



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Fisiologia e Biofísica**

**Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia**

**EDNEIA MENDES DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO MECANISMO CARDIOPROTETOR DE UM  
TRIPLEPTÍDEO DERIVADO DE Ts14, PEPTÍDEO VASODILATADOR DA PEÇONHA  
DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

Belo Horizonte

2021

EDNEIA MENDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO MECANISMO CARDIOPROTETOR DE UM  
TRYPEPTÍDEO DERIVADO DE Ts14, PEPTÍDEO VASODILATADOR DA PEÇONHA  
DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Área de concentração em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

Coorientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza Dos Santos

Belo Horizonte

2021

043

Silva, Edneia Mendes da.

Caracterização parcial do mecanismo cardioprotetor de um tripeptídeo derivado de Ts14, peptídeo vasodilatador da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* [manuscrito] / Edneia Mendes da Silva. – 2021.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga. Coorientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Isquemia. 3. Preparação de Coração Isolado. 4. Venenos de Escorpião. I. Braga, Thiago Verano. II. Santos, Robson Augusto Souza dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 550 DE EDNEIA MENDES DA SILVA**

**"Caracterização Parcial do Mecanismo Cardioprotetor Induzido Por Um Tripeptídeo Sintético Similar Ao Ts14,  
Um Peptídeo Vasodilatador da Peçonha do Escorpião Tityus serrulatus"**

**EDNEIA MENDES DA SILVA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **15 de dezembro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**, IEP/Santa Casa BH  
**Prof. Dr. Almir de Sousa Martins**, ICB/UFMG  
**Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, ICB/UFMG - Coorientador  
**Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elena de Lima Perez Garcia, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2021, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Almir de Sousa Martins, Membro de comissão**, em 16/12/2021, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).





Documento assinado eletronicamente por **Robson Augusto Souza dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 22/12/2021, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1142156** e o código CRC **EC9B4BE4**.

---

Referência: Processo nº 23072.263608/2021-38

SEI nº 1142156

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Thiago por me receber em seu grupo de trabalho e no laboratório de Hipertensão.

Ao professor Robson por aceitar a coorientação extremamente relevante para a conclusão deste trabalho.

À professora Maria José por disponibilizar os ratos SHR e SD para os experimentos.

A todos os professores do laboratório de Hipertensão por disponibilizarem equipamentos, insumos e compartilharem seus conhecimentos.

Ao Filipe pela colaboração no projeto.

Ao professor Jader e à professora Sílvia Guatimosim por compartilharem equipamentos e insumos essenciais aos experimentos em momentos de dificuldade.

À Mônica pela dedicação e cuidado com os ratos do biotério do laboratório de Hipertensão, e pelo convívio agradável tão importante no ambiente de trabalho.

A Carlos Ornelas, Renata Ribeiro, Alexandre Bruno, Lucas Bolais, Jônathas Almeida e Lucas Rodrigues por compartilharem seus conhecimentos.

Aos colegas do laboratório de Hipertensão com os quais aprendi muito durante todo o tempo de convivência.

À minha família, especialmente à minha filha Brisa, pelo apoio durante o período de dedicação ao projeto de mestrado.

Ao PPGFisFar pela oportunidade de crescimento científico.

Enfim, a todas as pessoas que torceram ou colaboraram para que eu conseguisse superar vários obstáculos, chegar até este momento e concluir mais uma etapa na minha formação acadêmica.

