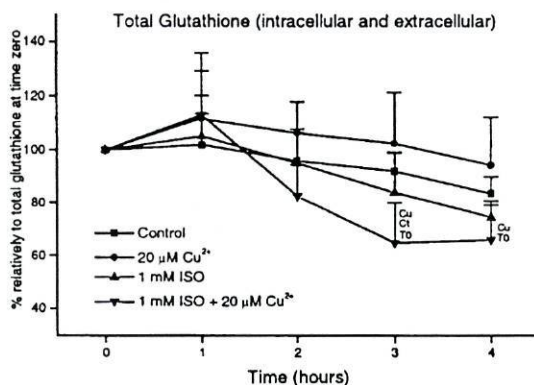
**Figure 3.** Intracellular percentage of GSH (A), GSSG (B), and GSH + GSSG (C) relative to total glutathione in the cardiomyocyte suspensions in control, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 1 mM ISO, and 1 mM ISO plus 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  incubations during 4 h (mean  $\pm$  SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 5$ ). Ct, compared to control at the same time. Cu, compared to 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at the same time. ISO, compared to 1 mM ISO at the same time. T0, compared to time zero.

course of experiments relative to the total glutathione at time zero.

In control samples, the intracellular levels of GSH, GSSG, and GSH + GSSG seem to be quite stable during the 4 h of incubation. No significant differences were observed for these parameters during all the incubation time when compared to the initial values (Figure 3). The extracellular level of the GSH content in control samples was significantly reduced from 12.5% of total glutathione at time zero to 8.1, 5.9, 5.1, and 5.4% after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 4A). However, no



**Figure 4.** Extracellular percentage of GSH (A) and GSSG (B) relative to total glutathione in the cardiomyocyte suspensions in control, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 1 mM ISO, and 1 mM ISO plus 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  incubations during 4 h (mean  $\pm$  SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 5$ ). Ct, compared to control at the same time. Cu, compared to 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at the same time. ISO, compared to 1 mM ISO at the same time. T0, compared to time zero.



**Figure 5.** Percentage of total glutathione (intracellular plus extracellular) relative to time zero in cardiomyocyte suspensions in control, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 1 mM ISO, and 1 mM ISO plus 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  incubations during 4 h (mean  $\pm$  SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 5$ ). Ct, compared to control at the same time. Cu, compared to 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at the same time. ISO, compared to 1 mM ISO at the same time. T0, compared to time zero.

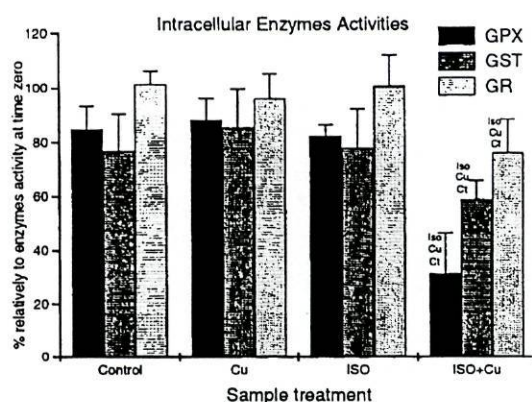
significant differences were observed in GSSG extracellular content (Figure 4B) and in total glutathione content (Figure 5).

In the samples incubated with 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  alone, intracellular GSH was significantly depleted from 70.6% of total glutathione at time zero to 42.5, 41.1 and 41.6%

after 1, 2 and 3 h of incubation, respectively (Figure 3A). This GSH depletion seems to result from its oxidation to GSSG, as it can be shown by the significant increase in intracellular GSSG content from 10.1% of total glutathione at time zero to 36.8 and 37.4% after 2 and 3 h of incubation, respectively (Figure 3B). Accordingly, these values are significantly higher than those of control samples (12.1 and 13.0% of total glutathione after 2 and 3 h of incubation, respectively) (Figure 3B). It is noteworthy that no significant differences were observed in intracellular GSH + GSSG content for Cu<sup>2+</sup> alone samples along the incubation period (Figure 3C). The GSH extracellular content was significantly reduced from 12.5% of total glutathione at time zero to 2.5, 3.1, 2.8 and 1.9% after 1, 2, 3 and 4 h of incubation, respectively (Figure 4A). After 1 h of incubation, extracellular GSH content for samples with Cu<sup>2+</sup> alone was also significantly lower than the control value (8.1%) (Figure 4A). However, similarly to the observed in the control samples, no significant differences were observed in GSSG extracellular content (Figure 4B) or in total glutathione content (Figure 5).

In the samples incubated with 1 mM ISO alone the intracellular GSH, GSSG and GSH + GSSG contents seem to be quite stable. No differences were observed for these parameters throughout the incubation time comparing to time zero or to control levels (Figure 3). The extracellular GSH content in samples with 1 mM ISO alone was significantly reduced from 12.5% of total glutathione at time zero to 4.5, 4.2, 3.3 and 2.3% after 1, 2, 3 and 4 h of incubation, respectively (Figure 4A). These results were accompanied by a significant increase in GSSG extracellular content from 6.8% at time zero to 34.3% of total glutathione after 4 h of incubation (Figure 4B). No significant differences were observed in total glutathione content (Figure 5).

In the samples incubated with 1 mM ISO plus 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>, both intra- and extracellular contents of GSH, GSSG, and GSH + GSSG were drastically changed during the incubation. The intracellular GSH was significantly reduced from 70.6% of total glutathione at time zero to 33.1, 19.6, 8.1, and 5.7% after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 3A). Accordingly, these values were significantly lower than the intracellular GSH content of control samples after 2, 3, and 4 h of incubation (60.6, 61.5, and 58.2% of total glutathione, respectively) (Figure 3A). Comparing the ISO plus Cu<sup>2+</sup> results after 2, 3, and 4 h of incubation with ISO alone results (68.2, 65.4, and 51.8% of total glutathione, respectively) and with Cu<sup>2+</sup> alone results after 3 and 4 h of incubation (41.6 and 49.5% of total glutathione, respectively), a significant depletion of intracellular GSH was observed in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples (Figure 3A). Concerning the intracellular GSSG results (Figure 3B), a tendency for higher levels of GSSG after 1 and 2 h of incubation was observed. However, no significant differences from time zero or control samples were observed during the 4 h of incubation. In the ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples, contrary to observed with the other samples, the levels of intracellular GSH + GSSG were significantly and drastically reduced from 80.7% of total glutathione at time zero to 44.3, 26.3, and 11.8% after 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 3C). These values are time-dependent and significantly different from the control, Cu<sup>2+</sup> alone and ISO alone samples values. In the extracellular GSH, a great depletion was observed at 1

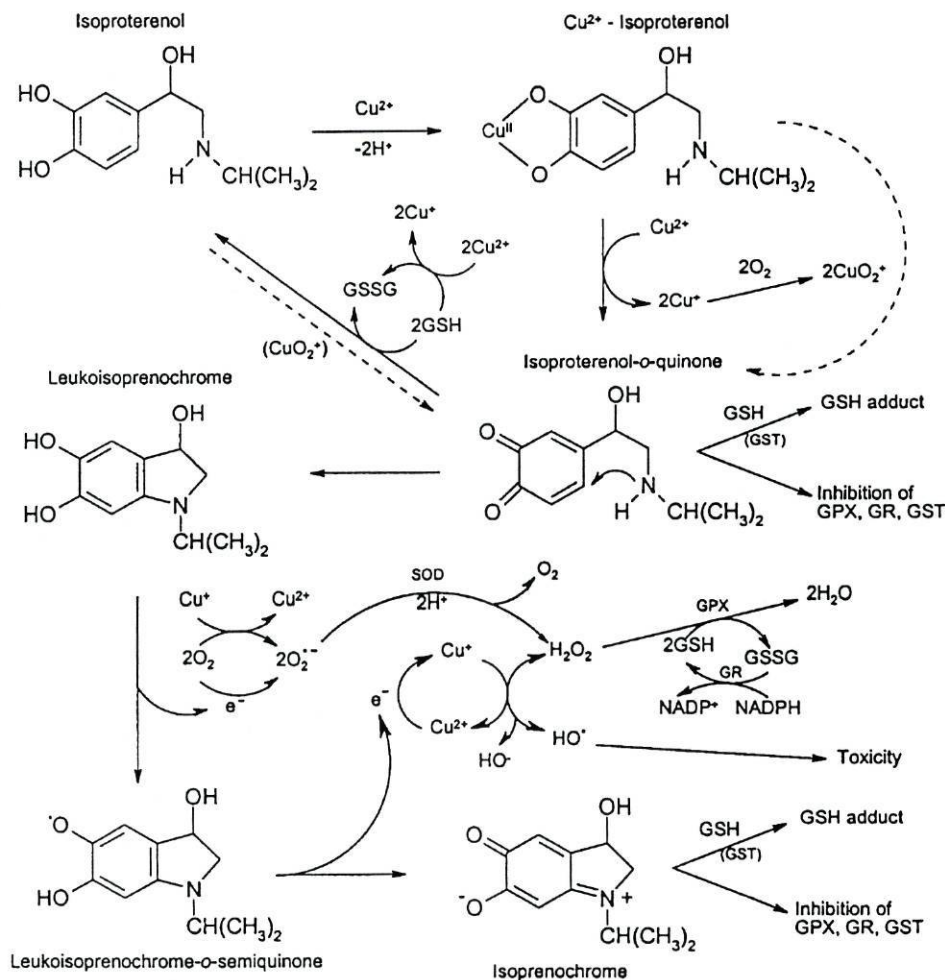


**Figure 6.** Percentage of intracellular GPX, GR, and GST activities relative to time zero after 4 h of incubation with 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>, 1 mM ISO, and 1 mM ISO plus 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> or control (mean  $\pm$  SD).  $p \leq 0.05$  ( $n = 6$ ). Ct, compared to control. Cu, compared to 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>. ISO, compared to 1 mM ISO.

h of incubation. The extracellular GSH was significantly reduced from 12.5% of total glutathione at time zero to 1.5% at 1 h of incubation, which is also significantly lower than the control value, 8.1% (Figure 4A). Extracellular GSH values after 2, 3, and 4 h of incubation (4.2, 4.5, and 2.7% of total glutathione, respectively) are also significantly lower than the time zero value but show a tendency to increase at 1 h of incubation (Figure 4A). The results of extracellular GSSG (Figure 4B) seem to explain the observed depletion of intracellular GSH (Figure 3A). GSSG significantly increased from 6.8% of total glutathione at time zero to 38.8, 51.5, 69.2, and 85.5% after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively (Figure 4B). The observed GSSG values after 2, 3, and 4 h of incubation were also significantly higher than in control, Cu<sup>2+</sup> alone, and ISO alone samples. The intracellular GSH depletion (Figure 3A) can also be explained by the results obtained for total glutathione (Figure 5). Total glutathione content was significantly reduced to 64.8 and 65.9% of initial total glutathione levels after 3 and 4 h of incubation, respectively (Figure 5). Accordingly, these values were significantly lower than those for Cu<sup>2+</sup> alone samples values (102.4 and 94.2% after 3 and 4 h of incubation, respectively) and control samples values (91.9% after 3 h of incubation).

Another parameter evaluated, which is important for the cell response to oxidative stress, was the intracellular activity of the enzymes GPX, GST, and GR. The activity of these enzymes was significantly lower after 4 h of incubation in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples than in control samples (Figure 6). The GPX activity was the most affected and decreased from 84.8% relative to GPX activity at time zero in control to 31.4% in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples. The GST decreased from 76.8% relative to GST activity at time zero in control to 59.0% in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples. Finally, the GR decreased from 101.5% relative to GR activity at time zero in control to 76.1% in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples. No significant differences were observed for the enzyme activities in Cu<sup>2+</sup> alone and ISO alone samples compared to control samples. The observed GPX, GST, and GR activities in ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples were also significantly lower than the activities in Cu<sup>2+</sup> alone samples (88.3, 85.3, and 96.2%, respectively) and in ISO alone samples (82.3, 77.8, and 100.6%, respectively) (Figure 6).

**Scheme 1. Proposed Mechanism for the ISO Oxidation into Isoprenochrome in the Presence of Copper, Glutathione, GPX, GR, and GST**



## Discussion

In normal physiological conditions, the circulatory and interstitial catecholamine concentrations in heart are in the nanomolar range. However, pathological conditions such as pheochromocytoma will increase their levels about 10 times, and during ischemia, the levels can increase to the micromolar range (26, 27). Notwithstanding the low levels of catecholamines, there are many reports suggesting its oxidation as a mechanism of catecholamine cardiotoxicity and neurotoxicity (8, 9). The *in vivo* findings of cysteinyl-dopa derivatives and adrenolutin seem to corroborate this hypothesis (8). Reported *in vivo* studies showed cardiotoxic effects after administration of 40 or 80 mg/kg ISO in rats (9). In previous studies, we found levels of ISO between 100 and 200  $\mu$ M in rat heart 15 min after the administration of 80 mg/kg ISO (*i.p.*) (Remião et al., unpublished data). Thus, the use of 1 mM ISO seems to be acceptable in *in vitro* studies in order to clarify the mechanism of toxicity induced by ISO oxidation.

At physiological pH, autoxidation of catecholamines seems to occur very slowly. However, oxidation of catecholamines is faster when it is enzymatically or metal-catalyzed. In fact, catecholamines are oxidized by enzymes such as xanthine oxidase (28), tyrosinase (29),

several copper-containing catechol oxidases (8), leukocyte myeloperoxidase, and heart muscle cytochrome *c* oxidase (9), and by the presence of cations such as Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, and several Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> chelates (8). Ferrylmyoglobin (30) and nitric oxide (12) are also able to initiate the oxidation of catecholamines.

Serum copper, free and bound, is in the normal range of 11–24  $\mu$ M (31, 32). Total copper concentration in the heart is higher (75  $\mu$ M) (33). Approximately 90% of physiological copper is bound to ceruloplasmin, which has been reported to oxidize catecholamines (8). The remaining copper is bound as a labile pool to albumin or amino acids and is redox-active (33). A correlation between serum ceruloplasmin, copper, and cardiovascular disease has been reported (34). In our study, the presence of 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> in the cardiomyocyte suspension increased the rate and extension of ISO oxidation in incubation medium as can be observed by ISO and isoprenochrome measured levels (Figure 1). This oxidation was time-dependent. We have previously reported that 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> induced ISO depletion in freshly isolated cardiomyocyte suspensions (5). It is known that Cu<sup>2+</sup> forms a complex with catechols (Cu<sup>2+</sup>-catechol) (16, 21, 35) and the oxidation of the catechol into *o*-quinone seems to be initially catalyzed by a reaction of Cu<sup>2+</sup> with this Cu<sup>2+</sup>-

catechol complex (Scheme 1) (35). The chain propagation of the catechol oxidation to *o*-quinone occurs by the reactivity of CuO<sub>2</sub><sup>+</sup>, formed after Cu<sup>+</sup> and O<sub>2</sub> reaction (35), and the oxidation process will continue until isoprenochrome formation. The isoproterenol-*o*-quinone can undergo an irreversible 1,4-intramolecular cyclization involving a nucleophilic attack of the nitrogen atom to the 6-position of the quinone ring, which leads to formation of an unstable leukoisoprenochrome (13). Leukoisoprenochrome is finally oxidized into isoprenochrome with reduction of species present in the system, namely, O<sub>2</sub>, Cu<sup>2+</sup>, or another molecule of *o*-quinone (Scheme 1) (13).

It was observed that ISO levels inversely correlate with the isoprenochrome levels in both incubation medium (Figure 1) and cells (Figure 2). Along the incubation time, ISO concentrations decrease as isoprenochrome concentrations increase. This effect was more pronounced in the ISO plus Cu<sup>2+</sup> samples. The intracellular presence of ISO reflects the cellular uptake of this catecholamine by the extraneuronal amine uptake-2 transport system (4). This transport system is present in the cardiomyocytes and exhibits a high affinity for ISO. In the case of isoprenochrome, its intracellular presence may also result from cellular uptake. In fact, previous studies in isolated perfused rat heart reported the presence of adrenochrome in subcellular fractions after heart perfusion with <sup>14</sup>C-adrenochrome (36). However, since the decrease of ISO in cells is higher during the incubation in the presence of Cu<sup>2+</sup>, it seems likely that the ISO oxidation occurs intracellularly. Furthermore, the uptake of Cu<sup>2+</sup> may be enhanced by the formation of the complex Cu-ISO, thus increasing the intracellular oxidation of ISO. This effect was reported for dopamine, which induces an increase of Cu<sup>2+</sup> uptake in substantia nigra neuronal cells that involves formation of the complex Cu<sup>2+</sup>-dopamine (16). It is noteworthy that ISO and isoprenochrome levels measured in the cells may not reflect only the presence of these molecules intracellularly but also some ISO and isoprenochrome bound to the outer-surface proteins of plasmatic cardiomyocyte membranes, since it is known that both ISO (37) and aminochromes (9) bind to proteins.

In this study, oxidative stress status was evaluated by measuring GSH and GSSG levels in the cells and in the incubation medium. GSH (Figure 3A), GSSG (Figure 3B), and GSH + GSSG levels (Figure 3C) in control cells were stable during the 4 h of incubation. However, a depletion of GSH was observed in the incubation medium of control samples (Figure 4A). Furthermore, a tendency for an increase in the GSSG content in the incubation medium was observed, although not significant (Figure 4B). These results are in agreement with the reported GSH oxidation in suspensions of isolated cardiomyocytes (22).

In cell samples incubated with 20 μM Cu<sup>2+</sup> alone, intracellular GSH was oxidized, without changes in the intracellular GSH + GSSG content along the incubation time (Figure 3). The Cu<sup>2+</sup> uptake by cardiomyocytes seems to occur via transport processes for essential metals such as SH-containing membrane carriers, pores, and Ca<sup>2+</sup> channels (38). The GSH oxidation induced by Cu<sup>2+</sup> can be explained in two ways (Scheme 1): (i) a direct reduction of Cu<sup>2+</sup> to Cu<sup>+</sup> (39); (ii) a reduction of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (40) produced in the presence of Cu<sup>2+</sup>. We have previously reported the GSH oxidation in cardiomyocyte suspensions after incubation with 20 μM Cu<sup>2+</sup>, which induced a slight decrease of cell viability (5). In fact, the presence of copper

may induce the production of the hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>) by the Fenton reaction with subsequent cytotoxic effects (40). In the incubation medium, the GSH content was depleted along the incubation time (Figure 4A). This depletion was faster and greater than in control samples, but no significant differences were observed in extracellular GSSG content (Figure 4B) or in total glutathione content (Figure 5). However, a tendency to an increase in GSSG content was observed (Figure 4B), which seems to indicate the GSH oxidation.

The intracellular glutathione status was not changed by the presence of ISO and isoprenochrome in ISO alone treated cells at the assayed concentrations (Figure 3). Notwithstanding the presence of isoprenochrome (Figure 2B) and the ISO tendency to decrease during the incubation (Figure 2A), no GSH oxidation was observed at the intracellular level. The observed ISO tendency to decrease may be explained by ISO autooxidation and/or enzymatic metabolism, but the absence of GSH oxidation indicates a low level of oxidative stress resulting from ISO oxidation. In fact, ISO autooxidation seems to occur very slowly at physiological pH (Figure 1A). Concerning the metabolism, catecholamines are metabolized by monoamine oxidase (MAO) and catechol-*O*-methyltransferase (COMT) (4). Metabolism of catecholamines by MAO generates hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a byproduct (41). However, catecholamines are metabolized in effector cells such as cardiomyocytes mainly by COMT, which metabolizes ISO to 3-*O*-methylisoproterenol (4). Furthermore, catecholamine *O*-methylation inhibits its nonenzymatic oxidation (21). Thus, the decreasing tendency of the ISO cellular content could result mainly from COMT (and MAO) activity and not from ISO oxidation into isoprenochrome. Concerning the isoprenochrome presence in the cells, it is likely that it results mainly from isoprenochrome uptake and binding to the outer-surface proteins of plasmatic membrane. The absence of intracellular oxidative stress could explain the unchanged cardiomyocyte viability after 1 mM ISO treatment as we have previously reported (5). In the incubation medium, GSH was oxidized in the presence of ISO, maximally after 4 h of incubation, which is in agreement with the observed extracellular ISO depletion (Figure 1A) and isoprenochrome formation (Figure 1B). Accordingly, we have previously reported GSH oxidation in cardiomyocyte suspensions after 1 mM ISO treatment (5).

In cell samples incubated with 1 mM ISO plus 20 μM Cu<sup>2+</sup>, intracellular GSH levels were drastically depleted (Figure 3A). This depletion was greater than with Cu<sup>2+</sup> alone. However, although a tendency to an increase in the intracellular GSSG content was observed after 1 and 2 h of incubation, it was not significant (Figure 3B). It is noteworthy that a time-dependent depletion of GSH + GSSG occurs in the cells (Figure 3C). Furthermore, a time-dependent increase of extracellular GSSG was also observed (Figure 4B), which cannot be only attributed to GSH oxidation in incubation medium (Figure 4A). All these results seem to indicate that intracellular GSH oxidation occurs with GSSG release to the incubation medium. This correlates with the observed intracellular ISO depletion and isoprenochrome increase (Figure 2). The ISO depletion at this point seems to occur mainly via oxidation catalyzed by Cu<sup>2+</sup>. The extracellular GSH also shows a tendency to increase between 1 and 3 h of incubation, which could result from cell membrane disruption (Figure 4A). The observed oxidative stress is

in agreement with our previous findings of strong cell hypercontracture, membrane disruption, and GSH oxidation in cardiomyocyte suspensions after treatment with 1 mM ISO plus 20  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> (5). The higher hypercontracture (15% rod-shaped cells) and cell disruption (48%) reported occurred after 4 h of incubation and can be related to the presence of 0.28 nmol of isoprenochrome per 2.5  $\times$  10<sup>5</sup> cardiomyocytes obtained in the present study. Accordingly, the prevention of ISO toxicity in neonatal rat heart cell cultures by antioxidants indicates the oxidation of ISO as a toxicity mechanism (7, 42). The oxidation of GSH seems to result from the oxidative status created by Cu<sup>2+</sup>-induced ISO oxidation into isoprenochrome (Scheme 1), both in cells (Figure 2) and in incubation medium (Figure 1). However, GSH seems to be not only oxidized but also conjugated, as can be deduced by total glutathione depletion after 3 and 4 h of incubation (Figure 5). A similar tendency was observed in ISO alone samples. This indicates a possible formation of thiol adducts with the quinones resulting from ISO oxidation (isoproterenol-*o*-quinone and isoprenochrome) (Scheme 1) (8, 43), as has been reported for dopamine oxidation products (44). Accordingly, *in vivo* studies have reported lipid peroxidation (1, 2, 6, 45), GSSG formation (6), and Ca<sup>2+</sup> accumulation (1, 6) in rat hearts after treatment with ISO. Furthermore, some of these effects were partially prevented by pretreating the rats with vitamin E (1, 6).

The cardiomyocyte incubation with ISO plus Cu<sup>2+</sup> decreased the activities of the enzymes GPX, GR, and GST after 4 h of incubation (Figure 6). Previous *in vitro* studies with purified enzymes have reported the inhibition of GR by ISO oxidation products (19) and GST by quinones (46). We have already reported the inhibition of GPX, GR, and GST in cardiomyocyte suspensions incubated with ISO plus Cu<sup>2+</sup> (5). However, in the present study, the cells were washed with fresh incubation medium before determination of the enzyme activity, thus avoiding contact of the enzymes with ISO oxidation products present in incubation medium. Therefore, in the present study, the enzyme activity reflects the intracellular activity at the time of sampling and not the activity of the enzymes in the suspension after myocyte membrane disruption. The observed depletion of enzyme activities may result in part from loss of the enzymes after cell membrane disruption during the 4 h of incubation. However, the different levels of enzyme activity depletion suggest the inhibition of the enzymes. GPX, GR, and GST are SH-dependent enzymes (47, 48), and their SH groups can react with ISO quinones and isoprenochrome leading to enzyme inactivation (Scheme 1). Aminochromes were found to inactivate the adenylyl cyclase, myosin ATPase, MAO, and COMT either through oxidation or through covalent adduct formation on their thiol groups (8, 9, 17). Accordingly, some *in vivo* studies have reported the reduction of activity of GST (45, 49), GPX (45, 49), and GR (49) after ISO administration to rats. The inhibition of these enzymes not only reflects an oxidative stress effect, but also exposes the cells to further oxidative damage, since GR, GPX, and GST are essential enzymes in cell protection against reactive oxygen species and electrophilic compounds (Scheme 1). Furthermore, GST has been reported to catalyze the reductive GSH conjugation of aminochromes (50).

## Conclusion

Isoprenochrome was detected in cardiomyocytes after incubation with ISO. Furthermore, in the presence of Cu<sup>2+</sup>, the oxidation of ISO into isoprenochrome was greatly increased. In cells, Cu<sup>2+</sup> itself induced GSH oxidation, but the Cu<sup>2+</sup> association with ISO greatly enhanced GSSG formation, which is subsequently released to the medium, and induced GSH depletion probably by conjugation with the *o*-quinones formed. Furthermore, the intracellular activity of GPX, GR, and GST decreased after ISO plus Cu<sup>2+</sup> incubation, which reflects oxidation or covalent adduct formation on their thiol groups. These results seem to indicate that oxidative stress resulting from catecholamine/transition metal association may contribute to catecholamine cardiotoxicity.

**Acknowledgment.** This work was supported by a project from FCT and POCTI, Portugal, and by FEDER European Community funding (project POCTI/36099/FCEB/2000).

## References

- Dhalla, K. S., Rupp, H., Beamish, R. E., and Dhalla, N. S. (1996) Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca<sup>2+</sup> transport due to excess catecholamines. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **10**, 231–238.
- Rupp, H., Dhalla, K. S., and Dhalla, N. S. (1994) Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24** (Suppl. 1), S16–S24.
- Akiyama, T., and Yamazaki, T. (2001) Myocardial interstitial norepinephrine and dihydroxyphenylglycol levels during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **49**, 78–85.
- Hoffman, B. B. (2001) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics* (Hardman, J. G., Limbird, L. E., and Gilman, A. G., Eds.) pp 215–268, McGraw-Hill, New York.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2001) Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovasc. Toxicol.* **1**, 195–204.
- Tappia, P. S., Hata, T., Hozaima, L., Sandhu, M. S., Panagia, V., and Dhalla, N. S. (2001) Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 85–92.
- Ramos, K., Combs, A. B., and Acosta, D. (1984) Role of calcium in isoproterenol cytotoxicity to cultured myocardial cells. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1989–1992.
- Bindoli, A., Rigobello, M. P., and Deeble, D. J. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biol. Med.* **13**, 391–405.
- Dhalla, N. S., Sasaki, H., Mochizuki, S., Dhalla, K. S., Liu, X., and Elimban, V. (2001) Catecholamine-induced cardiomyopathy. In *Cardiovascular toxicity* (Acosta, J. D., Ed.) pp 269–318, Raven Press, New York.
- Smythies, J., and Galzigna, L. (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 159–162.
- Martinez-Alvarado, P., Dagnino-Subiabre, A., Paris, I., Metodiowa, D., Welch, C. J., Olea-Azar, C., Ceviedes, P., Ceviedes, R., and Segura-Aguilar, J. (2001) Possible role of salsolinol quinone methide in the decrease of RCSN-3 cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 1069–1076.
- Riobó, N. A., Schopfer, F. J., Boveris, A. D., Cadenas, E., and Poderoso, J. J. (2002) The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Biol. Med.* **32**, 115–121.
- Bindoli, A., Rigobello, M. P., and Galzigna, L. (1989) Toxicity of aminochromes. *Toxicol. Lett.* **48**, 3–20.
- Dhalla, K. S., Ganguly, P. K., Rupp, H., Beamish, R. E., and Dhalla, N. S. (1989) Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Mol. Cell. Biochem.* **87**, 85–92.

- (15) Macarthur, H., Westfall, T. C., Riley, D. P., Misko, T. P., and Salvemini, D. (2000) Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9753–9758.
- (16) Paris, I., Dagnino-Subiabre, A., Marcelain, K., Bennett, L. B., Caviedes, P., Caviedes, R., Azar, C. O., and Segura-Aguilar, J. (2001) Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J. Neurochem.* **77**, 519–529.
- (17) Ebina, T., Toya, Y., Oka, N., Schwencke, C., Kawabe, J., and Ishikawa, Y. (1997) Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase by oxidized catecholamines. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1247–1254.
- (18) Miura, T., Muraoka, S., and Fugimoto, Y. (1999) Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin. *Chem.-Biol. Interact.* **123**, 51–61.
- (19) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (1999) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J. Enzymol. Inhib.* **15**, 47–61.
- (20) Goyer, R. A., and Clarkson, T. W. (2001). Toxic effects of metals. In *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons* (Klaassen, C. D., Ed.) pp 811–867, McGraw-Hill, New York.
- (21) Miller, J. W., Selhub, J., and Joseph, J. A. (1996) Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radical Biol. Med.* **21**, 241–249.
- (22) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2001) Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Anim.* **37**, 1–4.
- (23) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2001) The study of oxidative stress in freshly isolated Ca<sup>2+</sup>-tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicol. Vitro* **15**, 283–287.
- (24) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2000) Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* **14**, 468–473.
- (25) Lemos-Amado, F., Domingues, P., Ferrer-Correia, A., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Carvalho, F. D., and Bastos, M. L. (2001) Electrospray tandem mass spectrometry of aminochromes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2466–2471.
- (26) Wheatley, A. M., Thandroyen, F. T., and Opie, L. H. (1985) Catecholamine-induced myocardial cell damage: catecholamines or adrenochrome. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**, 349–359.
- (27) Lameris, T. W., Zeeuw, S. d., Alberts, G., Boomsma, F., Duncker, D. J., Verdouw, P. D., Veld, A. J. M. i. t., and Meiracker, A. H. v. d. (2000) Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* **101**, 2645–2650.
- (28) Foppoli, C., Coccia, R., Cini, C., and Rosei, M. A. (1997) Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**, 200–206.
- (29) Heacock, R. A. (1959) The chemistry of adrenochrome and related compounds. *Chem. Rev.* **59**, 181–237.
- (30) Giulivi, C., and Cadenas, E. (1998) Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radical Biol. Med.* **25**, 175–183.
- (31) Lauwerys, R. R. (1996). Occupational toxicology. In *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons* (Klaassen, C. D., Ed.) pp 987–1009, McGraw-Hill, New York.
- (32) Jacobs, D. S., Kasten, B. L., DeMott, W. R., and Wolfson, W. L. (1990) *Laboratory test handbook*, Lexi-Comp INC, Hudson.
- (33) Powell, S. R., Hyacinthe, L., Teichberg, S., and Tortolani, A. J. (1992) Mediatory role of copper in reactive oxygen intermediate-induced cardiac injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **24**, 1371–1386.
- (34) Fox, P. L., Mazumder, B., Ehrenwald, E., and Mukhopadhyay, C. K. (2000) Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radical Biol. Med.* **28**, 1735–1744.
- (35) Balla, J., Kiss, T., and Jameson, R. F. (1992) Copper(II)-catalyzed oxidation of catechol by molecular oxygen in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **31**, 58–62.
- (36) Fliegel, L., Takeo, S., Beamish, R. E., and Dhalla, N. S. (1985) Adrenochrome uptake and subcellular distribution in the isolated perfused rat heart. *Can. J. Cardiol.* **1**, 122–127.
- (37) Moffat, A. C. (1986) *Clarke's isolation and identification of drugs* (Jackson, J. V., Moss, M. S., and Widdop, B., Eds.) The Pharmaceutical Press, London.
- (38) Limaye, D. A., and Shaikh, Z. A. (1999) Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 59–66.
- (39) Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **91** (Suppl. 3C), 14S–22S.
- (40) Gregus, Z., and Klaassen, C. D. (2001). Mechanisms of toxicity. In *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons* (Klaassen, C. D., Ed.) pp 35–81, McGraw-Hill, New York.
- (41) Carvalho, F. D., Duarte, J. A., Carmo, H., Neuparth, M. J., Fernandes, E., Remião, F., and Bastos, M. d. L. (2001) Hydrogen peroxide production in mouse tissues after acute d-amphetamine administration. Influence of monoamine oxidase inhibition. *Arch. Toxicol.* **75**, 465–469.
- (42) Persoon-Rotherth, M., Valk-Kokshoorn, E. J. M. v. d., Egas-Kenniphans, J. M., Mauve, I., and Laarse, A. v. d. (1989) Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**, 1285–1291.
- (43) Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 135–160.
- (44) Byington, K. H. (1998) Detection of dopamine-tissue adducts. *Life Sci.* **63**, 41–44.
- (45) Sumitra, M., Manikandam, P., Kumar, D. A., Arutselvan, N., Balakrishana, K., Manohar, B. M., and Puvanakrishnan, R. (2001) Experimental myocardial necrosis in rats: role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation and antioxidant status. *Mol. Cell. Biochem.* **224**, 135–142.
- (46) Ommen, B. V., Ploemen, J. H. T. M., Bogaards, J. J. P., Monks, T. J., Gau, S. S., and Bladeren, P. J. V. (1991) Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. *Biochem. J.* **276**, 661–666.
- (47) Gilliland, G. L. (1993) Glutathione proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 875–884.
- (48) Vega, M. C., Walsh, S. B., Mantle, T. J., and Coll, M. (1998) The three-dimensional structure of Cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1. Carboxymethylation dramatically decreases the affinity for glutathione and is associated with a loss of electron density in the alphaB-310B region. *J. Biol. Chem.* **273**, 2844–2850.
- (49) Ithayarasi, A. P., and Devi, C. S. (1997) Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **41**, 369–376.
- (50) Harada, S., Tachikawa, H., and Kawanishi, Y. (2001) Glutathione S-transferase M1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 267–271.

