



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS AURANTIUM* L. NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS

CELI MACEDO POLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas – Estrutura e Função*.

Clélia Akiko Hiruma-Lima

**BOTUCATU – SP
2014**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
CITRUS AURANTIUM L. NO INFARTO DO MIOCÁRDIO
EM RATOS**

CELI MACEDO POLO

PROF^A ADJUNTA CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

PROF^A DR^A LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração
Biomoléculas – Estrutura e Função.

**BOTUCATU – SP
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Polo, Celi Macedo.

Avaliação do efeito do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. no infarto do miocárdio em ratos / Celi Macedo Polo. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 20100000

1. Laranja - Pesquisa. 2. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 3. Infarto do miocárdio. 4. Isquemia. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: *Citrus aurantium*; Infarto do miocárdio; Isoproterenol; Isquemia global; Ratos.

Auxílio Financeiro

CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

e

FAPESP

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos os animais que doaram suas vidas

Em prol da Ciência.

E a todos os cientistas

Pela dedicação à Ciência.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus pela Vida.

Pela Vida maravilhosa de oportunidades,

E por ter abraçado todas elas.

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram de alguma forma

Com uma palavra, um abraço, ouvidos, músicas, críticas...

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo apoio nos experimentos,

Tão cansativos e tão longos...

Aos professores do depto. de Farmacologia,

Sandra Cordellini e André S. Pupo, meu Muito Obrigada!

Sem o apoio de vocês, seria impossível a execução de parte do projeto!

À professora Patrícia Fidelis pelas palavras e pela prontidão em ajudar e tirar minhas dúvidas.

Aos técnicos da Farmaco e da Fisiologia (seu Júnior, Luís e Paulão, Tardivo,

Lílian, Juliano, e o Hélio “Ponpom” “Pai”, o panteão de todas as verdades!)

À minha família “de sangue” e à enorme família do NAAC, que há anos tanto me apoia!

À minha amável orientadora Clélia, pelo carinho e apoio

E à Lúcia, pelos puxões de orelha e momentos de descontração.

Meu agradecimento especial vai para meu namorado e companheiro de todas as horas,

Luiz Ricardo “Nulo”, que nunca mediu esforços para me ajudar,

Também foi Orientador nas horas vagas e ocupadas!

ÍNDICE

Índice de Figuras e Tabelas.....	9
Lista de abreviaturas.....	11
Resumo / Abstract.....	13
1. Introdução.....	15
1.1 Infarto agudo do miocárdio.....	16
1.1.1 Fisiopatologia.....	16
1.1.2 Alterações celulares.....	17
1.1.3 Remodelação cardíaca.....	19
1.1.4 Modelos experimentais.....	19
1.2 Uso de Plantas Medicinais.....	22
2. Objetivos.....	26
3. Metodologia.....	27
3.1 Extração do óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> (OEC).....	27
3.2 Animais.....	27
3.3 Experimentos.....	28
3.3.1 Modelo experimental de infarto do miocárdio por isoproterenol.....	28
3.3.2 Modelo experimental de infarto do miocárdio por isquemia/reperfusão em coração isolado.....	38
3.4 Análise estatística.....	39
4. Resultados.....	40
4.1 Modelo experimental de infarto do miocárdio por isoproterenol.....	40
4.1.1 Avaliação do pré-tratamento com OEC no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol.....	40
4.1.2 Avaliação do pré-tratamento com OEC na área de lesão induzida por isquemia/reperfusão em coração isolado.....	49
5. Discussão.....	51
6. Conclusão.....	61
7. Dificuldades encontradas.....	61
8. Perspectivas.....	61
Referências bibliográficas.....	62

Apêndice 1. Determinação de peroxidação lipídica pelos protocolos de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978) e Rozemberg <i>et al.</i> (2006), em VE de ratos Wistar machos.....	75
Apêndice 2. Aferição de pressão arterial caudal sistólica e diastólica de ratos Wistar machos pré-tratados com tween 80 8%, OEC (250 mg/kg), propranolol (10 mg/kg) ou anlodipina (5 mg/kg), durante 7 dias com indução de infarto do miocárdio por isoproterenol (2x100 mg/kg).....	76
Apêndice 3. Padronização do modelo de infarto por isoproterenol.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

1. Infarto do miocárdio e diferentes causas para a lesão.....	17
2. Esquema ilustrativo do aparato Langendorff.....	21
3. Fórmula estrutural do β -mirceno e limoneno.....	23
4. Foto da espécie arbórea de <i>Citrus aurantium</i>	25
5. Reações ocorridas durante a determinação de glutathiona reduzida.....	35
6. Protocolo de tratamento e aferição de pressão arterial caudal.....	36
7. Porcentagem de área de infarto em relação à área total em risco, em ratos em ratos pré-tratados por 7 dias, submetidos ao infarto por isoproterenol.....	42
8. Quantificação de mieloperoxidase em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos com indução ou não de infarto por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.....	45
9. Quantificação de malondialdeído em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos com indução ou não de infarto por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.....	46
10. Níveis de glutathiona reduzida em ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.....	47
11. Pressão arterial média (caudal) entre animais com indução de infarto por isoproterenol, durante o período de tratamento.....	48
12. Área de lesão em corações de ratos que sofreram lesão por isquemia/reperfusão.....	51
13. Ilustração esquematizando a ativação da via da adenosina através de exacerbada ativação de receptores β -adrenérgicos em músculo esquelético).....	57
Apêndice	
I. Diferentes protocolos utilizados para determinação de malondialdeído em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos, submetidos ou não ao infarto por isoproterenol.....	75
II. Pressão arterial sistólica e diastólica (caudal) entre animais com indução de infarto por isoproterenol, durante o período de tratamento.....	76
III. Imagens fotografadas por câmara digital, de coração de ratos Wistar machos, após administração de salina ou isoproterenol.....	77

IV. Peso relativo do coração (A) e ventrículo esquerdo (B) em ratos submetidos às diferentes doses de isoproterenol.....	78
V. Cortes histológicos corados em HE, da zona apical do VE de ratos Wistar machos, tratados com salina ou com diferentes doses de isoproterenol.....	79

Tabelas

1. Classificação do grau de injúria do miocárdio de acordo com as alterações observadas microscopicamente.....	29
2. Desenho experimental para avaliação do efeito cardioprotetor preventivo do OEC em ratos submetidos a infarto por isoproterenol.....	30
3. Peso corpóreo, peso relativo do coração e ventrículo esquerdo e porcentagem de fluido presente em ventrículo direito de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol.....	40
4. Peso relativo de diferentes órgãos de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol.....	41
5. Análises séricas de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias, com indução ou não de infarto por isoproterenol.....	43
6. Perfil lipídico sérico de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol.....	44
7. Índices de função cardíaca do ventrículo esquerdo (<i>ex-vivo</i>) após pré-tratamento durante 7 dias e indução de infarto por isoproterenol.....	49
Apêndice	
I. Peso relativo de órgãos de ratos Wistar machos, que receberam diferentes doses de isoproterenol.....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

AST: aspartato aminotransferase

BHT: butil-hidroxi-tolueno

CK-MB: *creatine kinase-myocardial band*

COX: ciclo-oxigenase

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico

e.p.m.: erro padrão da média

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERO: espécies reativas ao oxigênio

FC: frequência cardíaca

GPx: glutationa peroxidase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

HDL: lipoproteína de alta densidade

HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio

IAM: infarto agudo do miocárdio

ISO: isoproterenol

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MDA: malondialdeído

MPO: mieloperoxidase

NAC: N-acetil-cisteína

NADH/ NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NHLBI: *National Heart Lung and Blood Institute*

OEC: óleo essencial de *Citrus aurantium*

PA: pressão arterial

PAM: pressão arterial média

PBS: tampão fosfato salina

PDVE: pressão diastólica do ventrículo esquerdo

PIV: pressão intraventricular

PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo

SDS: dodecil-sulfato de sódio

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TG: triglicerídeos

TPF: trifeníl-formazan

TTC: cloreto de trifeníl-tetrazólio

UI: unidades internacionais

VD: ventrículo direito

VE:ventrículo esquerdo

RESUMO

O presente trabalho investigou o efeito do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. (OEC) em modelos experimentais de infarto do miocárdio em ratos. Para tanto, foram analisados parâmetros enzimáticos, séricos, morfológicos e funcionais de ratos submetidos à indução de infarto por isoproterenol. Foram analisados também parâmetros morfológicos de corações de animais tratados com OEC, posteriormente submetidos à isquemia/reperfusão *in vitro*. O OEC foi administrado oralmente por 7 dias na dose de 250 mg/kg. Nos dois últimos dias de tratamento, foi aplicado isoproterenol (2x100 mg/kg, a cada 24 horas) ou salina (2 mL/kg). Foram feitas medidas bioquímicas de injúria do miocárdio, através da dosagem sérica de CK-MB, AST, ALT, ureia, creatinina, colesterol total, que foram significativamente elevadas nos ratos infartados, apesar dos mesmos não apresentarem alterações nos parâmetros funcionais avaliados (pressão arterial e pressão intraventricular). A análise morfológica feita pelo método de coloração com TTC verificou presença de lesão isquêmica nos animais tratados com isoproterenol, assim como alterações na estrutura do miocárdio, observadas em cortes histológicos. O OEC não foi eficaz em evitar os parâmetros alterados pelo isoproterenol, assim como não preveniu contra os danos induzidos pela isquemia/reperfusão *in vitro*. O estudo conclui que o pré-tratamento com OEC não foi eficaz na cardioproteção nos modelos experimentados.

Palavras-chave: *Citrus aurantium*, Infarto do miocárdio, Isoproterenol, Isquemia global, Ratos.

ABSTRACT

The effect of treatment with *Citrus aurantium* essential oil (OEC) on rat models of experimental myocardial infarct was evaluated. Rats were treated with OEC 250mg/kg (p.o.) for 7 days and the infarct was induced by isoproterenol administration (100mg/kg, sc) on treatment days 6 and 7. Twenty four hours after the second isoproterenol injection the rats were killed and the enzymatic, serum, heart morphological and functional parameters were evaluated. Isoproterenol administration increased significantly the level of biochemical markers of myocardial (CK-MB, total cholesterol), liver (AST, ALT) and kidney (urea, creatinine) injury and induced myocardial damage and necrosis as evaluated by histopathological evaluation and TTC staining, respectively. No functional impairment was observed in the Langendorff perfused rat hearts from isoproterenol-treated animals. The OEC treatment was not able to prevent or attenuate the isoproterenol-induced myocardial lesion or any of the biochemical and morphological changes accompanying the infarct. In addition, hearts from OEC treated rats were not protected from the myocardial lesion induced by *in vitro* ischemia-reperfusion. The results obtained in the two different models of myocardial infarct show that OEC (250mg/kg) administration has no cardioprotective effect.

Key words: *Citrus aurantium*, myocardial infarction, isoproterenol, global ischemia, rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infarto Agudo do Miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocorre quando o fluxo sanguíneo coronariano é insuficiente para manter o aporte de oxigênio necessário à sobrevivência do miocárdio, o qual pode resultar em necrose do tecido (Thygesen *et al.*, 2012). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença isquêmica do coração matou em 2004, 7.198.000 pessoas, o equivalente a 12,8% do total de óbitos em todo o mundo. No ano de 2008, foram registradas 7.254.000 mortes pela doença (WHO, 2011), e em 2010 o IAM continuou sendo a principal causa de morte no mundo (Murray *et al.*, 2012). No Brasil, segundo dados publicados pelo Sistema Único de Saúde, 10,3% dos óbitos foram causados por IAM no ano de 2009 (Brasil, 2011). Nos Estados Unidos, aproximadamente 1,2 milhões de pessoas sofrem IAM todo ano (NHLBI, 2013) e 450.000 têm um episódio recorrente da doença. Estima-se que em 2004, os Estados Unidos gastou cerca de 133,2 bilhões de dólares com o IAM em 2004 (Costa *et al.*, 2007). Considerando-se os anos de vida perdidos devido a diversas doenças, a doença isquêmica do coração foi responsável por 12% do total de anos perdidos no mundo, em 2010 (Moran *et al.*, 2014).

1.1.1 Fisiopatologia

A morte decorrente do IAM pode ocorrer subitamente, como consequência de oclusão coronária aguda ou fibrilação cardíaca, ou as complicações advindas do insulto podem acontecer lentamente, ao longo de semanas ou anos, devido ao enfraquecimento progressivo do processo de bombeamento cardíaco (Hall, 2011). Afecções como vasoespasmos coronarianos secundários ao uso de drogas, traumatismos, lesões de válvula aórtica ou mitral e doenças trombóticas da coronária podem provocar IAM, mas sua causa mais frequente é a aterosclerose (figura 1) (Costa *et al.*, 2007).

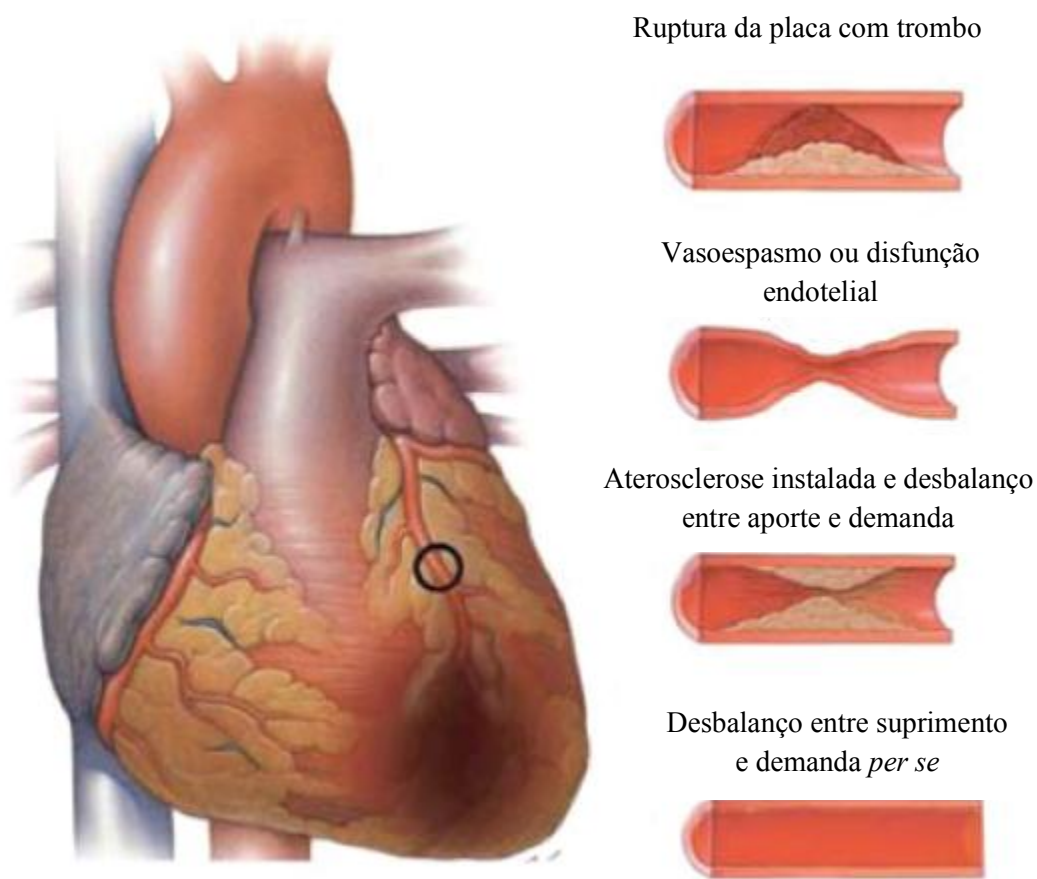
A aterosclerose, como principal causa de doença isquêmica do coração, caracteriza-se por depósito de colesterol em vários pontos do endotélio de qualquer artéria do corpo. Gradualmente, esses locais de acúmulo de colesterol são invadidos por tecido fibroso, tornando-se frequentemente calcificados (Hall, 2011). A ruptura de uma placa instável de artéria epicárdica pode resultar na formação de um trombo oclusivo

sobre uma placa aterosclerótica (Porto e Nery, 2005) bloqueando, inteiramente ou em parte, o fluxo sanguíneo coronariano (Hall, 2011).

Imediatamente após a oclusão coronariana aguda, o fluxo sanguíneo cessa nos vasos coronários, em um ponto além da oclusão, exceto por pequena quantidade de fluxo colateral dos vasos circundantes. A área do miocárdio atingida, que não consegue sustentar a função do músculo, é chamada de infartada (Hall, 2011). Logo após o início do infarto, sangue começa a penetrar pela circulação colateral no local que sofreu isquemia, tornando a área repleta de sangue estagnado. Simultaneamente, os cardiomiócitos utilizam os últimos vestígios de oxigênio do sangue, tornando a região com predomínio da cor azul-escuro, decorrente da presença de desoxihemoglobina. Nos estágios mais tardios, as paredes vasculares se tornam muito permeáveis, permitindo o extravasamento de líquido, o tecido edemacia e as células miocárdicas começam a inchar e ocorre progressiva redução do metabolismo celular. Dentro de poucas horas com quase nenhum suprimento sanguíneo, as células musculares morrem (Hall, 2011).

A extensão do infarto depende da localização da estenose coronária, do tamanho do leito vascular perfundido pelos vasos estreitados, da necessidade de oxigênio pelo músculo, da extensão da circulação colateral e da presença de fatores teciduais capazes de modificar o processo necrótico (Costa *et al.*, 2007). A região subendocárdica é o primeiro local onde ocorre lesão em qualquer condição de comprometimento do fluxo sanguíneo, pois os vasos desta porção estão sempre comprimidos pela contração sistólica do coração (Hall, 2011).

Figura 1. Infarto do miocárdio e diferentes causas para o insulto.



Thygesen *et al.*, 2012 (adaptado)

1.1.2 Alterações celulares

A lesão isquêmica irreversível é caracterizada por vários processos envolvendo a membrana sarcolêmica, eventualmente no seu rompimento e decorrente morte celular. Há acúmulo intracelular de H^+ como consequência da glicólise anaeróbica. Ao ser retomada a perfusão, o pH intracelular é normalizado pela troca do H^+ com o Na^+ extracelular. O excesso de Na^+ intracelular leva a ativação da bomba $2Na^+/Ca^{2+}$, que provocará excesso de cálcio intracelular (Frank *et al.*, 2012). O Ca^{2+} citosólico aumentado e dano mitocondrial causam ativação da fosfolipase e liberação de fosfolípidos e ácidos graxos livres, que são incorporados pela célula e sofrem dano peroxidativo pelos radicais livres e espécies reativas ao oxigênio. O rompimento de proteínas ancoradas do citoesqueleto e aumentos progressivos na permeabilidade da membrana celular resultam em rompimento físico e morte celular (Buja, 2005). A isquemia *per se* provoca estresse oxidativo e destruição celulares, que induzem ativação

de mediadores inflamatórios e liberação de enzimas citosólicas e de membrana (p.ex., CK-MB e troponinas), sendo que todo este processo é agravado pela reperfusão.