À CAPES, à Fapemig e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

***“Cada dificuldade na vida nos oferece uma oportunidade para nos voltarmos para dentro de nós mesmos e recorrermos aos nossos recursos interiores escondidos ou mesmo desconhecidos. As provações que suportamos podem e devem nos revelar quais são as nossas forças.”***

***(Shaaron Lebell, Epicteto – Arte de Viver)***

## Resumo

**Introdução:** A Hipotensina (Ts 14) é um peptídeo vasoativo presente na peçonha do escorpião amarelo *Tityus serrulatus*. Um tripeptídeo sintético derivado de Ts14 é capaz de potencializar o efeito hipotensor da Bradicinina (BK) e ativar o receptor B2 da BK, levando à vasodilatação. Esse tripeptídeo é capaz de promover um efeito anti-hipertensivo em ratos hipertensos (linhagem SHR). Quando a hipertensão não é tratada, podem ocorrer aterosclerose e infarto do miocárdio que podem progredir para insuficiência cardíaca e morte. Um dos tratamentos após o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a reperfusão coronariana, que por sua vez também pode causar lesões no coração, o que torna desejável a identificação de novas moléculas cardioprotetoras. Nesse sentido, estudos preliminares sugerem que o tripeptídeo induz um efeito inotrópico positivo, aumento da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE), um efeito cronotrópico negativo e reduz as arritmias associadas à isquemia/reperfusão (I/R) em corações de ratos Wistar após isquemia/reperfusão (I/R). Esses efeitos não são dependentes da produção de óxido nítrico (NO), que é um mecanismo de ação comum para moléculas cardioprotetoras. **Objetivo:** estudar o mecanismo cardioprotetor do tripeptídeo em corações reperfundidos após isquemia experimental. **Materiais e Métodos:** Foram organizados 3 protocolos experimentais: no protocolo experimental I, foram utilizados ratos Wistar machos, no protocolo experimental II, foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e no protocolo experimental III, foram utilizados ratos normotensos Sprague Dawley (SD). Cada um dos protocolos foi dividido em 3 grupos experimentais. O primeiro grupo foi constituído de corações saudáveis, sem indução da I/R, que foi induzida para o segundo e terceiro grupos. Enquanto nos protocolos experimentais I e II foi induzida isquemia regional, no protocolo III foi induzida isquemia global. Os experimentos ocorreram no Sistema de Langendorff e a solução de Krebs-Ringer foi usada para perfundir o coração. O pré-condicionamento com o tripeptídeo (grupo 3) dos protocolos I e II teve um período de estabilização de 50 minutos, seguido de 30 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão, sendo que a solução contendo o tripeptídeo perfundiu o coração a partir de 20 minutos de estabilização até o final da reperfusão. O pré-condicionamento com o tripeptídeo (grupo 3) do protocolo III teve período de estabilização de 35 minutos, 25 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão, sendo que a solução contendo o tripeptídeo perfundiu o coração a partir

de 20 minutos de estabilização até o final da reperfusão. A aquisição de dados foi feita no programa LabChart e a região circundante à isquemia foi preservada para análise molecular (Western blotting). Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG – Protocolo nº 213/2016. **Resultados:** Os parâmetros fisiológicos cardíacos avaliados tais como frequência cardíaca, pressões máxima e mínima ainda são inconclusivos e será necessário repeti-los e reavaliá-los. Entretanto, mostrou-se que o tripeptídeo aumentou a fosforilação de Akt nos corações tratados. A Akt fosforilada está relacionada à sobrevivência celular. **Conclusão:** Este trabalho permitiu a caracterização parcial do mecanismo de cardioproteção do tripeptídeo.

**Palavras-chave:** Isquemia/reperfusão, coração isolado, cardioproteção, peptídeo potenciador de bradicinina, Akt, *Tityus serrulatus*