TX025518Q

**5.7 Síntese e análise de aminocromos por HPLC com detecção por fotodíodos. Determinação de adrenocromo em sangue de rato (em publicação)**

# Synthesis and Analysis of Aminochromes by HPLC-Photodiode Array. Adrenochrome Evaluation in Rat Blood.

Fernando Remião<sup>1\*</sup>, Nuno Milhazes<sup>2,3</sup>, Fernanda Borges<sup>2</sup>, Félix Carvalho<sup>1</sup>, Maria L. Bastos<sup>1</sup>, Francisco Lemos-Amado<sup>4</sup>, Pedro Domingues<sup>4</sup>, A. Ferrer-Correia<sup>4</sup>

1. CEQUP/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

2. CEQOFFUP/Serviço de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

3. Instituto de Ciências de Saúde – Norte, R. Central da Gandra, 1317, Gandra, 4585-116 Paredes, Portugal

4. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-123 Aveiro, Portugal

**Run Title: Aminochromes evaluation by HPLC-Photodiode Array**

**Original Research**

**Key Words:** Aminochromes, Adrenochrome, Catecholamines, Oxidative stress, HPLC.

\* Corresponding author: Fernando Remião, CEQUP/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal. Tel. 351-222078908; FAX 351-222003977; Email [remiao@ff.up.pt](mailto:remiao@ff.up.pt)

## ABSTRACT

The catecholamines oxidation process induces cardiotoxicity and neurotoxicity. Catecholamines can oxidise to aminochromes through autoxidation or by enzymatic or non-enzymatic catalysis. Although some toxic effects seem to be related with the formation of aminochromes there is still scarce information concerning the identification and evaluation of these compounds in *in vivo* models.

In this study five catecholamines were oxidised to their respective aminochromes: adrenaline/adrenochrome, noradrenaline/noradrenochrome, dopa/dopachrome, dopamine/dopaminochrome, isoproterenol/isoprenochrome. The evaluation of the catecholamines oxidation profile was performed by HPLC with Photodiode Array detection and using either enzymatic (tyrosinase) or non-enzymatic [ $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaIO}_4$  and  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] catalytic systems. The  $\text{NaIO}_4$  was found to be the most efficient oxidant of catecholamines. An isocratic reverse phase HPLC method was developed to analyse each pair catecholamine/aminochrome. The analytical system was then applied to the detection of adrenochrome in rat blood at 490 nm. Thus, adrenochrome was administered i.p. to rats and its concentration in whole blood was monitored after 5, 15 and 25 minutes. Blood treatment for adrenochrome evaluation consists of an acidification for protein precipitation followed by a rapid neutralization. The results showed a rapid decrease of adrenochrome concentration in blood after its administration. The adrenochrome present in blood was characterised by UV and tandem mass spectrometry.

## INTRODUCTION

The catecholamines oxidation process induces cardiotoxicity (Behonick *et al.*, 2001; Dhalla *et al.*, 2001). In fact, since 1959 it is known that isoproterenol induces myocardial necrosis in rats (Rona *et al.*, 1959), which was suggested to be related with catecholamines oxidation in *in vivo* (Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Tappia *et al.*, 2001) and *in vitro* studies (Ramos and Acosta, 1989; Remião *et al.*, 2001; Tappia *et al.*, 2001). Furthermore, neurotoxic effects induced by oxidation of the catecholamines in the brain have been described (Smythies and Galzigna, 1998), especially dopamine oxidation, which was reported to be involved in the Parkinson's disease (Keller *et al.*, 2000; Martinez-Alvarado *et al.*, 2001).

The oxidation of catecholamines is initiated with its transformation to *ortho*-semiquinones and then to *ortho*-quinones (Fig. 1) (Bindoli *et al.*, 1989). *ortho*-Quinones can undergo an irreversible 1,4-intramolecular cyclisation, a process that involves a nucleophilic attack of the nitrogen atom to the 6-position of the quinone ring, which leads to the formation of unstable leukoaminochromes (Bindoli *et al.*, 1989). Leukoaminochromes are subsequently oxidised to aminochromes, through the intermediate leukoaminochrome-*ortho*-semiquinone. Aminochromes have been reported to induce toxicity and are related to the cardiotoxicity observed after catecholamines administration (Behonick *et al.*, 2001; Dhalla *et al.*, 2001).

Catecholamines oxidation can occur by autoxidation, but this reaction seems to happen very slowly at physiological pH (Bindoli *et al.*, 1992; Remião *et al.*, 2001). However, this process can be accelerated in physiological conditions by enzymatic or non-enzymatic catalysis. In fact, catecholamines are oxidised by enzymes such as xanthine oxidase (Foppoli *et al.*, 1997), peroxidase (Bindoli *et al.*, 1992), tyrosinase (Heacock, 1959), lipoxygenase (Núñez-Delicado *et al.*, 1996), several copper-containing catechol oxidases (Bindoli *et al.*, 1992), leukocyte myeloperoxidase and heart muscle cytochrome c oxidase (Dhalla *et al.*, 2001), and by the presence of metal cations such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and several  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  chelates (Bindoli *et al.*, 1992). Ferrylmyoglobin (Giulivi and Cadenas, 1998), nitric oxide (Riobó *et al.*, 2002) and ceruloplasmin (plasma protein containing copper) (Bindoli *et al.*,

1992) are also able to initiate the oxidation of catecholamines. Although the catecholamines oxidation catalysis and the related aminochromes toxicity have been described, no information concerning direct aminochromes identification and evaluation in *in vivo* models was reported so far.

In this study two catecholamines, one biogenic (adrenaline) and other synthetic amine (isoproterenol), were oxidised using enzymatic (tyrosinase) and non-enzymatic [ $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaIO}_4$  and  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] systems. The oxidation of these catecholamines was monitored by HPLC-Photodiode Array (HPLC-DAD) and the best oxidant system was selected and then applied to oxidise the catecholamines adrenaline, noradrenaline, dopa, dopamine and isoproterenol to their aminochromes adrenochrome, noradrenochrome, dopachrome, dopaminochrome and isoprenochrome, respectively (Fig. 1). An isocratic reverse-phase HPLC-DAD method was developed in order to separate and quantify each pair catecholamine/aminochrome. The analytical system was then applied to the quantification of adrenochrome in rat blood after its administration to rats. It was necessary to develop a sample preparation suitable for aminochromes analysis in biological samples, which is also described. Finally, the characterization of the adrenochrome in the rat blood was performed by UV and tandem mass spectrometry analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### *HPLC-DAD*

A HPLC system (Waters model 2690) with a Photodiode Array Detector (Waters model 996) was used. The analytical column was a commercially prepacked reverse phase cartridge of 244 mm x 4 mm I.D. containing LiChrospher 100 RP-8 (5  $\mu\text{m}$ ) from Merck (Darmstadt, Germany). An isocratic elution was performed at a flow rate of 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and at room temperature. A solution of 95% of 10 mM aqueous ammonium acetate (corrected to pH 2.5 with hydrochloric acid) plus 5% of acetonitrile was used as mobile phase, which was always filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Millipore, Madrid, Spain) and

degassed under helium stream. A Compaq computer fitted with Millenium<sup>32</sup> software (Waters) processed the chromatographic and spectral data.

### *Catecholamines oxidation*

Non-enzymatic oxidation:

To a solution of adrenaline or isoproterenol (1.0 mM) in 5 mL aqueous ammonium acetate buffer (100  $\mu$ M; corrected to pH 5.8 with hydrochloric acid) 2.0 mM of an inorganic oxidising agent [ $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaIO}_4$  and  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] was added. The solution was then incubated for 2 hours at room temperature with slight stirring. The oxidation was monitored at 5 minutes of incubation and thereafter at every 30 minutes.

Enzymatic oxidation:

To a solution of adrenaline or isoproterenol (1.0 mM) in 5 mL aqueous ammonium acetate buffer (100  $\mu$ M; corrected to pH 5.8 with hydrochloric acid) 165  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  of tyrosinase was added. The solution was then incubated for 2 hours at room temperature with slight stirring. The oxidation was monitored at 5 minutes of incubation and thereafter at every 30 minutes. Protein precipitation of the enzymatic reaction mixtures was performed by sample dilution with methanol (1:1) before HPLC analysis.

Catecholamines oxidation analysis:

The oxidation of catecholamines was monitored by HPLC-DAD. Chromatograms were analysed at 279 nm, which corresponds to the maximum absorption wavelength of catecholamines. The percentage of the catecholamines oxidation was calculated as percent decrease in peak area over a specified time period.

### *Synthesis and analysis of aminochromes*

The oxidation of the catecholamines adrenaline, noradrenaline, dopa, dopamine and isoproterenol to their respective aminochromes adrenochrome, noradrenochrome, dopachrome, dopaminochrome and isoprenochrome was performed using a non-enzymatic system. Each catecholamine (1 mM) was oxidised to the respective aminochrome by  $\text{NaIO}_4$  (2 mM) in aqueous

ammonium acetate buffer (100  $\mu\text{M}$ ; corrected to pH 5.8 with hydrochloric acid). The reactions were conducted at room temperature with vigorous shaking for 1 min. Samples were immediately injected into the HPLC system. Chromatograms were analysed at 490 nm. The complete oxidation of catecholamines was confirmed through the spectrometry at 279 nm. The UV spectrum of each aminochrome was also checked in each chromatogram. The aminochrome fractions were collected and their structures were confirmed by mass spectrometry through their MS/MS fragmentation pattern (Lemos-Amado *et al.*, 2001).

#### *Adrenochrome evaluation in rat blood*

Adrenochrome (32  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was administered (i.p.) to adult male Wistar rats, weighing 300-350 g. After ethyl-ether anaesthesia, heparinised blood samples were collected from vena cava at 5, 15 and 25 minutes after adrenochrome administration.

In order to perform HPLC analysis of the blood, 100  $\mu\text{L}$  of heparinised blood was added to 100  $\mu\text{L}$  of perchloric acid (10%) and centrifuged for 15 seconds at 16000g. The supernatant (100  $\mu\text{L}$ ) was immediately neutralized with  $\text{KHCO}_3$  0.76M (75  $\mu\text{L}$ ) and centrifuged for 15 seconds at 16000g. The supernatant (100  $\mu\text{L}$ ) was injected into the HPLC system and adrenochrome was detected and quantified at 490 nm.

Standard curves of adrenochrome were obtained by HPLC analysis of 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 and 12  $\mu\text{M}$  of adrenochrome standard. The linearity was verified for the studied concentrations and correlation coefficients were higher than 0.999.

#### *Mass spectrometry*

Electrospray ionization (ESI-MS) and tandem mass spectra (ESI-MS/MS) were acquired with a Q-TOF 2 mass spectrometer (Micromass, Manchester). The instrument resolution was set at 9500 (50% peak valley). The capillary needle voltage was 3000V and the source temperature was maintained at

150°C. Nitrogen was used as the nebulizer gas and argon was used as the collision gas. Cone voltage was at 30V for ESI-MS and ESI-MS/MS. Collisional induced dissociation spectra were acquired by selecting the desired ion with the quadrupole section of the mass spectrometer and colliding it in the collision cell with argon gas (measured pressure in the penning gauge  $\sim 6 \times 10^{-5}$ ) using a collision energy of 20-25 eV. The TOF analyser identified the resulting product ions. HPLC-ESI-MS and HPLC-ESI-MS/MS were performed using the same general MS conditions, increasing the desolvation temperature to 400°C. Data acquisition was carried out with a Micromass MassLynkx 3.4 data system.

The HPLC was connected to the Q-TOF with a homemade splitter, using the former optimised conditions, and the flow adjusted to  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the oxidation profile of a biological (adrenaline) and a synthetic (isoproterenol) catecholamine obtained with different non-enzymatic and enzymatic systems. For the same concentration of the inorganic oxidant it was found that  $\text{NaIO}_4$  completely oxidised both catecholamines in five minutes. With the other agents, either of non-enzymatic or enzymatic origin, the rate of the reactions was slower and incomplete.

All catecholamines were then oxidised with  $\text{NaIO}_4$ , which was found to be the fastest and most efficient oxidant of catecholamines (Fig. 2). An HPLC-DAD methodology was developed in order to analyse and quantify all the catecholamines and respective aminochromes under study (Fig. 3). The maximum absorption wavelengths for the catecholamines is 279 nm and for the aminochromes are 220, 305 and 490 nm. The limit of detection for adrenaline, in aqueous ammonium acetate buffer, was 1.6 pmol (in column) at 279 nm. The limit of detection for adrenochrome, in aqueous ammonium acetate buffer, was 0.1, 0.5 and 10 pmol (in column) at 220, 305 and 490 nm, respectively. It is noteworthy that the detection at 220 nm led to a higher sensitivity of the adrenochrome analysis. However, an improvement in specificity is found at 305 or 490 nm for this compound. Because aminochromes are in general not chemically stable and standards are not available it was necessary to

characterize the peaks obtained on the chromatograms. In the UV analysis, the UV spectra of all the aminochromes were similar to the spectrum of adrenochrome standard. Additionally, the aminochromes were characterised using tandem mass spectrometry in collected fractions from HPLC system, by applying a general fragmentation pattern characteristic of this class of compounds (Lemos-Amado *et al.*, 2001).

The analytical methodology developed was applied to evaluate aminochromes in blood. It is noteworthy that a stepwise preparation of the sample was essential to perform this qualitative and quantitative analysis. Different processes were assayed in order to remove proteins, such as protein precipitation by perchloric acid, acetonitrile and methanol, and protein withdrawal by Ultrafree-MC<sup>®</sup> centrifugal filter devices. It was found that aminochromes, such as adrenochrome, are extremely unstable in acidic medium, being rapidly transformed by perchloric acid (5%) to a colourless compound (probably a leukoderivative). The use of acetonitrile (2:1) for protein precipitation also destroyed the adrenochrome and with methanol (2:1) the results were not reproducible. However, the addition of perchloric acid (5%, final concentration) to adrenochrome and isoprenochrome aqueous solutions (0.1 mM) followed by a rapid (less than 1 minute) neutralization to pH 6-7 with KHCO<sub>3</sub> (0.33 M) allowed recoveries of 103.5±1.3 and 105.5±3.1% (n=4), respectively. After neutralization, aminochromes were stable during several minutes. Interestingly, a similar procedure was previously described for sample preparation in adrenochrome evaluation in suspensions of rat polymorphonuclear leucocytes (Matthews *et al.*, 1985), but it was reported not to be applicable for the measurement of adrenochrome in plasma (Dhalla *et al.*, 1989). However, in our studies, spiking serum with adrenochrome (25 µM), followed by perchloric acid addition, sample centrifugation and neutralisation, allowed adrenochrome recoveries of 102.6±1.7% (n=5). The same treatment was done to whole blood and adrenochrome recovery was 107.3±2.5% (n=3). Unfortunately, it was found that adrenochrome is rapidly destroyed in the neutralised supernatant from blood samples. Thus, the sample injection into the HPLC system must be done immediately after its preparation.

It was also tried to use Ultrafree-MC<sup>®</sup> centrifugal filter devices for protein removal. However it led to very low levels of adrenochrome recovery (data not shown). This can be explained by the fact that in biological samples aminochromes are bound in the tissues (Fliegel *et al.*, 1985), especially to the thiol groups of proteins (Bindoli *et al.*, 1992). The good recovery levels of adrenochrome in biological samples treated with perchloric acid could indicate that this acid destroys aminochrome-protein adducts.

Catecholamines can be also analysed in biological samples after protein precipitation in acidic medium (Lakshmana and Raju, 1997; Remião *et al.*, 2001). The neutralisation of acidic samples, immediately followed by HPLC injection, did not interfere with the catecholamines levels in samples (data not shown). Thus, the described procedure enables the simultaneous analysis of each catecholamine and respective aminochrome in biological samples.

In order to apply this procedure to evaluate adrenochrome in biological samples, adrenochrome was administered (i.p.) to rats in a dose of 32 mg.Kg<sup>-1</sup>. Blood samples were collected after 5, 15 and 25 minutes and treated as described above. This dose of adrenochrome was already used in a previous *in vivo* study to evaluate adrenochrome cardiotoxicity in rats (Singal *et al.*, 1982). Doses higher than 40 mg.Kg<sup>-1</sup> induce the death of the rats (Beamish *et al.*, 1981).

Figure 4A shows the chromatograms of blood samples from control rats and treated rats, obtained at 490 nm. The characterization of adrenochrome found in blood was performed by UV and tandem mass spectrometry. The comparative analysis of the UV spectra of adrenochrome detected in the rat blood and of the adrenochrome standard (5 µM) shows that they have a very similar profile (Fig. 4B). However, it was observed a higher absorbance at 258 nm in the spectrum of the adrenochrome present in rat blood, which results from an interference present in all studied samples from rat blood. The UV spectrum of this interference shows no absorbance either at 305 or 490 nm, thus has no interference in adrenochrome quantification.

The characterization of the adrenochrome was also performed by HPLC-ESI-MS and by HPLC-ESI-MS/MS. The adrenochrome was identified on HPLC-ESI-MS chromatogram of the treated sample of rat blood by comparing the retention time and using the molecular weight of the protonated molecule, *m/z*

180 (Figure 5 A and B). The sensitivity achieved with MS was similar to that found using the DAD detector. Further identification was done by performing HPLC-ESI-MS/MS of the ion at  $m/z$  180 and by comparison with the spectra of the standard acquired in the same experimental conditions, as can be seen on Figure 6 (A and B), following the general fragmentation pattern of these compounds (Lemos-Amado *et al.*, 2001).

The results of adrenochrome quantification in whole blood after its administration to rats are presented in fig. 7. The determinations were performed in whole blood because aminochromes have the capacity to bind to proteins and, therefore, the rejection of blood elements could result in adrenochrome loss. After 5, 15 and 25 minutes of adrenochrome administration the concentration of adrenochrome in blood was  $16.4 \pm 2.9$ ,  $6.0 \pm 1.6$  and  $2.4 \pm 1.6$   $\mu\text{M}$  (Mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ ), respectively (Fig. 7). These results show a rapid decrease of adrenochrome concentration in blood, which is in accordance with the *in vivo* toxic effects reported by Singal *et al.*, 1982. In that study, adrenochrome, after its i.v. injection, rapidly induced ultrastructural and cardiovascular changes (in 5-10 min), which decrease in severity after this time (Singal *et al.*, 1982). The main effects reported included swelling of mitochondria and sarcotubular system, intracellular and perinuclear oedema, hypercontraction of myofibrils, partial separation of the intercalated disk and depression of heart rate and blood pressure. The results are also in accordance with previous studies, which report the fast adrenolutin appearance in blood and urine of rats (Dhalla *et al.*, 1989), as well as in tissues and blood of rabbits (Fischer and Landtsheer, 1950), after administration of adrenochrome. A similar work reported a rapid appearance of sulphate conjugates of adrenolutin and of 5,6-dihydroxy-N-methylindole (DHMI) in urine of rats after adrenochrome administration (Noval *et al.*, 1962). Adrenochrome can also be incorporated in tissues, such as myocardium, where it binds in an irreversible way (Fliegel *et al.*, 1985). Thus, it seems that adrenochrome rapidly disappears from blood by tissue uptake or by rearrangement and metabolism to adrenolutin and DHMI. Adrenolutin has been measured in mammalian plasma, which is an evidence for the adrenochrome formation in the evaluated tissues (Dhalla *et al.*, 2001). However, the toxic effects induced by catecholamines oxidation processes are mainly related to aminochromes. Adrenochrome and isoproterenol oxidation

products have been reported to induce cell damage, contractile failure and impairment of mitochondrial energy production in perfused rat heart (Dhalla *et al.*, 2001). Adrenochrome and oxidised adrenaline solutions were reported to inhibit monoamine oxidase (Dhalla *et al.*, 2001), alkaline phosphatase (Dhalla *et al.*, 2001) and adenylyl cyclase (Ebina *et al.*, 1997) in a variety of tissues. Dopa, dopamine and isoproterenol oxidation products were also reported to inhibit *in vitro* creatine kinase and glutathione reductase (Miura *et al.*, 1999; Remião *et al.*, 1999). Thus, the development of this methodology allows a direct quantification of adrenochrome in blood or tissues and the correlation of its level with the observed toxic effects.

## CONCLUSION

In all studied catalytic systems, the  $\text{NaIO}_4$  was found to be the most efficient oxidant of catecholamines. An isocratic reverse-phase HPLC-DAD methodology was developed in order to separate and quantify catecholamines and their respective aminochromes in blood. A sample treatment procedure for aminochromes evaluation in biological samples was also developed and applied to the detection of adrenochrome in rat blood. All the chromatographic data was validated by UV and tandem mass spectrometry. In the *in vivo* study, the adrenochrome concentration in rat blood rapidly decreases after its administration.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a project from FCT and POCTI, Portugal, by FEDER European Community funding (project POCTI/36099/FCB/2000) and by project PRAXIS XXI/BD/18520/98.

## REFERENCES

- Beamish, RE, Dhillon, KS, Singal, PK and Dhalla, NS Protective effect of sulfinpyrazone against catecholamine metabolite adrenochrome-induced arrhythmias. *American Heart Journal* 1981; **102**: 149.
- Behonick, GS, Novak, MJ, Nealley, EW and Baskin, SI Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). *Journal of Applied Toxicology* 2001; **21**: S15.
- Bindoli, A, Rigobello, MP and Deeb, DJ Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine* 1992; **13**: 391.
- Bindoli, A, Rigobello, MP and Galzigna, L Toxicity of aminochromes. *Toxicology Letters* 1989; **48**: 3.
- Dhalla, KS, Ganguly, PK, Rupp, H, Beamish, RE and Dhalla, NS Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1989; **87**: 85.
- Dhalla, KS, Rupp, H, Beamish, RE and Dhalla, NS Mechanisms of alterations in cardiac membrane  $Ca^{2+}$  transport due to excess catecholamines. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 1996; **10**: 231.
- Dhalla, NS, Sasaki, H, Mochizuki, S, Dhalla, KS, Liu, X and Elimban, V, 2001, Catecholamine-induced cardiomyopathy, in: Cardiovascular Toxicity, ed. Acosta, D (Raven Press, New York) p. 269.
- Ebina, T, Toya, Y, Oka, N, Schwencke, C, Kawabe, J-i and Ishikawa, Y Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase by oxidized catecholamines. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; **29**: 1247.
- Fischer, P and Landtsheer, L Métabolisme de l'adrénochrome et du trihydroxyméthylindole chez le lapin. *Experientia* 1950; **6**: 305.
- Fliegel, L, Takeo, S, Beamish, RE and Dhalla, NS Adrenochrome uptake and subcellular distribution in the isolated perfused rat heart. *Canadian Journal of Cardiology* 1985; **1**: 122.
- Foppoli, C, Coccia, R, Cini, C and Rosei, MA Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; **1334**: 200.
- Giulivi, C and Cadenas, E Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; **25**: 175.

- Heacock, RA The chemistry of adrenochrome and related compounds. *Chemical Review* 1959; **59**: 181.
- Keller, JN, Huang, FF, Dimayuga, ER and Maragos, WF Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; **29**: 1037.
- Lakshmana, MK and Raju, TR An isocratic assay for norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine using their native fluorescent by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection in discrete brain areas of rat. *Analytical Biochemistry* 1997; **246**: 166.
- Lemos-Amado, F, Domingues, P, Ferrer-Correia, A, Remião, F, Milhazes, N, Borges, F, Carvalho, FD and Bastos, ML Electrospray tandem mass spectrometry of aminochromes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001; **15**: 2466.
- Martinez-Alvarado, P, Dagnino-Subiabre, A, Paris, I, Metodiewa, D, Welch, CJ, Olea-Azar, C, Ceviedes, P, Ceviedes, R and Segura-Aguilar, J Possible role of slasolinol quinone methide in the decrease of RCSN-3 cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; **283**: 1069.
- Matthews, SB, Henderson, AH and Campbell, AK The adrenochrome pathway: the major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1985; **17**: 339.
- Miura, T, Muraoka, S and Fugimoto, Y Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin. *Chemical-Biological Interactions* 1999; **123**: 51.
- Noval, JJ, Sohler, A, Stackhouse, SP and Bryan, AC Metabolism of adrenochrome in experimental animals. *Biochemical Pharmacology* 1962; **1**: 467.
- Núñez-Delicado, E, Pérez-Gilabert, M, Sánchez-Ferrer, A and García-Carmona, F Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: a kinetic study of isoproterenol oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; **1293**: 17.
- Ramos, K and Acosta, D, 1989, Cytotoxic actions of isoproterenol in cardiac cells: protective effects of antioxidants, in: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol. 2, eds. Miquel, J, Quintanilha, AT and Weber, H (CRC, Florida) p. 177.

- Remião, F, Carmo, H, Carvalho, F and Bastos, ML Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition* 1999; **15**: 47.
- Remião, F, Carmo, H, Carvalho, F and Bastos, ML Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovascular Toxicology* 2001; **1**: 195.
- Riobó, NA, Schopfer, FJ, Boveris, AD, Cadenas, E and Poderoso, JJ The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; **32**: 115.
- Rona, G, Chappel, CI, Balazs, T and Gaudry, R An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Archives of Pathology* 1959; **67**: 443.
- Rupp, H, Dhalla, KS and Dhalla, NS Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1994; **24 (suppl. 1)**: S16.
- Singal, PK, Dhillon, KS, Beamish, RE, Kapur, N and Dhalla, NS Myocardial cell damage and cardiovascular changes due to I.V. infusion of adrenochrome in rats. *British Journal of Experimental Pathology* 1982; **63**: 167.
- Smythies, J and Galzigna, L The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; **1380**: 159.
- Tappia, PS, Hata, T, Hozaima, L, Sandhu, MS, Panagia, V and Dhalla, NS Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; **387**: 85.

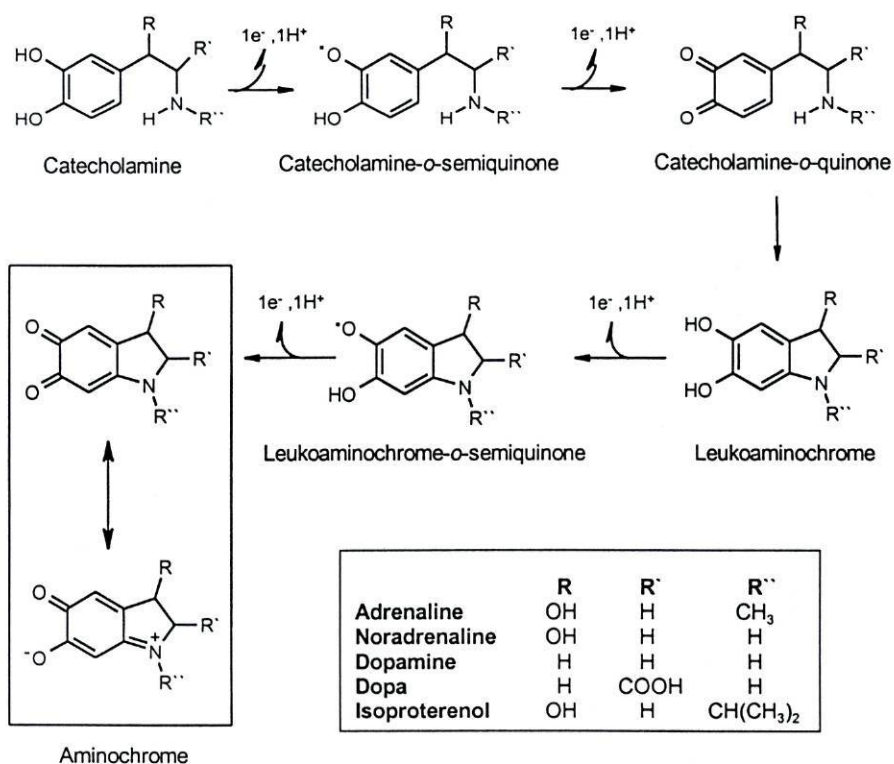


Fig. 1 – Proposed mechanism for catecholamines oxidation to aminochromes (adapted from Bindoli *et al.*, 1989).

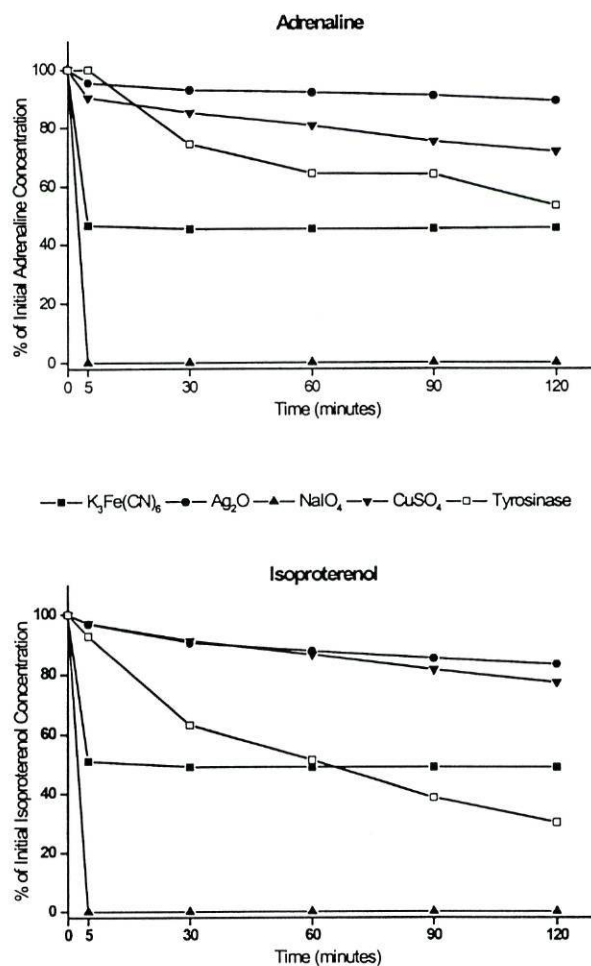


Fig. 2 – Adrenaline and isoproterenol oxidation profile using different enzymatic (tyrosinase) and non-enzymatic [ $Ag_2O$ ,  $CuSO_4$ ,  $NaIO_4$  and  $K_3Fe(CN)_6$ ] systems.

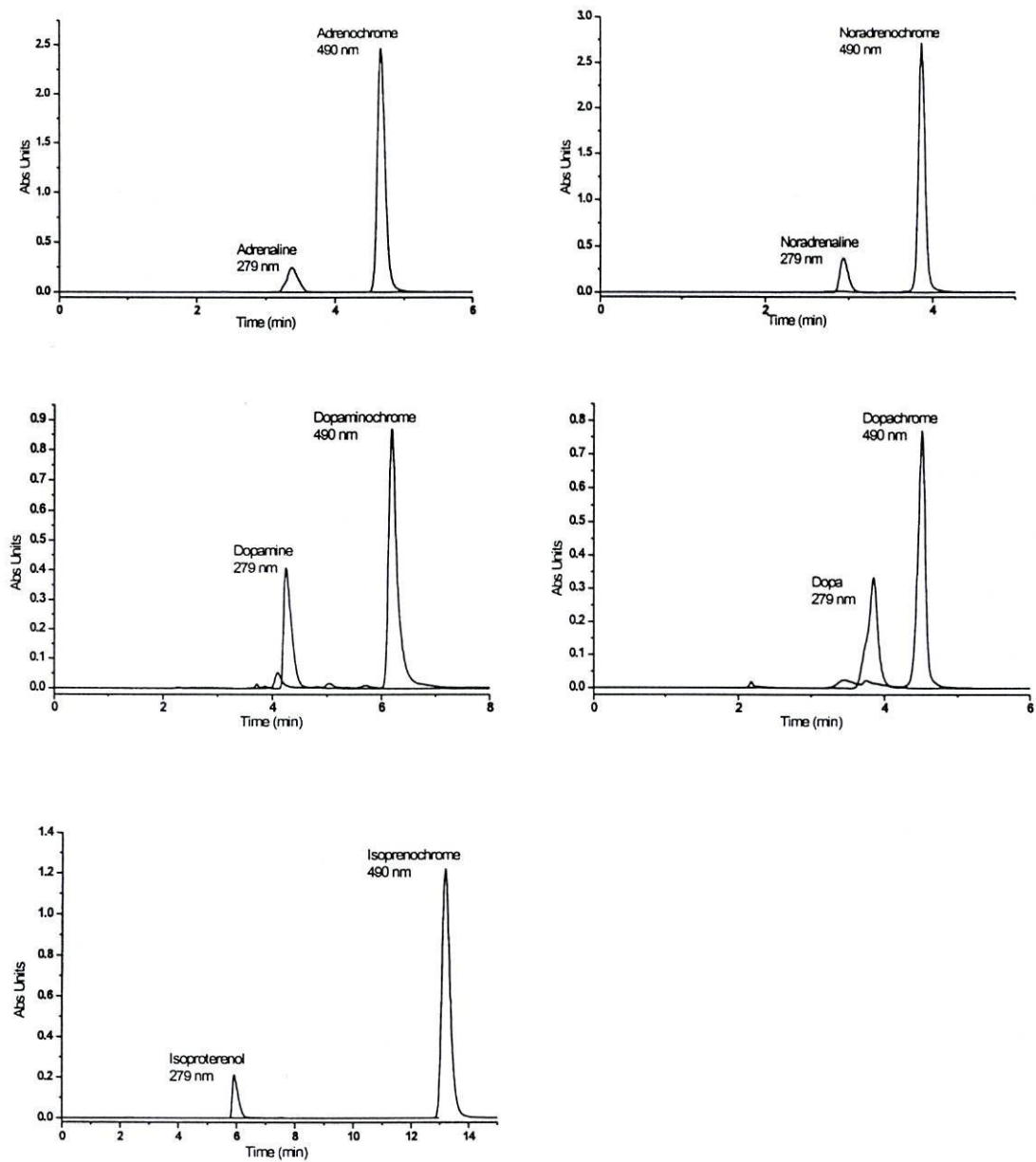


Fig. 3 – Chromatograms of the catecholamines (1 mM) and respective aminochromes.