A necrose do miocárdio torna-se evidente após 24 horas do infarto. Inicialmente, é acompanhada por infiltração neutrofilica e, posteriormente, por infiltrado linfocítico e monocítico (Fishbein *et al.*, 1978). Após 3 a 4 dias do infarto, inicia-se o acúmulo local dos miofibroblastos. O colágeno I e III também se acumulam na região periférica do infarto no terceiro dia e torna-se bem organizado após 14 dias. O processo de cicatrização se completa no 21º dia após o infarto (Jugdutt, 2003; Ertl e Frantz, 2005).

As primeiras características morfológicas do infarto do miocárdio ocorrem entre 12 e 24 horas do início (Burke e Virmani, 2007), embora haja ativação de metaloproteinases, enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação do colágeno, uma hora após o início da isquemia. É provável que 3 horas após, cerca de 50% do colágeno já tenha sido degradado, cessando essa atividade proteolítica após uma semana do infarto (Zornoff *et al.*, 2009). A hipereosinofilia no citoplasma avaliada por coloração em HE, é característica de isquemia miocárdica. Infiltração neutrofilica está presente nas bordas da parede do miocárdio 24 horas após seu início. O infarto persistindo entre 24 e 48 horas, estabelece-se a necrose por coagulação, com vários graus de picnose nuclear e cariólise. As estriações do cardiomiócito são preservadas e os sarcômeros alongados. As bordas mostram proeminente infiltração neutrofilica em 48 horas. No 3º ao 5º dia a porção central do infarto mostra perda de núcleo e estrias do cardiomiócito. Em infartos menores, neutrófilos invadem o interior do infarto e suas margens, resultando em cariorrexe mais severa (Burke e Virmani, 2007). Em humanos, o infarto torna-se visível macroscopicamente em um período de 18 a 24 horas entre sua ocorrência e a morte do indivíduo (Filho, 2006).

Marcadores de isquemia incluem o fator-1 induzido por hipóxia e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que podem ser evidenciadas por técnicas imunohistoquímicas (Abbate *et al.*, 2005). O influxo de células inflamatórias, incluindo mastócitos, ativa uma cascata de quimiocinas que suprimem inflamação adicional e resulta em tecido de cicatrização (Frangogiannis, 2004). Macrófagos e fibroblastos começam a surgir nas margens. Uma semana após o infarto, os neutrófilos diminuem e o tecido de granulação se estabelece, com invasão neocapilar e linfocítica e a ocorrência de infiltração de células do plasma. Apesar dos linfócitos serem observados no 2º e 3º dias, eles não estão em grande quantidade em nenhuma fase da evolução do infarto. A remoção

fagocítica dos cardiomiócitos necrosados ocorre pelos macrófagos (Burke e Virmani, 2007).

Por volta da 2^a semana, os fibroblastos estão proeminentes, mas sua presença pode ser verificada a partir do 4^o dia, na periferia do infarto. Os cardiomiócitos necrosados continuam sendo removidos pelos macrófagos, enquanto que os fibroblastos produzem colágeno ativamente, e a angiogênese ocorre na área de cicatrização. Dependendo da extensão da necrose, a cicatrização pode estar completa em 4 semanas ou mais. A área central do infarto pode permanecer não reparada, apresentando cardiomiócitos mumificados por longos períodos, apesar das margens do infarto estarem completamente cicatrizadas (Burke e Virmani, 2007).

1.1.3 Remodelação cardíaca

A remodelação ventricular é um processo compensatório influenciado pela sobrecarga hemodinâmica ou ativação neuro-hormonal. As adaptações morfológicas, como hipertrofia do cardiomiócito, acúmulo de miofibroblastos e colágeno, são os principais processos para preservar a função cardíaca após lesões. A remodelação cardíaca é um importante processo patológico, que resulta em progressiva disfunção do órgão (redução da frequência cardíaca e da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo), que se apresenta clinicamente como insuficiência cardíaca, podendo levar à morte súbita (Shinde e Frangogiannis, 2014).

1.1.4 Modelos experimentais

a. Modelo de indução de infarto do miocárdio por Isoproterenol

O isoproterenol (ISO) é uma catecolamina sintética, agonista β -adrenérgico que em altas doses administradas uma ou duas vezes a cada 24 horas (ou em doses reduzidas, administradas por período prolongado) provoca um severo estresse no miocárdio, resultando em apoptose (Song *et al.*, 2011) e necrose do miocárdio. A indução do infarto é dada pela administração do ISO pela via subcutânea (sc.) ou intraperitoneal (ip.). Como demonstrado por Rona *et al.* (1959), a administração de ISO na dose de 170mg/kg ou em doses mais elevadas, está associada a elevada mortalidade (50-90%). Porém, a administração de doses menores (85 mg/kg) de ISO é capaz de induzir lesões severas, com menor mortalidade (10%). As injúrias induzidas pelo ISO

são visíveis macroscopicamente através de colorações acinzentadas ou amareladas, que incluem o ápice, a porção inferior do ventrículo esquerdo e o septo interventricular. O processo patológico do dano por ISO é caracterizado por áreas manchadas de isquemia e esta injúria tem muitas similaridades com o IAM tradicional atribuído à doença coronariana isquêmica (Senthil *et al.*, 2007).

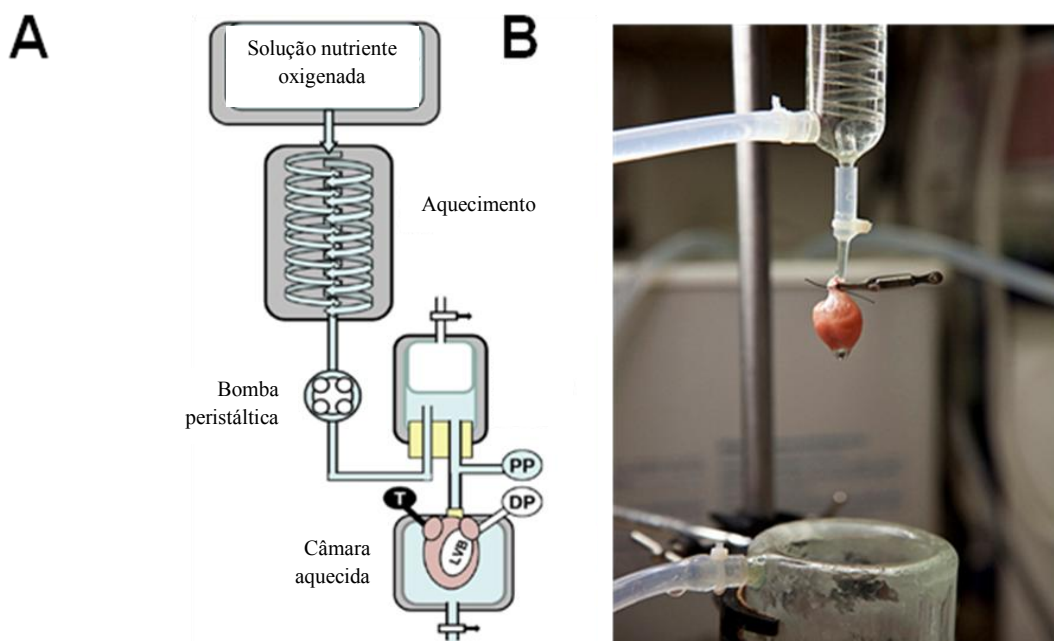
O infarto induzido pelo ISO é causado por uma insuficiência coronariana aguda provocada pelo desequilíbrio entre a demanda energética do miocárdio (elevada pelo potente efeito cronotrópico positivo do isoproterenol) e o fluxo coronariano ao miocárdio. A hipóxia do miocárdio resulta, então, na necrose cardíaca. A elevação excessiva de cálcio intracelular e a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO) com consequente indução de estresse oxidativo estão envolvidos na indução de morte dos cardiomiócitos e lesão cardíaca causados pelo ISO (Jiang e Downing, 1990). As ERO podem originar-se de várias fontes: pelo aumento de cálcio intracelular, oxidação da hipoxantina (produto da degradação de purinas) pela xantina oxidase, degradação de catecolaminas e transporte mitocondrial de elétrons (Garlick *et al.*, 1987).

A participação de ERO na lesão cardíaca induzida pelo ISO é demonstrada pela elevada lipoperoxidação cardíaca em animais infartados com esta catecolamina e pela cardioproteção conferida por antioxidantes (Zhang *et al.*, 2005; Punithavathi e Prince, 2010; Meeran e Prince, 2011). Além disso, a participação de ERO na lesão cardíaca induzida pelo ISO encontra respaldo na observação de que a ativação de receptores beta-adrenérgicos em cardiomiócitos eleva a produção de ERO (Andersson *et al.*, 2011; Bovo *et al.*, 2012).

b. Modelo de infarto por isquemia global no coração isolado (*in vitro*)

A realização de estudos com o coração isolado e perfundido *in vitro* são baseadas na técnica originalmente descrita por Oscar Langendorff em 1895. Nela, o animal é morto e seu coração retirado, isolado e conectado - via artéria aorta - a um sistema de perfusão retrógrada com solução nutriente (p.ex., Krebs) oxigenada e aquecida (37°C). Um esquema da metodologia experimental é apresentado na figura 2.

Figura 2. Esquema ilustrativo do aparato Langendorff.



A) Esquema ilustrativo do aparato Langendorff (LVB: balão ventricular esquerdo; DP: pressão desenvolvida; PP: pressão de perfusão; T: monitor de temperatura); modificado de Bell, Mocanu e Yellon (2011). B) Fotografia de coração de cobaia montado no sistema Langendorff (Google images).

A aorta ascendente é amarrada a uma cânula conectada a um sistema de perfusão que, sob a ação de uma bomba peristáltica, perfunde o coração com solução nutriente, a um fluxo ou pressão constante. A solução nutriente entra na aorta e exerce pressão sobre as cúspides da valva aórtica, promovendo o fechamento da mesma e impedindo que a solução entre na cavidade do ventrículo esquerdo. Desta maneira, a solução nutriente flui inteiramente pelos óstios coronarianos, nutrindo todo o miocárdio e mantendo a função do coração. Das artérias coronárias, a solução passa às veias coronárias, sendo drenada ao átrio direito e ejetada pelo ventrículo direito para fora do coração, via artéria pulmonar. Sob estas condições de perfusão o coração continua viável durante várias horas (Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007; Bell, Mocanu e Yellon, 2011). Adicionalmente, parâmetros funcionais do coração podem ser analisados através, por exemplo, do registro da pressão intraventricular no ventrículo esquerdo utilizando-se transdutores de pressão.

O coração montado no sistema Langendorff é extensivamente utilizado em estudos fisiológicos/farmacológicos para estudo da função cardíaca e estudo da injúria

cardíaca induzida pela isquemia. A injúria isquêmica neste modelo pode ser induzida *in vitro* pela oclusão e reperfusão da artéria descendente anterior esquerda ou através da paralisação da perfusão de solução nutriente pelo coração, um protocolo denominado isquemia global (na qual todo o miocárdio é submetido à isquemia). Após o período de isquemia (por paralisação de fluxo), a perfusão de solução nutriente é reiniciada constituindo, então, o processo de reperfusão. A associação dos processos de isquemia e reperfusão promove a lesão cardíaca. Este modelo reproduz *in vitro* a participação do cálcio e de radicais livres na lesão do miocárdio induzida pela isquemia/reperfusão *in vivo* (Higgins e Blackburn, 1984; Watts, Maiorano e Maiorano, 1986; Garlick *et al.*, 1987; Pietri, Culcasi e Cozzone, 1989; Yasmin, Strynadka e Schulz, 1997; Zhang *et al.*, 2013).

Os efeitos de manipulações farmacológicas que modulem o comprometimento do miocárdio ao insulto isquêmico, podem ser avaliados através de parâmetros morfológicos (área de lesão induzida e histologia do miocárdio), bioquímicos (níveis de antioxidantes endógenos, atividade de enzimas), moleculares (expressão de genes, níveis de proteínas) e funcionais (fluxo coronariano, função contrátil do ventrículo esquerdo, pressão sistólica e diastólica).

1.2 *Uso de Plantas Mediciniais*

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, sendo consideradas um caminho promissor para a descoberta de novas drogas. Pressões evolutivas selecionaram metabólitos nas plantas com elevado valor adaptativo, os denominados metabólitos secundários. Durante muito tempo, foram considerados como produtos de excreção vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, com propriedades biológicas interessantes. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio (Simões *et al.*, 2004). São compostos cuja biossíntese está relacionada não à sobrevivência da espécie, mas à defesa e/ou comunicação entre espécies (Emery *et al.*, 2010).

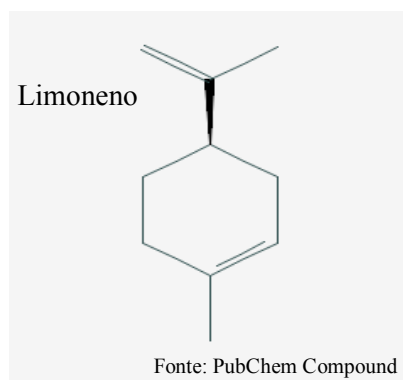
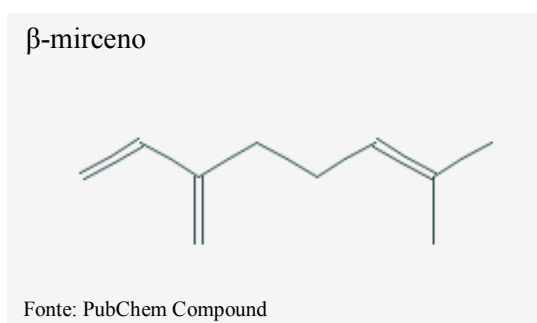
A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas e extração, isolamento e purificação de novos compostos de

fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (Di Stasi, 1996).

Os terpenos são compostos orgânicos produzidos de combinações de várias unidades-base contendo cinco carbonos (C₅), chamadas isopreno (Škrovánková, Misurcova e Machu, 2012). Dentre os metabólitos secundários, esta é a classe mais representativa, com cerca de 30.000 compostos conhecidos, produzidos por vegetais, animais, fungos e bactérias (Emery *et al.*, 2010). Além de ser o maior grupo de produtos naturais oriundos de plantas, contém a maior variedade de estruturas moleculares devido à diversidade de terpeno sintases e seus múltiplos produtos (Degenhardt, Kollner e Gershenzon, 2009).

Os principais terpenos encontrados em plantas medicinais são os monoterpenos (C₁₀) e os diterpenos (C₂₀). Os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais. Como exemplo de monoterpenos encontrados em plantas medicinais, estão o β -mirceno e o limoneno (figura 3), principais constituintes do óleo essencial de *Citrus aurantium* L., produto natural estudado neste trabalho.

Figura 3. Fórmula estrutural do β -mirceno e limoneno.



A planta *Citrus aurantium* L., (Figura 4) pertencente à família Rutaceae, é popularmente conhecida como laranja-amarga ou laranja-azedada, por conter um suco muito ácido e desagradável ao paladar. Na alimentação, a população utiliza sua casca em forma de compota ou outros doces. Para fins medicinais, são utilizadas as cascas dos frutos, as flores e folhas. Já foram descritos os usos populares medicinais desta espécie,

para o tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, como diurética, além de atuar contra taquicardia e reumatismo (Pio-Corrêa e Azeredo-Penna, 1978; Santos *et al.*, 1988; Sanguinetti, 1989) e como antiespasmódica (Cordeiro *et al.*, 1996).

A caracterização fitoquímica do óleo essencial da casca dos frutos de *Citrus aurantium* (OEC) foi realizada a partir de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massas. A análise apontou para a presença de três principais constituintes: limoneno (97,8%), β -mirceno (1,43%) e octanal (0,45%), demonstrando assim que a constituição do OEC é majoritariamente de terpenos (Moraes, 2008).

Em estudo realizado em nosso laboratório com o β -mirceno, constatou-se que este monoterpene possui atividade antioxidante por manter elevados os níveis de glutathione total e por reduzir os níveis de mieloperoxidase nos tecidos de estômago e duodeno de ratos (Bonamin, 2010).

A literatura científica dispõe de diversos trabalhos avaliando a ação cardioprotetora de terpenos em modelos de infarto do miocárdio (Shmist *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012; Hussain-Shaik *et al.*, 2012; Waldman *et al.*, 2013). Resultados relevantes tornam os terpenos promissores no campo da terapia preventiva e curativa da doença isquêmica do coração, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Considerando-se as ações antioxidantes de um dos componentes majoritários do OEC (β -mirceno), e a relevância dos terpenos como cardioprotetores, o presente estudo pretendeu avaliar o efeito antioxidante do OEC na prevenção da lesão miocárdica em ratos.

Figura 4. Foto da espécie arbórea de *Citrus aurantium* localizada no Departamento de Botânica da UNESP – Botucatu.



Foto: Flávia Bonamim

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a ação cardioprotetora preventiva do óleo essencial de *Citrus aurantium* contra o infarto do miocárdio em modelos experimentais em ratos

Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de infarto do miocárdio por isoproterenol;
- Caracterizar os efeitos do óleo essencial de *Citrus aurantium* no infarto do miocárdio, através de parâmetros bioquímicos e funcionais.

3. METODOLOGIA

3.1 Extração do óleo essencial de *Citrus aurantium* (OEC)

A coleta dos frutos (não maduros) foi realizada no período da manhã, nos meses de maio e junho de 2012, em espécies arbóreas localizadas no Departamento de Botânica da UNESP - campus de Botucatu (identificada no herbário do mesmo departamento como BOTU 23123). As cascas dos frutos foram submetidas à extração do óleo essencial por arraste a vapor d' água com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger (Marconi. S.A., Brasil). O material vegetal (casca dos frutos) foi misturado com água destilada no interior de um balão volumétrico (2L) e este recipiente foi disposto sobre uma manta aquecedora até a ebulição. O óleo essencial obtido foi armazenado em frasco âmbar a 5° C para a realização dos experimentos farmacológicos. A extração teve rendimento médio de 0,5 mL de óleo essencial para cada fruto.

3.2 Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 180g e 230g e idade entre 6 e 7 semanas foram utilizados para os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os animais utilizados neste trabalho foram provenientes da ANILAB – Animais de Laboratório (Paulínia/SP) e Biotério Central da UNESP – Botucatu e aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP - Botucatu) por pelo menos três semanas antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial para ratos Nuvilab® e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, protocolado sob o número 417-CEUA.

3.3 Experimentos

3.3.1 Modelo experimental de infarto do miocárdio por isoproterenol

a) *Padronização do modelo*

Inicialmente foi realizada a padronização da dose efetiva de ISO capaz de gerar lesão, assim como padrões de alteração morfológica que caracterizasse o dano induzido pela catecolamina.

Com a finalidade de se padronizar a dose de ISO capaz de induzir os danos no miocárdio, foram administradas duas doses da catecolamina: 2x85 mg/kg ou 2x100 mg/kg pela via subcutânea em intervalos de 24 horas entre as administrações. Em cada grupo experimental, foram analisados os parâmetros descritos a seguir.

Peso dos órgãos

O peso total do coração, VE, pulmões, fígado e rins foram mensurados para análise de possível instalação de edema induzido pela administração do ISO. Após 24 horas da última administração subcutânea da catecolamina ou salina, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os ratos foram abertos longitudinalmente em sua porção ventral, para retirada dos órgãos. O coração foi retirado, lavado em salina gelada e seco cuidadosamente em gaze para drenagem do excesso de salina. Pulmões, fígado e rins tiveram o excesso de tecido adiposo e vasos sanguíneos retirados e em seguida, efetuou-se a pesagem dos órgãos.