## Abstract

**Introduction:** The Hypotensin (Ts14) is a vasoactive peptide that is found in the venom of the yellow scorpion *Tityus serrulatus*. A Ts14-derived synthetic tripeptide can potentiate the hypotensive effect of Bradykinin (BK) and activates the B2 receptor, leading to vasodilation. This tripeptide promotes an anti-hypertensive action in spontaneously hypertensive rats (SHR lineage). When hypertension is not treated, atherosclerosis and myocardial infarction can occur and can progress to heart failure and death. The current treatment for acute myocardial infarction (AMI), which is an ischemic injury of cardiac myocytes, is coronary reperfusion, but reperfusion can also lead to tissue damage. Thus, searching for new cardioprotective agents is in great need. In this regard, preliminary results suggest that this tripeptide induces a positive inotropic effect, due to increased left ventricle developed pressure (LVDP), and reduced heart rate. It also reduced the cardiac arrhythmias associated with I/R. All effects were independent of NO production, which is a common mode of action for cardioprotection. **Objective:** To characterize the cardioprotective mechanism of the tripeptide in reperfused hearts after experimental I/R. **Materials and Methods:** Three experimental protocols were organized with male rats: in experimental protocol I, Wistar rats were used, in experimental protocol II, spontaneously hypertensive rats (SHR), and in experimental protocol III, normotensive Sprague Dawley (SD) rats were used. Each of the protocols was divided into 3 experimental groups. The first group consisted of healthy hearts, without I/R induction, while I/R was induced for the second and third groups. The main difference between these last two groups was that the third group was treated with tripeptide before I/R. The experiments were carried out on the Langendorff System and the Krebs-Ringer solution was used for cardiac perfusion. In protocols I and II, preconditioning with the tripeptide (group 3) had a stabilization period of 50 minutes, followed by 30 minutes of ischemia and 30 minutes of reperfusion. The tripeptide perfused the hearts from 20 minutes of the stabilization until the end of reperfusion. In protocol III, preconditioning with the tripeptide (group 3) had a stabilization period of 35 minutes, followed by 25 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion. The tripeptide perfused the hearts from 20 minutes of the stabilization until the end of reperfusion. Data acquisition was performed using the LabChart program and the region corresponding to the

per-ischemic of the hearts was reserved for molecular analysis (Western blotting). The experiments were approved by the local Animal Ethical Committee (CEUA, Protocol No. 213/2016). **Results:** evaluated cardiac physiological parameters such as heart rate, maximum and minimum pressures are still not conclusive and it will be necessary to repeat and reassess them. However, tripeptide was shown to increase Akt phosphorylation in treated hearts. Phosphorylated Akt is related to cell survival. **Conclusion:** This project allowed the partial characterization of the tripeptide cardioprotection mechanism.

**Key words:** Ischemia/reperfusion, isolated heart, cardioproteccion, bradykinin potentiate peptide, Akt, *Tityus serrulatus*.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático da anatomia cardíaca .....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema evidenciando as principais ramificações das artérias coronárias esquerda e direita .....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema mostrando a sístole e a diástole de forma simplificada .....	22
<b>Figura 4.</b> Principais vias de cardioproteção .....	25
<b>Figura 5.</b> Resumo das cascatas de formação e degradação de cininas e ativação dos receptores B1 e B2 .....	29
<b>Figura 6.</b> Frequência cardíaca dos resultados preliminares .....	35
<b>Figura 7.</b> Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo dos resultados preliminares .....	35
<b>Figura 8.</b> Derivada máxima ou positiva da $dP/dt$ dos resultados preliminares .....	36
<b>Figura 9.</b> Índice de Gravidade de Arritmias de reperfusão dos resultados preliminares .....	36
<b>Figura 10.</b> Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo com L-NAME .....	37
<b>Figura 11.</b> Frequência cardíaca com L-NAME .....	38
<b>Figura 12.</b> Derivada máxima da $dP/dt$ com L-NAME .....	38
<b>Figura 13.</b> Índice de gravidade de arritmias com L-NAME .....	39
<b>Figura 14.</b> Foto de aparato de Langendorff com coração acoplado .....	47
<b>Figura 15.</b> Detalhe do registro da pressão intraventricular no LabChart .....	48
<b>Figura 16.</b> Efeito do peptídeo na fosforilação da ERK .....	53
<b>Figura 17.</b> Efeito do peptídeo na fosforilação da Akt .....	54
<b>Figura 18.</b> Pressão Sistólica Final (Protocolo experimental I) .....	56
<b>Figura 19.</b> Pressão Diastólica Final (Protocolo experimental I) .....	56