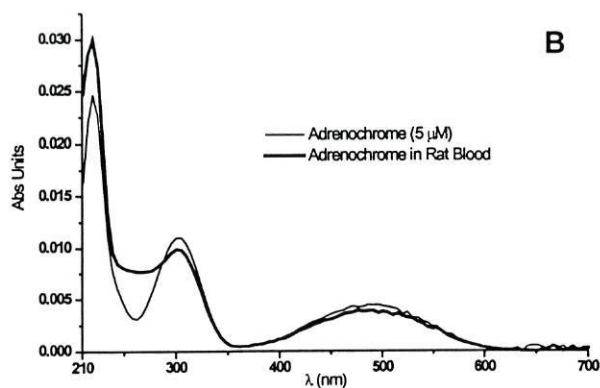
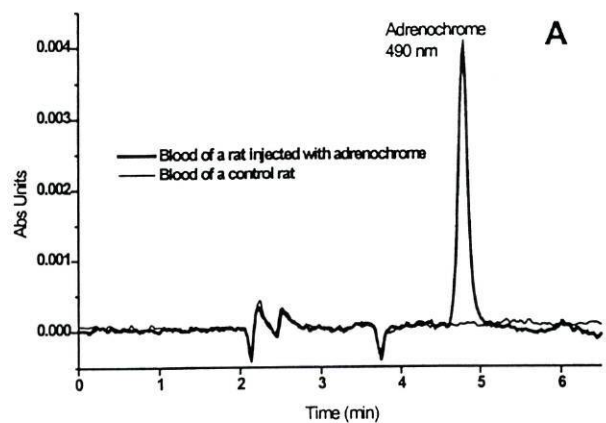


Fig. 4 – A. Chromatograms of blood samples from control rats and treated rats ( $32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of adrenochrome), obtained at 490 nm. B. UV spectra of adrenochrome standard and adrenochrome in rat blood.

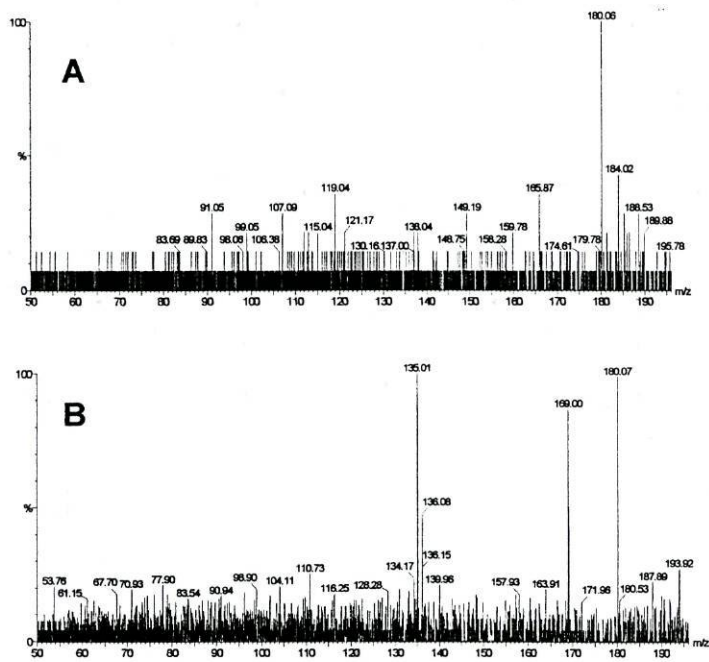


Fig. 5 – HPLC-ESI-MS spectrum of: A. adrenochrome standard solution (5  $\mu$ M), B. rat blood sample.

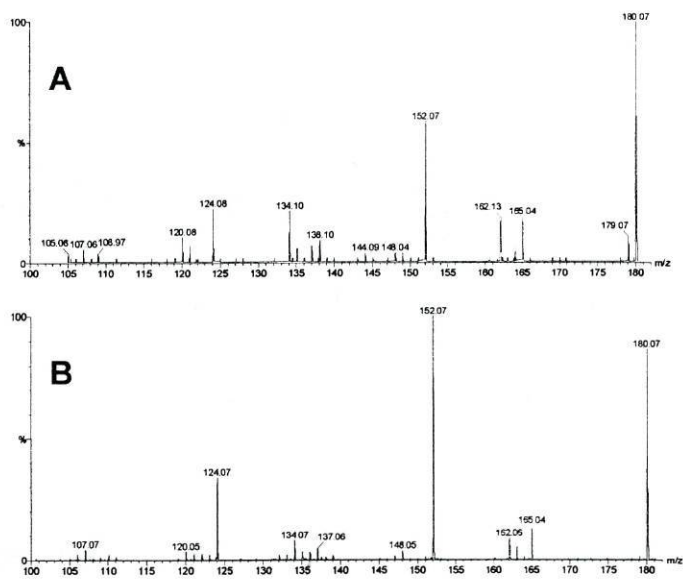


Fig. 6 – HPLC-ESI-MS/MS spectrum of the protonated molecule of m/z 180 obtained from: A. adrenochrome standard solution (5  $\mu$ M), B. rat blood sample.

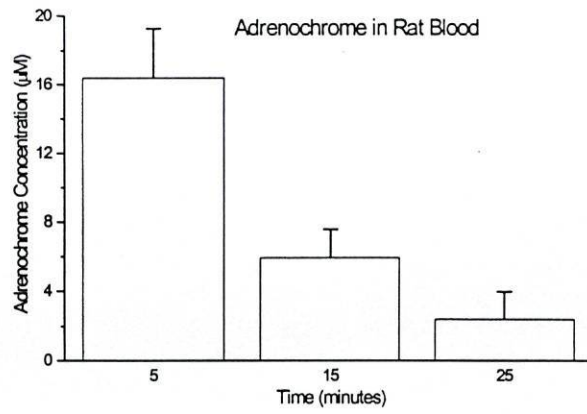


Fig. 7 – Concentration of adrenochrome (Mean±S.D., n=5) in rat blood at 5, 15 and 25 minutes after administration of 32 mg.kg<sup>-1</sup> of adrenochrome (i.p.)

## **5.8 Determinação das concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol após a sua administração a ratos na dose de 80 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p.)**

### **5.8.1 Objectivo**

Determinar as concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol, após a sua administração, em doses tóxicas (80 mg.Kg<sup>-1</sup>), a ratos por via injectável.

### **5.8.2 Metodologia**

#### *5.8.2.1 Administração do isoproterenol a ratos. Recolha de amostras de sangue e coração*

Foram utilizados 4 ratos Wistar adultos machos com peso médio de 205±6 g (média±desvio padrão). A solução de isoproterenol foi preparada de modo a ser injectada (i.p.) aos animais na dose de 80 mg.Kg<sup>-1</sup> num volume de 1 mL de soro fisiológico. Doze minutos após a administração do isoproterenol, os ratos injectados foram anestesiados com éter etílico e a sua cavidade abdominal aberta. Quinze minutos após a administração do isoproterenol, recolheram-se cerca de 0,5 mL de sangue da veia cava inferior com agulha heparinizada. As proteínas sanguíneas foram removidas após precipitação com ácido perclórico (5% de concentração final) e centrifugação durante 10 minutos a 16000g. Posteriormente, procedeu-se à abertura da cavidade torácica, de onde o coração foi removido, lavado em soro fisiológico e enxugado em papel de filtro. Depois de pesado, o coração foi homogeneizado em 4 mL de ácido perclórico a 5%. A suspensão resultante foi centrifugada durante 10 minutos a 16000g. Os sobrenadantes dos centrifugados foram injectados no HPLC com

detector de ultravioleta, sendo o isoproterenol detectado a 279 nm segundo as condições cromatográficas previamente estabelecidas e descritas no ponto 5.5.

### 5.8.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Valores encontrados de isoproterenol no plasma e coração de rato, 15 minutos após a sua administração (i.p.) na dose de 80 mg.Kg<sup>-1</sup>. DP – desvio padrão da média.

ISOPROTERENOL	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Média	DP
Peso Rato (g)	203	198	213	206	205	6,3
Peso Coração (g)	0,81	0,72	0,84	0,73	0,78	0,06
Plasma (nmol/mL)	98,5	54,1	48,4	55,7	<b>64,2</b>	<b>23,1</b>
Coração (nmol/g)	115,6	170,5	103,8	128,3	<b>129,6</b>	<b>29</b>

As concentrações de isoproterenol encontradas no plasma e coração de ratos, 15 minutos após a sua administração (80 mg.Kg<sup>-1</sup> por i.p.) foram 64,2±23,1 µM e 129,6±29,0 µM, respectivamente. A dose de 80 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p.) de isoproterenol é frequentemente utilizada no estudo *in vivo* da cardiotoxicidade desta catecolamina (Lombardini, 1980; Singal *et al.*, 1981a; Rona, 1985; Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988; Yunge *et al.*, 1989; Marjomaki *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2001). Assim, as concentrações obtidas são uma forte indicação dos níveis de catecolaminas *in situ* que induzem os fenómenos tóxicos. Estas concentrações servem, por isso, de referência para a selecção das concentrações de isoproterenol a utilizar em estudos *in vitro*.

## **5.9 Detecção por RPE da formação de radicais resultantes da oxidação do isoproterenol, em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato**

### **5.9.1 Objectivo**

Procurar indícios da oxidação do isoproterenol a isoprenocromo ao nível celular, pela detecção, por ressonância paramagnética electrónica (RPE), de radicais resultantes da oxidação do isoproterenol.

### **5.9.2 Metodologia**

#### *5.9.2.1 Cardiomiócitos de rato adulto*

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito nos pontos 5.3 e 5.4. Foram utilizadas suspensões de cardiomiócitos isolados na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> em solução modificada de “Krebs-Henseleit” saturada com carbogénio, a pH 7,2 e adicionada de Ca<sup>2+</sup> na concentração final de 1,8 mM (solução de incubação).

Para os ensaios, as células foram previamente incubadas nas condições descritas, durante 30 minutos, após os quais foram incubadas, durante o tempo máximo de 4 horas, na presença de isoproterenol (10 mM) e Cu<sup>2+</sup> (20 µM). Nos ensaios controlo houve apenas a adição de CuSO<sub>4</sub> (20 µM).

#### *5.9.2.2 Tratamento das amostras para espectroscopia de RPE*

Foram recolhidas alíquotas de 1 mL da suspensão celular ao fim de 3 e 4 horas de incubação. Estas alíquotas foram tratadas progressivamente de modo a preparar 4 tipos diferentes de amostras:

- amostra “extracelular”. Após a recolha das alíquotas da suspensão celular, procedeu-se à sua centrifugação a 300g durante 2 minutos. O sobrenadante foi usado como amostra “extracelular”;
- amostra “solução de lavagem”. O sedimento anterior foi lavado com 1 mL de solução fresca de incubação e centrifugado de novo a 300g durante 2 minutos. Este processo foi repetido por mais 2 vezes. Após a última centrifugação o sobrenadante foi recolhido e usado como amostra “solução de lavagem”;
- amostra “celular”. O resultante sedimento, correspondente às células, foi ressuspenso em 200  $\mu$ L de solução de incubação fresca e usado como amostra “celular”;
- amostra “membranas celulares”. Foi preparada após sonicação de uma amostra “celular” durante 1 minuto a uma intensidade média (50 Watts; 20 kHz) e mantida em gelo. Esta foi seguida de centrifugação a 16000g durante 2 minutos e o depósito ressuspenso em 200  $\mu$ L de solução de incubação fresca.

Adicionalmente, foram também analisados por RPE I) o sobrenadante resultante da preparação da amostra “membranas celulares” e II) o sobrenadante proveniente da centrifugação da amostra “membranas celulares”, após ter sido submetida a sonicação (condições idênticas às atrás descritas). É importante referir que foi adicionado  $MgSO_4$  a todas as amostras, na concentração final de 5 mM, com a finalidade de estabilizar o ou os radicais em estudo.

Realizaram-se também experiências com tris(oxalato)cromato(III) de potássio triidratado (oxalato de crómio) com o intuito de estudar a localização do radical na suspensão celular. O oxalato de crómio tem a particularidade de não atravessar as membranas biológicas, além de possuir a propriedade de alargar e até suprimir sinais de RPE provenientes de moléculas orgânicas radicalares (Berg e Nesbitt, 1979; Giulivi e Cadenas, 1998a). Nestes estudos, e previamente à espectroscopia de RPE da amostra, adicionaram-se 5  $\mu$ L de uma solução deste composto em meio de incubação a 150  $\mu$ L das amostras a analisar, de modo a obter uma concentração final de 20 mM de oxalato de crómio.

Procedeu-se igualmente à avaliação da viabilidade celular. Esta foi realizada pelo teste de exclusão do azul tripano. O azul tripano é um corante orgânico azul que possui carga negativa, o que não lhe permite entrar nas células que mantenham o seu potencial de membrana (Berry *et al.*, 1991). Consequentemente, o azul tripano é excluído pelas células com membranas intactas, enquanto as células danificadas o incluem rapidamente, corando-se de azul especialmente ao nível do núcleo (Berry *et al.*, 1991). Para este procedimento, diluíram-se 50  $\mu\text{L}$  da amostra “celular” em igual volume de azul de tripano (concentração final de 0,2%). As células permeáveis e não permeáveis ao corante foram quantificadas por microscopia óptica em “câmara de Neubauer”. A razão entre as células não coradas e o número total de células contadas permite calcular a percentagem de viabilidade celular.

### 5.9.3 Análise por RPE

Os espectros de RPE foram obtidos num espectrómetro Bruker ECS 106 equipado com uma cavidade TM110. Para tal, transferiram-se alíquotas de aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  das amostras para pipetas Pasteur (seladas nas pontas), as quais se introduziram de seguida na cavidade do espectrómetro. As condições instrumentais utilizadas foram: temperatura ambiente, frequência 9,77 GHz, potência 20 mW, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 1,0 G, ganho  $8 \times 10^5$ , velocidade de varrimento  $1,4 \text{ G} \cdot \text{s}^{-1}$ , constante de tempo 21 ms e número de varrimentos acumulados 14. Os valores dos parâmetros do Hamiltonismo de spin foram determinados por simulação computacional dos espectros experimentais obtidos, com recurso ao programa PEST WinSim (Public Epr Software Tools-para MS-Windows NT, 95, versão 0.96, desenvolvido por Dave Duling).

### 5.9.4 Resultados e discussão

Na figura 5.1 são apresentados os espectros de RPE correspondentes à análise de amostras das suspensões celulares preparadas após 3 horas de

incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ). Nesta figura é observado um sinal presente na amostra “extracelular”. Este sinal surge entre 3475 e 3490 G e apresenta 3 bandas de igual intensidade indicativas de acoplamento hiperfino com um núcleo com  $I=1$ . Um segundo desdobramento de cada uma das bandas anteriores em 3 é visível na banda a campo magnético mais baixo. Atendendo à intensidade (1:2:1) das bandas, o desdobramento é atribuído a um acoplamento com 2 núcleos equivalentes com  $I=1/2$ . Na amostra “celular” está também presente um sinal com menor resolução e amplitude, que ocupa um campo magnético compreendido entre 3472 e 3490 G. A amostra “solução de lavagem” não apresentou qualquer sinal nas condições experimentais descritas. A estabilização do ou dos radicais correspondentes a estes sinais, para a sua observação por RPE, foi conseguida com  $\text{Mg}^{2+}$  na concentração de 5 mM. O  $\text{Mg}^{2+}$  tem sido utilizado com funções semelhantes, embora em maiores concentrações (0,1-0,5 M) (Prabhananda *et al.*, 1985; Kalyanaraman *et al.*, 1987; Giulivi e Cadenas, 1998b). Outros catiões como o  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  e o  $\text{Al}^{3+}$  poderiam ser também usados (Kalyanaraman *et al.*, 1985; Prabhananda *et al.*, 1985). No entanto, o  $\text{Mg}^{2+}$  na concentração de 5 mM mostrou-se eficiente na estabilização do radical, sem afectar a viabilidade dos cardiomiócitos durante o tempo de análise por RPE. Para diminuir possíveis interferências na viabilidade celular, o  $\text{Mg}^{2+}$  foi adicionado às amostras imediatamente antes da sua análise. Uma outra alteração relativamente aos protocolos habituais nesta dissertação foi a concentração de isoproterenol usada na incubação da suspensão de cardiomiócitos. No sentido de amplificar o sinal de RPE, foi necessário aumentar a concentração do isoproterenol para 10 mM. Esta maior concentração do isoproterenol pode dificultar a comparação dos resultados obtidos da viabilidade com os dos parâmetros dos outros ensaios realizados nesta dissertação, em que se utilizou a concentração de 1 mM de isoproterenol. No entanto, a concentração de 10 mM de isoproterenol poderá ser considerada aceitável para a finalidade do estudo aqui apresentado.

Os espectros de RPE observados na figura 5.1 demonstram a presença de um ou mais radicais no meio extracelular e nas células. A presença destes nas células é confirmada pelo facto da amostra “solução de lavagem” não dar origem a nenhum sinal, descartando a possibilidade do sinal ali observado

resultar da contaminação da amostra “celular” com meio extracelular. A menor resolução do espectro referente à amostra “celular” poderá ser considerada um indício adicional da presença do sinal nas células. Ao restringir a mobilidade das espécies, ocorre um aumento da largura de banda dos respectivos sinais de RPE, logo, a perda de resolução observada no espectro é indicativo da interação destes com algum componente celular de baixa mobilidade (por exemplo, a membrana celular).

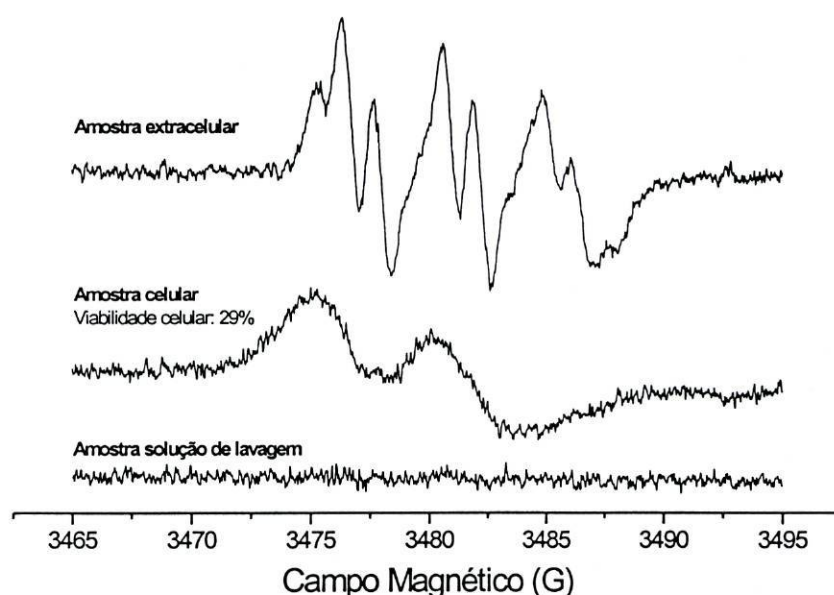


Figura 5.1 – Espectros de RPE das amostras “extracelular”, “celular” e “solução de lavagem” de uma alíquota de suspensão de cardiomiócitos recolhida 3 horas após incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ).

Na figura 5.2 apresentam-se os espectros de RPE correspondentes a amostras “celulares” de alíquotas da suspensão celular recolhidas 3 e 4 horas após a incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ). Adicionalmente, apresenta-se o resultado referente a uma alíquota recolhida 4 horas após a incubação com apenas  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (controlo). A ausência de sinal nesta última amostra é indicativa da importância do isoproterenol para o sinal observado nas amostras “celulares”. O controlo da amostra “extracelular” apresentou o mesmo resultado. Nas amostras “celulares” o aumento da amplitude do sinal entre as 3 e as 4 horas de incubação sugere que a formação

do ou dos radicais aumenta com o tempo de incubação e corrobora com a diminuição da viabilidade celular. Este aumento do sinal pode resultar da diminuição das defesas antioxidantes das células, como observado nos estudos anteriores (ver em 5.5 e 5.6).

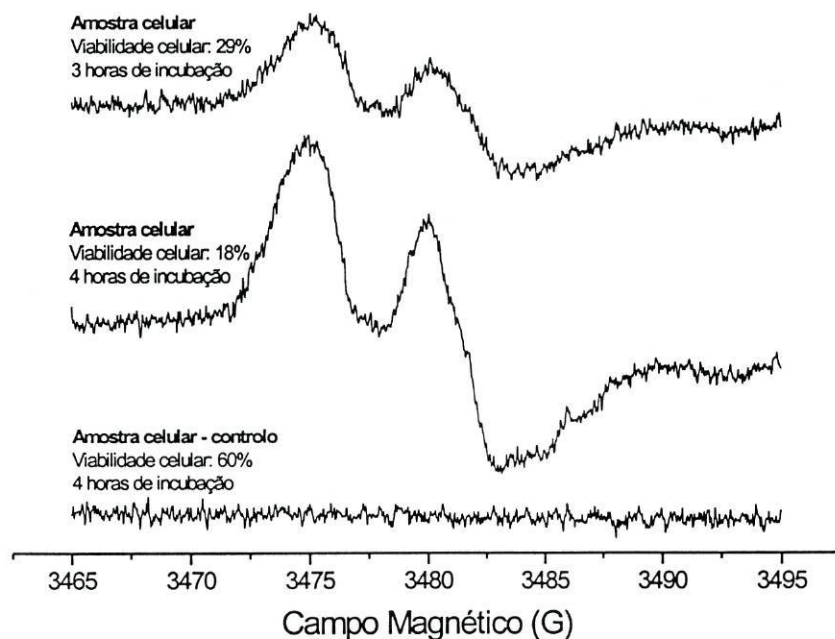
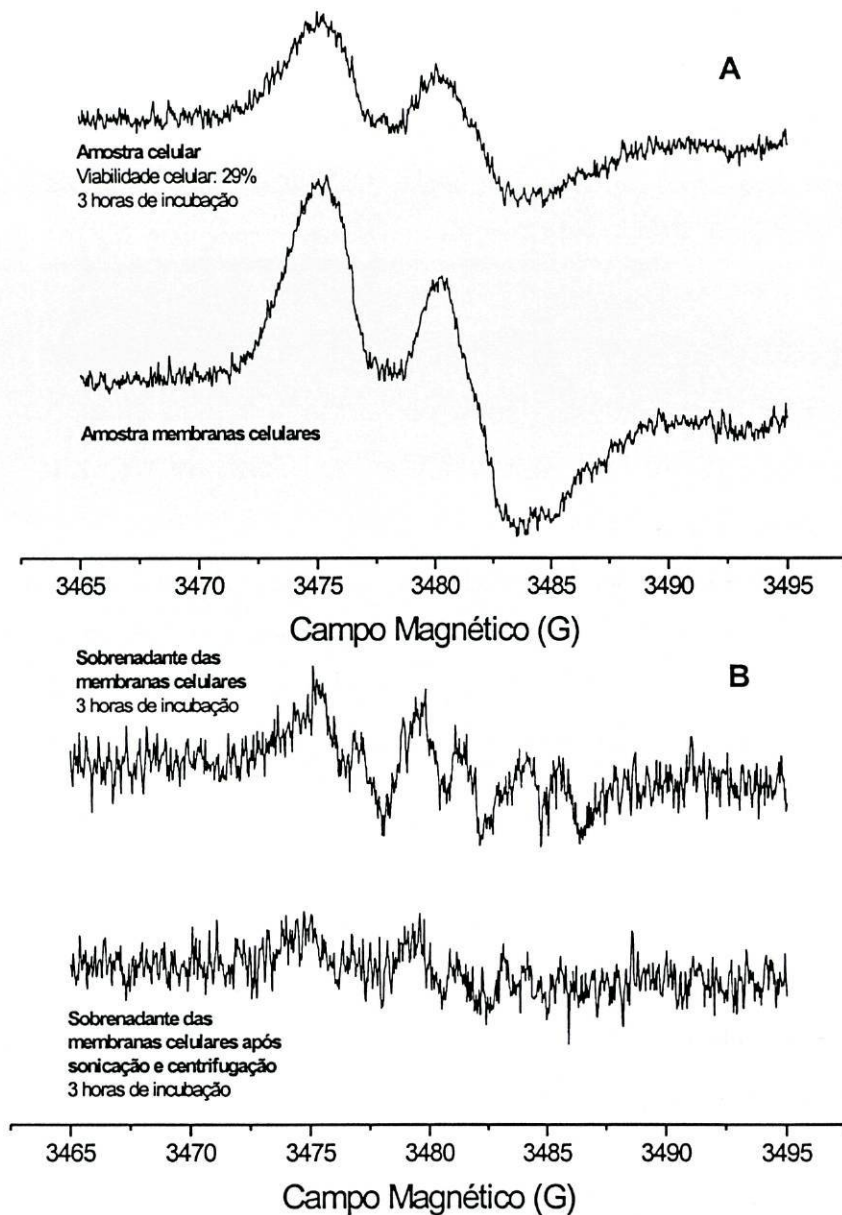


Figura 5.2 – Espectros de RPE da amostra “celular” de alíquotas de suspensão celular recolhidas 3 e 4 horas após incubação na ausência (controlo) ou na presença de isoproterenol (10 mM) e  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ).

Após a confirmação da presença do ou dos radicais a nível celular e pelo facto da maioria destas células já ter perdido a impermeabilidade da sua membrana, suspeitou-se que o ou os radicais se encontravam nas próprias membranas celulares. Assim, preparou-se uma amostra resultante da destruição dos cardiomiócitos (por sonicação), que foi denominada de “membranas celulares” e que é composta por membranas de células não completamente destruídas, pelo citoesqueleto das células, pelos seus núcleos e, em parte, pelos organelos mais pesados, como as mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas (Koolman e Rohm, 1996). Nesta amostra observou-se a presença de um forte sinal (Fig. 5.3-A).



**Figura 5.3 – Espectros de RPE das amostras “celular” (A), “membranas celulares” (A), sobrenadante da amostra “membranas celulares” (B) e sobrenadante da amostra “membranas celulares” após sonicação e centrifugação (B). Estas amostras foram preparadas a partir de uma alíquota de suspensão celular recolhida 3 horas após incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ).**

Pode-se igualmente observar que o sobrenadante resultante da centrifugação das células destruídas, na preparação da amostra “membranas celulares”, originou um sinal residual (Fig. 5.3-B). O facto de também se observar um sinal após submissão das membranas ao mesmo tratamento das células, levou a concluir que este era induzido, pelo menos em parte, pelo processo de sonicação e centrifugação das amostras (Fig. 5.3-B). Tal

tratamento parece libertar o ou os radicais aprisionados nas amostras “celular” e “membranas celulares”. No entanto, um aspecto importante deste sinal é que este assume um perfil mais semelhante ao sinal encontrado na amostra “extracelular”. Tal facto, justifica-se pelo aumento da mobilidade do ou dos radicais em causa e parece ser indicativo de que o sinal proveniente das amostras “celular” e “membranas celulares” corresponde ao mesmo composto presente no meio “extracelular”.

No sentido de confirmar a presença do ou dos radicais ao nível celular e das suas estruturas, estudou-se o comportamento do sinal na presença do oxalato de crómio nas diferentes amostras. Como já referido, o oxalato de crómio não atravessa as membranas biológicas e alarga, ou mesmo suprime, os sinais de RPE provenientes de moléculas orgânicas radicalares (Berg e Nesbitt, 1979; Giulivi e Cadenas, 1998a). Para a validação deste efeito relativamente ao sinal em estudo, foi analisado o espectro de RPE da amostra “extracelular” na ausência e na presença de oxalato de crómio (20 mM) (Fig. 5.4-A).

O sinal da amostra “extracelular” com oxalato de crómio apresentou-se com menor resolução e intensidade, confirmando, assim, as características deste composto relativamente ao sinal de RPE do ou dos radicais resultantes da oxidação do isoproterenol. Experiências semelhantes foram realizadas com as amostras “celulares” e “membranas celulares” (Fig. 5.4-B). O oxalato de crómio nestas amostras não foi capaz de actuar sobre o sinal em estudo. Estes resultados parecem confirmar a presença do ou dos radicais nas estruturas celulares, representadas pela amostra “membranas celulares”.

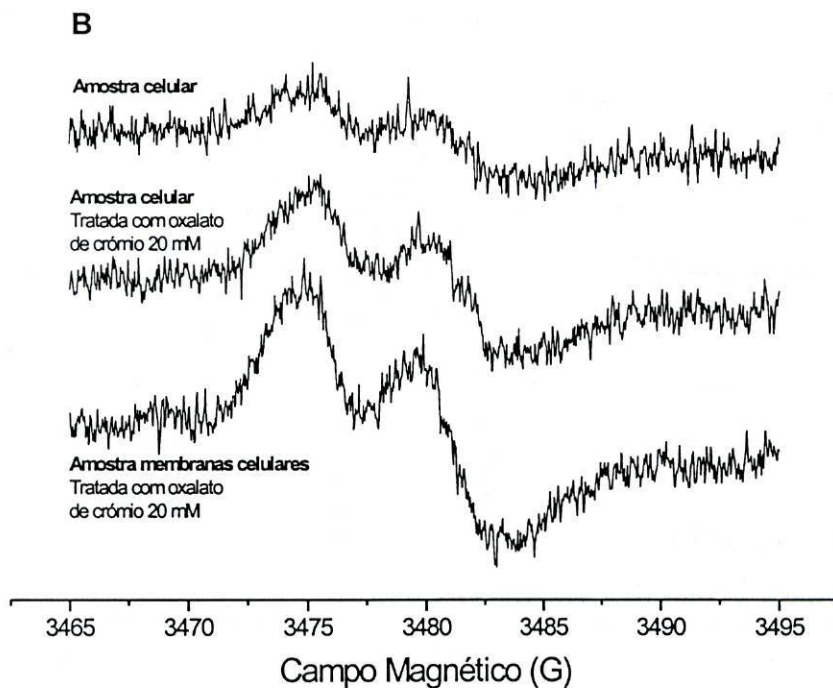
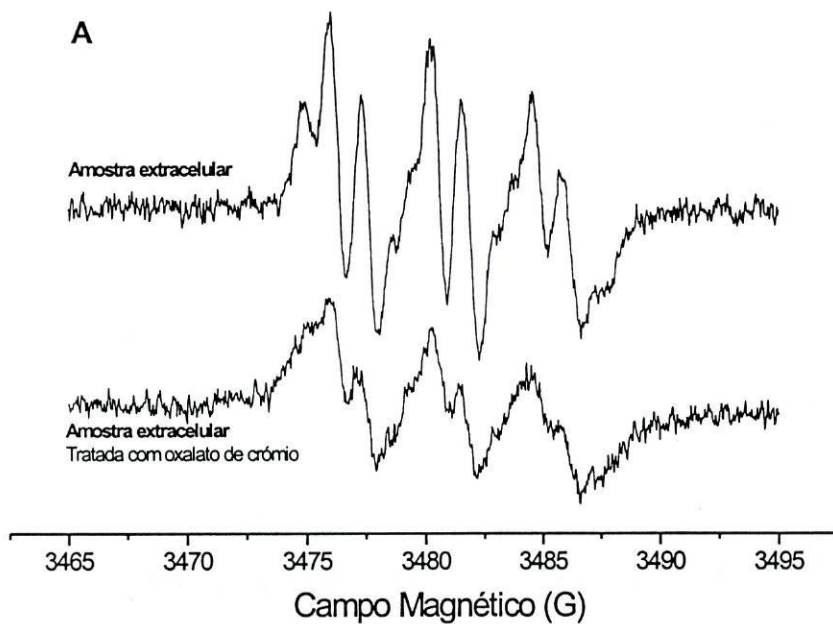


Figura 5.4 – Espectros de RPE das amostras “extracelular” (A), “celular” (B) e “membranas celulares” (B) tratadas ou não com oxalato de cromo 20 mM. Estas amostras correspondem a alíquotas de suspensão celular recolhidas 3 (A) ou 4 (B) horas após incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ).

No sentido de identificar o sinal na amostra “extracelular” foram efectuadas simulações por computador dos espectros de RPE dos radicais resultantes da oxidação do isoproterenol. O composto que apresentou a maior probabilidade de corresponder ao espectro de RPE observado, foi a leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona nas suas duas formas radicalares (Fig. 5.5). A proporção de 7:3 entre ambas formas foi a que obteve o melhor resultado na simulação. Os valores de  $g$  calculados dos radicais são 2,0046 e 2,0052, respectivamente. Este método computacional, infelizmente, não permite a atribuição destes valores às estruturas radicalares propostas.

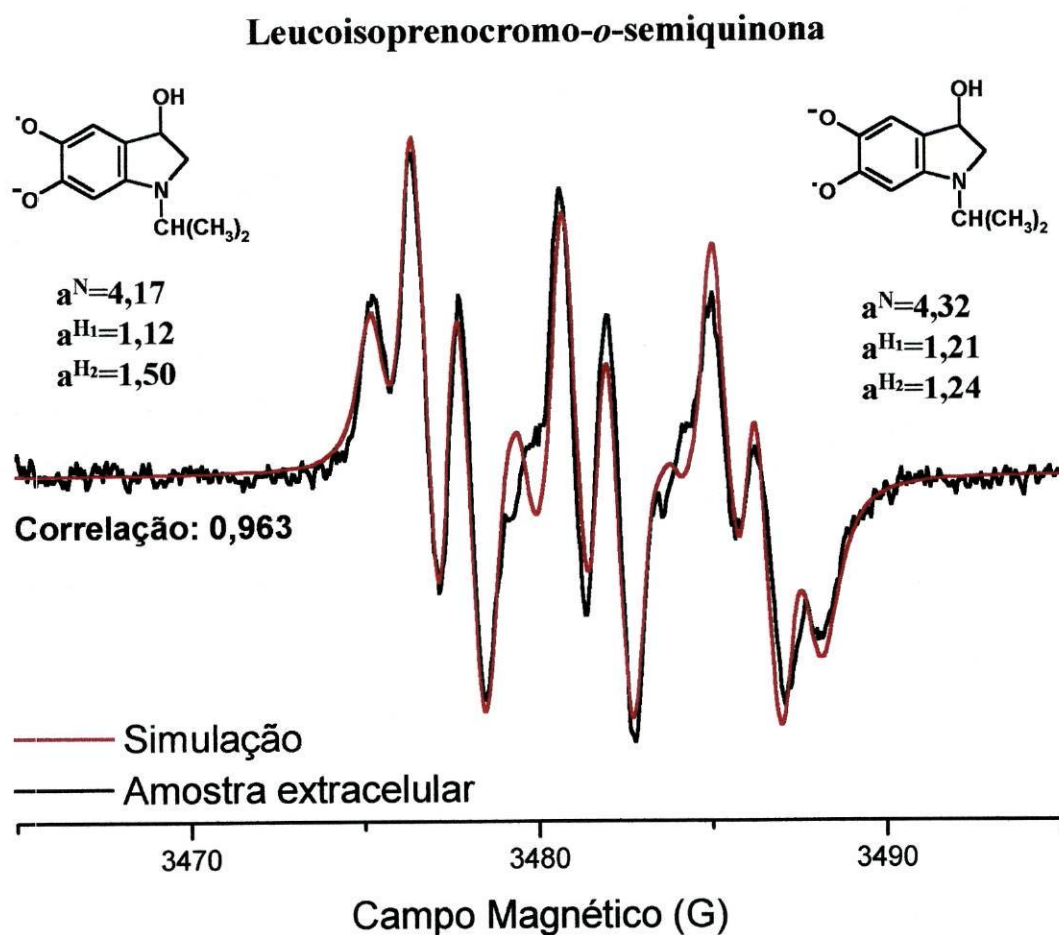


Figura 5.5 – Simulação de um espectro da leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona nas condições descritas sobreposto a um espectro de RPE de uma amostra “extracelular” (correspondente a uma alíquota de suspensão celular, recolhida 4 horas após incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ )).