Após pesagem do coração, o VE foi isolado e pesado, e 3 mm de seu ápice foi reservado para análise histológica.

Histologia

O grau de injúria induzido pelo isoproterenol foi avaliado histologicamente a partir de cortes transversais de 3 mm de espessura do ápice do VE. As amostras foram fixadas em solução de formalina 10% (pH 7.4) durante 24 horas e mantidas em álcool 70% até a inclusão em parafina. Foram feitas secções de 3 locais distintos, medindo 4µm cada secção e coradas em hematoxilina e eosina (H&E). A severidade do infarto foi analisada conforme classificação de Albayrak *et al.* (2009), de acordo com o grau de inflamação, edema e desorganização da arquitetura tecidual (tabela 1).

Tabela 1. Classificação do grau de injúria do miocárdio de acordo com as alterações observadas microscopicamente (Albayrak *et al.*, 2009, modificado).

Classificação	Alterações
0	Sem danos
+	Mínimo infiltrado inflamatório, média desorganização do miocárdio (menor que 5%)
++	Moderado infiltrado inflamatório, moderada desorganização do miocárdio (5-20%)
+++	Infiltrado inflamatório amplo, severa desorganização do miocárdio (maior que 20%)

Após padronização do modelo de infarto por ISO, realizou-se os experimentos para teste do efeito do OEC na cardioproteção preventiva.

b) Efeito do OEC no infarto do miocárdio por isoproterenol

Protocolo experimental

O efeito preventivo do OEC foi testado de acordo com o protocolo a seguir. Os pré-tratamentos foram realizados oralmente durante 7 dias, de acordo com o grupo experimental (tabela 2). A dose de OEC utilizada foi de 250 mg/kg, previamente selecionada devido a sua eficácia na cicatrização de úlceras gástricas (no qual se observou ação antioxidante). Para solubilização do OEC foi utilizado como veículo o tween 80 a 8% em volume equivalente a 10 mL/kg.

Como grupos controles positivos, foram utilizados os pré-tratamentos com o propranolol (10 mg/kg) e anlodipina (5 mg/kg). O propranolol foi solubilizado em salina; a anlodipina foi utilizada na forma de suspensão, solubilizada em solução de metilcelulose a 0,05% em salina.

Tabela 2. Desenho experimental para avaliação do efeito cardioprotetor preventivo do OEC em ratos submetidos a infarto por isoproterenol.

Grupo	Número de animais por grupo experimental
Tween 80 a 8% + salina sc.	7
OEC 250 mg/kg + salina sc.	7
Propranolol 10 mg/kg + salina sc.	7
Anlodipina 5 mg/kg + salina sc.	7
Tween 80 a 8% + ISO sc.	8
OEC 250 mg/kg + ISO sc.	8
Propranolol 10 mg/kg + ISO sc.	8
Anlodipina 5 mg/kg + ISO sc.	8

Animais que receberam isoproterenol (ISO) pela via subcutânea (sc) para indução de infarto.

O infarto foi induzido pela administração de duas doses de 100 mg/kg de isoproterenol, solubilizado em solução salina em volume equivalente a 2 mL/kg, por via subcutânea. No sexto e sétimo dias de pré-tratamento com tween 80 a 8%, OEC, propranolol ou anlodipina, o ISO foi administrado em intervalo de 24 horas entre cada aplicação. Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina após 24 horas da 2ª dose de ISO.

Para avaliação da ação cardioprotetora do OEC no infarto do miocárdio experimental, foram utilizados neste trabalho dois controles positivos. Suas ações estão descritas a seguir.

Propranolol

Os β -bloqueadores são um amplo grupo de fármacos, que inibem competitivamente os receptores β . Apresentam propriedades farmacodinâmicas, dependendo de sua seletividade. Os bloqueadores β_1 seletivos reduzem a contratilidade cardíaca e a pressão sanguínea; os β_2 seletivos inibem o relaxamento do músculo liso nos vasos sanguíneos (Paravastu, Mendonca, da Silva, 2009). Considerando que o ISO atua como agonista nos três tipos de receptor β (β_1 , β_2 e β_3), o propranolol foi o fármaco β -bloqueador escolhido devido a sua afinidade tanto para receptores β_1 como para β_2 .

Anlodipina

É um fármaco bloqueador de canais de Ca^{2+} , comumente usado para tratamento de hipertensão e angina (Singh *et al.*, 2013). Age inibindo o influxo transmembrana de íons cálcio tanto na musculatura lisa vascular como no músculo cardíaco. A anlodipina é um vasodilatador arterial periférico, que causa redução na resistência vascular periférica e redução na pressão sanguínea (Derosa e Maffioli, 2011). Este tipo de bloqueador é muito utilizado em estudos com animais e são efetivos na redução da extensão de necrose do miocárdio e na preservação da função ventricular após oclusão da coronária. Os efeitos da anlodipina são mediados pela redução na pós-carga (levando a diminuição no consumo de oxigênio), pela vasodilatação coronariana, e pela prevenção de dano celular (reduz a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular durante a isquemia) (Held, Yusuf, Furberg, 1989).

c) *Análises*

I. Coração

O coração foi retirado, lavado em salina gelada para retirar o excesso de sangue, seco rapidamente em gaze, pesado e separado em ventrículo esquerdo e ventrículo direito, que tiveram seus pesos também determinados. O ventrículo direito foi

imediatamente levado à estufa a 56 °C, por 48 horas, para quantificação de edema (peso inicial menos peso final). O ventrículo esquerdo de cada coração foi então cortado transversalmente em 3 partes. O ápice (3 mm) foi reservado para histologia; uma fatia de 2 mm para quantificação da área de lesão e o restante destinado às análises teciduais de glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO).

II. Edema

Para se avaliar o edema induzido pelo isoproterenol, foram avaliados os pesos dos seguintes órgãos: pulmões, fígado, rins e adrenais. Para uma análise comparativa foi analisado o peso dos órgãos entre os diferentes pré-tratamentos dos animais com e sem indução de infarto por ISO.

III. Análises séricas

Após a eutanásia dos animais em guilhotina, o sangue foi coletado, colocado em tubos e centrifugado a 4°C por 15 minutos a 1000 x g para separação do soro. O material foi então aliquotado em tubos e armazenados a -80°C. Com este material foi realizada a determinação dos níveis de ureia, creatinina, AST, ALT, colesterol total, HDL e triglicerídeos. Para análise sérica foram utilizados reagentes da marca Katal (São Paulo, Brasil) e o equipamento utilizado foi o Cobas Mira Plus da *Roche Diagnostic Systems* (São Paulo, Brasil).

A análise de CK-MB foi determinada por método imunoenzimático (kit comercial da *Cloud-clone corporation* – Houston, EUA).

IV. Análises teciduais

Amostras do VE (aproximadamente 90mg) foram coletadas de cada animal dos diferentes grupos e armazenadas em tubos a -80° C, para análise de MDA, MPO e GSH.

Malondialdeído

O nível de peroxidação lipídica do miocárdio de ratos dos diferentes grupos de tratamento foi avaliado através da determinação do conteúdo de MDA tecidual. O MDA é formado endogenamente como produto da decomposição oxidativa de diferentes substratos como amionoácidos e carboidratos complexos e como metabólito secundário na via de produção de prostaglandinas, porém, a principal fonte de MDA tecidual é proveniente da oxidação de ácidos graxos com três ou mais ligações duplas (Bird e

Draper, 1984). Os níveis teciduais de MDA foram determinados por espectrofotometria do produto de reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, sob pH ácido uma molécula de MDA da amostra reage com duas moléculas de TBA dando origem a um produto de coloração rosada com máxima absorção de luz entre os comprimentos de onda 532-535 nm (Raharjo e Sofos, 1993).

Para determinação de peroxidação lipídica, as amostras do ápice do VE foram processadas em homogeneizador tipo moinho (MA099, Marconi[®]) em soluções-tampão a 10°C, de acordo com o protocolo utilizado. Foram avaliados três distintos protocolos para quantificação de malondialdeído (Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1978; Zingarelli *et al.*, 1999; Rozemberg *et al.*, 2006), todos baseados na reação colorimétrica entre TBA e MDA. Entre os reagentes utilizados para a reação, estão o dodecil-sulfato de sódio (SDS) 8,1%, ácido acético 20% e TBA 0,8%. Nos três protocolos a reação ocorreu em meio ácido (pH 3,5) a 95°C durante 60 minutos, e a coloração formada foi lida em espectrofotômetro a 532nm.

Na técnica utilizada por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978), a amostra foi homogeneizada em KCl 1,15%, na proporção 1:10, e após adição dos reagentes, levada a aquecimento (95°C) por 60 minutos. Depois de resfriadas, as amostras foram acrescidas de *n*-butanol e piridina (15:1), para ocorrer a separação entre a fase orgânica das demais substâncias, minimizando a interferência destas na leitura do MDA.

O método para análise de peroxidação lipídica realizada por Rozemberg *et al.* (2006), utilizou homogenato 20% em PBS e adicionou BHT (butil-hidroxi-tolueno) como um dos reagentes participantes da reação aquecida. O BHT teve a função de minimizar a peroxidação durante o procedimento. Ao término da reação, não foram acrescidos reagentes para separação da fase orgânica, como realizado por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978). Zingarelli *et al.* (1999) prepararam o homogenato a 20% em solução de KCl 1,15% e não utilizaram nenhum composto para separação da fase orgânica ou de caráter antioxidante, como o BHT.

Mieloperoxidase

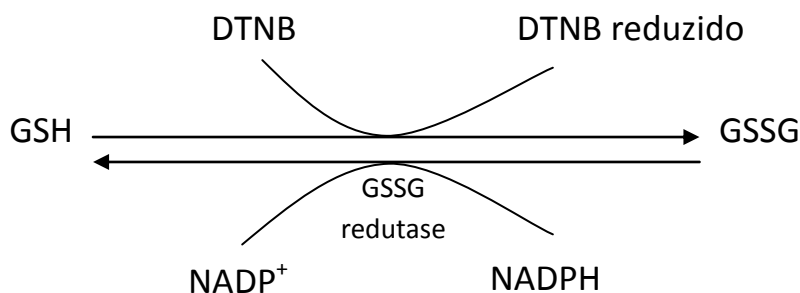
A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima pró-oxidante presente em neutrófilos e está envolvida em passos metabólicos centrais correlacionados ao processo de inflamação. Esta enzima é capaz de converter peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, um produto responsável pela oxidação de inúmeras macromoléculas como lipoproteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, dentre outros. A atividade da MPO é

proporcional ao número de neutrófilos infiltrados no miocárdio. Para a sua determinação, foi utilizado o tampão de reação HTAB 0,5% em PBS 50 mM (pH 6.0) aplicado ao homogenato das amostras. O HTAB atua como detergente, lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, liberando-as na solução. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com peróxido de hidrogênio, sendo que uma unidade de MPO é capaz de degradar 1 nmol/minuto de H₂O₂ a 25°C (Krawisz *et al.*, 1984). A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorbância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro.

Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona, juntamente com outros compostos, como as vitaminas, compõe a segunda linha de defesa antioxidante (Cnubben *et al.*, 2001) e sua queda é indicativa de lesão. Este tripeptídeo, composto de aminoácidos não essenciais, é descrito como um importante agente antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999). Amostras do coração dos ratos submetidos ao infarto do miocárdio induzido por isoproterenol foram coletadas, pesadas e mantidas em 1 ml de TCA 5% (ácido tricloroacético) a -20°C até o momento da análise. Foram então homogeneizadas em turrax (Polytron®) em solução de TCA 5% (1:20), centrifugadas duas vezes e seu sobrenadante utilizado para a determinação de GSH. O método se baseia na oxidação total da glutathiona com o uso do reativo DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico), seguida de redução da forma oxidada com a enzima glutathiona redutase e NADPH (Anderson, 1985) (figura 5). A concentração da glutathiona reduzida foi determinada pela velocidade de redução do DTNB, que gera uma coloração amarelada detectável em espectrofotômetro a 412 nm.

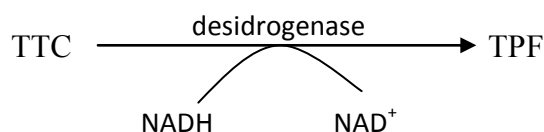
Figura 5. Reações ocorridas durante a determinação de glutatona reduzida, segundo protocolo de Anderson, 1985.



DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; NADP: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo.

V. Área de lesão

A área de lesão do miocárdio foi analisada utilizando-se o método de coloração com 2,3,5-tetracloroeto de trifetil-tetrazólio (TTC). O TTC (composto fotossensível) é reduzido enzimaticamente na mitocôndria a precipitações do corante 1,3,5-trifenil-formazan (TPF), na presença de desidrogenases e NADH (um doador de elétrons) (Csonka *et al.*, 2010).



Esta reação ocorre apenas em tecidos vivos com respiração mitocondrial intacta, pois a queda de NADH (necessário à atividade das desidrogenases) após a morte celular, praticamente exclui a reação de TTC a TPF. Tecidos com níveis normais de desidrogenases são corados de vermelho, enquanto que a zona necrótica permanece não corada, devido à perda da enzima (Csonka *et al.*, 2010)

Para quantificação da área de necrose do miocárdio, foram feitos cortes transversais do VE de 2 mm de espessura e corados em solução de TTC 1% em PBS (pH 7.4) a 37°C, por 20 minutos. Após o período de incubação, os cortes foram isolados e mantidos em solução de formalina 10% (pH 7.4) por 20 minutos, à temperatura ambiente, para evidenciar o contraste entre tecido viável (vermelho) e não viável (pálido). Os cortes foram então prensados entre duas lâminas histológicas e

fotografados para quantificação da porcentagem da área de lesão no *software* de imagem AVSoft BioView 5. A área de lesão foi quantificada e normalizada à área total do corte (área em risco=área do miocárdio).

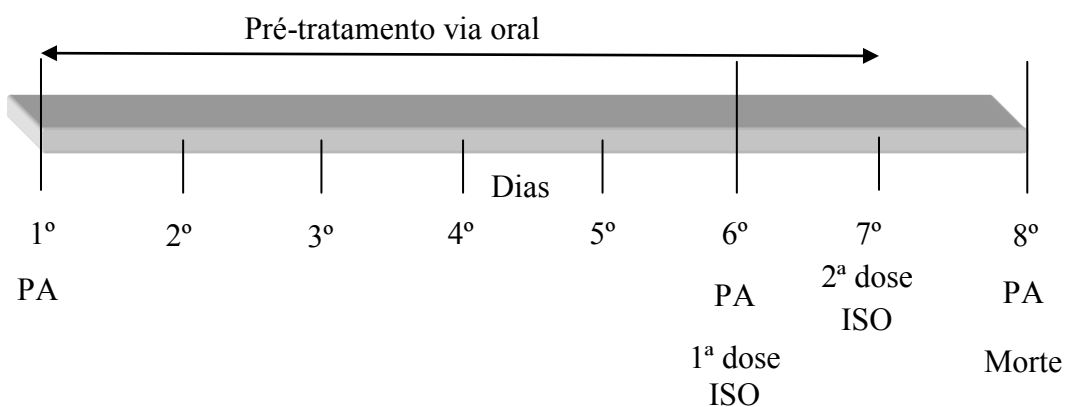
VI. Parâmetros funcionais

Para análise funcional das alterações induzidas pelo ISO e/ou pelos tratamentos, realizou-se um experimento para aferição da pressão arterial caudal e pressão intraventricular em coração isolado. Para isto, utilizou-se ratos Wistar machos na mesma idade e faixa de peso do experimento anterior (6 a 7 semanas, 180g a 230g).

a) Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal foi aferida em três momentos distintos. A primeira foi realizada anteriormente ao início do tratamento; a segunda no 6º dia (antes da primeira dose de isoproterenol ou salina); e a terceira, no momento anterior à eutanásia (figura 6). O aparelho utilizado foi um pletismógrafo de cauda versão 2.11 do fabricante Insight[®] (Ribeirão Preto, Brasil), e o registro efetuado pelo *software* do próprio equipamento. Para dilatação da artéria caudal, cada animal foi mantido por 10 minutos em bioaquecedor antes da aferição da pressão arterial.

Figura 6. Protocolo de tratamento e aferição de pressão arterial caudal.



PA: pressão arterial; ISO: isoproterenol

b) Pressão intraventricular

Ao final do período de pré-tratamento, os animais foram anestesiados com quetamina (70mg/kg im.) e xilazina (70mg/kg im.) e heparinizados (100UI/animal ip.) 5 minutos antes da eutanásia e submetidos ao protocolo.

Os corações foram rapidamente retirados e lavados em solução de Krebs a 37°C. A artéria aorta foi localizada e conectada ao sistema de perfusão através de uma cânula fabricada com agulha hipodérmica sem bisel (16 gauge). O coração foi então submetido à perfusão retrógrada a um volume constante de 10 ml/min com solução de Krebs aerada (95% O₂ + 5% CO₂) a 37°C através de bomba peristáltica (Minipuls 3 – Gilson®). A solução de Krebs utilizada foi composta de NaCl 119mM, KCl 4,7mM, CaCl₂ 1,8mM, KH₂PO₄ 1,2mM, MgSO₂ 1,2mM, glicose 11mM e NaHCO₃ 25mM, em pH 7,4 e mantida a 37°C, aerada com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂).

A pressão ventricular esquerda foi medida por meio de um balão não-elástico preenchido por água, inserido no ventrículo esquerdo (via átrio esquerdo), conectado a um transdutor de pressão (MP36 – Biopac systems, Inc.) e registrado pelo *software* BSL Pro 3.7.3. A pressão inicial foi ajustada para obtenção da pressão diastólica final igual a 10 mmHg. Foram analisados dados obtidos durante 15 minutos, de batimentos por minuto (BPM), pressão sistólica, diastólica, (expressas em mmHg) e taxas máximas (velocidade) de contração (+dP/dt_{máx}) e de relaxamento (-dP/dt_{máx}), expressas em mmHg/s. A pressão desenvolvida ventricular esquerda mede a força da contratilidade ventricular, e a relação entre pressão desenvolvida e tempo (dP/dt_{máx}) reflete o poder de contratilidade do coração (Elmes *et al.*, 2008).

VII. Substâncias utilizadas

O cloridrato de isoproterenol (*DL-hydrochloride isoprenaline*), a N-acetilcisteína e o 2,3,5-tetracloroeto de trifetil-tetrazólio (TTC) foram obtidos da empresa Sigma Aldrich® (Saint Louis, EUA); o hidrocloreto de (±)-propranolol foi obtido da empresa RBI *Chemical Co.* (Saint-Louis, EUA) em frasco de 5g. O besilato de anlodipina foi obtido da empresa Rakshit Drugs (Índia), em frasco contendo 100mg do composto. Todos os compostos possuem grau de pureza maior que 99%.

3.3.2. Modelo experimental de infarto do miocárdio por isquemia/reperfusão em coração isolado

Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos, pré-tratados durante 7 dias com salina (10mL/kg), tween 80 a 8% (10mL/kg), OEC (250mg/kg) ou N-acetil-cisteína (NAC) (10mg/kg). Cada grupo foi subdividido em dois, sendo que uma metade teve o coração submetido pelo processo de isquemia/reperfusão, e a outra metade não. Ao final do período de pré-tratamento, os animais foram anestesiados com quetamina (70mg/kg im.) e xilazina (70mg/kg im.) e heparinizados (100UI/animal ip.) 5 minutos antes da eutanásia e submetidos ao protocolo. Neste estudo foi avaliada a área de lesão decorrente do processo de isquemia/reperfusão.