<b>Figura 20.</b> Frequência Cardíaca (Protocolo experimental I) .....	57
<b>Figura 21.</b> dP/dT Máxima (Protocolo experimental I) .....	57
<b>Figura 22.</b> dP/dT Mínima (Protocolo experimental I) .....	58
<b>Figura 23.</b> Pressão Desenvolvida pelo VE (Protocolo experimental I) .....	58
<b>Figura 24.</b> Índice de gravidade de arritmias (Protocolo experimental I) .....	59
<b>Figura 25.</b> Pressão Sistólica Final (Protocolo experimental II) .....	60
<b>Figura 26.</b> Pressão Diastólica Final (Protocolo experimental II) .....	60
<b>Figura 27.</b> Frequência Cardíaca (Protocolo experimental II) .....	61
<b>Figura 28.</b> dP/dT Máxima (Protocolo experimental II) .....	61
<b>Figura 29.</b> dP/dT Mínima (Protocolo experimental II) .....	62
<b>Figura 30.</b> Pressão Desenvolvida pelo VE (Protocolo experimental II) .....	62
<b>Figura 31.</b> Índice de gravidade de arritmias (Protocolo experimental II) .....	63
<b>Figura 32.</b> Pressão Sistólica Final (Protocolo experimental III) .....	64
<b>Figura 33.</b> Pressão Diastólica Final (Protocolo experimental III) .....	64
<b>Figura 34.</b> Frequência Cardíaca (Protocolo experimental III) .....	65
<b>Figura 35.</b> dP/dT Máxima (Protocolo experimental III) .....	65
<b>Figura 36.</b> dP/dT Mínima (Protocolo experimental III) .....	66
<b>Figura 37.</b> Pressão Desenvolvida pelo VE (Protocolo experimental III) .....	66
<b>Figura 38.</b> Gravidade de arritmias (Protocolo experimental III) .....	67
<b>Figura 39.</b> Fotos da área infartada (Protocolo III) .....	67
<b>Figura 40.</b> Área infartada (Protocolo III) .....	68
<b>Figura 41.</b> Sugestão de via cardioprotetora do tripeptídeo .....	72

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Concentração final da solução de Krebs-Ringer .....	46
--	----

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

AKT – Proteína cinase B

AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico

AP – Aminopeptidase

ATP – Trifosfato de adenosina

AVE – Acidente vascular encefálico

BK – Bradicinina

Ca<sup>2+</sup> - Íons cálcio

([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) – Transiente de cálcio intracelular

CAPM – Cininogênio de alto peso molecular

CD - Calidina

CI – Condicionamento isquêmico

CIR – Condicionamento isquêmico remoto

CPM – Carboxipeptidase M

CPN – Carboxipeptidase N

DAC – Doença arterial coronariana

DCV – Doença cardiovascular

des-Arg-BK – desArginina bradicinina

ECA – Enzima conversora de Angiotensina

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial

Fator XIIa – Fator XII ativado

FC – Frequência cardíaca

GC – Guanilil ciclase

GMPC – Monofosfato de guanosina cíclico

GSK3 $\beta$  – Glicogênio Sintase Cinase 3  $\beta$

GPCR – Receptores acoplados à proteína G

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IGA – Índice de gravidade de arritmias

IP – Fosfato de inositol

I/R – Isquemia/reperfusão

L-NAME – NG-nitro-L-arginina metil éster

NADPH oxidase – oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NEP – endopeptidase neutra

NO – Óxido nítrico

PI3K – Fosfatidilinositol-3,cinase

PKC $\epsilon$ : Proteína cinase C épsilon

PKG – Proteína cinase G

PLA2 – Fosfolipase A2

PLC – Fosfolipase C

PPB – Peptídeo potenciador de bradicinina

PTPM ou mTP - Poro de transição de permeabilidade mitocondrial

PVDE – Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

RISK – Cinase protetora de lesão de reperfusão

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SAFE – Cinase pró sobrevivência