Dado o alargamento do sinal observado nas amostras “celulares” e “membranas celulares” torna-se difícil identificar o ou os radicais que lhe dão origem. O facto de este sinal ocupar um campo magnético semelhante ao sinal presente na amostra “extracelular” e de ocorrer um sinal de perfil semelhante a este no sobrenadante resultante da sonicação e centrifugação das células, parece ser indicativo de se estar na presença do mesmo composto. No entanto, as diferenças no perfil dos sinais provenientes da amostra “celular” e da amostra “extracelular” não permitem ser-se conclusivo relativamente a esta hipótese. Curiosamente, estes resultados tornar-se-iam mais interessantes a confirmar-se a hipótese de não se tratar do mesmo composto, pois era indicativo da presença de um ou mais radicais formados, muito provavelmente, apenas ao nível celular.

Por comparação com o sinal de uma concentração conhecida de tempo, quantificaram-se os radicais na amostra “extracelular” e na amostra “celular” de uma alíquota recolhida após 3 horas de incubação. Os valores obtidos foram 2,4  $\mu\text{M}$  na amostra “extracelular” e 2,8 nmol por  $2,5 \times 10^5$  células na amostra celular.

Posteriormente, realizou-se um estudo do comportamento do ou dos radicais presentes na amostra “celular” após adição de GSH (2 mM) (Fig. 5.6). Na presença deste antioxidante o sinal diminuiu em intensidade. Este resultado é indicador de uma reacção entre o ou os radicais e a GSH, provavelmente com formação do radical glutationilo ( $\text{GS}^\cdot$ ) que dimeriza rapidamente a GSSG.

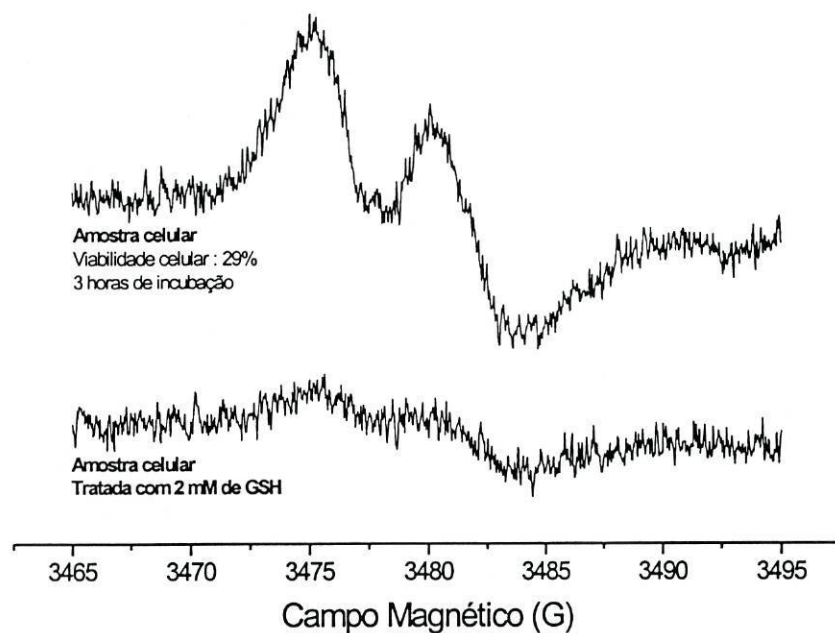


Figura 5.6 – Espectros de RPE de uma amostra “celular”, tratada ou não com GSH 2 mM, de uma alíquota de suspensão celular recolhida 3 horas após incubação com isoproterenol (10 mM) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ).

Em conclusão, estes estudos demonstram a formação, ao nível extracelular e celular, de radicais resultantes da oxidação do isoproterenol. Ao nível extracelular os radicais são muito provavelmente as duas formas radicalares da leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona. Ao nível celular, não foi possível identificar o sinal, embora seja provável tratar-se também da leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona. Adicionalmente, sabe-se que o ou os radicais, presentes ao nível dos cardiomiócitos, encontram-se fixados nas estruturas celulares, como por exemplo, membranas, citoesqueleto, núcleos, mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas, e desaparecem rapidamente na presença de GSH.

## **6 Discussão geral**

### **6.1 Interesse do estudo da cardiotoxicidade das catecolaminas – isoproterenol**

No 2º capítulo foram descritas as características da cardiomiopatia induzida por catecolaminas, em especial pelo isoproterenol, assim como os mecanismos propostos para o desenvolvimento dessa cardiotoxicidade. No entanto, algumas questões podem ser levantadas relativamente ao tema da dissertação. Qual o interesse do estudo da toxicidade cardíaca destes compostos? Porquê a escolha do isoproterenol como molécula modelo das catecolaminas neste tipo de estudos? É a estas questões que se pretende dar resposta nos pontos que se seguem.

#### **6.1.1 Acção terapêutica das catecolaminas**

Como foi já referido, as catecolaminas desempenham um papel fundamental como neurotransmissores. A estimulação pelo sistema nervoso autónomo simpático é mediada pelas catecolaminas adrenalina e noradrenalina (acção adrenérgica). Adicionalmente, ao nível do SNC, existe uma outra catecolamina endógena, a dopamina, que exerce também uma acção de neurotransmissor (Hoffman, 2001). Esta acção da dopamina também ocorre ao nível periférico em terminais nervosos e receptores dopaminérgicos.

A importância fisiológica das catecolaminas torna estas moléculas, e as que reproduzem a sua acção, em potenciais agentes terapêuticos. Estes compostos são geralmente designados por agentes simpaticomiméticos e a sua actividade pode ser classificada em 7 diferentes tipos (Hoffman, 2001):

- efeito excitatório em certos músculos lisos, tais como os presentes nos vasos sanguíneos cutâneos, nos rins, nas membranas das mucosas e nas glândulas salivares e sudoríparas;

- acção inibitória periférica noutros músculos lisos, tais como os presentes na parede intestinal, nos brônquios e nos vasos sanguíneos que irrigam os músculos esqueléticos;
- acção excitatória cardíaca com aumento da força e ritmo de contracção;
- acções metabólicas, tais como o aumento da glicogenólise no fígado e nos músculos e a libertação de ácidos gordos pelo tecido adiposo;
- acções endócrinas, tais como a modulação da secreção de insulina, renina e hormonas pituitárias;
- acções no SNC, tais como a estimulação da respiração, vigilância, actividade psicomotora e diminuição do apetite;
- acção pré-sináptica, de que resulta a inibição ou a facilitação da libertação de noradrenalina ou de acetilcolina.

A maior ou menor preponderância de alguns destes efeitos induzidos pelas catecolaminas está dependente da afinidade da catecolamina para o receptor em questão e da predominância desse receptor no tecido alvo. Assim, as diferentes catecolaminas podem ser usadas com variados fins terapêuticos (Hoffman, 2001), tais como: I) no choque, caracterizado por uma inadequada perfusão dos tecidos (agonistas  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos); II) na hipotensão (agonistas  $\alpha$  adrenérgicos), III) na hipertensão (agonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos de acção central); IV) nas arritmias cardíacas (adrenalina e em alguns casos o isoproterenol); V) na falha cardíaca (agonistas  $\beta$  adrenérgicos); VI) em hemorragias nas mucosas (adrenalina); VII) como descongestionante nasal (agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos); VIII) na asma (agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos); IX) e, ainda, nas reacções de hipersensibilidade (adrenalina).

Adicionalmente, a administração de outros compostos pode aumentar os níveis endógenos de catecolaminas, quer por indução da sua libertação quer por inibição da sua recaptação (Hoffman e Taylor, 2001). Por exemplo, a tiramina, efedrina e as anfetaminas originam uma rápida e breve libertação de neurotransmissores com actividade simpática. A cocaína e a imipramina (antidepressivo tricíclico) inibem o sistema *uptake-1*, mantendo assim, durante mais tempo os neurotransmissores na fenda sináptica.

Como conclusão, pode afirmar-se que as catecolaminas têm um largo espectro de acção farmacológica, podendo a sua acção ser prolongada pela actividade de outros fármacos. No entanto, a já referida cardiotoxicidade destes compostos é um dos principais efeitos limitantes do uso destes fármacos. Por exemplo, está descrito que doses terapêuticas de adrenalina ou noradrenalina originam com frequência arritmias ventriculares e o isoproterenol induz isquemia cardíaca (Hoffman, 2001).

### 6.1.2 Stress psicossocial

Como anteriormente referido no 2º capítulo, a activação do sistema nervoso simpático evoluiu no sentido de preparar o organismo para situações de risco de vida, muito comuns nos nossos antepassados (Lullmann *et al.*, 2000). No entanto, no Homem ocidental moderno a acção do sistema simpático já não se aplica (normalmente) às exigências dos nossos ancestrais. Este sistema é hoje essencialmente activado em situações de *stress* psicossocial muito comuns nas nossas sociedades. Sabe-se que o *stress* persistente aumenta, via secreção da corticotropina, a síntese de cortisol pelo córtex adrenérgico (Hoffman e Taylor, 2001). Por sua vez, os glucocorticóides aumentam a síntese de adrenalina ao induzirem a feniletanolamina-N-metiltransferase na medula supra-renal (Hoffman e Taylor, 2001). As enzimas tirosina-hidroxilase e dopamina- $\beta$ -hidroxilase também são aumentadas pelos glucocorticóides, o que potencia a capacidade de síntese da noradrenalina (Hoffman e Taylor, 2001). Tal pode conduzir a uma presença constante de elevadas concentrações de catecolaminas no organismo (Raab *et al.*, 1961; Haggendal *et al.*, 1987; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Black e Garbutt, 2002; Esch *et al.*, 2002). Como referido anteriormente, um dos órgãos alvo das catecolaminas é o coração. Assim, não surpreende que a ocorrência de lesões cardíacas, ou mesmo a morte súbita por doença cardíaca, possa ter o *stress* psicossocial como um dos seus factores determinantes (Raab *et al.*, 1961; Haggendal *et al.*, 1987; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996). Em conformidade com esta hipótese, foi descrito que a actividade do sistema nervoso simpático é mais elevada em pacientes com excesso de peso

(Scherrer *et al.*, 1994), com doença cardíaca de instabilidade coronária (McCance *et al.*, 1993) e com enfarte agudo do miocárdio (Rona, 1985; Dali e Sole, 1990; Sigurdsson e Swedberg, 1996). Adicionalmente, o sistema simpático, que como já anteriormente referido leva à libertação de glucose e de ácidos gordos, é também induzido por uma alimentação hipercalórica e por hiperinsulinemia (Landsberg, 1992; Scherrer *et al.*, 1994). Daqui pode resultar um ciclo vicioso, porque a presença de ácidos gordos diminui a utilização de glucose, o que aumenta a secreção de insulina, fechando-se o ciclo com a estimulação da actividade simpática e maior libertação de catecolaminas (Rupp *et al.*, 1994).

Em conclusão, pode dizer-se que a activação excessiva do sistema nervoso autónomo, por exemplo, pelo *stress* psicossocial, pode induzir um fenómeno de cardiotoxicidade mediado pelas catecolaminas.

### 6.1.3 Isquemia-reperfusão

As catecolaminas parecem também estar envolvidas na cardiotoxicidade resultante do fenómeno de isquemia-reperfusão. A isquemia cardíaca corresponde a uma situação de privação de circulação de sangue oxigenado no coração (Halliwell e Gutteridge, 1999). Se a circulação não cessar, mas for inferior à normal, diz-se que ocorre um fenómeno de hipóxia (Halliwell e Gutteridge, 1999). Em ambos os casos o fornecimento de O<sub>2</sub> é insuficiente para as necessidades metabólicas deste órgão. Esta privação de O<sub>2</sub> pode resultar de um fenómeno de aterosclerose, espasmo, bloqueio de uma artéria coronária ou, ainda, trombose (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dhalla *et al.*, 2000; Lefter e Granger, 2000; Buja, 2001). As maiores consequências da isquemia cardíaca são a depressão da função contráctil, arritmias e necrose (Buja, 2001). A reperfusão corresponde à recirculação e ao processo de reoxigenação do tecido previamente sujeito a isquemia.

Pelo processo isquémico ocorrem danos que poderão ser reversíveis ou irreversíveis. Quando a isquemia é curta, inferior a 20-30 minutos, a reperfusão restabelece totalmente os miócitos (Richard *et al.*, 1990; Buja, 2001). No entanto, o miocárdio pode demorar alguns dias até atingir a normalidade,

sendo o restabelecimento dos níveis de nucleótidos de adenina e a função contráctil do miocárdio os fenómenos de mais lenta recuperação (Richard *et al.*, 1990). Esta depressão da função contráctil, sem ocorrência de necrose, é denominada "stunned myocardium" (Richard *et al.*, 1990; Halliwell e Gutteridge, 1999; Lefer e Granger, 2000) e parece resultar da acção das ROS no sarcolema e nas proteínas de contracção (Lefer e Granger, 2000). A isquemia irreversível ocorre após uma prolongada ausência de O<sub>2</sub> e origina necrose por perda da integridade da estrutura celular em resultado da depleção energética, da produção de ROS e da sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> (Richard *et al.*, 1990; Halliwell e Gutteridge, 1999; Lefer e Granger, 2000; Buja, 2001).

A reperfusão do coração pode, no entanto, ser contraproducente. Pela reoxigenação do miocárdio podem ocorrer hemorragias no tecido danificado e um agravamento dos danos provocados pela isquemia, levando ao aparecimento de necrose com bandas de contracção e calcificação (Richard *et al.*, 1990; Buja, 2001). Este agravamento da situação pela reoxigenação é denominado de "paradoxo do oxigénio" (Hess *et al.*, 1989; Richard *et al.*, 1990) e é mediado por um fenómeno de *stress* oxidativo (Richard *et al.*, 1990; Halliwell e Gutteridge, 1999; Lefer e Granger, 2000; Buja, 2001). Tal acontece porque durante a reperfusão ocorre uma considerável produção de ROS, por mecanismos que a seguir serão descritos, que exercem citotoxicidade.

Um dos fenómenos que ocorre durante a isquemia cardíaca é o aumento da libertação de catecolaminas ao nível da glândula supra-renal e dos terminais nervosos simpáticos da zona isquémica do miocárdio (Wheatley *et al.*, 1985; Hess *et al.*, 1989; Dali e Sole, 1990; McCance *et al.*, 1993; Lameris *et al.*, 2000; Buja, 2001). Estudos realizados em porcos anestesiados demonstraram o aumento de noradrenalina (de 1,0 para 524,0 nM), adrenalina (<0,2 para 4,7 nM) e dopamina (0,4 nM para 43,9 nM) no fluído intersticial cardíaco após 60 minutos de isquemia (Lameris *et al.*, 2000). Este aumento parece, em parte, resultar da acção invertida do transportador *uptake-1* (Lameris *et al.*, 2000). Outro estudo, em doentes com instabilidade coronária e sintomas isquémicos, permitiu verificar actividade simpática aumentada ao nível cardíaco (34 pmol.min<sup>-1</sup> para 102 pmol.min<sup>-1</sup>) (McCance *et al.*, 1993). Neste estudo, os doentes que apresentavam síndromes de instabilidade isquémica também apresentaram actividades simpáticas no coração aumentadas

comparativamente aos doentes com angina estável. O aumento dos níveis de catecolaminas pelo fenómeno isquémico está também documentado ao nível neuronal (Kuo *et al.*, 2000). Assim, segundo alguns autores, o aumento de catecolaminas pode originar efeitos cardiotóxicos durante o fenómeno de isquemia-reperfusão (Hess *et al.*, 1989; McCance *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998; Buja, 2001). Em conformidade com esta hipótese, foi demonstrado que o tratamento prévio de ratos com isoproterenol aumentava a danificação cardíaca induzida pelo fenómeno de isquemia-reperfusão (Piper *et al.*, 1999).

Mecanicamente, uma das vias mais referidas para a cardiotoxicidade das catecolaminas durante a isquemia-reperfusão é a produção de ROS, quer pela metabolização daquelas pela MAO quer pela produção de compostos resultantes da oxidação das catecolaminas (Hess *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1998). A oxidação das catecolaminas durante este fenómeno poderá ser catalisada por metais de transição, tais como o  $\text{Cu}^{2+}$  ou o  $\text{Fe}^{3+}$  (Jewett *et al.*, 1989). Estes metais têm os seus níveis aumentados 8 a 9 vezes no início da reperfusão, após 35 minutos de isquemia (Chevion *et al.*, 1993). Adicionalmente, os radicais  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{HO}^{\cdot}$  podem também catalisar a oxidação das catecolaminas (ver em Bindoli *et al.*, 1992).

Durante o fenómeno de isquemia-reperfusão ocorrem diversas alterações, que favorecem a produção de ROS, ao nível:

- do sistema xantina-desidrogenase (XD)/xantina-oxidase (XO). Durante a isquemia a XD transforma-se em XO, por oxidação dos grupos sulfidrilo e/ou por proteólise. Além disso, a degradação do ATP pela acção isquémica dá origem a hipoxantina que funciona como substrato da XO (Chambers e Downey, 1989; Hess *et al.*, 1989; Richard *et al.*, 1990; Halliwell e Gutteridge, 1999; Buja, 2001);
- da mitocôndria. Durante a isquemia há um aumento dos agentes redutores (aumento da concentração de lactato e NADH), da concentração do ião hidrogénio e da auto-oxidação da coenzima Q. Tais fenómenos favorecem a redução univalente do  $\text{O}_2$  por parte da mitocôndria (Hess *et al.*, 1989; Buja, 2001). Por outro lado, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante a reperfusão (Sharikabad

- et al.*, 2000) pode induzir a permeabilidade transitória mitocondrial, com consequente desacoplamento da mitocôndria (Saris e Eriksson, 1995);
- das prostaglandinas. Durante a isquemia do miocárdio pode ocorrer o aumento da actividade metabólica do ácido araquidónico pelo sistema da ciclooxigenase. Este metabolismo induz a formação de ROS ao nível dos cardiomiócitos, do endotélio vascular e dos leucócitos invasores (Hess *et al.*, 1989; Buja, 2001);
  - dos granulócitos e macrófagos. Durante uma fase precoce do processo de isquemia/reperfusão desenvolve-se uma resposta inflamatória com invasões leucocitárias. Os leucócitos activados levam à formação de ROS (Hess *et al.*, 1989; Manson e Hess, 1989; Buja, 2001).

Em suma, várias alterações ocorrem durante a isquemia-reperfusão que contribuem para a toxicidade provocada por este fenómeno ao nível cardíaco. Uma dessas alterações é o aumento dos níveis de catecolaminas no coração, a qual parece ter um papel importante nos efeitos tóxicos observados.

#### **6.1.4 Feocromocitoma**

Os feocromocitomas estão na origem de uma síndrome clínica grave com possível desfecho fatal, caracterizada por hipertensão severa associada a complicações cardíacas (Hegedus, 2000; Bravo, 2002). Os feocromocitomas são tumores que produzem, armazenam e excretam catecolaminas. Ocorrem geralmente na medula supra-renal, mas também podem desenvolver-se nas células cromafins dos gânglios simpáticos (Landsberg e Young, 1998). Outros tumores relacionados são os quemodectomas derivados do corpo carotídeo e os ganglioneuromas derivados dos neurónios simpáticos pós-ganglionares. Os efeitos clínicos deste tipo de tumores estão essencialmente relacionados com a libertação de catecolaminas, sendo a hipertensão o sinal clínico mais predominante (mais de 50% dos casos) (Landsberg e Young, 1998). O feocromocitoma é a patologia responsável pelos sintomas de 0,1% da população hipertensa, sendo curável se devidamente diagnosticado e tratado.

A síntese e armazenamento das catecolaminas nos feocromocitomas ocorre de um modo semelhante ao da medula supra-renal normal, no entanto, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de libertação das catecolaminas (Landsberg e Young, 1998). Estes tumores não são enervados e, por isso, a libertação das catecolaminas não é induzida por estimulação nervosa. Como hipótese, a libertação de catecolaminas pode estar relacionada com alterações do fluxo sanguíneo ou como consequência de fenómenos de necrose no tumor (Landsberg e Young, 1998).

Em resultado do feocromocitoma os níveis circulatórios de catecolaminas aumentam acentuadamente, podendo atingir concentrações 10 vezes superiores ao normal (Wheatley *et al.*, 1985). São descritos valores plasmáticos da ordem de 120 nM de noradrenalina e 11 nM de adrenalina (Hegedus, 2000). Em concordância, os níveis de catecolaminas eliminados pela urina estão aumentados (Landsberg e Young, 1998). Em indivíduos normais o limite máximo de catecolaminas urinárias está compreendido entre 590 e 885 nmol (100 e 150 µg) por 24 horas. Na maioria dos doentes com feocromocitoma, os valores excedem 1480 nmol (250 µg) por dia. A maioria dos feocromocitomas armazena e liberta noradrenalina e adrenalina, sendo a percentagem de noradrenalina, no entanto, superior ao normal (Landsberg e Young, 1998). Os feocromocitomas extra-adrenérgicos geralmente produzem exclusivamente noradrenalina. A libertação de dopamina só ocorre em feocromocitomas malignos. Os feocromocitomas podem, no entanto, igualmente sintetizar, armazenar e libertar peptídeos, tais como opióides endógenos, adrenomedulina, endotelina, eritropoietina, neuropeptídeo Y, cromogranina A e a proteína relacionada com a hormona de crescimento (Landsberg e Young, 1998).

Tal como já anteriormente referido, um dos órgãos afectados pelo feocromocitoma é o coração. Alterações rítmicas, tais como taquicardia ou bradicardia auricular, arritmias supraventriculares e contracções ventriculares prematuras são algumas das manifestações descritas na literatura (Landsberg e Young, 1998). Cardiomiopatias associadas a miocardites, fibrose miocárdica ou hipertrofia do coração estão também associadas aos elevados níveis de catecolaminas induzidos pelo feocromocitoma (Landsberg e Young, 1998). A análise *post-mortem* do coração de vítimas do feocromocitoma revela focos de

necrose miocárdica com bandas de contracção e infiltrações de células inflamatórias, alterações que são directamente relacionáveis com a toxicidade das catecolaminas (Colucci e Braunwald, 1998; Baroldi *et al.*, 2001; Hoffman, 2001).

### 6.1.5 Isoproterenol

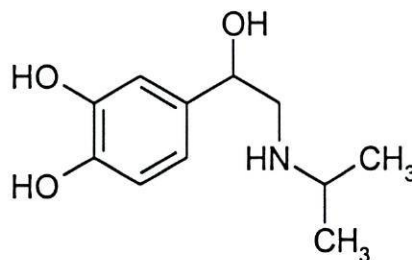


Figura 6.1 – Estrutura química do isoproterenol.

O isoproterenol (Fig. 6.1) é uma catecolamina sintética, também conhecida por isoprenalina, com a designação química de *d,l*-β-[3,4-diidroxifenil]-α-isopropilaminoetanol. Foi sintetizada em 1940 por Konzett com o objectivo de aumentar a capacidade broncodilatadora da adrenalina (ver em Waldeck, 2002). Esta catecolamina simpaticomimética possui um grupo isopropilo no grupo amina, o que lhe confere uma acção agonista β-adrenérgica com pequena afinidade para os receptores α (Hoffman, 2001). Esta acção específica β-adrenérgica permitiu a Ahlquist, em 1948, a classificação dos adrenoreceptores nas classes α e β (ver em Waldeck, 2002). A presença de grupos hidroxilo nas posições 3 e 4 no anel benzénico do isoproterenol potencia a sua acção adrenérgica, ao mesmo tempo que faz diminuir a selectividade para os diferentes tipos de receptores β. O grupo hidroxilo no carbono β aumenta a potência adrenérgica, embora diminua a acção no SNC em resultado do aumento da hidrofília da molécula. A presença deste hidroxilo confere quiralidade ao carbono β. Dos dois isómeros ópticos, a forma levógira é a que apresenta maior actividade periférica.

A acção farmacológica do isoproterenol caracteriza-se por diminuir a resistência vascular periférica induzindo a queda da pressão diastólica (Parfitt,

1999; Hoffman, 2001). A pressão sistólica mantém-se inalterada ou aumenta, mas a pressão arterial média diminui. Ao nível cardíaco ocorre um efeito inotrópico e cronotrópico positivo. O isoproterenol promove, de um modo geral, o relaxamento dos músculos lisos quando tonificados, em especial os gastrintestinais e os brônquicos (Hoffman, 2001). A prevenção da brônquio-constricção, associada ao efeito inibitório da libertação de histamina induzida por alergénios, torna o isoproterenol passível de uso no tratamento da asma. O isoproterenol induz, ainda, o aumento da produção energética, a libertação de ácidos gordos e a hiperglicemia. Esta última é devida à libertação de insulina pela actividade  $\beta$ -adrenérgica do isoproterenol ao nível pancreático, sendo, no entanto, menor do que a induzida pela adrenalina.

O isoproterenol é prontamente absorvido quando administrado na forma de aerossol (Hoffman, 2001). Quando administrado por via oral o isoproterenol é menos activo em resultado da sua sulfatação ao nível intestinal (Parfitt, 1999). Quando administrado por estas duas vias, o isoproterenol é eliminado na urina essencialmente como isoproterenol sulfatado e residualmente como isoproterenol inalterado ou 3-*o*-metilo conjugado (Moffat, 1986). O isoproterenol é, também, rapidamente metabolizado pela COMT, mas pouco metabolizado pela MAO e ao nível dos terminais dos neurónios não é captado (ou é pouco captado) pelo sistema *uptake-1* (Hoffman, 2001). Após administração intravenosa o tempo de semi-vida do isoproterenol é de minutos, sendo 90% eliminado pela via urinária em 24 horas, tanto na sua forma inalterada (15%) como no seu metabolito 3-*o*-metilo (Moffat, 1986; Parfitt, 1999). Os metabolitos do isoproterenol podem também ser excretados por via biliar em pequenas quantidades (Moffat, 1986).

No que respeita à sua utilidade terapêutica, o isoproterenol pode ser utilizado em situações de emergência para estimular o coração de pacientes com bradicardia (sem resposta à atropina) ou paragem cardíaca (Parfitt, 1999; Hoffman, 2001). Em particular, é usado no controlo e prevenção de ataques "Stokes-Adams" (tratamento temporário e prévio à colocação de *pacemaker* artificial) ou em tratamentos da arritmia ventricular "torsade de pointes". No tratamento do choque ou da asma, o isoproterenol foi substituído por outros fármacos simpaticomiméticos (Hoffman, 2001).

Ao nível experimental, o isoproterenol tem sido utilizado como molécula modelo para o estudo da cardiotoxicidade das catecolaminas. A escolha desta catecolamina sintética, neste tipo de estudos, fica a dever-se essencialmente a 6 razões:

- maior margem de segurança do isoproterenol em estudos *in vivo* entre a dose letal e a dose cardiotoxicidade, em relação às catecolaminas biogénicas (Rona, 1985; Dhalla *et al.*, 1992);
- o isoproterenol é 29 a 72 vezes mais potente na indução de lesões miocárdicas de igual intensidade às resultantes da acção da adrenalina e noradrenalina (ver em Dhalla *et al.*, 2001);
- boa correlação entre a dose de isoproterenol e o grau de intensidade da necrose miocárdica (Rona, 1985);
- as lesões miocárdicas induzidas pelo isoproterenol são semelhantes às encontradas em doentes sujeitos a elevadas concentrações de catecolaminas por um prolongado período de tempo (por exemplo, o feocromocitoma) (ver em Dhalla *et al.*, 2001);
- a necrose induzida pelo isoproterenol é semelhante à necrose que ocorre após um enfarte do miocárdio (Rona, 1985);
- uma única administração de doses tóxicas de isoproterenol origina alterações fisiológicas e morfológicas idênticas às que ocorrem após uma falha cardíaca ligeira (Grimm *et al.*, 1998).

Em conclusão, o isoproterenol é uma catecolamina sintética com uma utilidade terapêutica bastante limitada. No entanto, pelas suas características cardiotoxicas, o isoproterenol é bastante estudado e os seus efeitos cardíacos têm sido relacionados e extrapolados para as catecolaminas biogénicas.

## **6.2 Seleccção do modelo experimental a utilizar no estudo da cardiotoxicidade do isoproterenol**

Nesta dissertação são apresentadas duas publicações referentes ao modelo de suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto que foi desenvolvido e utilizado nos estudos da cardiotoxicidade *in vitro* do isoproterenol (ver em 5.3 e 5.4). Pretende-se dar nos pontos seguintes a justificação do desenvolvimento e aplicação deste modelo neste estudo.

### **6.2.1 Porquê o uso de cardiomiócitos isolados**

Os estudos de toxicidade cardíaca têm vindo a ser cada vez mais realizados em modelos *in vitro* constituídos por cardiomiócitos isolados (suspensões e culturas), em combinação ou mesmo em substituição do coração isolado ou do animal no seu todo (Haworth *et al.*, 1990). A utilização de células isoladas para este tipo de estudos tem as vantagens éticas conferidas aos ensaios *in vitro*, aliadas à grande vantagem de possibilitar o estudo dos efeitos dos compostos directamente nas células. Esta particularidade permite:

- que uma grande variedade de parâmetros bioquímicos e biofísicos possam ser avaliados com relativa facilidade;
- que o meio envolvente das células possa ser controlado rapidamente e com precisão;
- que os efeitos vasculares, quando considerados como variáveis experimentais, sejam removidos;
- que, fraccionando as células isoladas em várias alíquotas, seja facilmente realizado o estudo da acção dos compostos em diferentes concentrações.

Estas propriedades tornam os cardiomiócitos isolados num excelente modelo para a investigação dos mecanismos de acção das substâncias em estudo e para a comparação da toxicidade relativa de diferentes compostos

(Haworth *et al.*, 1990). Tendo estas características em conta, o modelo dos cardiomiócitos isolados foi considerado o adequado para o objectivo subjacente a esta dissertação.

### 6.2.2 Porquê a escolha de cardiomiócitos tolerantes ao $\text{Ca}^{2+}$

A utilização de um modelo com cardiomiócitos tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$  advém da importância crucial deste catião, quer na fisiologia celular (Evenas *et al.*, 1998) quer nos fenómenos de toxicidade celular (Orrenius *et al.*, 1989). Foi considerado essencial que os cardiomiócitos se encontrassem, durante os estudos a realizar, num meio com níveis fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , para assim melhor se explanarem os mecanismos de toxicidade das moléculas em estudo.

#### Paradoxo do $\text{Ca}^{2+}$

A obtenção de células adultas viáveis e tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$  é, no entanto, um processo difícil. O isolamento dos cardiomiócitos exige a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  para impedir a funcionalidade dos desmossomas e, assim, permitir a separação das células (Berry *et al.*, 1970). No entanto, durante a separação dos discos intercalares, parte do glicocalix que cobre a superfície do sarcolema pode perder-se (Piper, 2000). Apesar disso, outros contactos intercelulares permanecem intactos, tais como as junções estreitas, o que torna a separação incompleta e fragiliza as células durante a reposição do  $\text{Ca}^{2+}$ . Tal acontece porque na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre a contracção celular, levando a um aumento de tensão mecânica nas junções remanescentes entre as células, o que pode originar a destruição do sarcolema. Para este processo de morte celular parece também contribuir a alteração dos fluxos iónicos e das reservas energéticas durante a ausência e reposição do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6.2) (Chapman e Tunstall, 1987; Piper, 2000).