A N-acetil-cisteína ($C_5H_9NO_3S$), um aminoácido sulfurado, foi a substância escolhida para controle positivo devido ao seu alto poder antioxidante, sequestrador de radicais livres (Meeran, Prince, Basha, 2012), principais agentes lesivos neste modelo de infarto do miocárdio (Garlick *et al.*, 1987). O composto foi obtido da empresa Sigma Aldrich® (Saint Louis, EUA), com grau de pureza maior que 99%.

Protocolo experimental

Os corações foram rapidamente retirados e imersos em solução de Krebs a 37°C com a seguinte composição: NaCl 119mM, KCl 4,7mM, $CaCl_2$ 1,8mM, KH_2PO_4 1,2mM, $MgSO_2$ 1,2mM, glicose 11mM e $NaHCO_3$ 25mM, em pH 7,4. A artéria aorta foi localizada e conectada ao sistema de perfusão através de uma cânula fabricada com agulha hipodérmica sem bisel (16 gauge). O coração foi então submetido à perfusão retrógrada a um volume constante de 10ml/min com solução de Krebs aerada (95% O_2 + 5% CO_2) a 37°C através de bomba peristáltica (Minipuls 3 – Gilson®). O excesso de tecido adiposo, vasos sanguíneos, pulmão e timo aderidos ao coração foram retirados após estabelecida a perfusão do coração, sendo o tempo máximo entre a retirada do coração e o início da perfusão de 90 segundos.

Após quinze minutos de perfusão (estabilização) a bomba peristáltica foi desligada e os corações foram submetidos a um período de 30 minutos de isquemia normotérmica (imersos em solução salina a 37°C). Decorridos os 30 minutos de isquemia a bomba de perfusão foi reativada e os corações foram reperfundidos com solução Krebs (10ml/minuto) por um período de 60 minutos, tempo suficiente para se

induzir lesão isquêmica (Schwarz *et al.*, 2000; Ferrera *et al.*, 2009). Os corações dos animais do grupo sem isquemia permaneceram durante uma hora e 45 minutos em perfusão constante. Após os 60 minutos de reperfusão o coração foi retirado do sistema, cortado transversalmente em 4 fatias de 2 mm (do ápice em sentido aos átrios) e corado em TTC 1% para visualização da área de lesão, como descrito anteriormente.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Para as análises paramétricas, os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de Dunnett ou Tukey com nível de significância mínimo para valor de $p < 0,05$; para comparação entre dois grupos, foi realizado teste t não emparelhado, com nível de significância mínimo para valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 Modelo experimental de infarto do miocárdio por isoproterenol

4.1.1 Avaliação do pré-tratamento com OEC no infarto induzido pelo isoproterenol

Peso corpóreo e peso dos órgãos

Os efeitos do isoproterenol e dos pré-tratamentos no peso corpóreo, peso relativo do coração e VE e porcentagem de líquido do ventrículo direito são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Peso corpóreo, peso relativo do coração e ventrículo esquerdo e porcentagem de fluido presente em ventrículo direito de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol (n=8).

Tratamento	Peso corpóreo (g)	Ganho de peso (1° ao 8° dia)	Coração	VE	Fluido do VD (%)
Tween + sal	245,5±4,6	29,2±1,5	0,3±0,004	0,22±0,003	75,8±0,3
OEC + sal	233,2±6,0	31,3±1,7	0,3±0,01	0,21±0,005	75,5±0,3
Propranolol + sal	242,0±4,6	30,5±2,2	0,3±0,005	0,21±0,004	75,4±0,2
Anlodipina + sal	234,5±5,2	28±2,2	0,3±0,004	0,21±0,002	75,2±0,2
Tween + ISO	230,4±6,8	6,8±3,5 ^a	0,49±0,02 ^a	0,34±0,016 ^a	78,7±0,4 ^a
OEC + ISO	227,2±3,6	8,7±1,3 ^b	0,49±0,02 ^b	0,34±0,013 ^b	77,6±0,7 ^b
Propranolol + ISO	222,0±3,8 ^c	13±2,8 ^c	0,47±0,02 ^c	0,33±0,012 ^c	77,8±0,3 ^c
Anlodipina + ISO	218,4±4,1 ^d	3,8±2,6 ^d	0,52±0,02 ^d	0,37±0,01 ^d	78,3±0,3 ^d

Média ± e.p.m. Letras (a-d): teste t não emparelhado a: p<0,05 vs. tween + sal; b: p<0,05 vs. OEC sal; c: p<0,05 vs. propranolol + sal; d: p<0,05 vs. anlodipina + sal. ANOVA seguido de Dunnett entre animais salina ou infartados: sem diferença estatisticamente significativa. Sal: ratos que receberam salina sc. ISO: ratos que receberam isoproterenol sc. VE: ventrículo esquerdo. VD: ventrículo direito.

A tabela 3 mostra que o isoproterenol reduziu significativamente o ganho de peso nos animais infartados, em relação aos seus respectivos controles (salina). A administração da catecolamina promoveu aumento no peso do coração e VE, e nenhum

pré-tratamento utilizado foi capaz de impedir estas alterações. O conteúdo de líquido do VD foi significativamente elevado (aproximadamente 3%) pela administração de isoproterenol e este efeito não foi alterado pelo tratamento com OEC, propranolol ou anlodipina.

A tabela 4 apresenta o peso relativo dos pulmões, fígado e rins e peso absoluto das adrenais após pré-tratamento por 7 dias e administração de isoproterenol ou salina.

Tabela 4. Peso relativo de diferentes órgãos de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol (n=8).

Tratamento	Pulmões	Fígado	Rins	Adrenais (mg)
Tween + sal	0,005±0,0004	0,041±0,001	0,007±0,0003	44,6±1,8
OEC + sal	0,005±0,0003	0,047±0,002*	0,008±0,0002	42,2±2,3
Propranolol + sal	0,006±0,0006	0,042±0,001	0,008±0,0002	38,5±1,1
Anlodipina + sal	0,005±0,0003	0,040±0,001	0,008±0,0001	39,8±2,4
Tween + ISO	0,006±0,0007	0,041±0,001	0,008±0,0005	47,0±5,1
OEC + ISO	0,007±0,0005 ^b	0,044±0,0006 [#]	0,009±0,0001 ^b	53,4±1,8 ^b
Propranolol + ISO	0,006±0,0005	0,040±0,0008	0,008±0,0001	50,6±2,2 ^c
Anlodipina + ISO	0,007±0,0008 ^d	0,040±0,0009	0,008±0,0002	58,3±1,5 ^{d,#}

Média ± e.p.m. Sal: ratos que receberam salina sc. ISO: ratos que receberam isoproterenol sc. Letras (b-d): teste t não emparelhado b: p<0,05 vs. OEC + sal; c: p<0,05 vs. propranolol + sal; d: p<0,05 vs. anlodipina + sal. Símbolo *: p<0,05 ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos salina (vs. tween + sal) e símbolo #: p<0,05 ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos isoproterenol (vs. tween + ISO).

O tratamento de ratos por 7 dias com veículo, OEC, propranolol ou anlodipina não alterou o peso dos pulmões, rins ou adrenais. O pré-tratamento com OEC (250 mg/kg) realizado por gavagem durante 7 dias aumentou o peso fígado, tanto em relação aos grupos não infartados (salina) quanto em relação aos grupos infartados (isoproterenol).

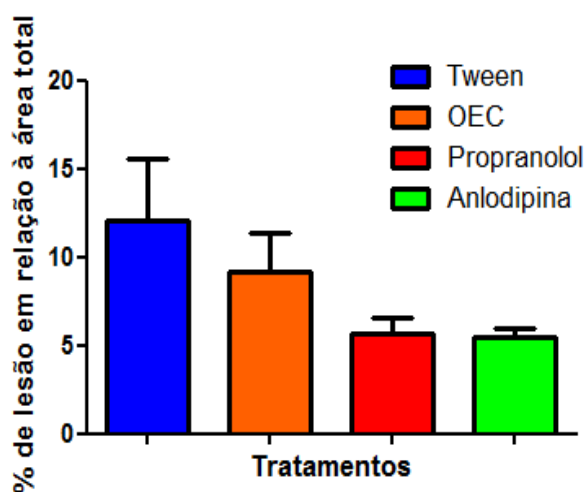
O isoproterenol na dose utilizada não induziu alterações no peso dos órgãos avaliados (tween + ISO). Entretanto, em ratos tratados com o OEC (250 mg/kg) e submetidos ao infarto por isoproterenol houve aumento significativo ($p < 0,05$) no peso do fígado, pulmões, rins e adrenais. Após a administração de isoproterenol, o propranolol causou a elevação no peso das adrenais ($p < 0,05$) e o pré-tratamento com anlodipina aumentou significativamente os pesos dos pulmões e adrenais ($p < 0,05$).

Área de lesão do miocárdio

A área de lesão do miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos pré-tratados com veículo, OEC, propranolol ou anlodipina e submetidos ao protocolo de indução de infarto está representada na figura 7. A análise dos cortes transversais do VE mostram que os diferentes tratamentos não foram capazes de reduzir a área de lesão induzida pelo isoproterenol (figura 7).

Amostras do miocárdio de animais submetidos ao tratamento com veículo, OEC, propranolol ou anlodipina durante 7 dias mas não submetidos ao procedimento de infarto com isoproterenol não apresentaram lesão (dados não apresentados).

Figura 7. Porcentagem de área de infarto em relação à área total em risco, em ratos pré-tratados por 7 dias, submetidos ao infarto por isoproterenol (n=8).



Média \pm e.p.m. ANOVA seguido de Dunnett: $p > 0,05$.

Análises séricas

O isoproterenol aumentou os níveis séricos de CK-MB (marcador de necrose miocárdica), AST, ALT (marcadores de lesão hepática) ureia e creatinina (marcadores de lesão renal) ($p < 0,05$) (tabela 5). O pré-tratamento com o OEC não preveniu as alterações induzidas pelo infarto. O pré-tratamento com propranolol protegeu contra o aumento dos níveis de CK-MB ($p < 0,05$ – teste t não emparelhado entre o grupo tween infartado, apesar de não apresentar diferença estatística com o teste ANOVA seguido de Dunnett) e seus níveis séricos de ureia foram significativamente aumentados em relação ao controle (tween ISO). A anlodipina protegeu contra as alterações séricas induzidas pelo isoproterenol, com exceção da ureia, que teve seus níveis elevados em relação ao seu controle (anlodipina sal).

Tabela 5. Análises séricas de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias, com indução ou não de infarto por isoproterenol.

Tratamento	CK-MB (ng/mL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
N	4	8	8	8	8
Tween sal	31,7±4,7	51,9±2,7	103,9±3,9	49,7±2,2	0,314±0,014
OEC sal	41,1±3,5	51,3±1,8	114,9±7,09	45,9±1,4	0,313±0,013
Propranolol sal	36,1±3,2	54,1±4,4	108,8±5,7	46,8±1,9	0,313±0,013
Anlodipina sal	41,8±1,8	58,9±3,6	118,9±4,9	50,0±2,0	0,314±0,014
Tween ISO	56,3±4,7 ^a	69,8±7,6 ^a	251,2±43,8 ^a	59,2±5,7 ^a	0,417±0,04 ^a
OEC ISO	51,6±4,4	66,3±2 ^b	196,6±33,4 ^b	66,0±2,5 ^b	0,375±0,025 ^b
Propranolol ISO	42,4±1,7	64,6±3,9	159,3±23,3	72,3±1,9 ^{c, #}	0,413±0,023 ^c
Anlodipina ISO	41±3,6 [#]	69,6±2,7	178,6±33,0	62,0±3,0 ^d	0,343±0,20

Média ± e.p.m. Sal: ratos que receberam salina sc. ISO: ratos que receberam isoproterenol sc. Letras (a-d): teste t não emparelhado a: $p < 0,05$ vs. tween sal; b: $p < 0,05$ vs. OEC sal; c: $p < 0,05$ vs. propranolol sal; d: $p < 0,05$ vs. anlodipina sal. Símbolo #: $p < 0,05$ ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos isoproterenol (vs. tween ISO).

Os efeitos do isoproterenol e dos pré-tratamentos realizados no perfil lipídico estão listados na tabela 6. Os ratos infartados tratados com veículo (tween ISO) apresentaram aumento de colesterol total ($p<0,05$) e níveis inalterados de triglicerídeos e HDLc. O OEC (250mg/kg) e o propranolol (10mg/kg) não evitaram a elevação de colesterol total, mas após o infarto causaram uma queda significativa nos níveis de triglicerídeos, quando comparado aos respectivos controles (sem infarto). O pré-tratamento por 7 dias com a anlodipina evitou o aumento de colesterol total induzido pelo isoproterenol e reduziu significativamente os triglicerídeos após a administração do beta-agonista.

Tabela 6. Perfil lipídico sérico de ratos Wistar machos pré-tratados por 7 dias e com indução ou não de infarto por isoproterenol (n=8).

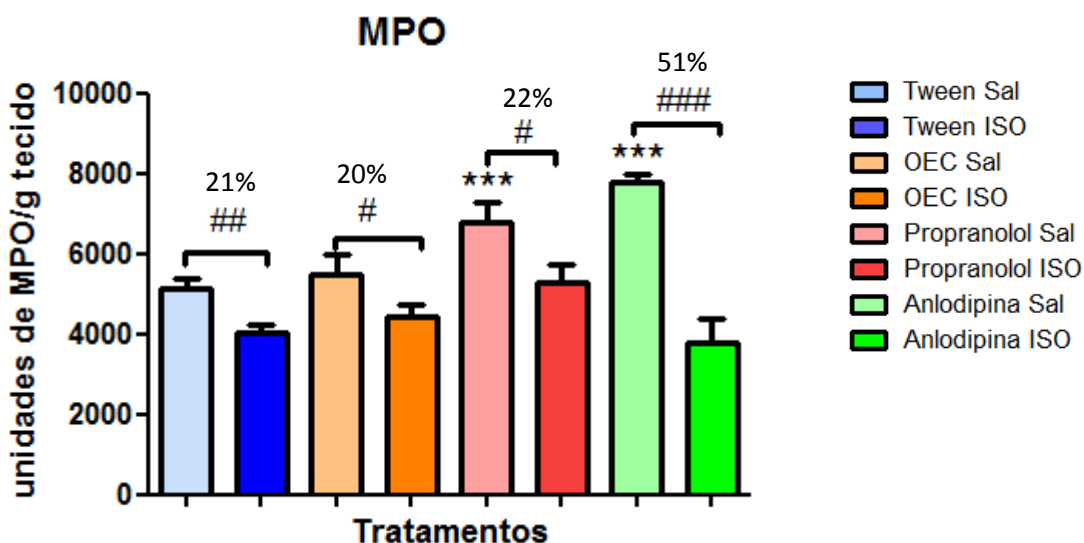
Tratamento	Colesterol (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	TG (mg/dL)
Tween + sal	50,0±1,0	37,2±0,6	106,4±9,5
OEC + sal	56,8±1,7	40,8±0,8	115,8±8,2
Propranolol + sal	55,0±3,1	40,5±1,5	105±1,3
Anlodipina + sal	60,8±2,0 *	42,3±1,3*	100,5±8,7
Tween + ISO	77,3±4,2 ^a	41,5±1,6	80,3±8,0
OEC + ISO	67,8±3,9 ^b	40,3±1,3	72,7±4,3 ^b
Propranolol + ISO	66,3±2,1 ^c	41,3±0,6	77,8±5,9 ^c
Anlodipina + ISO	62,0±4,2 [#]	38,4±1,0	67,4±5,2 ^d

Média ± e.p.m. Sal: ratos que receberam salina sc. ISO: ratos que receberam isoproterenol sc. Letras (a-d): teste t não emparelhado a: $p<0,05$ vs. tween + sal; b: $p<0,05$ vs. OEC + sal; c: $p<0,05$ vs. propranolol + sal; d: $p<0,05$ vs. anlodipina + sal. Símbolo *: $p<0,05$ ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos salina (vs. tween + sal) e símbolo #: $p<0,05$ ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos isoproterenol (vs. tween + ISO).

Análises teciduais de malondialdeído, mieloperoxidase e glutathiona reduzida

As alterações teciduais analisadas no presente trabalho estão apresentadas nas figuras 8 a 10. Os níveis cardíacos de MPO encontram-se elevados após pré-tratamento por 7 dias com propranolol e anlodipina ($p < 0,001$). A administração de isoproterenol causou a redução neste marcador de infiltração neutrofílica ($p < 0,05$), em todos os grupos. Dentre os pré-tratamentos, a anlodipina intensificou a redução de MPO induzida pela administração de isoproterenol.

Figura 8. Quantificação de mieloperoxidase em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos com indução ou não de infarto por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.

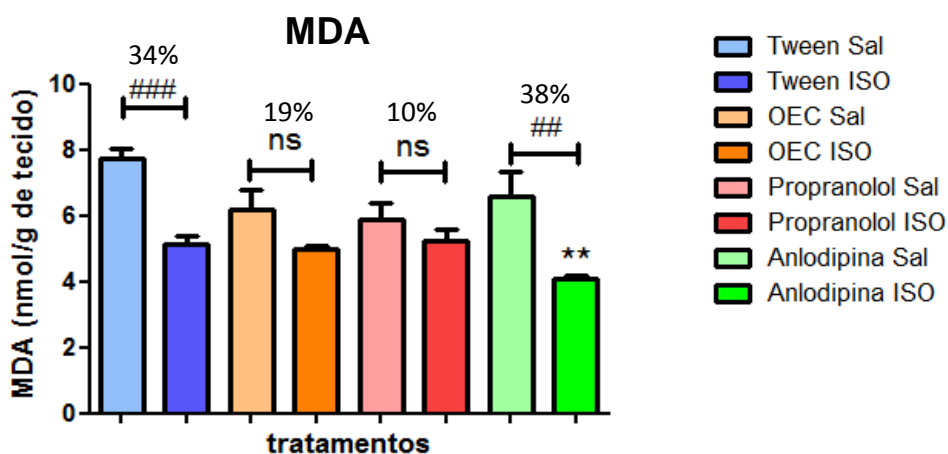


Média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$ – ANOVA seguido de Dunnett (vs. tween sal); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$ - teste t não emparelhado entre mesmo pré-tratamento. As porcentagens refletem a redução de MPO induzida pelo isoproterenol.

A redução de mieloperoxidase foi semelhante nos grupos tratados com tween, OEC e propranolol, porém maior no tratado com anlodipina.

A determinação de peroxidação lipídica pela análise de malondialdeído (Zingarelli *et al.*, 1999) está representada na figura 9.

Figura 9. Quantificação de malondialdeído em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos com indução ou não de infarto por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.