SD – Linhagem de ratos Sprague Dawley

SERCA – Ca<sup>2+</sup>ATPase do retículo sarcoplasmático

SOD – enzima superóxido dismutase

Ts14 – Peptídeo isolado do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

WHO – Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. Anatomia do coração .....	19
1.2. Fisiologia cardíaca .....	21
1.3. Cardiopatia Isquêmica e Infarto Agudo do Miocárdio .....	23
1.4. Cardioproteção .....	24
1.5. Sistema Caliceína-Cininogênio-Cininas .....	27
1.6. Peptídeos Potenciadores de Bradicininina .....	31
1.7. Modelos experimentais disponíveis para estudar as doenças isquêmicas do coração .....	32
1.8. Resultados preliminares indicando efeito cardioprotetor do tripeptídeo derivado de Ts14 .....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	42
3.1. Objetivo geral .....	42
3.2. Objetivos específicos .....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1. Animais .....	43
4.2. Delineamento experimental .....	43
4.2.1. Protocolo experimental I – Ratos Wistar .....	43
4.2.2. Protocolo experimental II – Ratos SHR .....	44
4.2.3. Protocolo experimental III – Ratos SD .....	45
4.3. Preparação do coração e o Aparato de Langendorff .....	46
4.4. Concentração do Peptídeo derivado do Ts4 .....	47
4.5. Índice de Gravidade de Arritmias .....	48
4.6. Área infartada .....	49
4.7. Western blotting .....	49

<b>4.8. Análise estatística .....</b>	<b>51</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Análises Moleculares com Pré-condicionamento com o Tripeptídeo (Protocolo I) .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.1. Western Blotting - ERK fosforilada normalizada pela ERK total .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.2. Western Blotting - Akt fosforilada normalizada pela Akt total .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Efeito do tripeptídeo na função cardíaca .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2.1. Protocolo experimental I: ratos Wistar .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.2. Protocolo experimental II: ratos SHR .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.3. Protocolo experimental III: ratos SD .....</b>	<b>63</b>
<b>5.3. Efeito do tripeptídeo na área infartada (Protocolo experimental III) .....</b>	<b>67</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>9 LIMITAÇÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

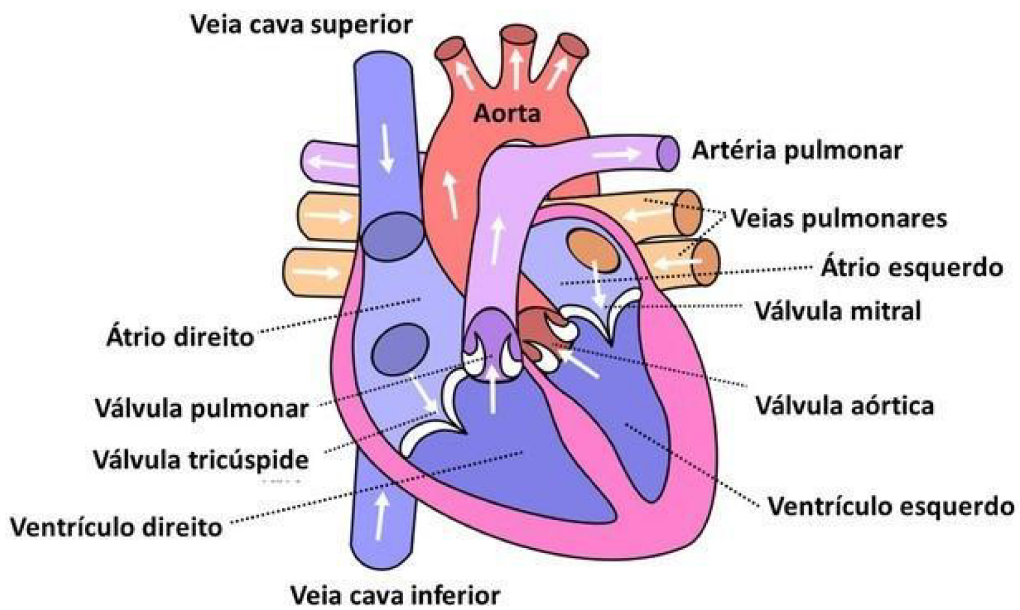
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Anatomia do Coração