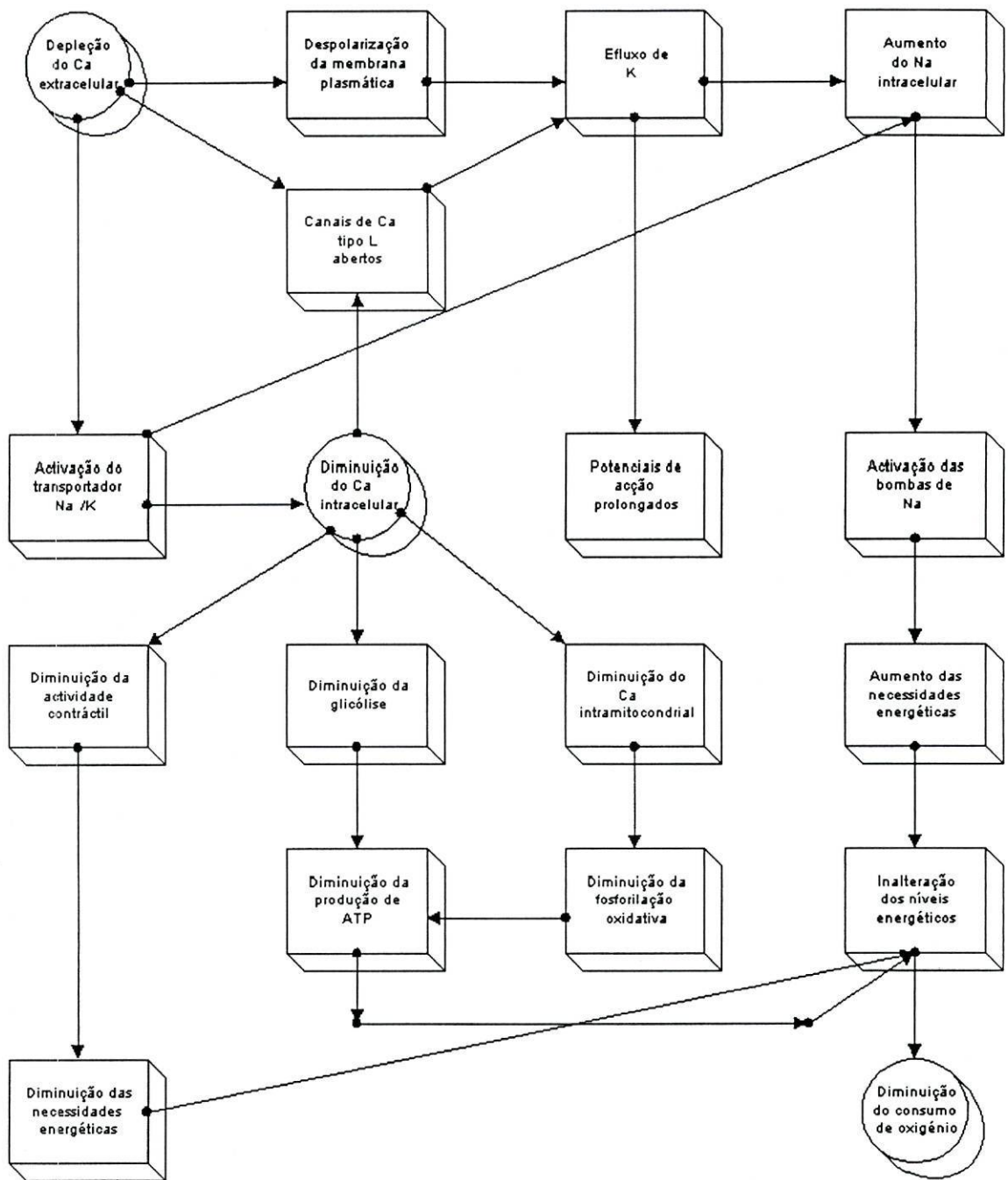


Figura 6.2 – Consequências da depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no coração (adaptado de Chapman e Tunstall, 1987).

A alteração dos fluxos iónicos inicia-se com a depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que induz a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , a despolarização do sarcolema e o aumento, por acção do sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , da concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular (Chapman e Tunstall, 1987). Por sua vez, o aumento de  $\text{Na}^+$  activa a bomba de  $\text{Na}^+$  e os canais de  $\text{K}^+$  para reduzir a concentração destes iões, estabelecendo-se um novo equilíbrio obtido entre os

canais de  $K^+$  e a bomba de  $Na^+$  (Chapman e Tunstall, 1987). Em termos energéticos, a depleção do  $Ca^{2+}$  citoplasmático origina a redução da produção de energia, pela diminuição da glicólise e da função mitocondrial. O consumo energético é, por um lado, reduzido em sequência do decréscimo da actividade contráctil e aumentado pelo incremento da actividade da bomba de  $Na^+$ . Como resultado final verifica-se a não alteração dos níveis energéticos e uma redução do consumo de  $O_2$  (Fig. 6.2).

Quando se retoma os níveis de  $Ca^{2+}$  fisiológicos, e dadas as elevadas concentrações de  $Na^+$  citosólico, ocorre um aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico por acção do sistema antiporte  $Na^+/Ca^{2+}$  (Chapman e Tunstall, 1987; Piper, 2000). Este incremento de  $Ca^{2+}$  induz um fenómeno de sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , de onde resulta a desorganização dos miofilamentos, a hipercontractura (contrações anormais dos cardiomiócitos), a formação de vesículas no sarcolema por desorganização do citoesqueleto e, por fim, a morte celular (Chapman e Tunstall, 1987; Haworth, 1990; Piper, 2000).

A morte celular pela reintrodução do  $Ca^{2+}$  foi denominada de paradoxo do  $Ca^{2+}$  (Zimmerman e Hulsmann, 1966). O paradoxo de  $Ca^{2+}$  é bastante limitante no isolamento de cardiomiócitos viáveis e levou a que muitos autores apresentassem modelos de cardiomiócitos isolados com níveis sub-fisiológicos deste catião (Kono, 1969; Berry *et al.*, 1970; Vahouny *et al.*, 1970; El-Shenawy e Abdel-Rahman, 1993; Andersson *et al.*, 1996). Durante o desenvolvimento da técnica de isolamento dos cardiomiócitos, realizado na parte experimental e apresentada nesta dissertação (ver em 5.3 e 5.4) procedeu-se ao aperfeiçoamento do processo de isolamento, de modo a obter o máximo de células viáveis tolerantes à reintrodução do  $Ca^{2+}$  a níveis fisiológicos.

### **6.2.3 Ratos fetais/neonatais versus ratos adultos**

Uma outra opção que teve de ser tomada foi a escolha do tipo de cardiomiócitos a utilizar. Os provenientes de ratos fetais/neonatais ou provenientes de ratos adultos. Os dois tipos de células apresentam diferenças estruturais e biológicas. Por exemplo, nos cardiomiócitos fetais/neonatais predominam os receptores  $\beta_2$ , ao passo que nos cardiomiócitos adultos

predominam os receptores  $\beta_1$  (Morisco *et al.*, 2001). Outra diferença prende-se com a concentração de taurina, a qual se repercute no próprio processo de isolamento. Os cardiomiócitos isolados, quando embrionares ou neonatais, são relativamente fáceis de obter (Melchert *et al.*, 2001). O fenómeno do paradoxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é menos pronunciado nestas células porque a concentração de  $\text{Na}^+$  citosólico aumenta de forma mais moderada durante a exposição à solução isenta de  $\text{Ca}^{2+}$  e os fosfatos energéticos diminuem menos durante a reposição do  $\text{Ca}^{2+}$  (Uemura *et al.*, 1985). Esta protecção parece ser mediada pelo aminoácido taurina, cujas concentrações parecem ser superiores no coração dos ratos recém nascidos relativamente aos dos adultos (Kramer *et al.*, 1981; Takihara *et al.*, 1985). O mecanismo de protecção parece envolver a existência de um sistema cotransportador taurina/ $\text{Na}^+$ , que protege a célula de um aumento exagerado deste catião ao nível intracelular (Suleiman e Chapman, 1993; Suleiman, 1994). Nos últimos anos desenvolveram-se, no entanto, técnicas para a obtenção de cardiomiócitos de ratos adultos que tornaram possível efectuar estudos neste tipo de células. Estas técnicas e os seus aspectos inovadores foram descritos e discutidos no ponto 5.4. A escolha do modelo de células provenientes de ratos adultos é mais consentânea com o tipo de células *in vivo* sujeitos à acção tóxica dos compostos em geral e das catecolaminas em particular. Por esse motivo os estudos realizados efectuaram-se neste tipo de células.

#### 6.2.4 Suspensões *versus* culturas

A escolha de suspensões de cardiomiócitos como modelo experimental, em detrimento das culturas, advém da sua maior facilidade de utilização e do facto de seu tempo de fiabilidade ser suficiente para a execução dos estudos propostos. Na realidade, as culturas de cardiomiócitos de ratos adultos são um modelo de difícil utilização, não só em resultado da dificuldade de isolamento das células, mas também do complicado processo de crescimento das mesmas (Melchert *et al.*, 2001). As culturas celulares apresentam, ainda, outra dificuldade para os estudos de toxicidade. Exigem uma composição complexa dos meios de incubação, os quais muitas vezes interagem com os compostos

em estudo. Este facto poderia inviabilizar os estudos apresentados nesta dissertação. Tendo em conta que um dos seus aspectos mais importantes é a oxidação do isoproterenol, a presença de meios complexos e muitas vezes de composição desconhecida (como no caso do uso de soro fetal) poderia dificultar o controlo deste processo de oxidação durante os ensaios. Por estas razões, entendeu-se que a escolha das suspensões de cardiomiócitos era a mais adequada para os estudos a realizar.

### **6.3 Selecção das concentrações de isoproterenol a utilizar nos estudos *in vitro***

As concentrações de isoproterenol utilizadas nos estudos *in vitro* foram de 0,1; 0,5 e 1,0 mM. A escolha destas concentrações baseou-se em duas vertentes que serão descritas nos pontos seguintes. Na primeira teve-se em linha de conta as concentrações plasmáticas e cardíacas do isoproterenol após a sua administração a ratos em doses tóxicas. Na segunda foram consideradas as concentrações de isoproterenol já utilizadas por outros autores em estudos *in vitro* similares.

#### **6.3.1 Determinação das concentrações de isoproterenol no plasma e coração de ratos após a sua administração em doses tóxicas**

##### ***6.3.1.1 Doses de isoproterenol usadas em estudos de cardiotoxicidade***

Nos estudos de toxicidade *in vivo* o isoproterenol é normalmente administrado (i.p. ou s.c.) a ratos em doses da ordem dos mg.Kg<sup>-1</sup> ou cg.Kg<sup>-1</sup>. Quando, em 1959, Rona e colaboradores descreveram as lesões, semelhantes a um enfarte, no miocárdio de rato após 48 horas da administração de isoproterenol, estes autores utilizaram a dose de 5,25 mg.Kg<sup>-1</sup> desta catecolamina (Rona *et al.*, 1959). Outros autores conseguiram os mesmos efeitos com doses semelhantes, de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> e 10 mg.Kg<sup>-1</sup> (s.c.) (Heap *et al.*,

1996; Mohan e Bloom, 1999; Tipnis *et al.*, 2000; Ocaranza *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> (s.c.) diminui o conteúdo cardíaco de ATP ao final de 1 hora (Kondo *et al.*, 1987). No entanto, doses compreendidas entre 50 e 200 µg.Kg<sup>-1</sup> de isoproterenol (s.c) parecem ser suficientes para induzir efeitos necróticos ao fim de 12-48 horas (Bloom e Davis, 1972; Joseph *et al.*, 1983; Benjamin *et al.*, 1989). De igual modo, a administração de 1 mg.Kg<sup>-1</sup> de isoproterenol a ratos através de uma bomba osmótica, ao longo de 24 horas, induziu focos de necrose, embora mais tênues do que os observados após a administração subcutânea de 1 mg.Kg<sup>-1</sup> (Benjamin *et al.*, 1989). Adicionalmente, a administração de 1 mg.Kg<sup>-1</sup> de isoproterenol (s.c.) pareceu induzir a fibrose do miocárdio e a acumulação de tecido conectivo no subendocárdio (Benjamin *et al.*, 1989). O efeito hipertrófico do isoproterenol pode ser observado após administração repetida a ratos de doses diárias de 4 a 5 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 2 a 7 dias (Gallego *et al.*, 2001; Leenen *et al.*, 2001; Ocaranza *et al.*, 2002), mas já foi descrito após a administração de apenas 500 µg.Kg<sup>-1</sup> (s.c.) durante dois dias (Benjamin *et al.*, 1989).

Apesar dos efeitos tóxicos do isoproterenol poderem ser observados com a administração por via injectável de poucos mg.Kg<sup>-1</sup>, a maioria dos estudos de toxicidade *in vivo* desta catecolamina reportam-se a doses da ordem dos cg.Kg<sup>-1</sup> e por vezes dg.Kg<sup>-1</sup>. Grande parte dos efeitos do isoproterenol relatados no 2º capítulo desta dissertação e referentes à revisão de Dhalla e colaboradores, 2001 referem-se a estudos em que se usaram doses de isoproterenol, por via injectável, de 40 mg.Kg<sup>-1</sup> (Dhalla *et al.*, 2001). Doses idênticas ou ligeiramente superiores foram também usadas em diferentes estudos no sentido de tentar esclarecer o mecanismo de toxicidade desta catecolamina (Whitehurst *et al.*, 1994; Sánches *et al.*, 1997; Tappia *et al.*, 2001) ou de induzir simplesmente a necrose cardíaca para estudos de cardioprotecção de outras substâncias (Padma e Devi, 2000; Sumitra *et al.*, 2001; Manikandan *et al.*, 2002). Uma das doses injectáveis também usadas com frequência no estudo da cardiotoxicidade do isoproterenol é da ordem das 80 mg.Kg<sup>-1</sup> (Lombardini, 1980; Singal *et al.*, 1981a; Rona, 1985; Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988; Yunge *et al.*, 1989; Marjomaki *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2001). Esta dose é ideal para o estudo do mecanismo de protecção exercido pela taurina contra a acção tóxica do isoproterenol

(Lombardini, 1980; Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988), assim como no estudo da toxicidade do isoproterenol exercida pela via da sua oxidação (Singal *et al.*, 1981a; Guarnieri *et al.*, 1986; Yunge *et al.*, 1989; Rupp *et al.*, 1994). Doses da ordem das  $\text{mg.Kg}^{-1}$  de isoproterenol foram também usadas em vários estudos relativos à cardiotoxicidade desta catecolamina (Azuma *et al.*, 1987; Preus *et al.*, 1988; Nirmala e Puvanakrishnan, 1996; Grimm *et al.*, 1998; Rathore *et al.*, 1998; Sasikumar e Devi, 2000; Sharma *et al.*, 2001; Mini e Rajamohan, 2002).

#### 6.3.1.2 *Determinação das concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol após a sua administração a ratos na dose de 80 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p.)*

A maioria dos estudos que pretendem esclarecer o mecanismo de cardiotoxicidade do isoproterenol, pela via da sua oxidação, utiliza doses injectáveis compreendidas entre 40 e 80  $\text{mg.Kg}^{-1}$  desta catecolamina (Singal *et al.*, 1981a; Panagia *et al.*, 1985; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Dhalla *et al.*, 2001; Tappia *et al.*, 2001). Assim, decidiu-se determinar as concentrações plasmáticas e cardíacas de isoproterenol após a sua administração a ratos na dose de 80  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (i.p.). As concentrações de isoproterenol encontradas 15 minutos após a sua administração foram de 64,2  $\mu\text{M}$  no plasma e de 129,6  $\mu\text{M}$  no coração (ver em 5.8).

#### 6.3.2 **Concentrações de isoproterenol usadas em estudos *in vitro* para a avaliação da cardiotoxicidade do isoproterenol**

Em 1982, Steen e colaboradores avaliaram a cardiotoxicidade do isoproterenol em suspensões de cardiomiócitos, tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , isolados de rato adulto (Steen *et al.*, 1982). Neste trabalho, Steen e colaboradores utilizaram concentrações de isoproterenol compreendidas entre 1  $\mu\text{M}$  e 1 mM, as quais consideraram equivalentes às concentrações plasmáticas de isoproterenol conhecidas por induzir necrose subendocardial *in vivo* (Ferrans *et*

*al.*, 1969; Woolf *et al.*, 1976). Apesar de também terem induzido a oxidação do isoproterenol com  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA, Steen e colaboradores não encontraram qualquer alteração da viabilidade ou mesmo da morfologia celular. Uma possível explicação para estes resultados é o facto da incubação do isoproterenol só ter decorrido por um tempo máximo de uma hora. A corroborar esta hipótese, nos estudos apresentados nesta dissertação, as alterações de viabilidade só ocorreram 3 horas após a incubação de isoproterenol (1 mM) com  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (ver em 5.5).

Concentrações na mesma ordem de grandeza foram utilizadas mais tarde em culturas primárias de cardiomiócitos neonatais (Ramos e Acosta, 1983; Ramos *et al.*, 1983; Acosta *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1984; Persoon-Rothert *et al.*, 1989; Ramos e Acosta, 1989). Nestes estudos o isoproterenol induziu a perda de viabilidade celular ao fim de 6 horas e 24 horas em concentrações de 0,25 e 0,1 mM, respectivamente (Ramos e Acosta, 1983; Persoon-Rothert *et al.*, 1989). Em concentrações de 0,5 e 1,0 mM a perda de viabilidade ocorreu a partir das 4 horas de incubação (Ramos e Acosta, 1983). Observou-se igualmente o aumento da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  ao fim de uma hora nas células em cultura incubadas com isoproterenol nas concentrações de 0,1 e 0,5 mM (Ramos *et al.*, 1984), assim como a fragilização da membrana mitocondrial (Ramos *et al.*, 1983) e inibição da bomba de troca iónica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Acosta *et al.*, 1984) ao fim de 0,5 horas para a concentração de 0,5 mM. As concentrações de isoproterenol compreendidas entre 0,1 e 1 mM demonstraram, assim, efeitos tóxicos em cardiomiócitos neonatais em cultura. Curiosamente, estes efeitos foram sempre de algum modo revertidos pela acção de antioxidantes, o que indiciava o envolvimento de um fenómeno de *stress* oxidativo na cardiotoxicidade do isoproterenol (Ramos e Acosta, 1983; Ramos *et al.*, 1983; Acosta *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1984; Persoon-Rothert *et al.*, 1989; Ramos e Acosta, 1989).

### 6.3.3 Conclusão

Em termos fisiológicos, os níveis de catecolaminas circulatórias e intersticiais situam-se em valores da ordem dos nM. Estas concentrações

podem, no entanto, ser aumentadas em situações patológicas. Na maioria dos estudos *in vivo*, realizados no sentido de se tentar esclarecer o mecanismo de cardiotoxicidade do isoproterenol, foram utilizadas doses compreendidas entre 40 e 80 mg.Kg<sup>-1</sup>. Observou-se que estas doses de isoproterenol correspondem a concentrações plasmáticas e cardíacas em valores da ordem das centenas de µM. Em conformidade, os estudos previamente descritos de avaliação da toxicidade do isoproterenol em cardiomiócitos isolados reportam-se a concentrações compreendidas entre 0,1 e 1 mM desta catecolamina. Assim, tendo em conta os dados descritos e o objectivo de determinar o mecanismo de toxicidade do isoproterenol em cardiomiócitos isolados, foram estabelecidas as concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mM de isoproterenol para os estudos a realizar.

#### **6.4 Escolha do modelo de oxidação do isoproterenol**

O agente escolhido para a catálise da oxidação do isoproterenol foi o Cu<sup>2+</sup> na concentração de 20 µM. Nos pontos seguintes serão abordadas as razões desta escolha.

##### **6.4.1 Processos de oxidação das catecolaminas ao nível biológico**

Vários autores têm sugerido a oxidação das catecolaminas a aminocromos em sistemas biológicos (Matthews *et al.*, 1985; Dhalla *et al.*, 1989; Bindoli *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994; Smythies e Galzigna, 1998; Galzigna *et al.*, 1999; Macarthur *et al.*, 2000; Behonick *et al.*, 2001). Além dos já referidos efeitos cardiotóxicos, a oxidação das catecolaminas tem sido envolvida no choque séptico (Macarthur *et al.*, 2000) e, no caso da dopamina, na doença de Parkinson (Pezzella *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1998; Galzigna *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 2000; Martinez-Alvarado *et al.*, 2001; Pattison *et al.*, 2002). A actividade pró-oxidante dos neurotransmissores, e, em especial, das catecolaminas ao nível do NADH e da cisteína, foi também comparada e descrita recentemente (Siraki e O'Brien, 2002). No entanto, a oxidação das

catecolaminas é extremamente lenta a pH fisiológico (Jewett *et al.*, 1989; Remião *et al.*, 2001b; Schweigert *et al.*, 2001; Remião *et al.*, 2002a). Em termos biológicos, esta oxidação deverá ocorrer quando é catalisada pela acção de enzimas ou na presença de metais de transição. A catálise enzimática pode ser mediada pela XO (Valerino e McCormack, 1971; Foppoli *et al.*, 1997), tirosinase (Heacock, 1959; Cánovas *et al.*, 1982), lipoxigenase (Núñez-Delicado *et al.*, 1996), por várias catecol-oxigenases que contêm cobre (ver em Bindoli *et al.*, 1992), pela mieloperoxidase dos leucócitos (Matthews *et al.*, 1985) ou pela citocromo-c-oxidase presente no músculo cardíaco (ver em Dhalla *et al.*, 2001). No que respeita aos metais, as catecolaminas podem ser oxidadas pelo  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (Heacock, 1959; Bindoli *et al.*, 1992) e por vários quelatos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , como por exemplo, a ferrilmioglobina (Giulivi e Cadenas, 1998b), a S-nitrosoglutationa/ $\text{Cu}^{2+}$  (Rigobello *et al.*, 2001), a ceruloplasmina ( $\alpha_2$ -glicoproteína plasmática que armazena o cobre) (Cha e Kim, 1999), o ferricianeto e o ferricitocromo c (ver em Bindoli *et al.*, 1992). No entanto, radicais como o  $\text{HO}^\cdot$ , o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Misra e Fridovich, 1972; Mahan e Insel, 1984; Bindoli *et al.*, 1992; Macarthur *et al.*, 2000) e o monóxido de azoto ( $^\cdot\text{NO}$ ) (Klatt *et al.*, 2000) também podem induzir a oxidação das catecolaminas em sistemas biológicos. Preparações mitocondriais e microssomais parecem catalisar a oxidação das catecolaminas via  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (ver em Bindoli *et al.*, 1992). Os produtos de oxidação das catecolaminas, tais como as melaninas, também podem induzir esta oxidação (Hegedus, 2000).

#### 6.4.2 Escolha do $\text{Cu}^{2+}$ na concentração de 20 $\mu\text{M}$

No processo de selecção do modelo apropriado de oxidação do isoproterenol houve a preocupação de escolher um agente oxidante que penetrasse nas células e aí também pudesse exercer a sua acção. Neste propósito, os metais de transição têm vantagem sobre os sistemas enzimáticos, pois estes não têm a possibilidade de atravessar a membrana plasmática. O cobre é, juntamente com o ferro, um dos metais de transição mais importantes a nível fisiológico. A presença destes metais é essencial para

a síntese de uma grande variedade de enzimas e outras proteínas envolvidas na respiração, transporte de O<sub>2</sub> e formação de ·NO (Halliwell e Gutteridge, 1999). Embora ambos, Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, demonstrem a capacidade de oxidar as catecolaminas, esta oxidação apenas parece ocorrer de um modo linear e dependente da concentração do catião no caso de este ser o Cu<sup>2+</sup> (Waalas *et al.*, 1963). Adicionalmente, e ao nível do ácido desoxirribonucleico (ADN), foi descrito que a associação DOPA e Cu<sup>2+</sup> era mais tóxica que a associação de DOPA e Fe<sup>3+</sup> (Morin *et al.*, 1998). Por estes motivos, o Cu<sup>2+</sup> foi escolhido como agente oxidante do isoproterenol nos estudos realizados. O Cu<sup>2+</sup> também já foi utilizado por outros autores como catalisador da oxidação da dopamina em estudos de neurotoxicidade (Miller *et al.*, 1996; Snyder e Friedman, 1998; Paris *et al.*, 2001) e em estudos do envolvimento da oxidação de catecóis nos danos do ADN (Hirakawa *et al.*, 2002). A sua entrada para os cardiomiócitos parece ocorrer pelos canais e transportadores existentes nas membranas, tais como transportadores de membrana com grupos SH, poros e canais de Ca<sup>2+</sup> (Limaye e Shaikh, 1999). A formação de um complexo entre o Cu<sup>2+</sup> e o isoproterenol poderá ainda favorecer a entrada de Cu<sup>2+</sup> para a célula, tal como parece acontecer no caso do complexo Cu<sup>2+</sup>-dopamina ao nível neuronal (Paris *et al.*, 2001). O Cu<sup>2+</sup> poderá, assim, exercer a sua actividade oxidante ao nível intracelular.

O cobre está presente no organismo na forma livre ou ligada, em concentrações compreendidas entre 11 e 24 µM (Jacobs *et al.*, 1990; Lauwerys, 1996). A concentração total de cobre no coração é da ordem de 75 µM (Powell *et al.*, 1992). No entanto, os níveis de cobre poderão estar aumentados em patologias como a doença de Wilson (Scheinberg, 1998). Cerca de 90% do cobre fisiológico está ligado à ceruloplasmina, a qual se encontra no sangue em concentrações compreendidas entre 200 e 400 mg/L (Halliwell e Gutteridge, 1999). O restante cobre encontra-se essencialmente ligado à albumina ou a aminoácidos e é activo, no que respeita à sua capacidade de se envolver em ciclos redox (Powell *et al.*, 1992). Os níveis de cobre, tais como os do ferro, poderão ainda estar aumentados 8 a 9 vezes após um fenómeno de isquemia prolongada (Chevion *et al.*, 1993). Em estudos *in vitro* o cobre exerce acção oxidante mesmo quando ligado à ceruloplasmina,

oxidando catecolaminas (Waalas *et al.*, 1963; Bindoli *et al.*, 1992; Halliwell e Gutteridge, 1999) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Fox *et al.*, 2000). O valor seleccionado de 20  $\mu\text{M}$  para a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  é um valor elevado se considerarmos os níveis de cobre livre no organismo, mas está em conformidade com os valores fisiológicos de cobre total, ou seja, livre e ligado. Esta concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  foi previamente utilizada em estudos *in vitro* na oxidação de catecóis, para a avaliação da sua toxicidade ao nível do ADN (Hirakawa *et al.*, 2002). De realçar que o  $\text{Cu}^{2+}$  é apenas um dos agentes passíveis de induzir a oxidação das catecolaminas a nível fisiológico e, por isso, a concentração elevada de  $\text{Cu}^{2+}$  que é utilizada poderá englobar os diferentes processos de oxidação abordados.

## **6.5 Discussão dos resultados**

Os resultados obtidos foram discutidos nas publicações presentes nesta dissertação. O que se pretende neste ponto é integrar os resultados obtidos num contexto sequencial que torne mais fácil a sua interpretação. Com essa finalidade, a discussão será abordada em função dos diferentes parâmetros avaliados nos estudos realizados.

### **6.5.1 Oxidação do isoproterenol em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato**

A oxidação do isoproterenol nas suspensões de cardiomiócitos isolados de rato foi avaliada em dois dos estudos publicados (ver em 5.5 e 5.6) e num terceiro estudo, ainda não publicado, onde se descreve a formação das duas formas radicalares da leucoisoprenocromo-*o*-semiquinona ao nível extracelular e de radicais, possivelmente os mesmos, ao nível dos cardiomiócitos (ver em 5.9). No primeiro estudo (ver em 5.5), foi comparada, ao longo da incubação e no meio extracelular, a depleção do isoproterenol, por oxidação, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mM e na presença ou ausência de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (ver em 5.5 a Fig. 4). No segundo estudo (ver em 5.6), foi avaliada a depleção

do isoproterenol e a formação do seu aminocromo, o isoprenocromo, quer ao nível dos cardiomiócitos quer ao nível extracelular, após incubação do isoproterenol (1 mM) e na presença ou ausência de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (ver em 5.6 as Fig. 1 e 2). No terceiro estudo (ver em 5.9) procuraram-se indícios da oxidação do isoproterenol a isoprenocromo ao nível celular, pela detecção, por RPE, de radicais intermediários. Adicionalmente, para a determinação directa e simultânea do isoproterenol e do isoprenocromo nos cardiomiócitos isolados, foi desenvolvido um procedimento para a quantificação das catecolaminas e respectivos aminocromos por HPLC-DAD (ver em 5.7).

A análise dos resultados permite concluir que:

- a oxidação do isoproterenol a isoprenocromo na suspensão celular é directamente proporcional ao tempo de incubação e é muito mais acentuada na presença do  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ );
- a velocidade de oxidação do isoproterenol, na presença do  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ), não é dependente da concentração inicial do isoproterenol;
- o isoprenocromo surge nos cardiomiócitos, por captação deste a partir do meio extracelular e/ou por oxidação intracelular do isoproterenol, sendo a sua concentração superior no caso da incubação do isoproterenol em presença do  $\text{Cu}^{2+}$ ;
- verificou-se a formação da leucoisoprenocromo-o-semiquinona no meio extracelular. O mesmo composto, ou um outro resultante da oxidação do isoproterenol, forma-se ao nível dos cardiomiócitos, nas suas membranas, citosqueleto, núcleos e organelos mais pesados, como as mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas.

#### 6.5.1.1 *Catálise da oxidação do isoproterenol pelo $\text{Cu}^{2+}$*

A oxidação do isoproterenol na ausência de catalisadores é um processo lento em condições de pH e temperatura fisiológicas. Tal já fora referido em estudos anteriores e parece de algum modo questionar a importância deste fenómeno a este nível (Jewett *et al.*, 1989; Schweigert *et al.*, 2001). Na realidade, poucos efeitos foram observados nas suspensões de cardiomiócitos pela oxidação do isoproterenol na ausência do  $\text{Cu}^{2+}$ . No entanto, na presença

do  $\text{Cu}^{2+}$  a oxidação é suficientemente rápida para se observarem efeitos de inibição enzimática (GPX e GST) ao final de 1 hora para a concentração de 0,1 mM de isoproterenol (ver em 5.5).

O processo de oxidação do isoproterenol pelo  $\text{Cu}^{2+}$  parece ocorrer via formação de um complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -isoproterenol (Balla *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1996; Paris *et al.*, 2001; Schweigert *et al.*, 2001) que reage posteriormente com o  $\text{Cu}^{2+}$  originando a isoproterenol-o-quinona (ver em 5.6 o esquema 1). Foi sugerido que esta oxidação ocorre de um modo directo, sem formação do intermediário isoproterenol-o-semiquinona (Balla *et al.*, 1992). A não detecção deste radical, nas análises efectuadas por RPE (ver em 5.9), parece confirmar que a oxidação do isoproterenol a isoproterenol-o-quinona, na presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , ocorre por perda simultânea dos 2 electrões. Esta oxidação pode também ser catalisada pelo complexo  $\text{CuO}_2^+$ , o qual resulta da reacção entre o  $\text{Cu}^+$  e o  $\text{O}_2$ . Balla e colaboradores sugerem que este complexo é determinante no grau da propagação da oxidação dos catecóis pelo cobre, o que talvez explique o facto da concentração de isoproterenol não ter influenciado a velocidade da sua oxidação na presença de iguais concentrações deste metal. A oxidação dos catecóis pelo  $\text{CuO}_2^+$  ocorre via redução do  $\text{O}_2$  do complexo a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Balla *et al.*, 1992). Após a formação da isoproterenol-o-quinona, esta pode sofrer um rearranjo a leucoisoprenocromo que rapidamente se oxida a leucoisoprenocromo-o-semiquinona (ver em Bindoli *et al.*, 1989). Este radical é finalmente oxidado a isoprenocromo. Nestas oxidações, o  $\text{Cu}^{2+}$ , o  $\text{O}_2$ , e ROS podem funcionar como aceitadores de electrões. Foi, ainda, sugerido que a oxidação do leucoaminocromo é essencialmente mediada pelo  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a oxidação da leucoaminocromo-o-semiquinona pelo  $\text{O}_2$  (Baez e Segura-Aguilar, 1994; Paris *et al.*, 2001).

Nos estudos realizados da oxidação do isoproterenol a isoprenocromo em suspensões de cardiomiócitos houve a necessidade de: I) desenvolver um procedimento para a quantificação simultânea do isoproterenol e isoprenocromo nestas amostras e II) proceder à detecção e localização dos radicais resultantes da oxidação do isoproterenol ao nível dos cardiomiócitos.

### 6.5.1.2 Determinação do isoproterenol e isoprenocromo nas suspensões de cardiomiócitos

Foi desenvolvido um procedimento para a determinação das catecolaminas e respectivos aminocromos por HPLC-DAD (ver em 5.7). Os aminocromos estudados foram o adrenocromo, noradrenocromo, dopaminocromo, dopacromo e isoprenocromo, que resultam da oxidação da adrenalina, noradrenalina, dopamina, dopa e isoproterenol, respectivamente. Dada a dificuldade de obtenção de padrões de aminocromos, à exceção do adrenocromo, fez-se a comprovação dos picos cromatográficos dos aminocromos através da caracterização dos seus espectros de UV (ver em 5.7) e de espectrometria de massa (Lemos-Amado *et al.*, 2001). Foi, ainda, desenvolvido um procedimento de preparação de amostras biológicas para a quantificação dos aminocromos. Este procedimento permitiu a quantificação simultânea de isoprenocromo e de isoproterenol, nas suspensões celulares e, em especial, nos cardiomiócitos (ver em 5.5 e 5.6).

A presença de isoprenocromo ao nível dos cardiomiócitos (ver em 5.6 a Fig. 2B) é um resultado importante que poderá explicar os efeitos tóxicos observados pela oxidação do isoproterenol. A sua presença nos cardiomiócitos poderá advir da sua captação a partir do meio extracelular ou, então, da oxidação intracelular do isoproterenol. Em conformidade, a presença de adrenocromo em estruturas sub-celulares, como, por exemplo, as mitocôndrias após perfusão do coração com C<sup>14</sup>-adrenocromo, já foi descrita, o que demonstra a possibilidade dos aminocromos serem incorporados nas células a partir do meio exterior (Fliegel *et al.*, 1985; Taam *et al.*, 1986). Por outro lado, a observação de uma maior rapidez na depleção intracelular do isoproterenol nas células incubadas na presença de Cu<sup>2+</sup>, comparativamente às incubadas na sua ausência, parece ser indicativo de uma oxidação intracelular do isoproterenol pelo Cu<sup>2+</sup> (ver em 5.6 a Fig. 2A).

### 6.5.1.3 Detecção e localização dos radicais resultantes da oxidação do isoproterenol ao nível dos cardiomiócitos

No ponto anterior descreveu-se a presença do isoprenocromo ao nível celular após a incubação dos cardiomiócitos com isoproterenol. No sentido de tentar esclarecer o local da oxidação do isoproterenol a este nível, procuraram-se indícios deste fenómeno nas células recorrendo à espectrometria de RPE (ver em 5.9).