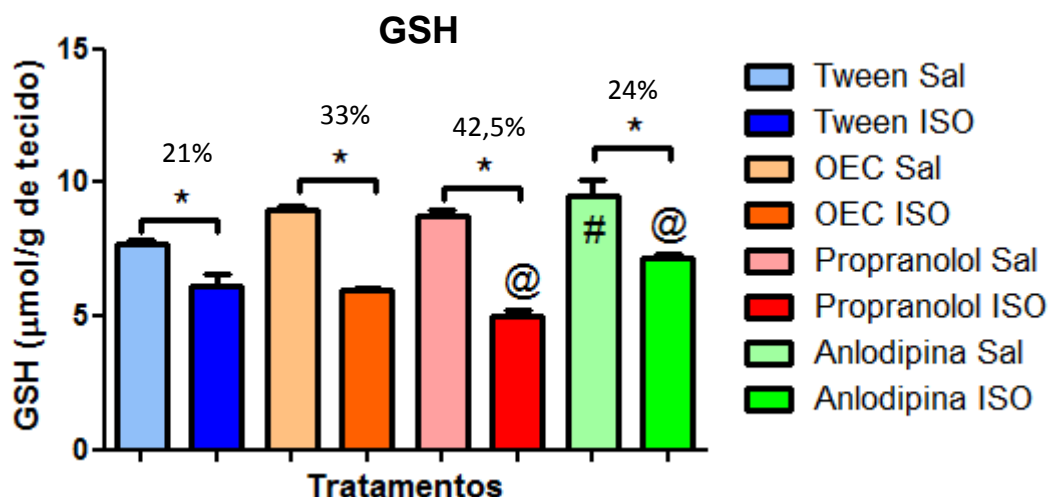


Média \pm e.p.m. ## p <0,01, ### p <0,001 - teste t não emparelhado entre mesmos tratamentos; ** p <0,01 ANOVA seguido de Dunnett (vs. tween + ISO). ns: sem diferença estatisticamente significativa. As porcentagens refletem a redução de MDA induzida pelo isoproterenol.

A indução de infarto por isoproterenol reduziu significativamente (p <0,001) os níveis de MDA no VE dos animais. A reprodutibilidade destes resultados foi testada empregando dois outros protocolos distintos de preparação das amostras do miocárdio ventricular (Apêndice 1). O pré-tratamento com OEC e propranolol evitaram esta queda, enquanto que a anlodipina não preveniu a redução de MDA induzida pelo infarto (p <0,01).

Dentre os pré-tratamentos realizados, apenas a anlodipina aumentou os níveis de GSH após 7 dias de pré-tratamento (figura 10).

Figura 10. Níveis de glutathiona reduzida em ventrículo esquerdo de ratos com indução ou não de infarto por isoproterenol, pré-tratados por 7 dias.



Média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ teste t não emparelhado; # $p < 0,05$ ANOVA seguido de Dunnett entre grupos salina vs. controle (Tween); @ $p < 0,05$ ANOVA seguido de Dunnett entre grupos infartados vs. controle (Tween). Sal: animais não infartados; ISO: animais infartados por isoproterenol. As porcentagens refletem a redução de GSH induzida pelo isoproterenol.

Após indução de infarto por isoproterenol, a glutathiona reduzida teve seus níveis diminuídos em todos os grupos ($p < 0,05$), quando comparado aos animais submetidos ao mesmo pré-tratamento. Os animais infartados e pré-tratados com propranolol foram aqueles que apresentaram as maiores reduções dos níveis de GSH enquanto que o pré-tratamento com anlodipina foi efetivo em minimizar a queda dos níveis de GSH (figura 10).

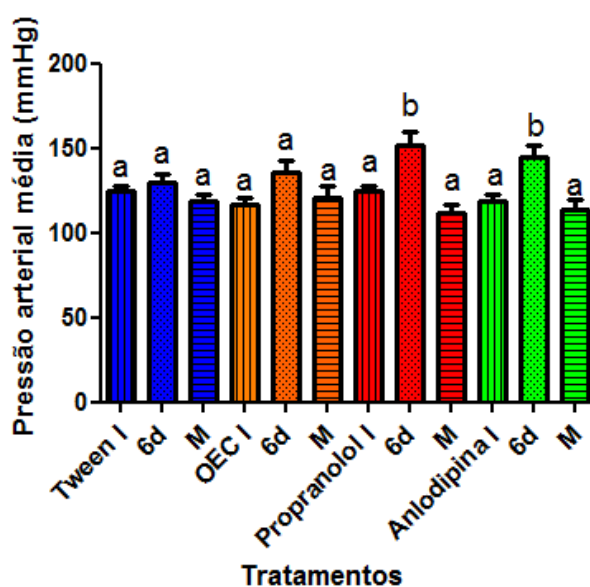
Análise funcional

Para complementar o estudo das alterações bioquímicas e morfológicas induzidas pelo isoproterenol e pelos tratamentos realizados, foi incorporada a análise de parâmetros hemodinâmicos no desenho experimental.

Pressão arterial caudal

A pressão arterial média (PAM) apresentou aumento no decorrer do pré-tratamento em animais pré-tratados com propranolol e anlodipina (figura 11).

Figura 11. Pressão arterial média (caudal) nos diferentes grupos com indução de infarto por isoproterenol, durante o período de tratamento.



Média \pm erro padrão da média. Letras diferentes (entre mesmo grupo de tratamento): $p < 0,05$ ANOVA seguido de Tukey. I: aferição da pressão no primeiro dia de tratamento; 6d: aferição da pressão 6º dia de tratamento; M: aferição da pressão antes da eutanásia (n=6-8).

Após as duas doses de isoproterenol (100mg/kg) no 6º e 7º dias, a pressão arterial média dos animais pré-tratados com propranolol ou anlodipina foi reduzida aos níveis anteriores ao início do tratamento (figura 11). Nos animais tratados com tween ou OEC o isoproterenol não reduziu significativamente a PAM. Os valores de pressão sistólica e diastólica apresentaram o mesmo perfil da PAM e são apresentadas no Apêndice 2.

Pressão intraventricular

A função cardíaca dos animais submetidos ou não ao infarto por isoproterenol foi avaliada em coração isolado no sistema Langendorff.

Os pré-tratamentos com OEC, propranolol e anlodipina *per se* não induziram qualquer alteração nos parâmetros funcionais analisados (tabela 7). A administração de isoproterenol em ratos pré-tratados com tween, OEC ou propranolol não causou alterações na função cardíaca nos animais infartados.

Tabela 7. Índices de função cardíaca do ventrículo esquerdo (*ex-vivo*) após pré-tratamento durante 7 dias e indução de infarto por isoproterenol.

Grupo	N	PSVE mmHg	PDVE mmHg	+dP/dt_{max} mmHg/s	-dP/dt_{max} mmHg/s	FC bpm
Tween Sal	7	61,7±10,1	-7,6±1,3	1244±183	-667±109	249±4,7
OEC Sal	5	43,5±6,2	-4,0±2,5	892±186	-469±74	222±17,4
Propranolol Sal	5	64,2±5,6	-9,1±1,3	1406±185	-808±89	234±13,2
Anlodipina Sal	5	53,9±11,1	-6,2±3	1115±217	-649±133	290±16,7
Tween ISO	8	69,6±6,8	-8,3±2,8	1571±172	-845±86	243±3,8
OEC ISO	6	70,0±16,0	-8,7±1,9	1782±328	-901±192	234±6,9
Propranolol ISO	6	76,3±0,8	-12,7±1,8	1833±136	-940±102	258±3,8
Anlodipina ISO	6	84,7±8,1	-10,8±0,6	2189±259 ^a	-1036±152	233±6,0 ^a

Média ± e.p.m. Letra a: p<0,05 teste t não-emparelhado (vs. anlodipina sal). PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDVE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt_{max} e -dP/dt_{max}: taxas máximas de contração e relaxamento; FC: frequência cardíaca. Sal: animais não infartados; ISO: animais infartados por isoproterenol.

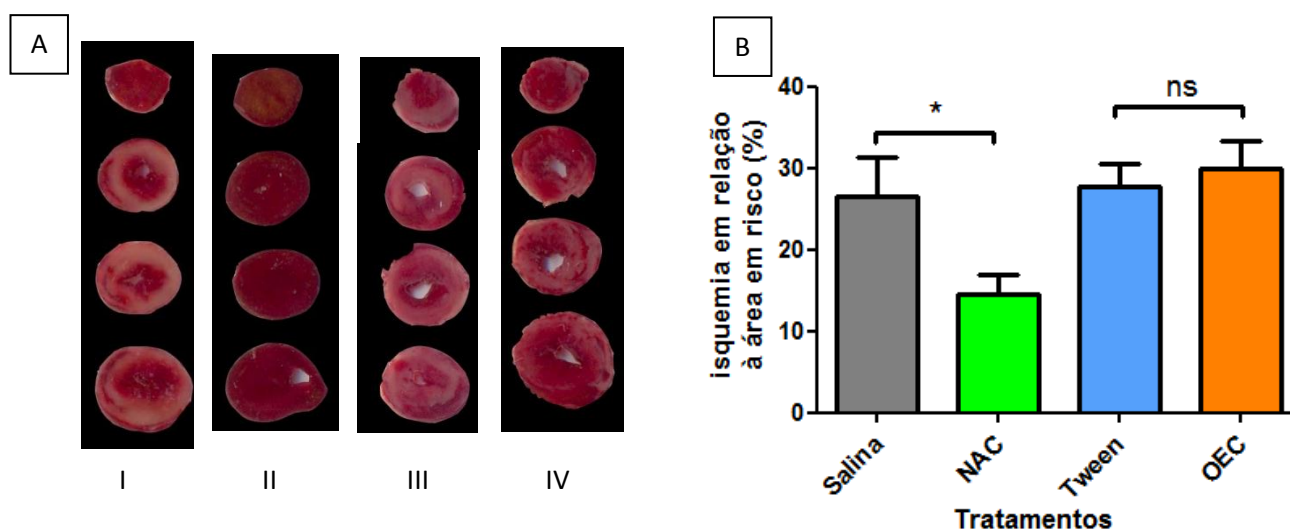
A contratilidade do VE de animais pré-tratados com anlodipina e posteriormente submetidos ao infarto por isoproterenol foi estatisticamente maior em relação ao seu controle (anlodipina salina). Corações de animais pré-tratados com o bloqueador de cálcio apresentaram redução da frequência cardíaca após administração de isoproterenol (tabela 7).

4.1.2 Avaliação do pré-tratamento com OEC na área de lesão induzida por isquemia/reperfusão em coração isolado

Após tratamento dos ratos por 7 dias, os corações foram retirados e submetidos ao protocolo de isquemia global. Após o procedimento, foi realizada a análise dos cortes corados em TTC 1%, para quantificação da área de lesão (figura 12).

Os corações de ratos não submetidos à isquemia global não apresentaram lesão, independentemente do grupo de pré-tratamento (dados não mostrados).

Figura 12. Área de lesão em corações de ratos que sofreram lesão por isquemia/reperfusão.



A: imagens digitalizadas dos cortes de corações corados em TTC 1%; I – pré-tratado com salina; II - pré-tratado com NAC 10mg/kg; III - pré-tratado com tween 80 8% 10mL/kg; IV - pré-tratado com OEC 250mg/kg. B: porcentagem de área de lesão em relação à área total em risco. Média \pm erro padrão da média. n=9; * $p < 0,05$ teste t não emparelhado. ns: sem significância estatística. NAC: N-acetil-cisteína.

A isquemia/reperfusão no coração isolado causou intensa necrose no miocárdio (figura 12A). O pré-tratamento com N-acetil-cisteína (10 mg/kg) atenuou a lesão induzida pelo processo (figura 12A,B) ($p < 0,05$). O pré-tratamento com o OEC (250 mg/kg) não foi capaz de reduzir os danos induzidos pelo processo isquêmico.

5. DISCUSSÃO

Para a realização deste trabalho, inicialmente foi realizada a padronização do método de indução do infarto. A partir do levantamento bibliográfico realizado sobre o modelo de indução de infarto do miocárdio por isoproterenol, foram encontradas diversas doses para indução, que variaram em sua maioria entre duas aplicações de 85 mg/kg e 200 mg/kg, a cada 24 horas. A dose de isoproterenol adequada às nossas condições experimentais foi inicialmente determinada através da observação das alterações cardíacas causadas pela administração do isoproterenol em duas doses de 85 e 100mg/kg injetadas a cada 24 horas.

A necrose do miocárdio induzida pelo isoproterenol localiza-se usualmente na área apical do coração (Rona *et al.*, 1959). No presente trabalho, após 24 horas da 2ª dose de isoproterenol, a necrose foi evidente no ápice cardíaco, que apresentou áreas pálidas esbranquiçadas e notável edemaciamento (Apêndice 3). O edemaciamento do coração, observado macroscopicamente, foi representado pelo aumento expressivo em seu peso. O peso do coração e VE aumentaram significativamente após a administração das duas doses de 85 mg/kg ou 100 mg/kg. Este aumento deve-se em grande parte ao edema (aumento da permeabilidade vascular, fluido intersticial e celular) induzido pela isquemia (Laine e Allen, 1991). O edema pôde ser observado microscopicamente através da análise dos cortes histológicos de miocárdio após o infarto. As secções histológicas dos corações dos animais do grupo controle (salina 2mL/kg sc.) mostram a arquitetura de um tecido cardíaco íntegro, com cardiomiócitos normais, sem estiramento tecidual. Na análise histológica dos animais com os corações infartados, foi possível observar intenso infiltrado inflamatório, edema e desestruturação da arquitetura do tecido cardíaco após a administração da catecolamina.

Baseando-se nas descrições de Rona *et al.*, (1959), em relação às alterações morfométricas em diferentes órgãos de animais submetidos ao isoproterenol, neste trabalho foram realizadas aferição do peso de rins, fígado e pulmões. Nas doses de isoproterenol testadas, os pulmões tiveram seus pesos aumentados ($p < 0,05$), devido à congestão ocasionada pelo infarto (Rona *et al.*, 1959). O edema pulmonar ocorre devido a um desbalanço nas pressões hidrostáticas de Starling (aumento da pressão diastólica final), decorrente do infarto do miocárdio. Na lesão cardíaca, as células endoteliais dos capilares pulmonares se encontram expostas ao aumento da pressão microvascular decorrente do processo inflamatório, levando ao acúmulo de líquido no interior dos

alvéolos (Yan *et al.*, 2013). Neste trabalho foi demonstrado que o peso do fígado e rins apresentaram redução estatisticamente significativa a partir da administração de isoproterenol em duas doses de 100 mg/kg. A redução do débito cardíaco originado pelo infarto leva à congestão hepática e menor perfusão sanguínea renal (Naschitz *et al.*, 1990). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que ocorreu uma possível necrose nestes órgãos, como comprovado macroscopicamente (Rona *et al.*, 1959) e histologicamente (Thirupurasundari, Jayalakshmi, Devaraj, 2005) em ratos infartados por isoproterenol e também descritos por Naschitz *et al.* (1990) na clínica, em pacientes com insuficiência cardíaca.

Com base nos resultados da padronização metodológica, foi determinado que a melhor dose de isoproterenol a ser utilizada para indução de infarto do miocárdio foi a de 100 mg/kg/dia administrada por dois dias consecutivos, com um intervalo de 24 horas entre as aplicações. Ao se administrar esta dose em animais entre 6 e 7 semanas de vida, observou-se baixos índices de mortalidade (aproximadamente 2%), enquanto que o mesmo procedimento em animais mais velhos (acima de 8 semanas), a mortalidade ultrapassou 50%. As alterações macroscópicas e microscópicas observadas durante nossa padronização corroboram com os resultados obtidos por Rona *et al.* (1959), onde verificou-se alteração no peso de órgãos e em cortes histológicos de miocárdio após indução de infarto por isoproterenol.

O óleo essencial de *Citrus aurantium* é composto majoritariamente por monoterpenos, classe de substâncias de elevada capacidade antioxidante (Graßmann, 2005). De fato, o limoneno, um dos componentes majoritários do OEC (97,8%) mostrou-se eficaz em modelos experimentais de estresse oxidativo (Roberto *et al.*, 2009; Murali, Karthikeyan e Saravanan, 2013; Rehman *et al.*, 2014). Devido ao papel central do estresse oxidativo na gênese do infarto do miocárdio, este trabalho investigou o possível efeito cardioprotetor do OEC contra a lesão isquêmica do coração através de abordagens morfológicas, bioquímicas e funcionais.

O isoproterenol, quando administrado em doses elevadas, dá início a uma sequência de alterações no miocárdio, que culminam em necrose (Bloom e Cancilla, 1969). A sobrecarga de cálcio intracelular produz estresse oxidativo e isquemia (Jiang e Downing, 1990), ativando mecanismos inflamatórios (Fishbein, 1978) e apoptóticos (Song, 2011). Dentre as alterações induzidas pelo infarto por isoproterenol, neste trabalho foram observadas alterações cardíacas (estresse oxidativo, edema, área

isquêmica, destruição tecidual, infiltrado inflamatório, aumento de CK-MB e colesterol total), hepáticas (elevação de AST, ALT), renais (elevação de ureia e creatinina) e menor ganho de peso corpóreo.

A extensão da área infartada é um determinante crítico do remodelamento do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca e arritmias subsequentes ao infarto agudo do miocárdio. Sendo assim, a principal abordagem terapêutica do infarto agudo do miocárdio visa a normalização do fluxo sanguíneo na área isquêmica minimizando o tamanho da lesão desenvolvida e a intensidade das complicações subsequentes (Braunwald, Maroko e Libby, 1974; Mewton *et al.*, 2011). Muitos estudos sugerem uma relação direta entre mortalidade e extensão do infarto, dado que o miocárdio não possui a habilidade de se regenerar (Csonka *et al.*, 2010). No presente trabalho o isoproterenol, administrado em duas doses de 100 mg/kg, induziu a uma pequena área de lesão, de aproximadamente 10% no grupo controle. Vários trabalhos demonstram a extensão do infarto por isoproterenol pelo método de coloração com TTC (Prabhu *et al.*, 2006; Prince, Dhanasekar e Rajakumar, 2011; Meeran, Prince e Basha, 2012). Prince (2013), utilizando duas doses de 100 mg/kg de isoproterenol, observou uma área de lesão igual a aproximadamente 50% da área em risco; enquanto que autores como Li *et al.* (2012), com a administração de isoproterenol em duas doses de 85mg/kg, encontraram uma área de isquemia de cerca de 35%.

O aumento no peso do coração e VE observado em ratos infartados devem-se, em grande parte, ao edema induzido pela isquemia cardíaca (fluido vascular, intersticial e celular) (Laine e Allen, 1991). O edema do miocárdio promove alterações funcionais e estruturais no coração em diferentes condições patológicas (Laine e Allen, 1991; Desai *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2006). Além de demarcar a área em risco no infarto agudo do miocárdio, as regiões edemaciadas se correlacionam com áreas de reperfusão microvascular prejudicada e função reduzida (Manciet, *et al.*, 1994; Abdel-Aty *et al.*, 2009; Phrommintikul *et al.*, 2010; Naßenstein *et al.*, 2014).