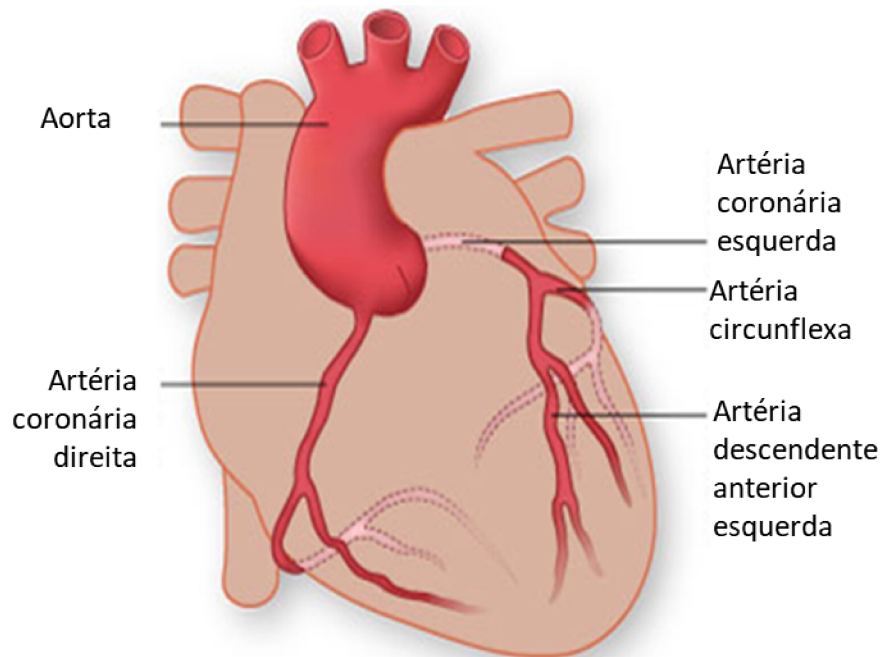
O coração é um órgão complexo que, no caso de aves e mamíferos, é composto por quatro câmaras – dois átrios e dois ventrículos. O sangue chega ao átrio direito (AD) através das veias cavas inferior e superior, passa do AD para o ventrículo direito (VD) após abertura da válvula tricúspide e sai do VD através da artéria pulmonar. Após ser oxigenado nos pulmões, o sangue entra no átrio esquerdo (AE) pelas veias pulmonares, segue para o ventrículo esquerdo (VE) logo depois da abertura da válvula mitral e deixa o VE pela artéria aorta em consequência da abertura da válvula aórtica. A sequência de abertura e fechamento das válvulas e a contração muscular coordenada garantem o fluxo unidirecional do sangue no coração. O órgão é formado principalmente por cardiomiócitos, fibroblastos, células murais (pericitos e células de músculo liso), células endoteliais e células imunes (mieloide e linfóide) (MEILHAC & BUCKINGHAM, 2018; LITVIŇUKOVÁ *et al.*, 2020). O coração possui ainda células especializadas em gerar e conduzir os impulsos cardíacos. Essas células estão organizadas formando o nódulo sinoatrial (localizado na junção entre a veia cava superior e o AD), o nódulo atrioventricular (situado no limite do AD com o VD), o feixe de His (no topo do septo interventricular) e as fibras de Purkinje (que partem dos ramos do feixe de His e alcançam as paredes livres dos ventrículos) (PARK & FISHMAN, 2017). A anatomia cardíaca resumida pode ser verificada na **figura 1**.

As artérias coronárias são as principais responsáveis pelo suprimento de sangue em toda a extensão do coração. Elas emergem da base do arco aórtico e se dividem em artéria coronária direita e esquerda. A artéria coronária direita perfunde principalmente o átrio e o ventrículo direitos, enquanto a esquerda perfunde principalmente o átrio e o ventrículo esquerdos. Na região anterior do ventrículo esquerdo, encontra-se o ramo descendente da artéria coronária esquerda (WHITAKER, 2018), como pode ser verificado na **figura 2**.