No estudo citado, observou-se a presença e formação de radicais resultantes da oxidação do isoproterenol, possivelmente as duas formas radicalares da leucoisoprenocromo-o-semiquinona, ao nível das estruturas celulares, tais como membranas, citoesqueleto, núcleos e mitocôndrias. A presença destes radicais nestas estruturas celulares, infelizmente, não esclarece se a oxidação do isoproterenol ocorre a nível intracelular. O facto da maioria dos cardiomiócitos ter perdido a sua integridade membranar aquando das análises efectuadas (Fig. 5.1 – 5.3), possibilita a ligação destes radicais a estas estruturas após a lise das células. No entanto, a possível presença da leucoisoprenocromo-o-semiquinona nas membranas e organelos celulares é um forte indicador de que a toxicidade devida à oxidação do isoproterenol pode, em parte, resultar da actividade deste radical a este nível. Foi descrita a extrema reactividade da leucoaminocromo-o-semiquinona (Segura-Aguilar *et al.*, 1998), tendo sido sugerido que este radical é o responsável pela neurotoxicidade resultante da oxidação da dopamina (Arriagada *et al.*, 2000; Paris *et al.*, 2001). A formação da leucoisoprenocromo-o-semiquinona ao nível celular pode também resultar da redução do isoprenocromo, com um electrão, catalisada por antioxidantes (Singal *et al.*, 1981b), pela NADPH-citocromo-b<sub>5</sub>-redutase, pela NADPH-citocromo-P450-redutase ou pela cadeia respiratória na presença de NADH (Brunmark e Cadenas, 1989; Bindoli *et al.*, 1990a; Baez e Segura-Aguilar, 1994; Segura-Aguilar *et al.*, 1998). É de realçar o facto de terem sido descritas recentemente enzimas presentes na superfície externa das membranas, tais como algumas flavoenzimas e a ferricianeto-redutase, que são capazes de reduzir univalentemente quinonas e aminocromos (Giulivi e Cadenas, 1998a; Arriagada *et al.*, 2000).

#### 6.5.1.4 Conclusão

A oxidação do isoproterenol é extremamente lenta na ausência do  $\text{Cu}^{2+}$ . Na sua presença esta oxidação é catalisada, podendo observar-se níveis consideráveis de isoprenocromo nos cardiomiócitos. O isoprenocromo, assim como radicais relacionados, encontrados nas estruturas celulares, podem ser os responsáveis pela toxicidade resultante da oxidação do isoproterenol.

#### 6.5.2 Viabilidade celular

Os estudos da viabilidade celular dos cardiomiócitos incubados com isoproterenol, na presença ou ausência do  $\text{Cu}^{2+}$ , foram apresentados no ponto 5.5. Alguns desses resultados foram também abordados no ponto 5.4 (Fig. 2). Nestes estudos, a viabilidade dos cardiomiócitos foi avaliada por dois processos independentes, morfologia celular e integridade da membrana plasmática.

##### Morfologia celular

A morfologia celular foi avaliada por observação microscópica dos cardiomiócitos. Os cardiomiócitos viáveis apresentam-se na forma rectangular ("rod-shaped cells"). No entanto, os cardiomiócitos quando são sujeitos a uma sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  entram em hipercontractura (Dali e Sole, 1990), levando a um desalinhamento irreversível das miofibrilhas, o que provoca o arredondamento das células ("round-shaped cells") (Haworth, 1990; Timerman *et al.*, 1990). Para esta alteração da forma celular parece contribuir a acção do  $\text{Ca}^{2+}$  no citesqueleto, que promove a dissociação dos filamentos de actina da membrana plasmática (Orrenius *et al.*, 1989). A disfunção das células na forma arredondada leva, em última instância, à morte celular. Por observação microscópica distinguem-se os dois tipos de formatos. Note-se que os cardiomiócitos podem apresentar-se na forma rectangular e possuírem, no entanto, um potencial de membrana anormal ou, então, encontrarem-se desprovidos em cerca de 70% do seu ATP. Por outro lado, podem apresentar-se na forma arredondada e continuarem metabolicamente activos, com a

permeabilidade membranar intacta (Haworth, 1990; Timerman *et al.*, 1990). Diversos autores utilizaram esta técnica para a avaliação da viabilidade e funcionalidade celular (Powell e Twist, 1976; Clark *et al.*, 1978; Haworth *et al.*, 1980; Kao *et al.*, 1980; Isenberg e Klockner, 1982; Farmer *et al.*, 1983; El-Shenawy e Abdel-Rahman, 1993; Guennec *et al.*, 1993; Viko *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996).

#### Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pela libertação de uma enzima intracelular, a LDH, para o meio extracelular. Outras enzimas poderiam também ter sido utilizadas, como por exemplo, a CPK (El-Shenawy e Abdel-Rahman, 1993) ou a  $\alpha$ -hidroxibutirato-desidrogenase (Persoon-Rothert *et al.*, 1989). Quando as células perdem a sua integridade membranar, as enzimas intracelulares transitam para o espaço extracelular. A razão da actividade dessas enzimas no meio extracelular sobre a actividade total na suspensão dá uma indicação da viabilidade celular. No entanto, foi sugerido que pode ocorrer a libertação enzimática dos cardiomiócitos sem que isso seja reflexo de danos irreversíveis nestes (Hüser *et al.*, 1996). Segundo Hüser e colaboradores, tal poderá acontecer por um fenómeno de exocitose ou desprendimento de vesículas membranares, sem que isso se traduza em lesão irreversível (Hüser *et al.*, 1996). A determinação da actividade da LDH para a avaliação da viabilidade dos cardiomiócitos é, também, referenciada por outros autores (Ramos e Acosta, 1983; Haworth, 1990; Timerman *et al.*, 1990).

Pela observação dos resultados ao nível da viabilidade, obtidos nos estudos efectuados, pode concluir-se que:

- o isoproterenol, nas concentrações estudadas, não induziu alterações na viabilidade celular quando incubado na ausência do  $\text{Cu}^{2+}$ ;
- o  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ), quando incubado isoladamente, induziu uma ligeira perda da permeabilidade membranar, que se reflectiu ao final da primeira hora de incubação (ver em 5.5 a Fig. 6);
- a incubação do isoproterenol na presença do  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) induziu alterações consideráveis na viabilidade celular, com arredondamento

dos cardiomiócitos, visível a partir das 2 horas de incubação do isoproterenol (1 mM), e perda da permeabilidade membranar, observável ao fim de 4 horas de incubação do isoproterenol (0,5 e 1 mM) (ver em 5.5 as Fig. 5 e 6).

#### 6.5.2.1 Ausência de efeito na viabilidade celular após incubação dos cardiomiócitos com isoproterenol na ausência de $\text{Cu}^{2+}$

A ausência de qualquer efeito na viabilidade celular dos cardiomiócitos sujeitos à concentração de 1 mM de isoproterenol é um resultado, de algum modo, surpreendente. No entanto, a ausência de morte celular nas primeiras horas de incubação com concentrações semelhantes de isoproterenol também foi descrita por outros autores (Steen *et al.*, 1982; Ramos e Acosta, 1983; Persoon-Rothert *et al.*, 1989). Como referido no 2º capítulo, um dos principais mecanismos propostos para a cardiotoxicidade do isoproterenol está relacionado com o efeito  $\beta$ -agonista deste, que poderá induzir um fenómeno de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bloom e Davis, 1972; Opie *et al.*, 1985; Rona, 1985; Wheatley *et al.*, 1985; Dhalla *et al.*, 2001). O facto das células se encontrarem suspensas num meio com concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , deveria proporcionar a expressão deste mecanismo de toxicidade. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foi observado ao fim de alguns minutos em culturas de cardiomiócitos neonatais sujeitas a concentrações de 0,1 e 0,5 mM de isoproterenol (Ramos *et al.*, 1984). A não observação de um fenómeno de citotoxicidade parece assim questionar a importância do referido mecanismo na toxicidade do isoproterenol. No entanto, há algumas questões a ter em conta, nomeadamente:

- os cardiomiócitos isolados de rato adulto estão em repouso na suspensão. Quando os cardiomiócitos foram incubados na presença de isoproterenol não foi observada a contracção dos cardiomiócitos. No entanto, a contracção destas células é, geralmente, apenas induzida por estimulação eléctrica, após a qual se podem realizar estudos, por exemplo, de efeitos inotrópicos de fármacos (Haworth, 1990).

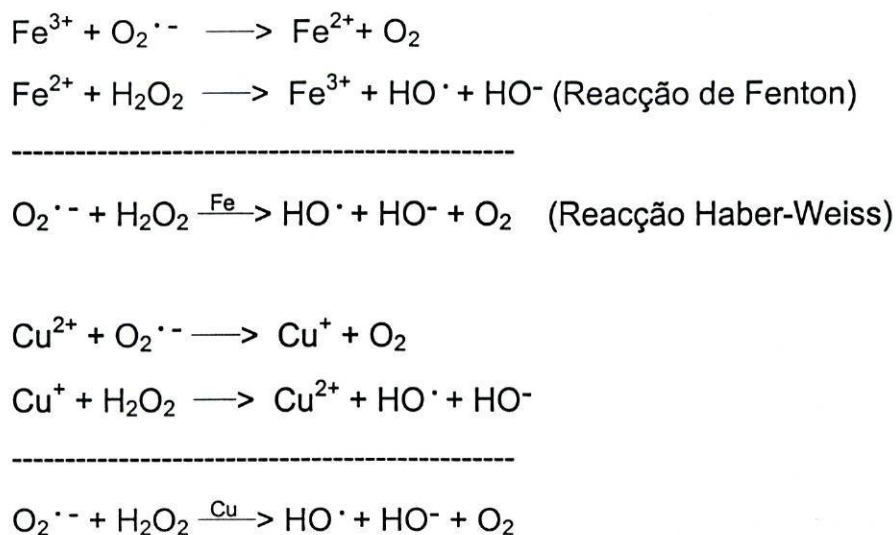
- foi observada a diminuição de cerca de 50% dos receptores  $\beta$  presentes em cardiomiócitos isolados, após 10 minutos de incubação com (-)-isoproterenol (Limas e Limas, 1984).
- a utilização de colagenases brutas e proteases podem danificar os receptores celulares (Steen *et al.*, 1982). No entanto, as enzimas utilizadas são também usadas em estudos de electrofisiologia, não sendo aí descritas alterações importantes a esse nível (Guenneec *et al.*, 1993; Cazorla *et al.*, 1997; Pascarel *et al.*, 1999).

Para além das questões relativas ao modelo utilizado, existem outras explicações para esta ausência de citotoxicidade do isoproterenol na concentração de 1 mM. Uma delas poderá ser a dessensibilização da adenilciclase na presença destas concentrações de isoproterenol, o que levaria a um menor aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Foi descrita a dessensibilização desta enzima, em valores da ordem dos 30%, em cardiomiócitos isolados incubados com isoproterenol (50 nM) durante 20 minutos (Murphy e Horackova, 1994). Outra explicação prende-se com a importância da oxidação do isoproterenol para que se verifiquem os efeitos tóxicos e com a lentidão deste processo na ausência de catalisadores. Em concordância com esta hipótese está um estudo de Persoon-Rotherth e colaboradores em que o isoproterenol (0,25 mM) induziu a diminuição da viabilidade celular de cardiomiócitos neonatais ao final de 6 horas, a qual não foi prevenida pelo  $\beta$ -bloqueador propranolol, mas sim por antioxidantes como o ácido ascórbico (Persoon-Rotherth *et al.*, 1989). Adicionalmente, neste mesmo estudo, o fenoterol,  $\beta$ -agonista menos oxidável que o isoproterenol, não induziu morte celular.

#### 6.5.2.2 Acção citotóxica do $\text{Cu}^{2+}$

O  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) induziu a morte dos cardiomiócitos, mesmo quando incubado isoladamente (ver em 5.5 a Fig. 6). Este efeito é provavelmente resultado de um fenómeno de *stress* oxidativo induzido pela redução do  $\text{Cu}^{2+}$ , tal como pode ser deduzido da oxidação da GSH (intra e extracelular) presente

nas suspensões celulares e nas células incubadas com  $\text{Cu}^{2+}$  (ver em 5.5 a Fig. 7 e em 5.6 as Fig. 3 e 4). O cobre, tal como o ferro, participa em reacções que levam à formação de ROS, em especial do  $\text{HO}^\cdot$  (Fig. 6.3) (Halliwell e Gutteridge, 1999).



**Figura 6.3 – Formação do radical  $\text{HO}^\cdot$  na presença de Fe e Cu. Reacção de Fenton e reacção de Haber-Weiss.**

Depois de formado, o  $\text{HO}^\cdot$  reage prontamente, podendo levar a um efeito de extrema toxicidade, via, por exemplo, peroxidação lipídica das membranas celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Para que a reacção de Fenton aconteça é necessário que o  $\text{Cu}^{2+}$  seja reduzido a  $\text{Cu}^+$ , o que pode ocorrer na presença de GSH ou de ácido ascórbico (Ohta *et al.*, 2000). O efeito citotóxico do  $\text{Cu}^{2+}$  parece, assim, surgir após a sua redução a  $\text{Cu}^+$ . Esta hipótese está em conformidade com um estudo onde a perfusão de corações isolados com  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) induziu a perda completa da função cardíaca ao fim de 30 minutos, mas apenas na presença de 0,25 mM de ascorbato (Powell *et al.*, 1992).

### 6.5.2.3 Acção citotóxica do isoproterenol associado ao $\text{Cu}^{2+}$

Na presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , o isoproterenol (1 mM) induziu um fenómeno de hipercontractura dos cardiomiócitos logo ao fim de 2 horas de incubação (ver

em 5.5 a Fig. 5). Este efeito foi drasticamente acentuado às 3 e 4 horas de incubação. A hipercontractura dos cardiomiócitos isolados está em conformidade com a necrose com formação de bandas de contracção, observada em estudos *in vivo* após a administração de catecolaminas (ver em 2.2.1) (Goldstein, 1995; Dhalla *et al.*, 2001). Por outro lado, as alterações da permeabilidade membranar dos cardiomiócitos apenas se observaram ao fim de 4 horas de incubação, mas para as concentrações 0,5 e 1 mM de isoproterenol (ver em 5.5 a Fig. 6). As alterações membranares são também descritas em estudos *in vivo* após administração de isoproterenol (Yunge *et al.*, 1989), inclusivamente com a ruptura e libertação das enzimas intracelulares (Preus *et al.*, 1988; Nirmala e Puvanakrishnan, 1996; Tipnis *et al.*, 2000; Manikandan *et al.*, 2002) (ver em 2.2.1.2). As alterações da viabilidade celular observadas pela acção do isoproterenol na presença do  $\text{Cu}^{2+}$  parecem reflectir um fenómeno de *stress* oxidativo, mediado pelos produtos de oxidação do isoproterenol e pelo ciclo redox do cobre (ver em 5.6 o esquema 1). O *stress* oxidativo induzido neste sistema foi confirmado através da observação da depleção da GSH intracelular, por oxidação e conjugação, e pela inibição das enzimas GR, GPX e GST (ver em 5.5 e 5.6). Em conformidade, foi descrita a danificação do ADN pela DOPA em associação com  $\text{Cu}^{2+}$  (Prutz, 1993; Morin *et al.*, 1998). A importância do *stress* oxidativo neste fenómeno foi também sugerida em estudos *in vitro* onde a diminuição da viabilidade celular induzida pelo isoproterenol foi prevenida por antioxidantes (Ramos e Acosta, 1983; Ramos *et al.*, 1983; Persoon-Rothert *et al.*, 1989). Adicionalmente, em estudos *in vivo*, a necrose cardíaca induzida pelo isoproterenol foi revertida, em parte, pela administração de antioxidantes, como a vitamina E (Singal *et al.*, 1981a; Haggendal *et al.*, 1987; Dhalla *et al.*, 1996; Tappia *et al.*, 2001), extractos antioxidantes (Padma e Devi, 2000; Sasikumar e Devi, 2000; Sharma *et al.*, 2001; Sumitra *et al.*, 2001) e péptidos ou aminoácidos (L-arginina) com actividade antioxidante (Sreepriya *et al.*, 1998; Manikandan *et al.*, 2002; Mini e Rajamohan, 2002), o que vem reforçar esta hipótese.

Os produtos resultantes da oxidação do isoproterenol responsabilizados pela diminuição da viabilidade celular poderão ser, isoladamente ou no seu conjunto, o isoprenocromo, a leucoisoprenocromo-o-semiquinona ou, ainda, os

radicais, em especial o HO·, resultantes do processo de oxidação do isoproterenol e do ciclo redox do cobre (ver em 5.6 o esquema 1).

### Isoprenocromo

Os aminocromos têm sido indicados como uns dos principais responsáveis pela cardiotoxicidade das catecolaminas e em particular da sua citotoxicidade (Dhalla *et al.*, 2001) (ver em 2.2.2.5.2). Em termos gerais os aminocromos têm características de reactividade muito semelhantes. Assim, foi descrito que a administração a ratos de adrenocromo em doses superiores a 10 mg.Kg<sup>-1</sup> induz arritmias, podendo ocorrer a morte destes para doses de 40 mg.Kg<sup>-1</sup> (Beamish *et al.*, 1981). Adicionalmente, foi descrita a hipercontração das miofibrilhas, assim como alterações ultraestruturais no miocárdio, como por exemplo, a turgescência mitocondrial e edema intracelular, para doses de 32 mg.Kg<sup>-1</sup> de adrenocromo (Singal *et al.*, 1982).

A perfusão do coração de ratos com adrenocromo induziu a necrose do miocárdio (Yates *et al.*, 1980; Takeo *et al.*, 1981; Yates *et al.*, 1981; Taam *et al.*, 1986) caracterizada por dissolução dos filamentos contrácteis, turgescência da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático, ocorrência de bandas de contração e de edemas intracelulares (Yates *et al.*, 1981). Foi ainda descrito que a perfusão do coração com adrenocromo (0,1 mM) amplifica os efeitos tóxicos resultantes de um fenómeno isquémico (Rump *et al.*, 2001).

Tem sido proposto que a toxicidade do adrenocromo resulta da inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial com reflexo no declínio da razão ATP/AMP no miocárdio (Taam *et al.*, 1986) e do aumento do conteúdo de Ca<sup>2+</sup> no miocárdio (Tappia *et al.*, 2001). Este último efeito resulta da acção inibitória do adrenocromo ao nível da actividade da bomba de Ca<sup>2+</sup> sarcoplasmática (Takeo *et al.*, 1980b; Tappia *et al.*, 2001), da actividade do sistema antiporte Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> sarcoplasmático (Tappia *et al.*, 2001), da capacidade de acumulação de Ca<sup>2+</sup> pela mitocôndria (Takeo *et al.*, 1981) e da actividade da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> no sarcolema (Takeo *et al.*, 1980a), os quais, no seu conjunto, levam a um aumento do Ca<sup>2+</sup> livre intracelular. Os aminocromos, devido à sua estrutura quinónica têm, ainda, a capacidade de se ligar ou oxidar grupos sulfidrílo, originando inibições enzimáticas (Bindoli *et al.*, 1992). Em concordância, nos estudos realizados e que serão discutidos nos pontos seguintes, ocorreu a

inibição das enzimas GR, GPX e GST ao nível celular em função da oxidação do isoproterenol (ver em 5.5 e 5.6). Além disso, observou-se a depleção de GSH por fenómenos de conjugação (ver em 5.6). O isoprenocromo foi quantificado e a sua concentração nos cardiomiócitos ao fim de 4 horas de incubação de isoproterenol (1 mM) mostrou-se significativamente superior na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  relativamente à concentração obtida na sua ausência (ver em 5.6 a Fig. 2B). Este resultado pode ser correlacionado com o facto de só após 4 horas de incubação e na presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , o isoproterenol (1 mM) ter induzido a morte celular por perda da permeabilidade membranar (ver em 5.5 a Fig. 6). O isoprenocromo parece, assim, contribuir para a diminuição da viabilidade celular.

#### Isoprenocromo-o-semiquinona

Os radicais aminocromo-o-semiquinonas também têm sido responsabilizados pelos efeitos tóxicos resultantes da oxidação das catecolaminas (Singal *et al.*, 1981b; Bindoli *et al.*, 1990a; Segura-Aguilar *et al.*, 1998; Paris *et al.*, 2001). Foi observado que a perfusão do coração de rato com adrenocromo na presença de cisteína ou ácido ascórbico induz lesões miocárdicas mais agravadas do que a perfusão com adrenocromo isoladamente (Singal *et al.*, 1981b). A extrema reactividade da leucoaminocromo-o-semiquinona tem sido responsabilizada pela neurotoxicidade resultante da oxidação da dopamina (Segura-Aguilar *et al.*, 1998; Arriagada *et al.*, 2000; Paris *et al.*, 2001). A observação da formação e presença da isoprenocromo-o-semiquinona ao nível das estruturas celulares, como as membranas, citoesqueleto, núcleos e mitocôndrias (ver em 5.9) parece estar em concordância com os efeitos citotóxicos observados nos cardiomiócitos. Para esta citotoxicidade poderá também contribuir a acção deste radical na oxidação da GSH observada nos cardiomiócitos (ver em 5.5 e 5.6).

#### Espécies reactivas de oxigénio (ROS)

Durante o processo de oxidação das catecolaminas ocorre a redução do  $\text{O}_2$  com formação do  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (Bors *et al.*, 1978). O  $\text{O}_2^{\cdot -}$  pode originar o  $\text{HO}^{\cdot}$  pela reacção de Fenton (ver em 6.5.2.1.2), o qual tem uma actividade citotóxica

bastante elevada (Halliwell e Gutteridge, 1999). Durante o processo de oxidação do isoproterenol e do ciclo redox do cobre, há a formação destas espécies (ver em 5.6 o esquema 1) que podem induzir, por exemplo, a peroxidação lipídica e a morte celular. O fenómeno de oxidação da GSH observado nos ensaios realizados (ver em 5.5 a Fig. 7 e em 5.6 as Fig. 3 e 4) pode resultar de uma reacção directa com o HO<sup>·</sup>, ou então, de uma reacção com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediada pela GPX (Halliwell e Gutteridge, 1999). A importância das ROS na toxicidade das catecolaminas está também amplamente referenciada na literatura (Singal *et al.*, 1981a; Miller *et al.*, 1996; Terland *et al.*, 1997; Dhalla *et al.*, 2001).

#### 6.5.2.4 Conclusão

O processo de oxidação do isoproterenol catalisado pelo Cu<sup>2+</sup> induz um fenómeno de citotoxicidade que pode ser mediado pelo isoprenocromo, leucoisoprenocromo-o-semiquinona ou, ainda, por ROS. As células desenvolvem primeiro um fenómeno de hipercontractura, perdendo a sua funcionalidade, seguido de permeabilização da membrana e morte celular. Este efeito pode ser, de algum modo, correlacionado com o efeito necrótico com bandas de contracção, verificado em estudos *in vivo*, após administração do isoproterenol. A contribuição das alterações nos níveis de glutathiona e na actividade das enzimas intracelulares para este efeito citotóxico, será discutido nos pontos seguintes.

#### 6.5.3 Alterações nos níveis de glutathiona

Os resultados obtidos no balanço dos níveis de glutathiona pela acção do isoproterenol, Cu<sup>2+</sup>, ou de ambos estão apresentados nos pontos 5.5 e 5.6. Alguns desses resultados foram também abordados no ponto 5.4 (Fig. 2). A reacção entre a GSH e os radicais semiquinónicos resultantes da oxidação do isoproterenol é descrita no ponto 5.9. Para a quantificação da GSH e da GSSG

nos cardiomiócitos isolados, desenvolveu-se uma técnica de HPLC com detector coulométrico (ver em 5.2).

### Glutathiona

A glutathiona ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos (Kretzschmar e Klinger, 1990; Sies, 1999). É sintetizado no organismo e trata-se de um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos, glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último o local activo responsável pelas propriedades bioquímicas da molécula (Griffith, 1999; Sies, 1999). Existe, na maioria das células, em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM (Griffith, 1999), sendo a sua concentração no coração e no fígado cerca de 2 e 8 mM, respectivamente (Halliwell e Gutteridge, 1999). Ao nível extracelular a concentração de GSH é da ordem de 5-50  $\mu$ M (Griffith, 1999). Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG, forma oxidada da GSH). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (Schafer e Buettner, 2001). Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathiona total (menos de 10%) (Halliwell e Gutteridge, 1999). A GSH pode, no entanto, também formar dissulfuretos do tipo GSSR com o tiol da cisteína presente em proteínas (Sies, 1999). A GSH é sintetizada em dois passos, catalisados pela  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase e pela glutathiona-sintetase (Griffith, 1999; Sies, 1999). Este processo ocorre essencialmente no fígado, sendo a GSH exportada, através da circulação sanguínea, para todos os tecidos (Kretzschmar e Klinger, 1990; Sies, 1999). A degradação da GSH e GSSG nos seus aminoácidos ocorre ao nível extracelular e, especialmente, ao nível renal, numa reacção catalisada pela  $\gamma$ -glutamiltranseptidase e pela cisteinil-glicina-dipeptidase (Griffith, 1999; Sies, 1999).

A glutathiona está omnipresente na célula, onde tem um papel crucial na I) metabolização do  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos como cofactor da GPX, II) na metabolização de xenobióticos como cofactor da GST e III) na desactivação de radicais. As vias enzimáticas serão abordadas no ponto 6.5.4. Na desactivação

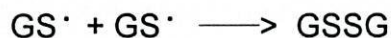
dos radicais, a GSH reage directamente com estes levando à formação do GS<sup>•</sup> (Halliwell e Gutteridge, 1999) (Equação 6.1).



**Equação 6.1 – Reacção entre a GSH e os radicais.**

O R<sup>•</sup> pode ser um HO<sup>•</sup>, alcoxilo (RO<sup>•</sup>), peroxilo (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>), radicais com centro de carbono ou o oxigénio singuleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Pode, ainda, ser uma molécula reactiva mas não radicalar, como o ácido hipocloroso (HOCl) e o anião peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

Posteriormente, GS<sup>•</sup> poderá dimerizar e formar GSSG (Equação 6.2).



**Equação 6.2 – Reacção entre dois radicais GS<sup>•</sup>.**

No entanto, fisiologicamente, a probabilidade de ocorrer o encontro entre dois GS<sup>•</sup> é reduzida, dada a baixa concentração deste (Halliwell e Gutteridge, 1999). Consequentemente, o GS<sup>•</sup> pode actuar como pro-oxidante:

- ao reagir com o O<sub>2</sub>, com formação do radical peroxiglutationilo (GSOO<sup>•</sup>) (Equação 6.3)



**Equação 6.3 – Formação de GSOO<sup>•</sup> na presença de GS<sup>•</sup> e O<sub>2</sub>.**

O GSOO<sup>•</sup> é muito instável e reage rapidamente na presença de O<sub>2</sub> originando outras moléculas radicalares, as quais resultam em produtos finais como o ácido sulfénico (GSOH) e o ácido sulfónico (GSO<sub>3</sub>H).

- ao formar o radical da glutathiona oxidada (GSSG<sup>•-</sup>) (Equação 6.4)



**Equação 6.4 – Formação de GSSG<sup>•-</sup> na presença de GS<sup>•</sup> e GS<sup>-</sup> (forma ionizada da GSH).**

O GSSG<sup>·-</sup> é um potente redutor, que pode reduzir metais, ou mesmo o O<sub>2</sub> com formação de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (Equação 6.5).



Equação 6.5 – Formação de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> na presença de GSSG<sup>·-</sup> e O<sub>2</sub>.

- ou, ainda, ao oxidar o NAD(P)H a NAD(P)<sup>·</sup> com formação final de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (Equação 6.6).



Equação 6.6 – Formação de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> na presença de GS<sup>·</sup>, NAD(P)H e O<sub>2</sub>.

A glutatona está também envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos de SH presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular (Halliwell e Gutteridge, 1999). A mitocôndria e o núcleo têm a sua própria reserva de GSH, de importância crucial na protecção destas estruturas contra a acção das ROS (Liebler e Reed, 1997; Schafer e Buettner, 2001).

Nos estudos realizados nas suspensões de cardiomiócitos, a observação das alterações ocorridas nos níveis de glutatona leva a concluir que:

- o isoproterenol, nas concentrações estudadas, não induz alterações nos níveis de glutatona intracelular quando incubado na ausência do Cu<sup>2+</sup> (ver em 5.6 a Fig. 3);
- o Cu<sup>2+</sup> (20 μM), quando incubado isoladamente, induz uma acentuada oxidação da GSH intracelular (ver em 5.6 a Fig. 3B);
- a incubação do isoproterenol na presença do Cu<sup>2+</sup> (20 μM) induziu alterações consideráveis nos níveis de glutatona:
  - ocorreu um fenómeno de *stress* oxidativo, conforme se pode constatar pelo aumento da razão GSSG/GSH+GSSG na

- suspensão celular para concentrações iguais ou superiores a 0,5 mM de isoproterenol (ver em 5.5 a Fig. 7);
- ocorreu a oxidação intracelular da GSH ao longo do tempo de incubação, com libertação da GSSG para o meio extracelular (ver em 5.6 as Fig. 3 e 4);
  - ocorreu, provavelmente, a formação de aductos entre os produtos resultantes da oxidação do isoproterenol e a GSH (ver em 5.6 a Fig. 5);
  - o fenómeno de *stress* oxidativo resultante da oxidação do isoproterenol é mais severo na presença de concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , do que na presença de concentrações sub-fisiológicas deste catião (ver em 5.5 a Fig. 2).

#### 6.5.3.1 Estabilidade da glutathiona intracelular durante a incubação dos cardiomiócitos com o isoproterenol isoladamente

Em conformidade com os resultados obtidos para a viabilidade celular (ver em 5.5 as Fig. 5 e 6), nas mesmas condições experimentais, os níveis de glutathiona intracelular não se alteraram durante a incubação com o isoproterenol isoladamente (ver em 5.6 a Fig. 3). Estes resultados estão, de certo modo, de acordo com os descritos por Ramos e colaboradores onde o conteúdo de GSH em culturas de cardiomiócitos neonatais não se modificou ao longo de 12 horas de incubação com isoproterenol 0,5 mM, apesar da diminuição da viabilidade a partir das 4 horas (Ramos *et al.*, 1983). A GSH que se libertou para o meio extracelular foi, no entanto, oxidada (ver em 5.6 a Fig. 4). Isto demonstra algum poder oxidante no meio que envolve os cardiomiócitos, em consequência da oxidação, ainda que pouco extensa, do isoproterenol (ver em 5.5 a Fig. 4 e em 5.6 a Fig. 1). Estes resultados dão, assim, a indicação de que a toxicidade do isoproterenol mediada pelo fenómeno da sua oxidação é um processo extremamente lento na ausência de catalisadores dessa oxidação. A presença de algum isoprenocromo ao nível celular (ver em 5.6 a Fig. 2) parece resultar da sua captação a partir do meio extracelular e não da oxidação do isoproterenol nas células.

### 6.5.3.2 Oxidação da GSH intracelular após incubação com $\text{Cu}^{2+}$ (20 $\mu\text{M}$ )

A oxidação da GSH intracelular pelo  $\text{Cu}^{2+}$  (ver em 5.6 a Fig. 3B) estará directamente relacionada com a diminuição da viabilidade celular observada nestas amostras (ver em 5.5 a Fig. 6). O  $\text{Cu}^{2+}$  pode induzir a oxidação da GSH por diferentes mecanismos (ver em 5.6 o esquema 1). Nestes, a GSH pode oxidar-se I) ao reduzir directamente o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  (Halliwell, 1991; Ohta *et al.*, 2000) e II) ao actuar como cofactor da GPX no metabolismo dos peróxidos formados na presença do cobre (Gregus e Klaassen, 2001). O cobre pode, ainda, participar na reacção de Fenton (Fig. 6.3) levando à formação do radical  $\text{HO}^\bullet$  que induz um meio extremamente oxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999). A redução do  $\text{Cu}^{2+}$  na presença da GSH poderá ser fundamental para a toxicidade deste catião, dada a capacidade oxidante do  $\text{Cu}^+$ . Em concordância com esta hipótese está a descrição da cardiotoxicidade do  $\text{Cu}^{2+}$  na sequência da sua redução pelo ascorbato (Powell *et al.*, 1992). Nesse estudo ocorreu a perda completa da função cardíaca ao final de 40 minutos de perfusão de corações isolados com  $\text{Cu}^{2+}$  (5  $\mu\text{M}$ ) na presença de ascorbato (0,25 mM).

### 6.5.3.3 Alterações nos níveis de glutathiona após incubação com isoproterenol na presença de $\text{Cu}^{2+}$

Os níveis de GSH e GSSG alteraram-se profundamente na sequência da oxidação do isoproterenol na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ . A GSH intracelular diminuiu acentuadamente via oxidação (ver em 5.6 as Fig. 3 e 4). Esta oxidação deverá ser consequência da interacção da GSH com o ciclo redox do cobre e da actividade da GPX sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ver em 5.6 o esquema 1). Outra via de oxidação, através da redução de quinonas e aminocromos pela GSH está também descrita (Heacock, 1959; Zhang e Dryhurst, 1995). A GSH pode ser, ainda, oxidada ao reagir com os radicais resultantes da oxidação do isoproterenol numa reacção do tipo radicalar (equação 6.1 e 6.2). Este tipo de oxidação da GSH ao nível celular foi sugerido pela observação dos resultados

obtidos nos estudos realizados por RPE (ver em 5.9). A GSSG formada, quando não reduzida pela GR, é depois exportada para fora das células. Tal deverá ocorrer, em parte, pela morte celular com a saída do seu conteúdo e, nas células vivas, pela acção de um transportador membranar (Shan *et al.*, 1990). Este transportador é uma bomba dependente do ATP, o que implica consumo energético (Cnubben *et al.*, 2001). A exportação da GSSG pelas células é, no entanto, uma forma de defesa destas (Schafer e Buettner, 2001).