A principal fonte energética do miocárdio provém de ácidos graxos. Do total de oxigênio consumido pelo tecido, 60 a 90% é utilizado para oxidar ácidos graxos. Sob condições anaeróbicas, como a isquemia, o músculo cardíaco está impossibilitado de oxidar esses substratos, resultando em um aumento nos seus níveis (Whitmer *et al.*, 1978). Os danos causados pelo infarto também levam à peroxidação de fosfolipídeos de

membrana e a aumento da lipólise (Karthikeyan, Sarala Bai e Devaraj, 2007) o que, juntamente com a elevação de ácidos graxos livres, culmina na maior disponibilidade de substrato para síntese de colesterol. Dessa forma, o aumento dos níveis de colesterol sérico observado no presente trabalho resultaria desta alteração metabólica induzida pelo isoproterenol no coração. Entretanto, nas condições experimentais realizadas neste trabalho, não observamos aumento de triglicérides ou redução de HDLc sérico observados por outros estudos no modelo de indução de infarto pelo isoproterenol (Karthikeyan, Sarala Bai e Devaraj, 2007; Mohamadin *et al.*, 2012).

Os danos hepático e renal foram observados pelo aumento sérico de AST, ALT, ureia e creatinina, sugerindo danos extra-cardíacos induzidos pelo infarto. Danos extra-cardíacos são importantes agravantes do quadro patológico após o infarto do miocárdio. A disfunção ou lesão hepática e renal são complicações comuns em pacientes que sofrem infarto do miocárdio (Das, Nussbaum e Leff, 1974; Lekston, Kurek e Tynior, 2009). A lesão hepática pode ser detectada clinicamente pelo aumento do nível sérico da ALT, enzima que está concentrada nos hepatócitos e no epitélio tubular renal. Os níveis aumentados de AST e ALT refletem severidade clínica e são preditores independentes de morte após um IAM, em um período de 30 dias (Lofthus *et al.*, 2012). O padrão de elevação da AST ao longo do tempo se assemelha ao da CK-MB, com o pico ocorrendo aproximadamente 24 horas após o IAM. A elevação dos níveis séricos da ALT ocorre entre um e 6 dias após o infarto do miocárdio retornando aos níveis basais após a redução dos marcadores de necrose cardíaca. Estes dados sugerem que a liberação de ALT pelo fígado, devido à congestão hepática, são eventos decorrentes do infarto do miocárdio (Lofthus *et al.*, 2012). De fato, alterações no fluxo sanguíneo hepático ou renal secundárias à redução do débito cardíaco são consideradas como principal causa do funcionamento inadequado destes órgãos (Rosin, 1961; Naschitz *et al.*, 1990; van Griensven *et al.*, 1998).

A redução de GSH no tecido cardíaco, observada nos animais controle submetidos ao infarto por isoproterenol, indica que houve lesão oxidativa, com consequente consumo do antioxidante celular, importante mecanismo de defesa contra radicais livres. Para se proteger contra as ERO, o organismo dispõe de diferentes mecanismos antioxidantes, sejam de origem endógena (superóxido dismutase, catalase, glutathiona) ou exógena (vitaminas e minerais provenientes da dieta). Entretanto, o maior removedor de peróxido de hidrogênio em células de mamíferos são as enzimas da

família da glutathione peroxidase (GPx), que contêm um sítio ativo de selênio e estão envolvidas não apenas na remoção de H_2O_2 , mas também no metabolismo de lipoperóxidos (Halliwell, 1996). A GSH, substrato da GPx, exerce efeitos antioxidantes diretos. Suas reações com O_2^- e H_2O_2 são lentas, mas rápidas com radicais peroxila. É um poderoso sequestrador de espécies reativas ao nitrogênio, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell, 1996). Sob condições de estresse oxidativo, as ERO são reduzidas pela GSH com a concomitante formação de glutathione oxidada (GSSG). Em circunstâncias fisiológicas normais, a GSSG é reduzida a GSH pela glutathione reductase à custa de NADPH (Cnubben *et al.*, 2001). Se a produção de ERO se sobrepuser à defesa enzimática, causará citotoxicidade, levando a apoptose ou necrose celulares (Kehrer, 1993). Assim como encontrado em diversos trabalhos (Kumaran e Prince, 2010; Mohamadin *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2013), o infarto do miocárdio induzido por isoproterenol provocou a redução nos níveis teciduais de GSH, indicando que houve consumo deste antioxidante para neutralizar radicais livres. Entretanto, no presente estudo, a peroxidação lipídica, caracterizada pelos níveis de MDA, e a infiltração de neutrófilos, indicada pela quantidade de MPO no miocárdio, encontram-se reduzidas nos animais infartados (tween + ISO) em comparação ao controle (tween + salina). A peroxidação lipídica está relacionada a alterações na estrutura da membrana celular (Priscilla e Prince, 2009), sendo consequência do desbalanço entre mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes. Sua elevação ocorre devido à ação de ERO com ácidos graxos poli-insaturados (Karthikeyan, Sarala Bai e Devaraj, 2007), gerando principalmente o MDA, um produto secundário da peroxidação lipídica (Bird e Draper, 1984). A reação de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados em tecidos biológicos pode ser iniciada por radicais livres (Raharjo *et al.*, 1993). Em um processo de lesão tecidual como o infarto, há intenso estresse oxidativo, que pode ser determinado indiretamente pela análise de MDA (Mužáková *et al.*, 2001). No modelo de infarto por isoproterenol (Priscilla e Prince, 2009; Panda *et al.*, 2012; Bayir *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Lim, Ko e Kim, 2013; Saravanan *et al.*, 2013) assim como em pacientes após infarto agudo do miocárdio (Bagatini *et al.*, 2011), há elevação dos níveis séricos deste indicador de peroxidação lipídica. Neste estudo, a administração de isoproterenol em doses eficazes na indução de necrose cardíaca (Punithavathi e Prince, 2010) reduziu significativamente a lipoperoxidação no miocárdio. Apesar deste resultado contraditório, a reprodutibilidade do resultado deste trabalho, no que se refere à peroxidação lipídica, também foi comprovada através da utilização de duas outras

metodologias de preparação de amostras para quantificação dos níveis teciduais de MDA (Apêndice 1). Efeito semelhante foi demonstrado por Rathore, Kale e Bhatnagar (1998), os quais avaliaram os níveis de MDA nas primeiras 12 horas após administração de duas doses de isoproterenol 300mg/kg. Os autores demonstraram pronunciada redução de marcadores de estresse oxidativo a partir da sexta hora após a 2ª dose de aplicação da catecolamina.

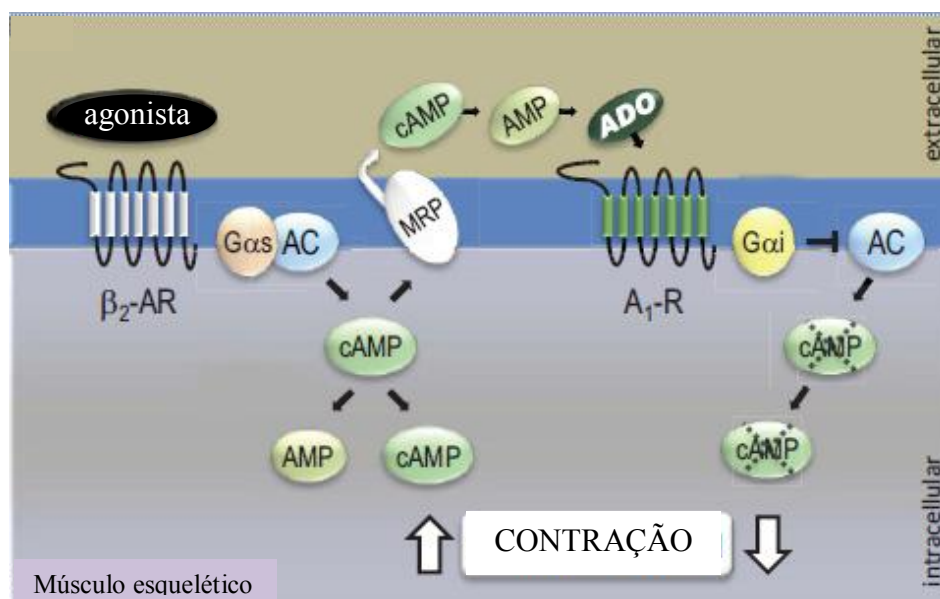
A necrose do miocárdio torna-se evidente após 24 horas do infarto. Inicialmente, é acompanhada por infiltração neutrofílica e, posteriormente, por infiltrado linfocítico e monocítico (Fishbein *et al.*, 1978). Dado que a MPO é uma enzima encontrada no interior de neutrófilos, o aumento de seus níveis no tecido cardíaco, diante de uma lesão, é esperado (Vimal e Devaki, 2004; Senthil *et al.*, 2007; Mohamadin *et al.*, 2012). Porém, como verificado neste estudo, a MPO apresentou valores maiores nos animais do grupo salina, em comparação aos infartados.

O infarto do miocárdio induzido por isoproterenol leva à perda de função cardíaca, com redução nos valores de pressão sistólica e contratilidade do VE, assim como aumento da pressão diastólica e menor relaxamento do VE (Goyal *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Como observado neste estudo, o isoproterenol não foi capaz de induzir alterações cardíacas funcionais. Uma hipótese a ser considerada, é que o isoproterenol na dose utilizada não induziu lesões isquêmicas significativas no miocárdio, necessárias para a quantificação de perda de função, como observado na quantificação da porcentagem de área de lesão.

Os resultados de área de lesão, peroxidação lipídica, infiltração de neutrófilos e ausência de queda na função cardíaca, sugerem que o isoproterenol 100 mg/kg pode ter desencadeado, simultaneamente, lesão cardíaca e ativação de vias cardioprotetoras no miocárdio. Uma hipótese a ser considerada, é a ativação da via da adenosina.

É conhecido que a ativação exacerbada de receptores β -adrenérgicos aumenta os níveis de adenosina extracelular no tecido cardíaco (figura 13).

Figura 13. Ilustração esquematizando a ativação da via da adenosina através de exacerbada ativação de receptores β -adrenérgicos em músculo esquelético (adaptado de Duarte, Menezes-Rodrigues e Godinho, 2012).



AC: adenilil ciclase; MRP: proteína de resistência a múltiplas drogas; ADO: adenosina.

A super ativação de receptores β -adrenérgicos leva ao incremento de AMPc intracelular. Este incremento é seguido pelo efluxo de AMPc e consequente geração de adenosina extracelular por conversão sequencial. Por sua vez, a adenosina estimula receptores de adenosina (A_1 , A_2 , A_3) presentes na membrana sarcoplasmática, inibindo o AMPc, e finalmente culminando na redução da contração da fibra (Duarte, Menezes-Rodrigues e Godinho, 2012). A ativação de receptores A_1 no miocárdio produz bradicardia e a ativação de A_{2B} contribui para a resposta vasodilatadora e hipotensora da adenosina. Sobre os efeitos da ativação de A_3 , há estudos demonstrando efeitos anti-inflamatórios e anti-infarto (Patel *et al.*, 2009). Em estudos realizados em coração de roedores, foi constatado um potente efeito cardioprotetor da adenosina contra a injúria isquêmica do miocárdio (LaMonica, Frohloff, Dobson, 1985; Headrick e Lasley, 2009). Adicionalmente, em altas concentrações, a adenosina age nos receptores A_{2A} e A_{2B} , inibindo a infiltração de neutrófilos e suas funções efetoras como *burst* oxidativo, produção de mediadores inflamatórios e liberação de grânulos (Barletta, Ley e Mehrad, 2012).

Embora a hipótese de cardioproteção pela ativação de receptores β -adrenérgicos no modelo de infarto induzido pelo isoproterenol pareça paradoxal, o efeito

cardioprotetor da ativação de receptores β -adrenérgicos no chamado pré-condicionamento farmacológico já é bem descrito (Marais *et al.*, 2001; Salie, Moolman e Lochner, 2011; Salie, Moolman e Lochner, 2012). Como observado por Rona *et al.*, (1959) a intensidade da lesão cardíaca induzida pela administração de isoproterenol é significativamente atenuada em altas doses da catecolamina. De fato, durante a padronização do protocolo de indução do infarto no presente trabalho observamos que uma dose de 200 mg/kg não foi capaz de induzir o edema no miocárdio evidenciado na dose única de isoproterenol 150 mg/kg (dados não mostrados).

Neste trabalho observou-se que o pré-tratamento com propranolol (antagonista β -adrenérgico) na dose de 10 mg/kg não evitou o dano cardíaco induzido pelo isoproterenol. Por outro lado, o fármaco preveniu o dano no fígado, observado pelo menor aumento no nível de enzimas hepáticas. Embora o fígado tenha sido poupado pela administração de propranolol, os danos renais foram intensificados. Em condições de diminuição do volume efetivo intravascular e insuficiência cardíaca descompensada, há aumento de ureia e creatinina séricas (Abensur, 2011). Saygitov, Glezer e Semakina (2010) observaram que após um IAM, pacientes apresentam elevação dos níveis séricos de ureia e creatinina. O aumento significativo em relação ao controle, destes marcadores de dano renal, sugere que o propranolol levou a um agravamento na insuficiência renal aguda induzida pelo infarto. Após 5 dias de tratamento com propranolol, observou-se elevação da PAM. A redução do débito cardíaco induzida pelo propranolol em indivíduos normotensos é mediada pela redução de volume sistólico (Ulrych *et al.*, 1968). Apesar desta redução, a pressão arterial é elevada, pois o propranolol leva ao aumento da resistência periférica total (Frolich, 1968). Após 24 horas da segunda administração de isoproterenol, entretanto, foi observada queda de PAM, demonstrando que ocorreu lesão cardíaca. O infarto do miocárdio acarreta em redução de débito cardíaco, levando à consequente queda de PA (Goyal *et al.*, 2009). Com a finalidade de manter-se a PA necessária à vida, é ativado o sistema renina-angiotensina-aldosterona (Wexler e McMurtry, 1983). Em estudo realizado por Wexler, Kittinger e Schreiber (1965), o aumento nos níveis séricos de aldosterona, assim como a hipertrofia do córtex da adrenal foi observado em animais submetidos ao infarto por isoproterenol (500 mg/kg). Por meio de cortes histológicos e dosagem de aldosterona e outros hormônios esteroides, a elevação no peso de adrenais foi associada ao aumento na liberação de aldosterona pelas glândulas, ocorrida no 2º dia após o infarto. Portanto, o aumento no

peso de adrenais observado neste trabalho, no grupo tratado com propranolol, pode ser devido à hipertrofia decorrente da grande produção de aldosterona em resposta à queda de PA induzida pelo infarto. Assim como ocorreu nos animais controle infartados, o pré-tratamento com propranolol não evitou a queda de GSH; pelo contrário, intensificou sua redução. Adicionalmente, os níveis de MDA não apresentaram diminuição após o infarto, sugerindo que o propranolol, sendo um antagonista B-adrenérgico, pode ter reduzido a ativação de β -adrenoceptores, podendo ter reduzido, conseqüentemente, a ativação da via protetora da adenosina. O maior consumo de GSH pelos cardiomiócitos parece ter sido suficiente para impedir o aumento de MDA no tecido cardíaco, apesar da menor cardioproteção. Pela ação conferida pelo propranolol, o dano cardíaco deveria ter sido significativamente menor em relação ao grupo controle. Porém, o fato de se ter, possivelmente, inibido em parte a ativação da via da adenosina, o pré-tratamento com propranolol foi capaz de exacerbar os danos induzidos pelo infarto.

A anlodipina administrada por 7 dias, na dose de 5 mg/kg não impediu a formação de edema cardíaco nem reduziu significativamente a área de lesão decorrente da administração de isoproterenol, em relação ao controle. Por outro lado, o bloqueador de canais de Ca^{2+} foi capaz de inibir o aumento dos níveis séricos de colesterol total e do marcador de necrose miocárdica CK-MB, cujo pico ocorre aproximadamente após 24 horas do início do infarto (Lofthus *et al.*, 2012). Juntamente com os valores reduzidos de MPO e MDA, pode-se concluir que a anlodipina minimizou significativamente a lesão cardíaca. A redução de MDA e o aumento de GSH em relação ao controle, podem ser explicados pela ação que o bloqueador de canais de cálcio exercem na célula cardíaca. Ao bloquear estes canais, o cardiomiócito reduz a contratilidade, produzindo menos ATP, e conseqüentemente, ocorrerá menos produção de radicais livres provenientes da respiração mitocondrial, havendo menor consumo de GSH e menor peroxidação lipídica. É possível que a cardioproteção apresentada pela anlodipina tenha sido por redução do influxo de cálcio nos cardiomiócitos ou ainda devido ao aumento no fluxo sanguíneo para o miocárdio (vasodilatação arterial) (Derosa e Maffioli, 2011). Diferentemente do propranolol, a ativação da via da adenosina não foi inibida pela anlodipina, já que esta via é independente de cálcio. O aumento na pressão arterial causado pelo pré-tratamento com o bloqueador de canais de cálcio pode ser decorrência da resposta à queda de PA induzida pela anlodipina, um vasodilatador periférico (Derosa e Maffioli, 2011). A redução de PA leva a ativação de um

mecanismo compensatório para mantê-la em níveis adequados (Nakaya, Schwartz e Millard, 1983; Hoshide *et al.*, 2005). O sistema de baroreflexo é ativado, pela indução de taquicardia sinusal, mediada pelo aumento no tônus simpático (Fujisawa *et al.*, 2009; Ishizaka *et al.*, 2009). O aumento na frequência cardíaca leva ao consequente aumento de PA. Por outro lado, após 24 horas da segunda administração de isoproterenol, foi observado queda da PA, decorrente da redução no débito cardíaco induzido pela lesão (Goyal *et al.*, 2009).

O pré-tratamento com OEC durante 7 dias não evitou os danos induzidos pelo ISO. Comparando-se ao grupo controle, as alterações decorrentes da isquemia cardíaca no grupo OEC foram semelhantes. Porém, os danos extra-cardíacos (aumento no peso de pulmões e rins) foram pronunciados. Adicionalmente, o pré-tratamento com o OEC *per se* causou elevação no peso do fígado sugerindo, apesar de não ter havido aumento nas enzimas hepáticas, que o OEC possui algum efeito sobre o fígado, necessitando maior investigação. Além do aumento no peso de pulmões e rins, o OEC também não evitou a elevação no peso das adrenais, causada pela queda do débito cardíaco. O OEC administrado durante 7 dias não alterou os níveis de colesterol *per se* ou induzido pelo isoproterenol. Entretanto, em estudo realizado por Costa *et al.* (2013), o tratamento do OEC na dose de 50 mg/kg durante 14 dias em camundongos promoveu redução dos níveis séricos de colesterol total. Um período maior de pré-tratamento com o OEC talvez seja suficiente para observar-se redução dos níveis de colesterol total. Juntamente a estes dados, o modelo de infarto por isquemia *in vitro* corrobora a ausência de efeitos cardioprotetores do OEC na dose de 250 mg/kg, administrado durante 7 dias antes e concomitantemente à indução de infarto por isoproterenol. Em comparação às alterações decorrentes do infarto no grupo controle, os resultados obtidos sobre o efeito do OEC no infarto do miocárdio sugerem que este composto natural exerce atividade no músculo cardíaco. A elevação no peso dos órgãos supracitados infere que o OEC pode ter reduzido a cardioproteção conferida pela ativação da via da adenosina.

A sinalização de receptores β -adrenérgicos é reduzida pela ativação de receptores para adenosina no miocárdio e em outros tecidos como a musculatura esquelética (LaMonica, Frohloff, Dobson, 1985; Duarte, Menezes-Rodrigues, Godinho, 2012). Em conjunto, nossos resultados sugerem que o isoproterenol 100 mg/kg tenha promovido um efeito dual através da ativação de fatores que induzem lesões no miocárdio e também ativação de vias cardioprotetoras que atenuaram as lesões

induzidas pelo isoproterenol. Embora esta hipótese não prejudique as conclusões deste trabalho, o emprego de doses de isoproterenol menores que 100 mg/kg é sugerido para a continuidade deste estudo. Futuros estudos são necessários para elucidação das alterações decorrentes da administração de isoproterenol observadas neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que o OEC na dose de 250 mg/kg administrado por 7 dias não exerce efeito cardioprotetor nos dois modelos de infarto do miocárdio testados.

7. DIFICULDADES ENCONTRADAS

A análise histológica proposta não foi realizada devido a problemas encontrados durante a manufatura das lâminas. A análise do grau de injúria, de acordo com as alterações microscópicas, foi prejudicada, não sendo possível estabelecer correlação entre grau de necrose tecidual e indicadores teciduais e séricos de lesão isquêmica do miocárdio, como nível de peroxidação lipídica e infiltração neutrofilica.

8. PERSPECTIVAS

A padronização dos modelos de infarto do miocárdio abre portas para o teste, em nosso laboratório, de diversos extratos de plantas de potencial efeito cardioprotetor. Na dose utilizada, o OEC não foi efetivo como agente cardioprotetor, porém, a avaliação do OEC em doses superiores ou sua administração por períodos maiores deve ser incentivada, assim como a avaliação do efeito de seus componentes majoritários em modelos de infarto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, A. *et al.* Infarct-related artery occlusion, tissue markers of ischaemia, and increased apoptosis in the peri-infarct viable myocardium. **European Heart Journal** 2005; 26(19):2039–45.

ABDEL-ATY, H. *et al.* Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study. **Journal of American College of Cardiology** 2009; 53(14):1194-1201.

ABENSUR, H. Biomarcadores na Nefrologia (*e-book*). 1ed. Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011, 110p.

ALBAYRAK, F. *et al.* Preventive effect of amiodarone during acute period in isoproterenol-induced myocardial injury in Wistar rats. **Cardiovascular Toxicology** 2009; 9:161-8.

ANDERSON, M. Determination of glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548-55, 1985.

ANDERSSON, D.C. *et al.* Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. **The journal of Physiology**, v. 589, n. 7, p. 1791-1801, 2011.

BAGATINI, M.D. *et al.* Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. **Heart Vessels**, v. 26, p. 55-63, 2011.

BARLETTA, K.E.; LEY, K; MEHRAD, B. Regulation of neutrophil function by adenosine. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, v. 32, p. 856-64, 2012.

BAYIR, Y. *et al.* Comparing effects of lacidipine, ramipril, and valsartan against experimentally induced myocardial infarcted rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 166-74, 2012.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 50, n. 6, p. 940-50, 2011.

BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 299-305, 1984.

- BLOOM, S; CANCELLA, P.A. Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low doses of isoproterenol. **The American Journal of Pathology**, v. 54, n. 3, p. 373-91, 1969.
- BONAMIN, F. Atividade anti-ulcerogênica e avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênicos do β -mirceno. Dissertação. Botucatu, 2010.
- BRASIL. Vítimas de infarto têm maior assistência no SUS. 2011. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/2389/162/vitimas-de-infarto-tem-maior-assistencia-no-sus.html> >. Acesso em: 2013 set 28.
- BRAUNWALD, E; MAROKO, P.R.; LIBBY, P. Reduction of infarct size following coronary occlusion. **Circulation research**, v. 35, n. 3, p.192-201, 1974.
- BUJA, L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, n. 4, p. 170–5, 2005.
- BURKE, A.P.; VIRMANI, R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. **Medical Clinics of North America**, v. 91, p. 553-72, 2007.
- CNUBBEN, N.H.P. *et al.* The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 10, p. 141-152, 2001.
- CORDEIRO, R.; NUNES, V.A.; ALMEIDA, C.R. *Plantas que Curam*. (1996) 1ed. Três.
- COSTA, C.A.R.A. *et al.* *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 42, 2013.
- COSTA, R.P.; DA SILVA, C.C.; PIMENTEL, I.C. Terapia nutricional das doenças cardiovasculares. In: Silva SMCS e Mura JAP. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. 1ed. São Paulo: Ed. Roca, 2007. 1122p.
- CSONKA, C. *et al.* Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, p. 163-70, 2010.
- DAS, G; NUSSBAUM, H.E.; LEFF, W.A. Hepatic function in acute myocardial infarction. **JAMA**, v. 230, n. 11, p. 1558-60, 1974.

- DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n.15-16, p. 1621-37, 2009.
- DEROSA, G.; MAFFIOLI, P. Drug safety evaluation of amlodipine. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 10, n. 5. p. 795-804, 2011.
- DESAI, K.V. *et al.* Mechanics of the left ventricular myocardial interstitium: effects of acute and chronic myocardial edema. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v.294, n.6, p. H2428-34, 2008.
- DI STASI, L.C. (1996) *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo, Editora UNESP.
- DUARTE, T; MENEZES-RODRIGUES, F.S.; GODINHO, R.O. Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of β 2-adrenoceptors to Gs and Gi proteins in mouse skeletal muscle. **Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 341, p.820-828, 2012.
- ELMES, M.J. Prenatal diet determines susceptibility to cardiac ischaemia-reperfusion injury following treatment with diethylmaleic acid and *N*-acetylcysteine. **Life Sciences**, v.82, p.149-55, 2008.
- EMERY, F.S.; DOS SANTOS, G.B.; BIANCHI, R.C. Metabolismo secundário. In: *A química na natureza*. São Paulo:Sociedade Brasileira de Química. 2010. 70p. Disponível em: http://www.quimica.seed.pr.gov.br/arquivos/File/AIQ_2011/quimica_natureza.pdf. Acesso em 27-set-2013.
- ERTL, G.; FRANTZ, S. Healing after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 66, p. 22-32, 2005.
- FERRERA, R. *et al.* One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.23, n. 4, p.327-31, 2009.
- FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1488p.
- FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D.; MAROKO, P.R. The histopathologic evolution of myocardial infarction. **Chest**, v. 73, p.843-9, 1978.

FROHLICH, E.D. Role of beta-adrenergic receptor blocking agents in hypertensive diseases: personal thoughts as the controversy persists. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 3, n. 6, p. 455-64.

FRANGOIANNIS, N.G. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. **Inflammatory Research**, v. 53, n.11, p. 585–95, 2004.

FRANK, A. *et al.* Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. **Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 16, n.3, p.123-32, 2012.

FUJISAWA, M. *et al.* Chronotropic effects of azelnidipine, a slow- and long-acting dihydropyridine-type calcium channel blocker, in anesthetized dogs: a comparison with amlodipine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 325-32, 2009.

GARLICK, P. B. *et al.* Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. **Circulation research** v. 61, n.5, p.757-60, 1987.

GOYAL *et al.* Myocardial salvaging effect of telmisartan in experimental model of myocardial infarction. **European Journal of Pharmacology**, v. 619, p.75-84, 2009.

GRABMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins and Hormones**, v. 72, p. 505-35, 2005.

GU, Y. *et al.* Artemisinin suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction via anti-inflammatory effects. **Journal of molecular histology**, v. 43, n.6, p.737-43, 2012.

HALL, J.E. Fluxo sanguíneo pelos músculos e o débito cardíaco durante o exercício; a circulação coronariana e a cardiopatia isquêmica. In: Tratado de Fisiologia Médica. 12ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151p.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defenses. Free Radical Biology and Medicine. Oxford, 3^aed., Clarendon Press, p.105-245, 1999.

HEADRICK, J.P.; LASLEY, R.D. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 193, p. 189-214, 2009.

HELD, P.H.; YUSUF, S.; FURBERG, C.D. Calcium channel blockers in acute myocardial infarction and unstable angina: an overview. **British Medical Journal**, v. 299, p. 1187-92, 1989.

HIGGINS, A. J.; BLACKBURN, K. J. Prevention of reperfusion damage in working rat hearts by calcium antagonists and calmodulin antagonists. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 16, n. 5, p. 427-38, 1984.

HOSHIDE, S. *et al.* Comparison of the effects of cilnidipine and amlodipine on ambulatory blood pressure. **Hypertension Research**, v. 28, p. 1003-8, 2005.

HUSSAIN SHAIK, A. *et al.* Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. **Journal of medicinal food**, v. 15, n.8, p. 741-6, 2012.

ISHIZAKA, T. *et al.* Cardiovascular effects of azelnidipine in comparison with those of amlodipine assessed in the halothane-anaesthetized dog. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 135-43, 2009.

JIANG, J.P.; DOWNING, S.E. Catecholamine Cardiomyopathy: Review and Analysis of Pathogenetic Mechanisms. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 63, p. 581-91, 1990.

JUGDUTT, B.I. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? **Circulation**, v. 108, p.1395-403, 2003.

KARTHIKEYAN, K.; SARALA BAI, B.R.; DEVARAJ, S.N. Efficacy of grape seed proanthocyanidins on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced myocardial injury. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p.295-301, 2007.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical reviews in toxicology**, v. 23, n.1, p.21-48, 1993.

KRAWISZ, J.E.; SHARON. P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation base don myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, p.1344-50, 1984.

- KUMARAN, K.S.; PRINCE, P.S.M. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. **Cell stress and chaperones**, v. 15, p. 791-806, 2010.
- LAINE, G.A.; ALLEN, S.J. Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. **Circulation Research**, v. 68, p. 1713-21, 1991.
- LAMONICA, D.A.; FROHLOFF, N.; DOBSON, J.G. **American journal of physiology heart and circulatory physiology**, v. 248, p.H737-H744, 1985.
- LEKSTON, A; KUREK, A; TYNIOR, B. Impaired renal function in acute myocardial infarction. **Cardiology Journal**, v. 16, n.5, p. 400-6, 2009.
- LI, H. *et al.* Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. **PLoS One** 2012; 7(11):e48872.
- LIM, K.H.; KO, D.; KIM, J.H. Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats. **Journal of Ginseng Research**, v. 37, n.3, p.273-82, 2013.
- LOFTHUS, D.M. *et al.* Pattern of liver enzyme elevations in acute ST-elevation myocardial infarction. **Coronary Artery Disease**, v. 23, p. 22-30, 2012.
- MANCIET, L.H. *et al.* Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. **The American Journal of Physiology**, v. 266, n. 4 (pt 2), p. H1541-50, 1994.
- MARAIS, E. *et al.* p38 MAPK activation triggers pharmacologically-induced β -adrenergic preconditioning, but not ischaemic preconditioning. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 33, p. 2157-77, 2001.
- MEERAN, M.F.N; PRINCE, P.S.M. Protective effects of N-acetyl cysteine on lipid peroxide metabolism on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Journal of biochemical molecular toxicology**, v. 25, n. 3, p. 151-7, 2011.
- MEWTON, N. *et al.* Infarct size reduction in patients with STEMI: why we can do it! **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 16, n. 3-4, p. 298, 2011.

- MOHAMADIN, A.M *et al.* Lycopene attenuates oxidative stress and heart lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats: A biochemical study. **Pathophysiology**, v. 19, p. 121-30, 2012.
- MORAN, A.E. *et al.* The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: The global burden of disease 2010 study. **Circulation**, v. 129, p. 1493-1501, 2014.
- MORAES, T.M. Determinação do mecanismo de ação antiulcerogênico do óleo essencial e dos compostos majoritários de *Citrus aurantium* L. (Rutaceae). Dissertação de mestrado. 76p, 2008.
- MORIMOTO, S. *et al.* Role of myocardial interstitial edema in conduction disturbances in acute myocarditis. **Heart and Vessels**, v. 21, n. 6, p. 356-60, 2006.
- MURALI, R.; KARTHIKEYAN, A; SARAVANAN, R. Protective effects of d-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 112, p. 175-81, 2013.
- MURRAY, C.J.L. *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for The global burden disease study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2197-223, 2012.
- MUŽÁKOVÁ, V. *et al.* Antioxidant vitamin levels and glutathione peroxidase activity during ischemia/reperfusion in myocardial infarction. **Physiology Research**, v. 50, p. 389-96, 2001.
- NAKAYA, H.; SCHWARTZ, A.; MILLARD, R.W. Reflex chronotropic and inotropic effects of calcium channel-blocking agents in conscious dogs. Diltiazem, verapamil, and nifedipine compared. **Circulation Research**, v. 52, p. 302-11, 1983.
- NASCHITZ, J.E.; YESHURUN, D.; SHAHAR, J. Cardiogenic hepatorenal syndrome. **Angiology**, v. 41, n.11, p. 893-900, 1990.
- NAßENSTEIN, K. *et al.* Cardiac MRI: T2-mapping versus T2-weighted dark-blood TSE imaging for myocardial edema visualization in acute myocardial infarction. **Herz**, v. 186, p. 166-172, 2014.
- NHLBI, N. H. L. A. B. I. What is a Heart attack? 2013. Disponível em: <<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/heartattack>>. Acesso em: 2013 set 28.

- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-58, 1979.
- PANDA, S. *et al.* Combined effects of quercetin and atenolol in reducing isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: possible mediation through scavenging free radicals. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, p. 235-42, 2012.
- PARAVASTU, S.C.V; MENDONCA, D.A.; da SILVA, A. Beta blockers for peripheral arterial disease. **European journal of vascular and endovascular surgery**, v. 38, p. 66-70, 2009.
- PATEL, R.A.G. *et al.* Reduction in myocardial infarct size at 48 hours after brief intravenous infusion of ATL-146e, a highly selective adenosine A_{2A} receptor agonist. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, p. H637-H642, 2009.
- PHROMMINTIKUL, A. Acute oedema in the evaluation of microvascular reperfusion and myocardial salvage in reperfused myocardial infarction with cardiac magnetic resonance imaging. **European Journal of Radiology**, v. 74, n. 3, p. e12-7, 2010.
- PIETRI, S.; CULCASI, M.; COZZONE, P. J. Real-time continuous-flow spin trapping of hydroxyl free radical in the ischemic and post-ischemic myocardium. **European journal of biochemistry / FEBS**, v.186, n. 1-2, p.163-73, 1989.
- PIO-CORRÊA, M.; AZEREDO-PENNA, L. DE. (1978) *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, pág.1926.
- PORTO, A.L.; NERY, M.W. Infarto agudo do miocárdio. In: Porto, C.C. *Doenças do Coração – prevenção e tratamento*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 116p.
- PRABHU, S. *et al.* Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 126-33, 2006.
- PRINCE, P.S.M.; DHANASEKAR, K.; RAJAKUMAR,S. Preventive effects of vanillic acid on lipids, Bax, Bcl-2 and myocardial infarcted rats: a biochemical and *in vitro* study. **Cardiovascular Toxicology**, v. 11, p. 58-66, 2011.

PRISCILLA, D.H.; PRINCE, P.S.M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. **Chemico-biological Interactions**, v. 179, p. 118-24, 2009.

PUNITHAVATHI, V.R.; PRINCE, P.S.M. Protective effects of combination of quercetin and α -tocopherol on mitochondrial dysfunction and myocardial infarct size in isoproterenol-treated myocardial infarcted rats: biochemical, transmission electron microscopic, and macroscopic enzyme mapping evidences. **Journal of biochemical molecular toxicology**, v. 24, n. 5, p. 303-12, 2010.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. **Meat Science**, v. 35, p. 145-69, 1993.

REHMAN, M.U. *et al.* d-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS and NF κ B in kidneys of Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, p. 465-76, 2014.

REN, Z. H. *et al.* Tanshinone II A attenuates inflammatory responses of rats with myocardial infarction by reducing MCP-1 expression. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 3-4, p. 212-8, 2010.

ROBERTO, D. *et al.* Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 106, p. 38-44, 2009.

RONA, G. *et al.* An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. **American Medical Association: Archives of pathology**, v. 67, p. 99-111, 1959.

ROSIN, A.J. Liver function in acute myocardial infarction. A study using bromsulphthalein test. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5253, p. 675-7, 1961.

ROZEMBERG, S. *et al.* Endotoxin-induced myocardial dysfunction in senescent rats. **Critical Care**, v. 10, p. R124, 2006.

- SALIE, R.; MOOLMAN, J.A.; LOCHNER, A. The role of β -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning (β PC). **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 25, p. 31-46, 2011.
- SALIE, R.; MOOLMAN, J.A.; LOCHNER, A. The mechanism of beta-adrenergic preconditioning: roles for adenosine and ROS during triggering and mediation. **Basic Research in Cardiology**, v. 107, p.281, 2012.
- SANGUINETTI, E.E. (1989) *Plantas que curam*. 2.ed. Porto Alegre.
- SANTOS, C.A.M.; TORRES, K.R.; LEONART, R. (1998) *Plantas medicinais (herbarium, flora et. Scientia)*. 2.ed. São Paulo, Ícone.
- SARAVANAN, G. *et al.* Cardioprotective activity of *Amaranthus viridis* Linn: Effect on serum marker enzymes, cardiac troponin and antioxidant system in experimental myocardial infarcted rats. **International journal of cardiology**, v. 165, p. 494-498, 2013.
- SAYGITOV, R.T.; GLEZER, M.G.; SEMAKINA,S.V. Blood urea nitrogen and creatinina levels at admission for mortality risk assessment in patients with acute coronary syndromes. **Emergency Medicine Journal: EMJ**, v. 27, p. 105-9, 2010.
- SENTHIL, S.; SRIDEVI, M.; PUGALENDI, V. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 418-23, 2007.
- SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. (2004) *Farmacognosia da planta ao medicamento* 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis Editora UFRGS/ Editora UFSC.
- SINGH, B.K. *et al.* Effect of *Cissampelos pareira* root extract on isoproterenol-induced cardiac dysfunction. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n.1, p. 51-60, 2013.
- SHINDE, A.V.; FRANGOIANNIS, N.G. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 74-82, 2014.
- SHMIST, Y. A. *et al.* Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 283, n.1-2, p.75-83, 2006.

SCHWARZ, E.R. *et al.* What is required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 10, p. 181, 2001. (Abstract)

ŠKROVÁNKOVÁ, S.; MISURCOVA, L.; MACHU, L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. **Advances in food and nutrition research**, v.67, p. 75-139, 2012.

SKRZYPIEC-SPRING, M. *et al.* Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 55, n.2, p.113-26, 2007.

SONG, Y. H. *et al.* Icariin attenuates cardiac remodelling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 63, n.4, p.541-9, 2011.

THIRUPURASUNDARI, C.J.; JAYALASHMI, R.; DEVARAJ, S.N. Liver architecture maintenance by tincture of *Crataegus* against isoproterenol-induced myocardially infarcted rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n.3, p. 400-4, 2005.

THYGESEN, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction: Expert consensus document. **European Heart Journal**, v. 33, p.2551-67, 2012.

ULRYCH, M. *et al.* Immediate hemodynamic effects of beta-adrenergic blockade with propranolol in normotensive and hypertensive man. **Circulation**, v. 37, p. 411-6, 1968.

VAN GRIENSVEN, J.M. *et al.* Effects of liver blood flow on the pharmacokinetics of tissue-type plasminogen activator (alteplase) during thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 63, n. 1, p. 39-47, 1998.