A glutationa total do sistema (GSH e GSSG intra e extracelular) vai diminuindo ao longo da incubação (ver em 5.6 a Fig. 5), levando a concluir que a GSH é, ainda, consumida na formação de aductos com os produtos resultantes da oxidação do isoproterenol. As quinonas, como por exemplo, a isoproterenol-o-quinona e o isoprenocromo, podem conjugar-se com a GSH. Estas reacções podem ocorrer por um processo químico (Bindoli *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Pattison *et al.*, 2002), ou então ser catalisadas pela GST, em especial pelas isoenzimas GSTM1 e M2 (ver em 5.6 o esquema 1) (Baez *et al.*, 1997; Segura-Aguilar *et al.*, 1997; Bolton *et al.*, 2000; Cnubben *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2001). A conjugação dos produtos de oxidação da dopamina com a cisteína ou a GSH estão amplamente referidos e associados à doença de Parkinson (Palumbo *et al.*, 1995; Byington, 1998; Spencer *et al.*, 1998; Magnay *et al.*, 2001). Os conjugados com a GSH ao nível intracelular podem ser exportados para o exterior, à semelhança da GSSG, por uma bomba para conjugados da GSH que é dependente do ATP (Halliwell e Gutteridge, 1999; Cnubben *et al.*, 2001).

A depleção da GSH intracelular leva a uma cascata de eventos nos cardiomiócitos, tais como aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, perda dos tióis proteicos, inibição da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, declínio do potencial de membrana da mitocôndria, depleção do ATP, peroxidação lipídica e, finalmente, morte celular (Dhanbhoora e Babson, 1992). O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular correlaciona-se com o fenómeno de hipercontractura (Dali e Sole, 1990), observado ao final de 2 horas de incubação (ver em 5.5 a Fig. 5), e a peroxidação lipídica com a perda da integridade da membrana (Timerman *et al.*, 1990), observado ao final de 4 horas de incubação (ver em 5.5 a Fig. 6). Assim, a diminuição da GSH intracelular parece ter induzido o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ocorrendo a hipercontractura dos cardiomiócitos (ver em 5.5 a Fig.

5) e posteriormente a peroxidação lipídica, promovendo a perda da integridade da membrana (ver em 5.5 a Fig. 6). Em conformidade, o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em resultado da oxidação do isoproterenol já foi descrito em culturas de cardiomiócitos (Ramos *et al.*, 1984).

O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$ , em consequência da oxidação das catecolaminas, parece resultar de uma inibição das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no sarcolema e do sistema uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Acosta *et al.*, 1984; Panagia *et al.*, 1985; Dhalla *et al.*, 1996; Tappia *et al.*, 2001). Como foi já referido, o potencial responsável por este efeito é o isoprenocromo. Na ausência da GSH este aminocromo pode actuar directamente nos referidos transportadores e bombas, inibindo-os. Tendo em conta a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  nos eventos descritos, compreende-se que os níveis de *stress* oxidativo sejam mais elevados quando os cardiomiócitos estão suspensos num meio com concentrações fisiológicas de deste catião relativamente a um meio com concentrações sub-fisiológicas do mesmo (ver em 5.5 a Fig. 2). Em conformidade, estudos *in vivo* demonstraram uma menor oxidação da GSH induzida pelo isoproterenol após administração de taurina (Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988). Este efeito parece ser mediado pela redução do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o qual contribui para a redução dos efeitos tóxicos desta catecolamina (Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988). A importância do  $\text{Ca}^{2+}$  neste fenómeno, pode ser também constatado pelo facto do efeito constritor do adrenocromo ao nível coronário, em corações isolados, ser dependente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução de perfusão (Karmazyn *et al.*, 1981).

Os resultados observados são validados por estudos *in vivo* onde se descreve a redução da razão GSH/GSSG e a peroxidação lipídica em corações de ratos tratados com doses tóxicas de isoproterenol (Azuma *et al.*, 1987; Ohta *et al.*, 1988; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Nirmala e Puvanakrishnan, 1996; Ithayarasi e Devi, 1997; Sreepriya *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2001; Sumitra *et al.*, 2001; Tappia *et al.*, 2001; Manikandan *et al.*, 2002). Em alguns destes estudos demonstrou-se que os níveis de GSH e a peroxidação lipídica eram, de certo modo, recuperados e revertidos, respectivamente, na presença de vitamina E (Tappia *et al.*, 2001) e de extractos antioxidantes (Sasikumar e Devi, 2000; Sharma *et al.*, 2001; Sumitra *et al.*, 2001; Mini e Rajamohan, 2002).

#### 6.5.3.4 Determinação simultânea de GSH e GSSG por HPLC com detector coulométrico

Para a determinação da GSH e GSSG nos cardiomiócitos isolados, desenvolveu-se uma técnica de HPLC com detector coulométrico que permite a detecção directa e simultânea deste tiol reduzido e oxidado após precipitação proteica da amostra (ver em 5.2). Esta técnica veio substituir uma outra técnica, também desenvolvida no nosso laboratório, em que a GSSG era determinada por HPLC com detector amperométrico, mas após redução da GSH pela GR na presença de NADPH (Carvalho *et al.*, 1994). A nova técnica, além das vantagens da determinação directa e simultânea da GSH e GSSG, tornou-se imperiosa para os estudos realizados, em consequência da inibição da GR pelos produtos de oxidação do isoproterenol (ver em 5.1).

#### 6.5.3.5 Conclusões

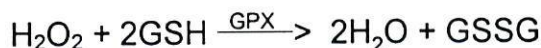
O processo de oxidação do isoproterenol a isoprenocromo catalisado pelo  $\text{Cu}^{2+}$  leva à depleção da GSH intracelular por oxidação e conjugação. Este fenómeno promove o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, com consequente hipercontractura dos cardiomiócitos e posteriormente a peroxidação lipídica, com perda da integridade membranar. Este efeito pode ser também correlacionado com a acção necrótica do isoproterenol em estudos *in vivo*.

#### 6.5.4 Inibição enzimática

Verificou-se que os produtos de oxidação do isoproterenol inibem as enzimas GPX, GR e GST nas suspensões de cardiomiócitos. Estes resultados são apresentados e discutidos no ponto 5.5 e no ponto 5.6. No ponto 5.1 descreveu-se um estudo realizado em GR purificada, onde se aborda o tipo de inibição desta enzima, assim como a acção protectora antioxidantes da GSH, cisteína e ácido ascórbico (ver em 5.1).

### Glutationa-peroxidase (GPX)

Esta enzima é uma proteína dependente do selénio, da qual foram caracterizadas 5 isoenzimas, que tem como função metabolizar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Equação 6.7) e os hidroperóxidos orgânicos (ROOH) (Equação 6.8) (Matés *et al.*, 1999; Cnubben *et al.*, 2001). Nesta acção, a GPX utiliza a GSH como cofactor, que oxida a GSSG.

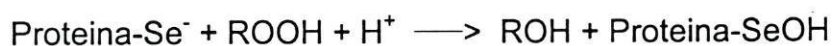


**Equação 6.7 – Acção catalítica da GPX.**

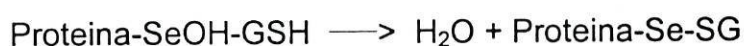


**Equação 6.8 – Redução de hidroperóxidos pela GPX.**

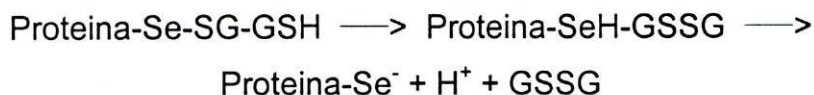
A GPX encontra-se em grandes quantidades no músculo cardíaco e está presente no citoplasma e na mitocôndria das células (Halliwell e Gutteridge, 1999). É de realçar o facto de praticamente não existir catalase a nível mitocondrial e, por isso, a GPX exercer aí um papel fundamental na metabolização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Halliwell e Gutteridge, 1999). No citoplasma a GPX é mais activa do que a catalase para concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  da ordem dos  $\mu\text{M}$  (Kaul *et al.*, 1993). O resíduo de selenocisteína (R-SeH) presente em cada uma das 4 subunidades desta enzima é essencial para a sua actividade catalítica (Gilliland, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999; Matés *et al.*, 1999). Mecanicamente, o selenol (proteína-Se<sup>-</sup>) reage com o ROOH formando o ácido selénico (proteína-SeOH) (Halliwell e Gutteridge, 1999):



Seguidamente a GSH liga-se,



Uma segunda molécula de GSH liga-se e, por fim, segue-se a libertação da GSSG e a regeneração do selenol:



### Glutathione-S-transferase (GST)

A GST é uma superfamília de isoenzimas que catalisa a conjugação da GSH com compostos electrofílicos (Equação 6.9) (Cnubben *et al.*, 2001).



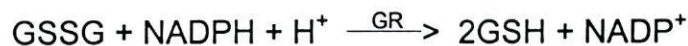
**Equação 6.9 – Acção catalítica da GST.**

A actividade da GST ocorre em substratos com grupos funcionais. O fígado é especialmente rico nesta enzima, que é maioritariamente citosólica, embora também se encontre ligada a membranas (Halliwell e Gutteridge, 1999). A GST possui múltiplas funções no metabolismo endógeno de xenobióticos, além de poder funcionar como transportadora de proteínas celulares. Por exemplo, o grupo heme, a bilirrubina, os esteróides e os pigmentos da bile ligam-se à GST de um modo não enzimático (Halliwell e Gutteridge, 1999). As GST citosólicas são dímeros e pelo menos 7 genes codificam as suas subunidades: alpha, mu, pi, sigma, kappa, theta e zeta (as isoenzimas respectivas são designadas de A, M, P, S, K, T e Z) (Cnubben *et al.*, 2001). As alpha, mu e pi são as mais abundantes nos mamíferos (Halliwell e Gutteridge, 1999). O local activo da GST tem dois locais de ligação, um para a GSH e um para o substracto (Rushmore e Pickett, 1993). O resíduo de tirosina presente na GST é essencial na conjugação com a GSH nas subunidades alpha, mu, pi, sigma. A inactivação deste grupo (por exemplo, pelo ONOO<sup>-</sup>) inibe a acção desta enzima (Halliwell e Gutteridge, 1999). O aminoácido cisteína também parece ter um papel fundamental na actividade da GST, pelo menos em algumas subunidades (Ommen *et al.*, 1991; Vega *et al.*, 1998).

Os conjugados são eliminados das células através de bombas dependentes do ATP (Halliwell e Gutteridge, 1999; Cnubben *et al.*, 2001). Nos hepatócitos a eliminação é essencialmente biliar. No entanto, os conjugados com a GSH podem também sofrer uma metabolização de fase III, sobretudo a nível renal, e dar origem a conjugados de N-acetilcisteína (mercapturatos) que são eliminados pela urina (Halliwell e Gutteridge, 1999). Algumas isoenzimas da GST (A e T) demonstram actividade *in vitro* semelhante à GPX para peróxidos, que não o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell e Gutteridge, 1999; Cnubben *et al.*, 2001). Estas enzimas são igualmente denominadas de glutationa-peroxidases independentes do selénio.

#### Glutationa-redutase (GR)

A GSSG pode ser reduzida a GSH por acção da enzima GR, tendo como cofactor o NADPH (Equação 6.10).



#### **Equação 6.10 – Acção catalítica da GR.**

A GR é uma enzima citosólica dimérica que, em cada unidade, contém uma flavina FAD e um grupo dissulfureto Cys58-Cys63 como local activo (Gilliland, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999). A actividade catalítica da GR ocorre em duas etapas, I) o grupo dissulfureto do local activo é reduzido pelo NADPH via FAD e II) a GR interage com a GSSG reduzindo-a a duas moléculas de GSH com nova oxidação do local activo da enzima (Gilliland, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os resultados observados nas alterações das actividades enzimáticas induzidas pelo processo de oxidação do isoproterenol permitem concluir que:

- a actividade catalítica das enzimas GPX, GR e GST é reduzida ao nível dos cardiomiócitos pelos produtos de oxidação do isoproterenol (ver em 5.5 as Fig. 8 a 10 e em 5.6 a Fig. 6);
- ao nível da GR a inibição é competitiva para a GSSG e é parcialmente prevenida pela acção antioxidante da GSH, cisteína e ácido ascórbico.

#### 6.5.4.1 Inibição da enzimas GPX, GR e GST

A inibição enzimática pelos produtos de oxidação das catecolaminas, e em especial pelo adrenocromo, é descrita desde longa data (Friedenwald e Heniz, 1942). Foi observado que o adrenocromo e outros aminocromos inibem várias enzimas, tais como a creatinacinase (Miura *et al.*, 1999), a adenilciclase (Ebina *et al.*, 1997), a GST humana (Ploemen *et al.*, 1994), a MAO, a COMT, a fosfatase alcalina, a hexocinase, a fosfofructocinase, a ATPase mitocondrial e a miosina-ATPase (Bindoli *et al.*, 1992; Dhalla *et al.*, 2001). Esta acção inibitória dos aminocromos fica a dever-se à sua capacidade de induzir a oxidação reversível dos grupos sulfidrilo e a desaminação de amins e aminoácidos das enzimas (Dhalla *et al.*, 2001).

Nos estudos apresentados nesta dissertação verificou-se a inibição da GPX e GST na suspensão de cardiomiócitos para concentrações de 0,1 mM de isoproterenol na presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , ao final de 1 hora de incubação (ver em 5.5 as Fig. 8 e 10). A GR foi inibida ao fim do mesmo tempo de incubação, mas para a concentração de 0,5 mM de isoproterenol (ver em 5.5 a Fig. 9). Do processo de oxidação do isoproterenol na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  podem resultar diferentes produtos, potenciais inibidores destas enzimas (ver em 5.6 o esquema 1). O isoprenocromo é um deles e estes resultados parecem indicar que baixas concentrações deste composto são suficientes para induzir a inibição observada. A concentração de isoprenocromo na suspensão, após uma hora de incubação na presença de isoproterenol (1 mM) mais  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ), é da ordem dos 50  $\mu\text{M}$  (ver em 5.6 a Fig. 1B). Dado que a velocidade de oxidação do isoproterenol, na presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , parece ser independente da sua concentração (ver em 5.5 a Fig. 4), poder-se-á afirmar, tendo em conta os resultados descritos, que a concentração de isoprenocromo rondará os 5  $\mu\text{M}$  quando ocorre a inibição da GPX e da GST e 25  $\mu\text{M}$  quando ocorre a inibição da GR. Esta inibição poderá, no entanto, ser resultado de outros produtos da oxidação do isoproterenol, que não o isoprenocromo. Um deles será a isoproterenol-*o*-quinona. As catecolamina-*o*-quinonas têm a capacidade de atacar grupos nucleofílicos, como os grupos sulfidrilo, hidroxilo e amina de

aminoácidos presentes, por exemplo, em enzimas (Rupp *et al.*, 1994). Em conformidade, quinonas, que não aminocromos ou resultantes da oxidação das catecolaminas, também foram descritas como inibidoras da GR (Bironaité *et al.*, 1991) e da GST (Ommen *et al.*, 1991). Outros potenciais inibidores são os radicais, como por exemplo o HO<sup>•</sup>, que são formados durante o processo de oxidação do isoproterenol. Foi descrito que a GR é inibida por sistemas indutores da reacção de Fenton, onde se inclui o sistema Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/catecolaminas (Gutierrez-Correa e Stoppani, 1997). Esta acção inibidora do HO<sup>•</sup> parece ocorrer por uma acção oxidante deste radical ao nível dos resíduos His467, Cys58 e Tyr114 do local activo da GR (Gutierrez-Correa e Stoppani, 1997).

A inibição da GPX, GR e GST ocorre ao nível intracelular nos cardiomiócitos (ver em 5.6). Na realidade, as células lavadas do meio extracelular, após a incubação do isoproterenol (1 mM) mais Cu<sup>2+</sup> (20 µM) durante 4 horas, apresentaram a actividade destas enzimas diminuídas, com especial relevância para a GPX (ver em 5.6 a Fig. 6). Estes efeitos são indicadores de uma acção tóxica ao nível enzimático durante o processo de oxidação das catecolaminas e, em particular, do isoproterenol. Estes resultados estão em conformidade com alguns estudos *in vivo* onde se verificou a inibição da GST (Ithayarasi e Devi, 1997; Rathore *et al.*, 1998; Sreepriya *et al.*, 1998; Sumitra *et al.*, 2001; Manikandan *et al.*, 2002), GPX (Nirmala e Puvanakrishnan, 1996; Ithayarasi e Devi, 1997; Sreepriya *et al.*, 1998; Sumitra *et al.*, 2001; Manikandan *et al.*, 2002) e da GR (Ithayarasi e Devi, 1997) após a administração de doses tóxicas de isoproterenol a ratos. A inibição destas enzimas torna as células cardíacas mais susceptíveis à acção tóxica dos produtos da oxidação das catecolaminas (ver em 5.6 o esquema 1). Esta amplificação de efeitos origina um aumento do *stress* oxidativo, que pode levar mais rapidamente à morte celular observada nos cardiomiócitos (ver em 5.5).

#### 6.5.4.2 Tipo de inibição enzimática da GR e acção dos antioxidantes

Foram realizados estudos no sentido de tentar clarificar o tipo de inibição enzimática exercida pelos produtos de oxidação das catecolaminas, em

particular os produtos de oxidação do isoproterenol ao nível da GR (ver em 5.1). Estudou-se, também, a acção antioxidante da GSH, cisteína e ácido ascórbico nessa inibição (ver em 5.1). Todos estes ensaios foram realizados com GR purificada da mucosa intestinal bovina.

A inibição da GR demonstrou-se competitiva para a GSSG. Aumentando a oxidação do isoproterenol verificou-se um aumento da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a manutenção da velocidade máxima da GR (ver em 5.1 a Fig. 4). Este tipo de inibição observado é consistente com a oxidação reversível, pelos produtos de oxidação do isoproterenol, dos grupos sulfidrilo presentes no local activo da GR. Em conformidade com esta hipótese temos a acção protectora da actividade da GR por parte da GSH, cisteína e ácido ascórbico (ver em 5.1 as Fig. 5 a 7). Esta protecção foi mais acentuada para a cisteína, enquanto que a protecção pelo ácido ascórbico exigiu concentrações muito superiores às necessárias pela cisteína e pela GSH. Estes resultados evidenciam a importância dos grupos sulfidrilo neste fenómeno. Em conformidade, foi também descrita a acção protectora de antioxidantes na inibição enzimática pelo isoproterenol em estudos *in vivo* (Ithayarasi e Devi, 1997; Sreepriya *et al.*, 1998; Sumitra *et al.*, 2001).

#### 6.5.4.3 Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam a acção inibitória dos produtos de oxidação do isoproterenol na actividade da GPX, GR e GST. Esta inibição pode ser induzida pelos aminocromos, pelas catecolamina-o-quinonas e ainda pelos radicais formados, como por exemplo, o  $HO^\cdot$ . Esta inibição pode ficar a dever-se à oxidação reversível dos grupos sulfidrilo ou à desaminação de aminas e aminoácidos essenciais para a acção catalítica das enzimas. No caso da GR a inibição mostrou-se competitiva para a GSSG e parece resultar de uma interacção com os grupos sulfidrilo presentes no local activo desta enzima. A inibição destas enzimas torna as células cardíacas mais susceptíveis à acção tóxica exercida pela oxidação das catecolaminas.

## 7 Proposta de um mecanismo de cardiotoxicidade do isoproterenol

Os resultados obtidos e analisados nos estudos apresentados nesta dissertação permitem elaborar, à luz dos conhecimentos actuais, um esquema que evidencie o mecanismo subjacente à toxicidade do isoproterenol, pela via da sua oxidação (Fig. 7.1). Neste esquema descreve-se a interacção do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação com o  $\text{Cu}^{2+}$ , o  $\text{Ca}^{2+}$ , a glutathione e as enzimas antioxidantes, ao nível intracelular em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto. Assim, o isoproterenol ao ser incorporado nos cardiomiócitos, quer na forma livre quer na forma complexada com o  $\text{Cu}^{2+}$ , inicia um processo de oxidação originando duas moléculas extremamente reactivas, a leucoisoprenocromo-o-semiquinona e o isoprenocromo. Neste processo ocorre a formação de ROS, com particular importância do  $\text{HO}^{\bullet}$ . O *stress* oxidativo que resulta destes fenómenos induz a oxidação da GSH, para a qual contribui a presença do  $\text{Cu}^{2+}$ , e a exclusão da GSSG da célula. A GSH pode, ainda, ser consumida ao reagir com o isoprenocromo numa reacção catalisada pela GST, originando a formação de um aducto, que é também excluído da célula. O isoprenocromo interage igualmente com a GR, GPX e GST levando à inibição parcial destas enzimas, o que contribui para a diminuição da capacidade de defesa das células. A leucoisoprenocromo-o-semiquinona e o isoprenocromo podem igualmente exercer os seus efeitos tóxicos ao nível das membranas, mitocôndrias, retículos sarcoplasmáticos e núcleos. Alguns dos efeitos que podem ocorrer são o desacoplamento mitocondrial, com consequente depleção energética e a inibição dos mecanismos de controlo do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que induz um fenómeno de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas alterações levam em última instância à morte celular.

Este mecanismo proposto de toxicidade pode ser, de algum modo, extrapolado para o mecanismo de toxicidade resultante da oxidação das catecolaminas biogénicas, no qual, a presença de catalisadores parece ser fundamental para a ocorrência deste fenómeno ao nível fisiológico.

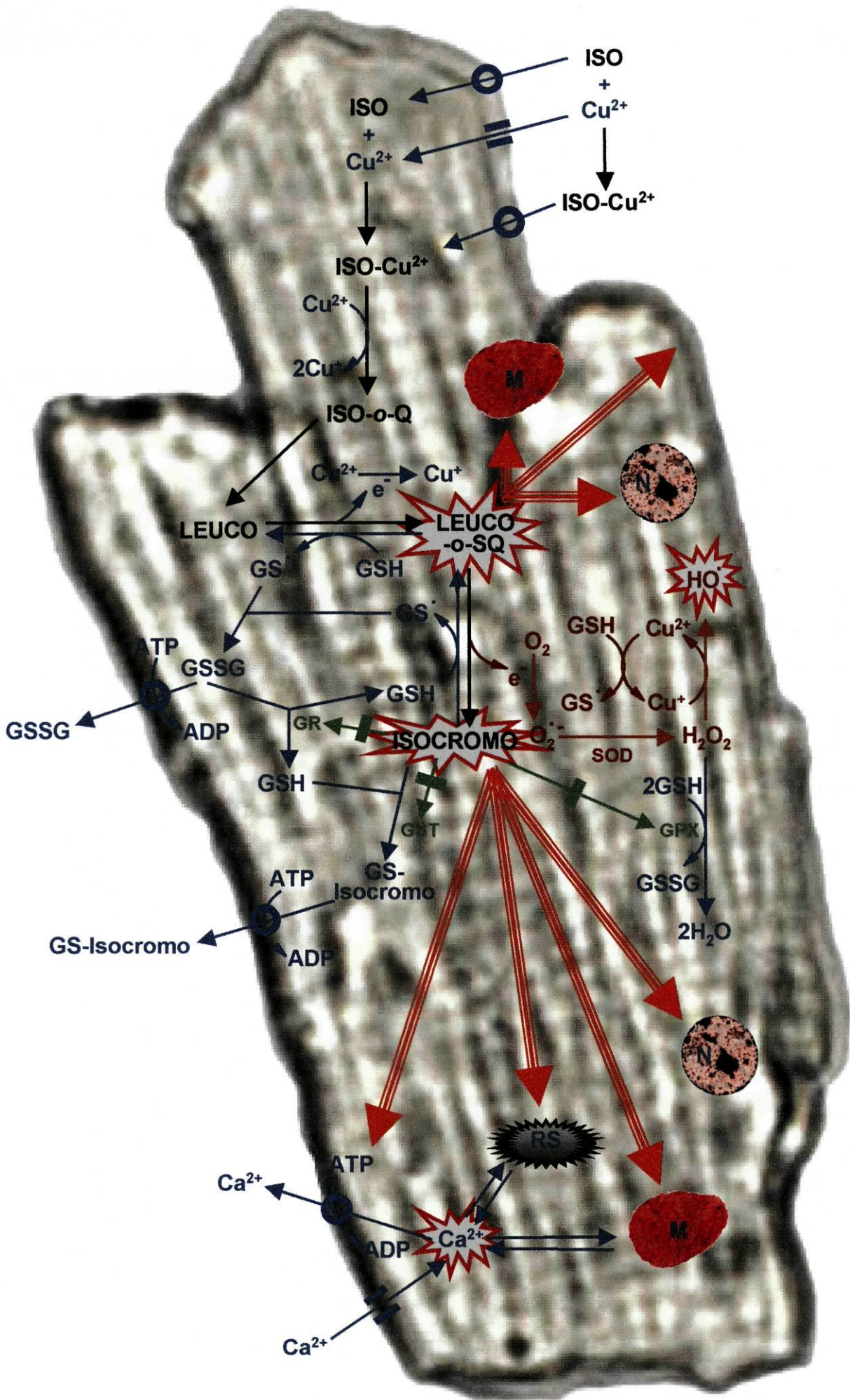


Figura 7.1 – (página anterior) Mecanismo proposto de toxicidade do isoproterenol, ao nível intracelular em cardiomiócitos isolados de rato, pela via da sua oxidação. A preto – oxidação do isoproterenol, a castanho – formação de ROS, a verde – interacção com as enzimas GPX, GR e GST e a vermelho – acção tóxica. Setas com barra transversal – acção inibitória, estrela vermelha – molécula potencialmente tóxica, círculo – transportador e barras paralelas – canal. ISO – isoproterenol, ISO-Cu<sup>2+</sup> – complexo entre o isoproterenol e o Cu<sup>2+</sup>, ISO-o-Q – isoproterenol-o-quinona, LEUCO – leucoisoprenocromo, LEUCO-o-SQ – leucoisoprenocromo-o-semiquinona, ISOCROMO – isoprenocromo, GS-Isocromo – aducto entre a GSH e o isoprenocromo, M – mitocôndria, N – núcleo e RS – retículo sarcoplasmático.

## 8 Conclusão geral

Os resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas permitiram concluir que:

- o isoproterenol exerce cardiotoxicidade celular, essencialmente quando a sua oxidação é catalisada pela presença de  $\text{Cu}^{2+}$ ;
- a oxidação do isoproterenol origina a formação de isoprenocromo e de radicais, como a leucoisoprenocromo-o-semiquinona, que estão presentes nas células e aí, muito provavelmente, exercem a sua acção tóxica;
- a acção tóxica resultante da oxidação do isoproterenol é dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular;
- a oxidação do isoproterenol induz a depleção da GSH, quer por oxidação quer por formação de aductos com os produtos resultantes da oxidação do isoproterenol;
- a oxidação do isoproterenol induz a inibição de enzimas, tais como a GR, a GPX e a GST;
- a inibição da GR pelos produtos da oxidação do isoproterenol ocorre de um modo competitivo para a GSSG e pode ser prevenida, em parte, pela acção de antioxidantes, especialmente por tióis.

Como conclusão final, os resultados obtidos demonstram que o processo de oxidação das catecolaminas e os compostos daí formados contribuem para a sua cardiotoxicidade. A catálise dessa oxidação, por exemplo, por metais de transição, parece ser fundamental para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos.

## 9 Proposta de estudos futuros

Em termos futuros, impõe-se a realização de estudos *in vivo*, que confirmem, de forma inequívoca, a importância da oxidação das catecolaminas endógenas na toxicidade cardíaca.

## 10 Referências

- Acosta D, Combs AA, Ramos K (1984) Attenuation by antioxidants of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibition by toxic concentrations of isoproterenol in cultured rat myocardial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 16:281-284
- Amin JK, Xiao L, Pimental DR, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (2001) Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:131-139
- Andersson B, Vidal R, Sundberg M, Rajs J, Sótonyi P (1996) Hydroperoxide-induced nucleotide degradation and adenosine formation in isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* 106:39-48
- Arriagada C, Dagnino-Subiabre A, Ceviedes P, Armero JM, Caviedes R, Segura-Aguilar J (2000) Studies of aminochrome toxicity in a mouse derived neuronal cell line: is this toxicity mediated via glutamate transmission? *Amino Acids* 18:363-373
- Azuma J, Hamaguchi T, Ohta H, Takihara K, Awata N, Sawamura A, Harada H, Tanaka Y, Kishimoto S (1987) Calcium overload-induced myocardial damage caused by isoproterenol and by adriamycin: possible role of taurine in its prevention. *Advances Experimental Medical Biology* 217:167-179
- Baez S, Segura-Aguilar J (1994) Formation of reactive oxygen species during one-electron reduction of noradrenochrome catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Redox Report* 1:65-70
- Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson A-S, Mannervik B (1997) Glutathione transferase catalyze the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochemical Journal* 324:25-28
- Balla J, Kiss T, Jameson RF (1992) Copper(II)-catalyzed oxidation of catechol by molecular oxygen in aqueous solution. *Inorganic Chemistry* 31:58-62

- Barger G, Dale HH (1910) Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *Journal of Physiology (London)* 41:19-59
- Baroldi G, Mittleman RE, Parolini M, Silver MD, Fineschi V (2001) Myocardial contraction bands. Definition, quantification and significance in forensic pathology. *International Journal of Legal Medicine* 115:142-151
- Beamish RE, Dhillon KS, Singal PK, Dhalla NS (1981) Protective effect of sulfinpyrazone against catecholamine metabolite adrenochrome-induced arrhythmias. *American Heart Journal* 102:149-152
- Behonick GS, Novak MJ, Nealley EW, Baskin SI (2001) Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). *Journal of Applied Toxicology* 21:S15-S22
- Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Kathy, Cho, Weber KT, Clark WA (1989) Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circulation Research* 65:657-670
- Berg SP, Nesbitt DM (1979) Chromium oxalate: a new label broadening agent for use with thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 548:608-615
- Berry M, Friend D, Scheuer J (1970) Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circulation Research* 26:679-687
- Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ (1991) Isolated hepatocytes: preparation, properties and applications. In: Burdon, RH and Knippenberg, PHv (eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam pp150-175
- Bindoli A, Deeble DJ, Rigobello MP, Galzigna L (1990a) Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1016:349-356
- Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine* 13:391-405
- Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L (1989) Toxicity of aminochromes. *Toxicology Letters* 48:3-20
- Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L (1990b) Reduction of adrenochrome by rat liver and brain DT-diaphorase. *Free Radical and Research Communications* 8:295-298

- Bironaité DA, Cenas NK, Kulys JJ (1991) The inhibition of glutathione reductase by quinones. *Zeitschrift fur Naturforschung* 46c:966-968
- Black PH, Garbutt LD (2002) Stress, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Psychosomatic Research* 52:1-23
- Bloom FE (1996) Neurotransmission and the central nervous system. In: Hardman, JG, Limbird, LE, Molinoff, PB, Ruddon, RW and Gilman, AG (eds.) *Goodman & Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York pp 267-293
- Bloom S, Davis DL (1972) Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *American Journal of Pathology* 69:459-470
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13:135-160
- Bors W, Michel C, Saran M, Lengfelder E (1978) The involvement of oxygen radicals during the autoxidation of adrenalin. *Biochimica et Biophysica Acta* 540:162-172
- Bravo EL (2002) Pheochromocytoma. *Cardiology in Review* 10:44-50
- Brunmark A, Cadenas E (1989) Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine* 7:435-477
- Buja LM (2001) Pathobiology of myocardial ischemic injury. In: Acosta, D (ed.) *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York pp 164-184
- Byington KH (1998) Detection of dopamine-tissue adducts. *Life Sciences* 63:41-44
- Cannon WB, Uridil JE (1921) Studies on conditions of activity in endocrine glands. VIII. Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver. *American Journal of Physiology* 58:353-354
- Cánovas FG, García-Carmona F, Sánchez JV, Pastor JLI, Teruel JAL (1982) The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry* 257:8738-8744
- Carvalho F, Duarte JA, Carmo H, Neuparth MJ, Fernandes E, Remião F, Sousa P, Bastos ML (1999) d-Amphetamine induced hydrogen peroxide production in mice tissues. *Toxicology Letters* 109 (Suppl 1):42
- Carvalho FD, Remião F, Vale P, Timbrell JA, Bastos ML, Ferreira MA (1994) Glutathione and cysteine measurement in biological samples by HPLC

- with a glassy carbon working detector. *Biomedical Chromatography* 8:134-136
- Cazorla O, Pascarel C, Garnier D, Guennec JYL (1997) Resting tension participates in the modulation of active tension in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29:1629-1637
- Cha M-K, Kim I-H (1999) Ceruloplasmin has a distinct active site for the catalyzing glutathione-dependent reduction of alkyl hydroperoxide. *Biochemistry* 38:12104-12110
- Chambers DE, Downey JM (1989) Xanthine oxidase, free radicals, and myocardial ischaemia. In: Miquel, J, Quintanilha, AT and Weber, H (eds.) *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. CRC, Florida pp 263-273
- Chapman RA, Tunstall J (1987) The calcium paradox of the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 50:67-96
- Chavdarian CG, Karashima D, Castagnoli N (1978) Oxidative and cardiovascular studies on natural and synthetic catecholamines. *Journal of Medicinal Chemistry* 21:548-554
- Chen QM, Tu VC, Purdom S, Wood J, Dilley T (2001) Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy induced by toxicants. *Cardiovascular Toxicology* 1:267-283
- Chevion M, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzki G, Kitrossky N (1993) Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proceedings of National Academy of Sciences - USA* 90:1102-1106
- Clark MG, Gannon BJ, Bodkin N, Patten GS, Berry MN (1978) An improved procedure for the high-yield preparation of intact beating heart from the adult rat biochemical and morphologic study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10:1101-1121
- Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden Jv, Bladeren PJv (2001) The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10:141-152
- Colucci WS, Braunwald E (1998) Cardiac tumors, cardiac manifestations of systemic diseases, and traumatic cardiac injury. In: Fauci, AS,

- Braunwald, E, Isselbacher, KJ, Wilson, JD, Martin, JB, Kasper, DL, Hauser, SL and Longo, DL (eds.) Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill, New York pp 241-242
- Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS (1998) Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 98:1329–1334
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999) Opposing effects of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100:2210-2212
- d'Ischia M, Palumbo A, Prota G (1988) Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* 44:6441-6446
- Dali PA, Sole MJ (1990) Myocardial catecholamines and the pathophysiology of heart failure. *Circulation* 82 (Suppl 1):I/35-I/43
- Désilets M, Baumgarten CM (1986) Isoproterenol directly stimulates the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump in isolated cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* 251:H218-H225
- Dhalla KS, Ganguly PK, Rupp H, Beamish RE, Dhalla NS (1989) Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Molecular and Cellular Biochemistry* 87:85-92
- Dhalla KS, Rupp H, Beamish RE, Dhalla NS (1996) Mechanisms of alterations in cardiac membrane  $\text{Ca}^{2+}$  transport due to excess catecholamines. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 10:231-238
- Dhalla NS, Sasaki H, Mochizuki S, Dhalla KS, Liu X, Elimban V (2001) Catecholamine-induced cardiomyopathy. In: Acosta, D (ed.) *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York pp 269-318
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 18:655-673
- Dhalla NS, Yates JC, Lee SL, Sinh A (1978) Functional and subcellular changes in the isolated rat heart perfused with oxidized isoproterenol. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10:31-41
- Dhalla NS, Yates JC, Naimark B, Dhalla KS, Beamish RE, Ostadal B (1992) Cardiotoxicity of catecholamines and related agents. In: Acosta, D (ed.) *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York pp 239-281

- Dhanbhoora CM, Babson JR (1992) Thiol depletion induces lethal cell injury in cultured cardiomyocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293:130-139
- Ebina T, Toya Y, Oka N, Schwencke C, Kawabe J-i, Ishikawa Y (1997) Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase by oxidized catecholamines. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29:1247-1254
- El-Shenawy N, Abdel-Rahman M (1993) Evaluation of chloroform cardiotoxicity utilizing a modified isolated rat cardiac myocytes. *Toxicology Letters* 69:249-256
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H (2002) Stress in cardiovascular diseases. *Medical Science Monitoring* 8:RA93-RA101
- Evenas J, Malmendal A, Forsen S (1998) Calcium. *Current Opinion in Chemical Biology* 2:293-302
- Farmer BB, Mancina M, Williams ES, Watanabe AM (1983) Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method. *Life Sciences* 33:1-18
- Fawcett DW, Bloom, Fawcett (1994) *A Textbook of Histology*. Chapman & Hall, New York
- Ferrans VJ, Hibbs RG, Walsh JJ, Burch GE (1969) Histochemical and electron microscopical studies on the cardiac necroses produced by sympathomimetic agents. *Annals New York Academy of Sciences* 156:309-332
- Fischer P, Landtsheer L (1950) Métabolisme de l'adrénochrome et du trihydroxyméthylindole chez le lapin. *Experientia* 6:305-306
- Fliegel L, Takeo S, Beamish RE, Dhalla NS (1985) Adrenochrome uptake and subcellular distribution in the isolated perfused rat heart. *Canadian Journal of Cardiology* 1:122-127
- Foppoli C, Coccia R, Cini C, Rosei MA (1997) Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334:200-206
- Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK (2000) Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine* 28:1735-1744
- Fox ST (1996) *Human Physiology*. WCB, Dubuque

- Friedenwald JS, Heniz H (1942) Inactivation of amino oxidase by enzymatic oxidative products of catechol and adrenaline. *Journal of Biological Chemistry* 146:411-419
- Gallego M, Espina L, Vegas L, Echevarria E, Iriarte MM, Casis O (2001) Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodelling in rats. *Pharmacological Research* 44:311-315
- Galzigna L, Schiappelli MP, Rigo A, Scarpa M (1999) A rat brain fraction and different purified peroxidases catalyzing the formation of dopaminochrome from dopamine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427:329-336
- Ganong WF (1993) *Review of Medical Physiology*. Appleton & Lange, London
- Gilliland GL (1993) Glutathione proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 3:875-884
- Giulivi C, Cadenas E (1998a) Extracellular activation of fluorinated aziridinybenzoquinone in HT29 cells EPR studies. *Chemico-Biological Interactions* 113:191-204
- Giulivi C, Cadenas E (1998b) Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 25:175-183
- Goldstein DS (1995) *Stress, Catecholamines and Cardiovascular Disease*. Oxford University Press, Oxford
- Gregus Z, Klaassen CD (2001) Mechanisms of toxicity. In: Klaassen, CD (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York pp 35-81
- Griffith OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27:922-935
- Grimm D, Elsner D, Schunkert H, Pfeifer M, Griese D, Bruckschlegel G, Muders F, Riegger GA, Kromer EP (1998) Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovascular Research* 37:91-100
- Grynberg A, Ziegler D, Rupp H (1996) Sympathoadrenergic overactivity and lipid metabolism. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 10:223-230
- Guarnieri C, Vaona I, Scheda M, Caldarera CM (1986) Effect of isoproterenol administration on rat heart glutathione status. *Free Radial Research Communications* 2:101-105

- Guenneec J-YL, Peineau N, Esnard F, Lacampagne A, Gannier F, Argibay J, Gauthier F, Garnier D (1993) A simple method for calibrating collagenase/pronase E ratio to optimize heart cell isolation. *Biologie Cellulaire* 79:161-165
- Gutierrez-Correa J, Stoppani AOM (1997) Inactivation of yeast glutathione reductase by Fenton systems: effect of metal chelators, catecholamines and thiol compounds. *Free Radical Research* 27:543-555
- Haggendal J, Jonsson L, Johansson G, Bjurström S, Carlsten J, Thorén-Tolling K (1987) Catecholamine-induced free radicals in myocardial cell necrosis on experimental stress in pigs. *Acta Physiologica Scandinavica* 131:447-452
- Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91 (Suppl 3C):14S-22S
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York
- Harada S, Tachikawa H, Kawanishi Y (2001) Glutathione S-transferase M1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281:267-271
- Hawley MD, Tatawawadi SV, Piekarski S, Adams RN (1967) Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *Journal of American Chemical Society* 89:447-450
- Haworth R (1990) Use of isolated adult myocytes to evaluate cardiotoxicity. II. Preparation and properties. *Toxicologic Pathology* 18:521-530
- Haworth R, Goknur A, Cook M, Decker R (1990) Use of isolated adult myocytes to evaluate cardiotoxicity. I. Sugar uptake and protein synthesis. *Toxicologic Pathology* 18:511-520
- Haworth R, Hunter D, Berkoff H (1980) The isolation of Ca<sup>2+</sup>-resistant myocytes from the adult rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 12:715-723
- Heacock RA (1959) The chemistry of adrenochrome and related compounds. *Chemical Review* 59:181-237

- Heap SJ, Hudlicka O, Okyayuz-Baklouti I (1996) Isoprenaline-induced damage in cardiac and skeletal muscle: interaction with methylxanthines. *Drug Development Research* 37:249-258
- Hegedus ZL (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology* 145:85-101
- Hess ML, Kontos M, Hearse DJ (1989) The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of myocardial ischemia and reperfusion-induced injury. In: Miquel, J, Quintanilha, AT and Weber, H (eds.) *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. CRC, Florida pp 275-285
- Hirakawa K, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi IHS (2002) Catechol and hydroquinone have different redox properties responsible for their differential DNA-damaging ability. *Chemical Research in Toxicology* 15:76-82
- Hoffman BB (2001) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman, JG, Limbird, LE and Gilman, AG (eds.) *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, New York pp 215-268
- Hoffman BB, Taylor P (2001) Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman, JG, Limbird, LE and Gilman, AG (eds.) *Goodman & Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York pp 115-153
- Hüser M, Stegemann E, Kammermeier H (1996) Is enzyme release a sign of irreversible injury of cardiomyocytes? *Life Sciences* 58:545-550
- Isenberg G, Klockner U (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium". *Pflügers Archives* 395:6-18
- Ithayarasi AP, Devi CS (1997) Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 41:369-376
- Jacobs DS, Kasten BL, DeMott WR, Wolfson WL, 1990, *Laboratory Test Handbook*. Lexi-Comp INC, Hudson

- Janatová T, Pelouch V, Ostádal B (1986) The effect of oxidized isoprenaline on the chick embryonic heart. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology* 64:897-903
- Jewett SL, Eddy LJ, Hochstein P (1989) Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? *Free Radical Biology and Medicine* 6:185-188
- Joseph X, Bloom S, Pledger G, Balazs T (1983) Determinants of resistance to the cardiotoxicity of isoproterenol in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 69:199-205
- Kalyanaraman B, Felix CC, Sealy RC (1985) Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes. *Environmental Health Perspectives* 64:185-198
- Kalyanaraman B, Premovic PI, Sealy RC (1987) Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. *Journal of Biological Chemistry* 262:11080-11087
- Kao RL, Christman EW, Luh SL, Krauhs JM, Tyers GFO, Williams EH (1980) The effects of insulin and anoxia on the metabolism of isolated mature rat cardiac myocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 203:587-599
- Karmazyn M, Beamish RE, Fkiegel L, Dhalla NS (1981) Adrenochrome-induced coronary artery constriction in the rat heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 219:225-230
- Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK (1993) Free radicals and heart. *Journal of Pharmacological Toxicological Methods* 30:55-67
- Keller JN, Huang FF, Dimayuga ER, Maragos WF (2000) Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Radical Biology and Medicine* 29:1037-1042
- King BD, Sack D, Kichuk MR, Hintze TH (1987) Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in conscious dogs. *Hypertension* 1987:582-590
- Klatt P, Cacho J, Crespo MD, Herrera E, Ramos P (2000) Nitric oxide inhibits isoproterenol-stimulated adipocyte lipolysis through oxidative inactivation of the beta-agonist. *Biochemical Journal* 351:485-493

- Kondo T, Ogawa Y, Sugiyama S, Ito T, Satake T, Ozawa T (1987) Mechanism of isoproterenol induced myocardial damage. *Cardiovascular Research* 21:248-254
- Kono T (1969) Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 178:397-400
- Koolman J, Rohm K-H (1996) *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme, Stuttgart
- Kramer JH, Chovan JP, Schaffer SW (1981) Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *American Journal of Physiology* 240:H238-H246
- Kretschmar M, Klinger W (1990) The hepatic glutathione system - influences of xenobiotics. *Experimental Pathology* 38:145-164
- Kuo J-S, Cheng F-C, Shen C-C, Ou H-C, Wu T-F, Huang H-M (2000) Differential alteration of catecholamine release during chemical hypoxia is correlated with cell toxicity and is blocked by protein kinase C inhibitors in PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 79:191-201
- Lameris TW, Zeeuw Sd, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Veld AJMit, Meiracker AHvd (2000) Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* 101:2645-2650
- Landsberg L (1992) Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 19 (Suppl 1):161-166
- Landsberg L, Young JB (1998) Pheochromocytoma. In: Fauci, AS, Braunwald, E, Isselbacher, KJ, Wilson, JD, Martin, JB, Kasper, DL, Hauser, SL and Longo, DL (eds.) *Harrison's Principles Of Internal Medicine*. McGraw-Hill, New York pp 334-334
- Langley JN (1901) Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *Journal of Physiology (London)* 27:237-256
- Lauwerys RR (1996) Occupational toxicology. In: Klaassen, CD (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York pp 987-1009
- Leenen FHH, White R, Yuan B (2001) Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *American Journal of Physiological Heart and Circulatory Physiology* 281:H2410-H2416

- Lefer DJ, Granger DN (2000) Oxidative stress and cardiac disease. *American Journal of Medicine* 109:315-323
- Lemos-Amado F, Domingues P, Ferrer-Correia A, Remião F, Milhazes N, Borges F, Carvalho FD, Bastos ML (2001) Electrospray tandem mass spectrometry of aminochromes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:2466-2471
- Lewandowsky M (1898) Ueber eine wirkung des nebennieren-extractes auf das auge. *Zentralblatt fur Physiology* 12:599-600
- Li R-K, Sole MJ, Mickle DAG, Schimmer J, Goldstein D (1998) Vitamin E and oxidative stress in the heart of the cardiomyopathic Syrian Hamster. *Free Radical Biology and Medicine* 24:252-258
- Liebler DC, Reed DJ (1997) Free-radical Defense and Repair Mechanisms. In: Wallace, KB (ed.) *Free Radical Toxicology*. Taylors & Francis, Washington
- Limas CJ, Limas C (1984) Rapid recovery of cardiac beta-adrenergic receptors after isoproterenol-induced "down"-regulation. *Circulation Research* 55:524-531
- Limaye DA, Shaikh ZA (1999) Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154:59-66
- Lombardini JB (1980) Effects of isoproterenol and methoxamine on the contents of taurine in rat tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 213:399-405
- Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D (2000) *Color Atlas of Pharmacology*. Thieme, Stuttgart
- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273:3756-3764
- Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D (2000) Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *PNAS* 97:9753-9758
- Magnay JL, Tong J, Drangova R, Baines AD (2001) Production of cysteinyl-dopamine during intravenous dopamine therapy. *Kidney International* 59:1891-1898

- Mahan LC, Insel PA (1984) Use of superoxide dismutase and catalase to protect catecholamines from oxidation in tissue culture studies. *Analytical Biochemistry* 136:208-216
- Manikandan P, Sumitra M, Kumar DA, Gayathri C, Arutselvan N, Manohar BM, Puvanakrishnan R (2002) Antioxidant potential of a novel tetrapeptide derivative in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Pharmacology* 65:103-109
- Manson NH, Hess ML (1989) Neutrophil infiltration of the myocardium: a potential mechanism for the free radical necrosis. In: Miquel, J, Quintanilha, AT and Weber, H (eds.) *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. CRC, Florida pp 255-261
- Marjomaki V, Ritamaki V, Gruenberg J (1994) Isoproterenol-induced redistribution of endosomes in cardiac myocytes. *European Journal of Cell Biology* 65:1-13
- Martinez-Alvarado P, Dagnino-Subiabre A, Paris I, Metodiewa D, Welch CJ, Olea-Azar C, Ceviedes P, Ceviedes R, Segura-Aguilar J (2001) Possible role of slasolinol quinone methide in the decrease of RCSN-3 cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283:1069-1076
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro INd (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32:595-603
- Matthews SB, Henderson AH, Campbell AK (1985) The adrenochrome pathway: the major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17:339-448
- McCance AJ, Thompson PA, Forfar JC (1993) Increased cardiac sympathetic nervous activity in patients with unstable coronary heart disease. *European Heart Journal* 14:751-757
- Melchert RB, Yuan C, Acosta D (2001) Cardiovascular toxicology: introductory notes. In: Acosta, D (ed.) *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York pp 3-30
- Midgley R (1992) *Dicionário Visual do Corpo Humano*. Editorial Verbo, Lisboa
- Miller JW, Selhub J, Joseph JA (1996) Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects

- of *o*-methylation and melatonin. *Free Radical Biology and Medicine* 21:241-249
- Mini S, Rajamohan T (2002) Cardioprotective effect of coconut kernel protein in isoproterenol administered rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 39:197-200
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 217:3170-3175
- Miura T, Muraoka S, Fugimoto Y (1999) Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin. *Chemical-Biological Interactions* 123:51-61
- Moffat AC, 1986, Clarke's Isolation and Identification of Drugs, eds. Jackson, JV, Moss, MS and Widdop, B (The Pharmaceutical Press, London).
- Mohan P, Bloom S (1999) Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovascular Pathology* 8:255-261
- Morin B, Davies MJ, Dean RT (1998) The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. *Biochemical Journal* 330:1059-1067
- Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J (2001)  $\beta$ -Adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the  $\beta_1$ -subtype in the rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:561-573
- Muller E (1966) Histochemical studies on the experimental heart infarction in the rat. *Naunyn-Schmiedebergs Archives fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 254:439-447
- Murphy MG, Horackova M (1994) Short-term exposure of intact ventricular myocytes to isoproterenol results in desensitization of adenylate cyclase. *European Journal of Pharmacology* 268:121-128
- Nikolaidis LA, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Stolarski C, Shen Y-t, Shannon RP (2002) Catecholamine stimulation is associated with impaired myocardial  $O_2$  utilization in heart failure. *Cardiovascular Research* 53:392-404

- Nirmala C, Puvanakrishnan R (1996) Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 159:85-93
- Noval JJ, Sohler A, Stackhouse SP, Bryan AC (1962) Metabolism of adrenochrome in experimental animals. *Biochemical Pharmacology* 1:467-473
- Núñez-Delicado E, Pérez-Gilabert M, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F (1996) Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: a kinetic study of isoproterenol oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1293:17-22
- Ocaranza MP, Díaz-Araya G, Chiong M, Muñoz D, Riveros JP, Ebensperger R, Sabat S, Irrázaval P, Jalil JE, Lavandero S (2002) Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 40:246-254
- Ohta H, Azuma J, Awata N, Hamaguchi T, Tanakaiko Y, Sawamura A, Kishimoto S, Sperelakis N (1988) Mechanism of protective action of taurine against isoprenaline induced myocardial damage. *Cardiovascular Research* 22:407-413
- Ohta Y, Shiraishi N, Nishikawa T, Nishikimi M (2000) Copper-catalysed autoxidations of GSH and L-ascorbic acid: mutual inhibition of the respective oxidations by their coexistence. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474:378-382
- Oliver G, Schäfer EA (1895) The physiological action of extract of the suprarenal capsules. *Journal of Physiology (London)* 18:230-276
- Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F (2000) Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 45:68-75
- Ommen BV, Ploemen JHTM, Bogaards JJP, Monks TJ, Gau SS, Bladeren PJV (1991) Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. *Biochemical Journal* 276:661-666
- Opie LH, Walpoth B, Barsacchi R (1985) Calcium and catecholamines: relevance to cardiomyopathies and significance in therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17 (Suppl 2):21-34

- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P (1989) Role of  $Ca^{2+}$  in toxic cell killing. *TIPS* 10:281-285
- Ostadal B, Rychterova V, Poupa O (1968) Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle. *American Heart Journal* 76:645-649
- Padma VV, Devi CSS (2000) Effect of fish oil on isoproterenol induced myocardial necrosis. *Indian Journal of Pharmacology* 32:324-326
- Palumbo A, D'Ischia M, Misuraca G, Martino LD, Prota G (1995) Iron- and peroxide-dependent conjugation of dopamine with cysteine: oxidative routes to the novel brain metabolite 5-S-cysteinyldopamine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1245:255-261
- Palumbo A, d'Ischia M, Misuraca G, Prota G (1989) A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. *Biochimica et biophysica acta* 990:297-302
- Panagia V, Pierce GN, Dhalla KS, Ganguly PK, Beamish R, Dhalla NS (1985) Adaptative changes in subcellular calcium transport during catecholamine-induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17:411-420
- Parfitt K (1999) *Martindale: The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London
- Paris I, Dagnino-Subiabre A, Marcelain K, Bennett LB, Caviedes P, Caviedes R, Azar CO, Segura-Aguilar J (2001) Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *Journal of Neurochemistry* 77:519-529
- Pascarel C, Brette F, Cazorla O, Guennec JYL (1999) Effects on L-type calcium current of agents interfering with the cytoskeleton of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Experimental Physiology* 84:1043-1050
- Pattison DI, Dean RT, Davies MJ (2002) Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol(amine)s. *Toxicology* 177:23-37
- Pearce RM (1906) Experimental myocarditis: a study of the histological changes following intravenous injections of adrenaline. *Journal of Experimental Medicine* 8:400-409

- Persoon-Rothert M, Valk-Kokshoorn EJMvd, Egas-Kenniphaas JM, Mauve I, Laarse Avd (1989) Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 21:1285-1291
- Pezzella A, d'Ischia M, Napolitano A, Misuraca G, Prota G (1997) Iron-mediated generation of the neurotoxin 6-hydroxydopamine quinone by reaction of fatty acid hydroperoxides with dopamine: a possible contribution mechanism for neuronal degeneration in Parkinson's disease. *Journal of Medical Chemistry* 40:2211-2216
- Piper HM (2000) The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovascular Research* 45:123-127
- Piper RD, Li FY, Myers ML, Sibbald WJ (1999) Effects of isoproterenol on myocardial structure and function in septic rats. *Journal of Applied Physiology* 86:993-1001
- Ploemen JH, Ommen BV, Haan AD, Venekamp JV, Bladeren PJV (1994) Inhibition of human glutathione S-transferases by dopamine, alpha-methyl dopa and their 5-S-glutathionyl conjugates. *Chemico-Biological Interactions* 90:87-99
- Powell SR, Hyacinthe L, Teichberg S, Tortolani AJ (1992) Mediator role of copper in reactive oxygen intermediate-induced cardiac injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24:1371-1386
- Powell T, Twist V (1976) A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72:327-333
- Prabhananda BS, Kalyanaraman B, Sealy RC (1985) Radical anions from one-electron-reduced adrenochrome. Detection and identification by electron spin resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 840:21-28
- Preus M, Bhargava AS, Khater AE, Gunzel P (1988) Diagnostic value of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzyme determinations for monitoring early cardiac damage in rats. *Toxicology Letters* 42:225-233
- Prutz WA (1993) Cu(II)-induced oxidation of catechols, ascorbate and o-phenylenediamine is promoted by DNA. *Zeitschrift fur Naturforschung* 48c:872-878

- Raab W, Stark E, MacMilan WH, Gigue WR (1961) Sympathogenic origin and antiadrenergic prevention of stress-induced myocardial lesions. *American Journal of Cardiology* 8:203-211
- Ramos K, Acosta D (1983) Prevention by L(-)-ascorbic acid of isoproterenol induced cardiotoxicity in primary cultures of rat myocytes. *Toxicology* 26:81-90
- Ramos K, Acosta D (1989) Cytotoxic actions of isoproterenol in cardiac cells: protective effects of antioxidants. In: Miquel, J, Quintanilha, AT and Weber, H (eds.) *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. CRC, Florida pp 177-185
- Ramos K, Combs AB, Acosta D (1983) Cytotoxicity of isoproterenol to cultured heart cells: effects of antioxidants on modifying membrane damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* 70:317-323
- Ramos K, Combs AB, Acosta D (1984) Role of calcium in isoproterenol cytotoxicity to cultured myocardial cells. *Biochemical Pharmacology* 33:1989-1992
- Rathore N, John S, Kale M, Bhatnagar D (1998) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacological Research* 38:297-303
- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (1999) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Journal of Enzyme Inhibition* 15:47-61
- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2000) Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* 14:468-473
- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2001a) Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 37:1-4
- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2001b) Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovascular Toxicology* 1:195-204

- Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2001c) The study of oxidative stress in freshly isolated  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicology in Vitro* 15:283-287
- Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2002a)  $\text{Cu}^{2+}$ -Induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chemical Research in Toxicology* 15:861-869
- Remião F, Milhazes N, Borges F, Carvalho F, Bastos ML, Lemos-Amado F, Domingues P, Ferrer-Correia A (2002b) Synthesis and analysis of aminochromes by HPLC-photodiode array. Adrenochrome evaluation in rat blood. *Biomedical Chromatography* (in press)
- Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1990) Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications. *Fundamentals of Clinical Pharmacology* 4:85-103
- Rigobello MP, Scutari G, Boscolo R, Bindoli A (2001) Oxidation of adrenaline and its derivatives by S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5:39-46
- Roden DM (1996) Antiarrhythmic drugs. In: Hardman, JG, Limbird, LE, Molinoff, PB, Ruddon, RW and Gilman, AG (eds.) *Goodman & Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York pp 839-874
- Rona G (1985) Catecholamine cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17:291-306
- Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R (1959) An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Archives of Pathology* 67:443-455
- Rosenblum I, Wohl A, Stein AA (1965) Studies in cardiac necrosis. II. Cardiovascular effects of sympathomimetic amines producing cardiac lesions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 7:9-17
- Rump AF, Klaus W (1995) Functional effects of adrenochrome in isolated rabbit heart. *Pharmacology and Toxicology* 77:102-105
- Rump AFE, Klaus W (1994) Cardiotoxicity of adrenochrome in isolated rabbit hearts assessed by epicardial NADH fluorescence. *Archives of Toxicology* 68:571-575

- Rump AFE, Schierholz J, Rosen R, Guttler K, Klaus W (2001) Studies on the role of superoxide anion radicals for the cardiotoxicity of adrenochrome. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research* 51:964-970
- Rupp H, Dhalla KS, Dhalla NS (1994) Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 24 (suppl. 1):S16-S24
- Rushmore TH, Pickett CB (1993) Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *Journal of Biological Chemistry* 268:11475-11478
- Sánchez VCd, Hernández-Munoz R, López-Barrera F, Yanez L, Vidrio S, Suárez J, Cota-Garza MD, Aranda-Fraustro A, Cruz D (1997) Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75:1300-1311
- Saris N-EL, Eriksson KO (1995) Mitochondrial dysfunction in ischaemia-reperfusion. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 107:171-176
- Sasikumar CS, Devi CSS (2000) Protective effect of Abana, a poly-herbal formulation, on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 32:198-201
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30:1191-1212
- Scheinberg IH (1998) Wilson's Disease. In: Fauci, AS, Braunwald, E, Isselbacher, KJ, Wilson, JD, Martin, JB, Kasper, DL, Hauser, SL and Longo, DL (eds.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, New York pp 345-345
- Scherrer U, Randin D, Tappy L, Vollenweider P, Jéquier E, Nicod P (1994) Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Circulation* 89:2634-2640
- Schluter K-D, Zhou XJ, Piper HM (1995) Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology* 269:c1311-c1316

- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology* 3:81-91
- Segura-Aguilar J, Baez S, Widersten M, Welch CJ, Mannervik B (1997) Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *Journal of Biological Chemistry* 272:5727-5731
- Segura-Aguilar J, Lind C (1989) On the mechanism of the Mn<sup>3+</sup>-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT-diaphorase and superoxide dismutase. *Chemico-Biological Interactions* 72:309-324
- Segura-Aguilar J, Metodiewa D, Welch CJ (1998) Metabolic activation of dopamine o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1381:1-6
- Shan X, Aw TY, Jones DP (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacological Therapeutics* 47:61-71
- Sharikabad MN, Hagelin EM, Hagberg IA, Lyberg T, Brors O (2000) Effect of calcium on reactive oxygen species in isolated rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32:441-452
- Sharma M, Kishore K, Gupta SK, Joshi S, Arya DS (2001) Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 225:75-83
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27:916-921
- Sigurdsson A, Swedberg K (1996) The role of neurohormonal activation in chronic heart failure and postmyocardial infarction. *American Heart Journal* 132:229-234
- Singal PK, Dhillon KS, Beamish RE, Kapur N, Dhalla NS (1982) Myocardial cell damage and cardiovascular changes due to I.V. infusion of adrenochrome in rats. *British Journal of Experimental Pathology* 63:167-176

- Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS (1981a) Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60:1390-1397
- Singal PK, Yates HC, Beamish RE, Dhalla NS (1981b) Influence of reducing agents on adrenochrome-induced changes in the heart. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 105:664-669
- Siraki AG, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters. *Toxicology* 177:81-90
- Smythies J, Galzigna L (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1380:159-162
- Snyder RD, Friedman MB (1998) Enhancement of cytotoxicity and clastogenicity of L-dopa and dopamine by manganese and copper. *Mutation Research* 405:1-8
- Sobel B, Jequier E, Sjoerdsma A, Lovenberg W (1966) Effect of catecholamines and adrenergic blocking agents on oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. *Circulation Research* 19:1050-1061
- Sole MJ, Liew C-C (1988) Catecholamines, calcium and cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology* 62:20G-24G
- Spencer JPE, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *Journal of Neurochemistry* 71:2112-2122
- Sreepriya M, Porckodi M, Devaki T, Nayeem M (1998) Anti-oxidant effects of L-arginine against isoproterenol-induced myocardial stress in rats. *Medical Science Research* 26:587-593
- Stanton HC, Schwartz A (1967) Effects of hydrazine monoamine oxidase inhibitor (phenelzine) on isoproterenol-induced myocardial pathologies in the rat. *Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics* 157:649-658
- Steen EM, Noronha-Dutra AA, Woolf N (1982) The response of isolated rat heart cells to cardiotoxic concentrations of isoprenaline. *Journal of Pathology* 137:167-176
- Stevenson WG (1995) Mechanisms and management of arrhythmias in heart failure. *Current Opinion in Cardiology* 10:274-281

- Strubelt O, Siegers CP (1975) Role of cardiovascular and ionic changes in pathogenesis and prevention of isoprenaline-induced cardiac necrosis. Pathophysiology and morphology of myocardial cell alteration. In: Fleckenstein, A and Rona, G (eds.) Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. University Park Press, Baltimore pp 135-142
- Suleiman M-S (1994) New concepts in the cardioprotective action of magnesium and taurine during the calcium paradox and ischaemia of the heart. *Magnesium Research* 7:295-312
- Suleiman M-S, Chapman RA (1993) Changes in the principal free intracellular amino acids in the langendorf perfused guinea pig heart during arrest with calcium-free or high potassium media. *Cardiovascular Research* 27:1810-1814
- Sumitra M, Manikandam P, Kumar DA, Arutselvan N, Balakrishana K, Manohar BM, Puvanakrishnan R (2001) Experimental myocardial necrosis in rats: role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation and antioxidant status. *Molecular and Cellular Biochemistry* 224:135-142
- Szakacs JE, Cannon A (1958) L-Norepinephrine myocarditis. *American Journal of Clinical Pathology* 30:425-430
- Taam GM, Takeo S, Ziegelhoffer A, Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS (1986) Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Canadian Journal of Cardiology* 2:88-93
- Taimor G, Schluter K-D, Piper HM (2001) Hypertrophy-associated gene induction after beta-adrenergic stimulation in adult cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:503-511
- Takeo S, Fliegel L, Beamish RE, Dhalla NS (1980a) Effects of adrenochrome on rat heart sarcolemmal ATPase activities. *Biochemical Pharmacology* 29:559-564
- Takeo S, Taam GML, Beamish RE, Dhalla NS (1980b) Effects of adrenochrome on calcium accumulation and adenosine triphosphatase activities of the rat heart microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 214:688-693

- Takeo S, Taam GML, Beamish RE, Dhalla NS (1981) Effects of adrenochrome on calcium accumulation by heart mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 30:157-163
- Takahara K, Azuma J, Awata N, Ohta H, Sawamura A, Kishimoto S, Sperelakis N (1985) Taurine's possible protective role in age-dependent response to calcium paradox. *Life Sciences* 37:1705-1710
- Tappia PS, Hata T, Hozaima L, Sandhu MS, Panagia V, Dhalla NS (2001) Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal  $Ca^{2+}$  transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387:85-92
- Terland O, Flatmark T, Tangeras A, Gronberg M (1997) Dopamine oxidation generates an oxidative stress mediated by dopamine semiquinone and unrelated to reactive oxygen species. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29:1731-1738
- Timerman AP, Altschuld RA, Hohl CM, Brierley GP, Merola AJ (1990) Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22:565-575
- Tipnis UR, He GY, Li S, Campbell G, Boor PJ (2000) Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis. *Cardiovascular Pathology* 9:273-280
- Uemura S, Young H, Matsuoka S, Jarmakani JM (1985) Low sodium attenuation of the  $Ca^{2+}$  paradox in the newborn rabbit myocardium. *American Journal of Physiology* 248:H345-H349
- Vahouny G, Wei R, Starkweather R, Davis C (1970) Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* 167:1616-1618
- Valerino DM, McCormack JJ (1971) Xanthine oxidase-mediated oxidation of epinephrine. *Biochemical Pharmacology* 20:47-55
- Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS (1998) *Human Physiology: the Mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill, New York
- Vega MC, Walsh SB, Mantle TJ, Coll M (1998) The three-dimensional structure of Cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1. Carboxymethylation dramatically decreases the affinity for glutathione and is associated with a loss of electron density in the alphaB-310B region. *Journal of Biological Chemistry* 273:2844-2850

- Viko H, Osnes J-B, Sjetnan AE, Skomedal T (1995) Improved isolation of cardiomyocytes by trypsination in addition to collagenase treatment. *Pharmacology and Toxicology* 76:68-71
- Waalas E, Waalas O, Haavaldsen S, Pedersen B (1963) Spectrophotometric and electron-spin resonance studies of complexes of catecholamines with Cu(II) ions and the interaction of ceruloplasmin with catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 100:97-109
- Waldeck B (2002) Beta-Adrenoceptor agonists and asthma—100 years of development. *European Journal of Pharmacology* 445:1-12
- Wheatley AM, Thandroyen FT, Opie LH (1985) Catecholamine-induced myocardial cell damage; catecholamines or adrenochrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17:349-359
- Whitehurst VE, Loseph X, Alleva FR, Vick JA, Whittaker P, Zhang J, Fry BE, Balazs T (1994) Enhancement of acute myocardial lesions by asthma drugs in rats. *Toxicologic Pathology* 22:72-76
- Wolf N, Davies MJ, Shaw MJ, Trickey RJ (1976) Experiences with isoprenaline-induced myocardial necrosis in the rat. *Journal of Pathology* 120:65-73
- Yates JC, Beamish RE, Dhalla NS (1981) Ventricular dysfunction and necrosis produced by adrenochrome metabolite of epinephrine: relation to pathogenesis of catecholamine cardiomyopathy. *American Heart Journal* 102:210-221
- Yates JC, Dhalla NS (1975) Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 7:807-816
- Yates JC, Taam GML, Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS (1980) Protection against adrenochrome-induced myocardial damage by various pharmacological interventions. *British Journal of Experimental Pathology* 61:242-255
- Yunge L, Bruneval P, Peters H, Poulsen R, Huttner I (1989) Perturbation of the sarcolemmal membrane in isoproterenol-induced myocardial injury: permeability and freeze-fracture studies in vivo and in vitro. *American Journal of Pathology* 134:171-185

- Zhang F, Dryhurst G (1995) Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 398:117-128
- Ziegler K (1905) Über die Wirkung intravenöser Adrenalin-Injektion auf das Gefäßsystem und ihre Beziehungen zur Arteriosklerose. *Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur Allgemeinen Pathologie* 38:229-254
- Zimmerman ANE, Hulsmann WC (1966) Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the rat heart. *Nature* 211:646-647