VIMAL, V.; DEVAKI, T. Linear furanocoumarin protects rat myocardium against lipidperoxidation and membrane damage during experimental myocardial injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, p. 393-400, 2004.

WALDMAN, M. *et al.* An ultra-low dose of tetrahydrocannabinol provides cardioprotection. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n.11, p.1626-33, 2013.

- WALSH, S. K. *et al.* Acute administration of cannabidiol in vivo suppresses ischaemia-induced cardiac arrhythmias and reduces infarct size when given at reperfusion. **British journal of pharmacology**, v. 160, n.5, p.1234-42, 2010.
- WANG, S. *et al.* Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 615, p.125-32, 2009.
- WANG, X. *et al.* Differential cardioprotective effects of salvianolic acid and tanshinone on acute myocardial infarction are mediated by unique signaling pathways. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n.3, p.662-71, 2011.
- WATTS, J. A.; MAIORANO, L. J.; MAIORANO, P. C. Comparison of the protective effects of verapamil, diltiazem, nifedipine, and buffer containing low calcium upon global myocardial ischemic injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 18, n.3, p. 255-63, 1986.
- WEXLER, B.C.; KITTINGER, G.W.; SCHREIBER, J.E. Steroids produced in vitro by adrenal glands of normal and arteriosclerotic rats during and after drug-induced myocardial necrosis. **Circulation research**, v. 16, p. 322-31, 1965.
- WEXLER, B.C.; McMURTRY, J.P. Hormonal and metabolic changes during acute myocardial infarction in normotensive vs hypertensive rats. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 64, p. 124-36, 1983.
- WHITMER, J.T. *et al.* Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n.12, p.4305-9, 1978.
- WHO. Causes of death 2008. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/evidence/bod>>.
- YAN, X. *et al.* Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 114, p. 637-49, 2014.
- YASMIN, W.; STRYNADKA, K. D.; SCHULZ, R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **Cardiovascular research**, v. 33, n. 2, p.422-32, 1997.
- ZHANG, G. X. *et al.* Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovascular research**, v. 65, n.1, p.230-8, 2005.

ZHANG, Y. *et al.* Tanshinone IIA inhibits miR-1 expression through p38 MAPK signal pathway in post-infarction rat cardiomyocytes. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 26, n.6, p.991-8, 2010.

ZHANG, H. *et al.* β -adrenergic-stimulated L-type channel Ca^{2+} entry mediates hypoxic Ca^{2+} overload in intact heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 65, p.51-8, 2013.

ZHOU, R. Cardioprotective effect of water and ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* in an experimental model of myocardial infarction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 440-6, 2012.

ZINGARELLI, B.; SZABÓ, C.; SALZMAN, A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut**, v. 45, p.199-209, 1999.

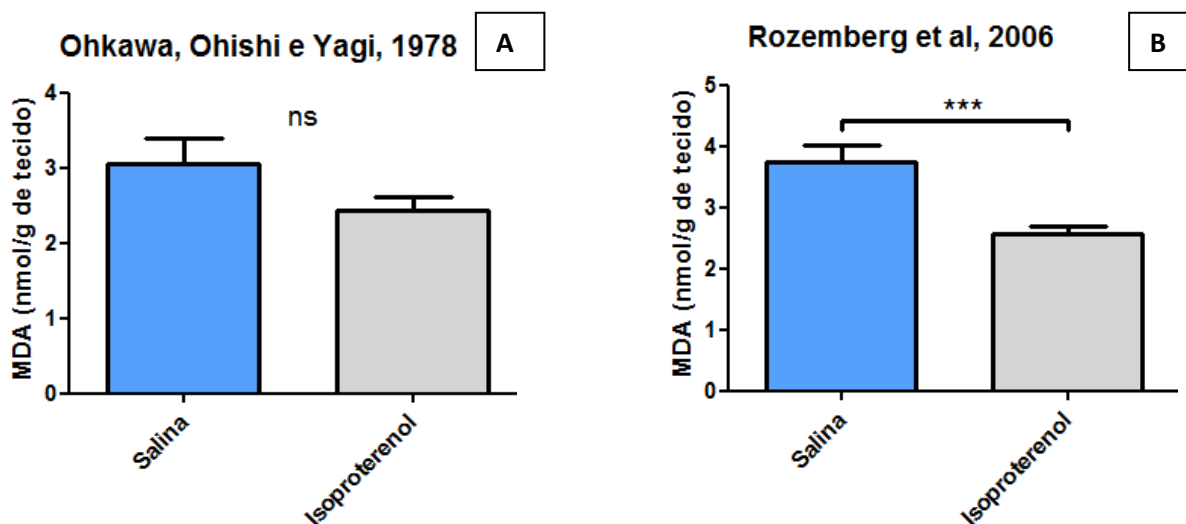
ZORNOFF, L.A.M. *et al.* Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 4, p.434-40, 2009.

APÊNDICE 1

Determinação de peroxidação lipídica pelos protocolos de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978) e Rozemberg *et al.* (2006), em VE de ratos Wistar machos.

O ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao infarto por isoproterenol foi utilizado para determinação de peroxidação lipídica. A figura I mostra a concentração de MDA, utilizando-se dois diferentes protocolos de determinação do composto.

Figura I. Diferentes protocolos utilizados para determinação de malondialdeído em ventrículo esquerdo de ratos Wistar machos, submetidos ou não ao infarto por isoproterenol.



Média \pm e.p.m. A: determinação de MDA de acordo com protocolo de Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1978. ns: sem diferença estatisticamente significativa. B: determinação de MDA de acordo com protocolo de Rozemberg *et al.*, 2006; *** $p < 0,001$, teste t não emparelhado.

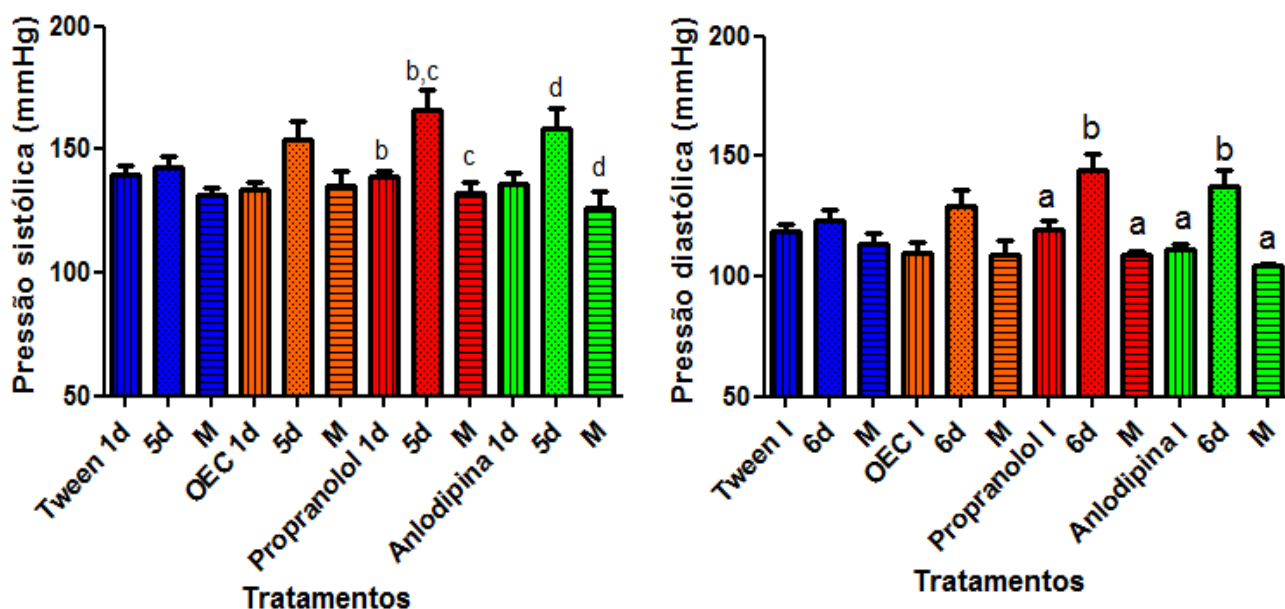
No método de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978) (figura IA) não é possível observar diferença significativa entre os grupos tratados com salina ou isoproterenol ($p > 0,05$). No outro método (figura IB), o VE dos animais com indução de infarto apresentaram redução significativa na concentração de MDA ($p < 0,05$).

APÊNDICE 2

Aferição de pressão arterial caudal sistólica e diastólica de ratos Wistar machos pré-tratados com tween 80 8%, OEC (250 mg/kg), propranolol (10 mg/kg) ou anlodipina (5 mg/kg), durante 7 dias com indução de infarto do miocárdio por isoproterenol (2x100 mg/kg).

A pressão arterial caudal sistólica e diastólica apresentaram aumento no decorrer do pré-tratamento apenas nos animais pré-tratados com propranolol e anlodipina. Após as duas doses de isoproterenol (100mg/kg) no 6º e 7º dias, a pressão sistólica e diastólica voltaram aos níveis iniciais. O pré-tratamento com tween ou OEC durante 7 dias não causou qualquer alteração na PA (figura II).

Figura II. Pressão arterial sistólica e diastólica (caudal) entre animais com indução de infarto por isoproterenol, durante o período de tratamento.



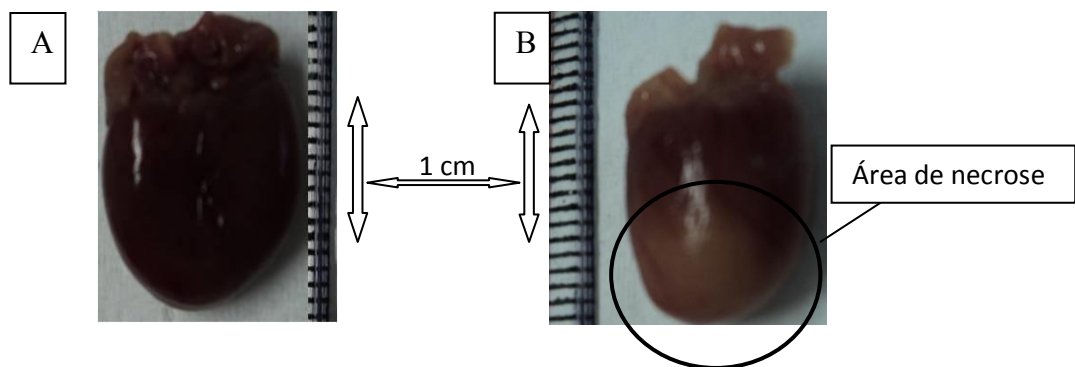
Média \pm erro padrão da média. Letras iguais: sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes: $p < 0,05$ ANOVA seguido de Tukey entre mesmo grupo de tratamento. * $p < 0,05$ ANOVA seguido de Dunnett (tratamentos vs. controle) no primeiro dia de tratamento; nos demais dias, não houve diferença estatisticamente significativa. I: aferição da pressão no primeiro dia de tratamento; 6d: aferição da pressão 6º dia de tratamento; M: aferição da pressão antes da eutanásia.

APÊNDICE 3

Padronização do modelo de infarto por isoproterenol

Após 24 horas da 2ª dose de isoproterenol, a necrose foi evidente no ápice cardíaco, que apresentou áreas pálidas esbranquiçadas e notável edemaciamento (figura III).

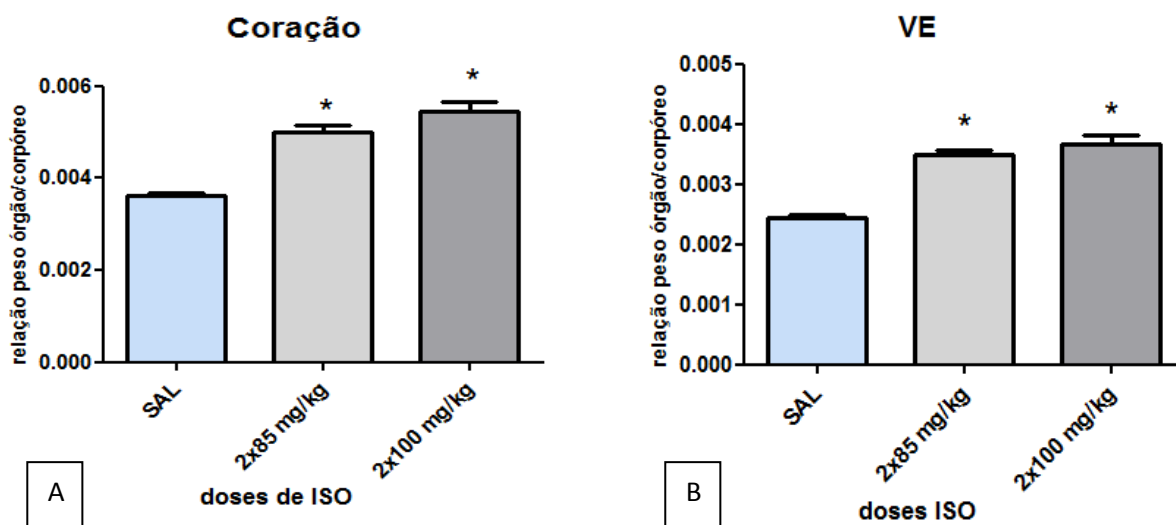
Figura III. Imagens fotografadas por câmara digital, de coração de ratos Wistar machos, após administração de salina ou isoproterenol.



A: salina 2ml/kg sc.; B: duas doses de 100mg/kg de ISO sc.

O peso do coração e VE aumentaram significativamente após a administração das doses de 2x85 mg/kg e 2x100 mg/kg (figura IVA, B).

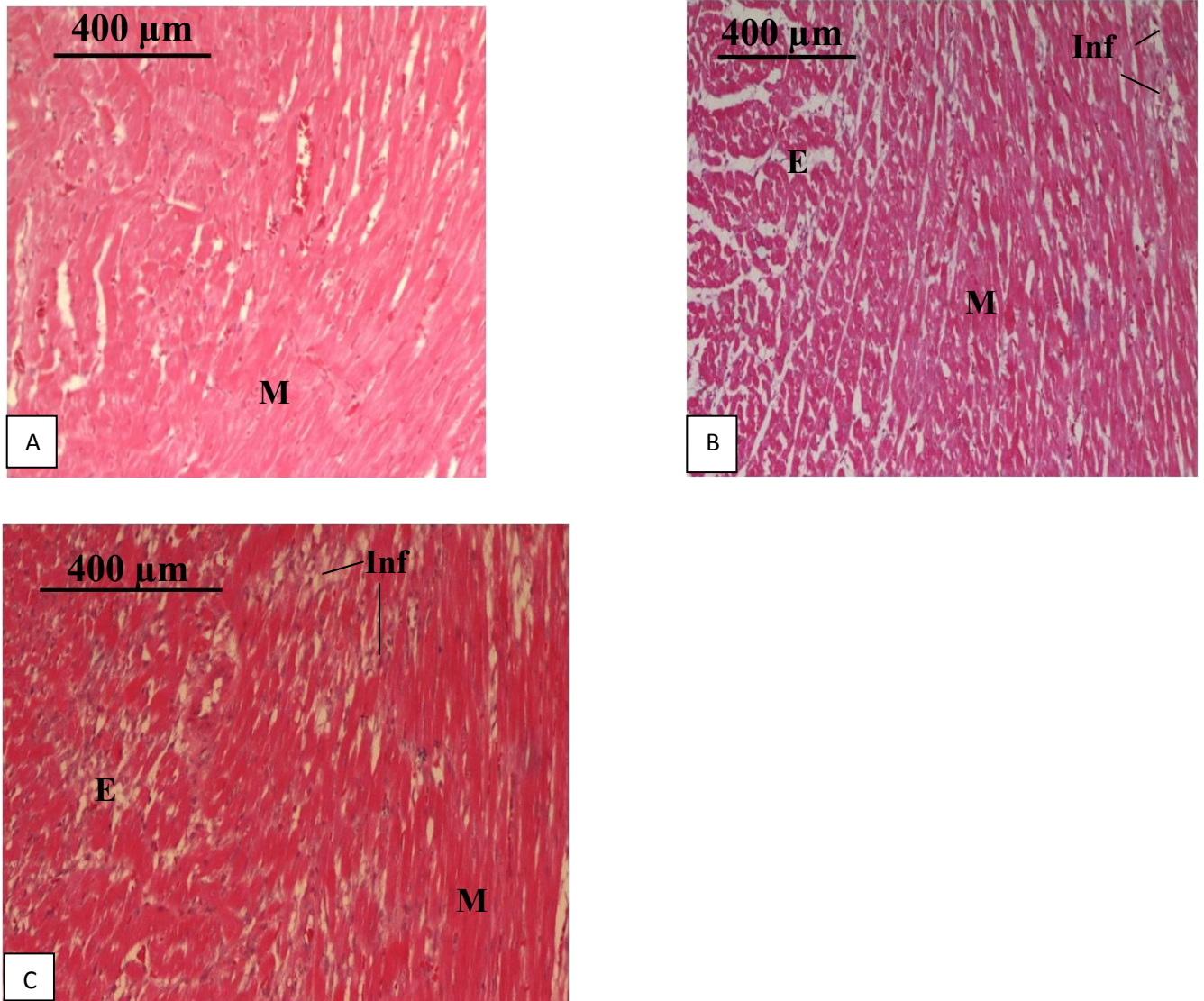
Figura IV. Peso relativo do coração (A) e ventrículo esquerdo (B) em ratos submetidos às diferentes doses de isoproterenol.



A: peso relativo do coração; B: peso relativo do ventrículo esquerdo. Dados representados como média \pm e.p.m. Símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) entre grupos infartados e salina (ANOVA seguido de Dunnett). SAL: animais que receberam salina 2ml/kg; ISO: isoproterenol.

As secções histológicas dos animais do grupo controle (salina 2ml/kg sc.) mostram a arquitetura de um tecido cardíaco íntegro, cardiomiócitos normais, sem estiramento. Na análise histológica dos animais infartados, foi possível observar intenso infiltrado inflamatório, edema e desestruturação da arquitetura do tecido cardíaco após a administração da catecolamina (figura V).

Figura V. Cortes histológicos da zona apical do VE de ratos submetidos ou não ao infarto por diferentes doses de isoproterenol, corados em HE.



Fotografias de cortes histológicos observados em microscopia de luz. A: grupo salina 2ml/kg sc (Grau de injúria 0); B: grupo ISO 2x85mg/kg sc. (Grau de injúria +); C: grupo ISO 2x100mg/kg (Grau de injúria ++). Aumento de 10x. M – Miócito; Inf – infiltrado inflamatório; E – edema intersticial.

Nas doses de isoproterenol testadas, os pulmões tiveram seus pesos aumentados ($p < 0,05$). Fígado e rins apresentaram redução estatisticamente significativa de peso na dose de 2x100 mg/kg (tabela I).

Tabela I. Peso relativo de órgãos de ratos Wistar machos, que receberam diferentes doses de isoproterenol (n=5).

Tratamento sc.	Pulmões	Fígado	Rins
Salina 2mL/kg	0,006±0,0001	0,048±0,001	0,0098±0,00024
ISO 2x85mg/kg	0,007±0,0005*	0,048±0,001	0,0092±0,00023
ISO 2x100mg/kg	0,007±0,0002*	0,043±0,0006*	0,0090±0,00019*

Média ± e.p.m. * p < 0,05 ANOVA seguido de Dunnett vs. salina.