**Figura 1.** Desenho esquemático da anatomia cardíaca



**Figura 2.** Esquema adaptado evidenciando as principais ramificações das artérias coronárias esquerda e direita.

1. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/sistema-cardiovascular-exercicios/>

2. Disponível em: <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/the-coronary-arteries/>

(Sites acessados em 21/10/2021)

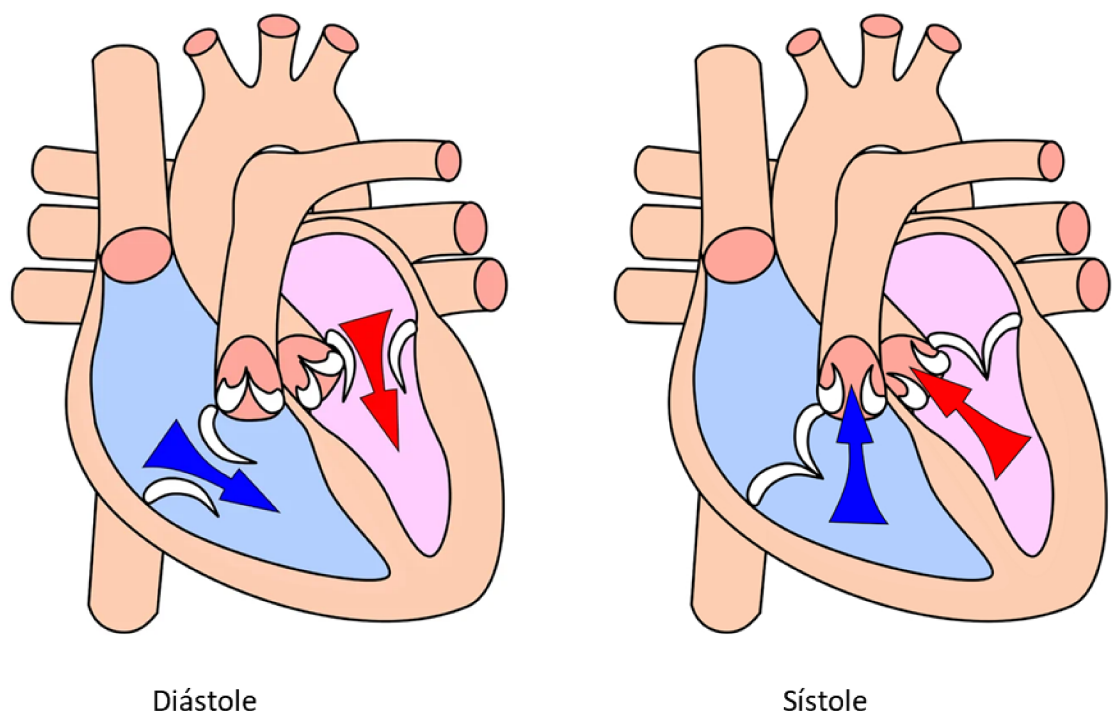
## 1.2 Fisiologia Cardíaca

O bombeamento ininterrupto do sangue pelo coração ocorre em virtude dos impulsos elétricos gerados no nódulo sinoatrial, o principal marca-passo fisiológico cardíaco. Os impulsos gerados são rapidamente propagados pelo músculo atrial, culminando na sua contração (sístole), abertura das válvulas tricúspide e mitral e na ejeção do sangue dos átrios para os ventrículos. Devido aos impulsos serem mais lentos no nódulo atrioventricular e demorarem a chegar ao feixe de His, os ventrículos estão em diástole (relaxados) no momento em que o sangue é ejetado dos átrios. Quando os impulsos alcançam o feixe de His, eles se propagam rapidamente pelos seus ramos (direito e esquerdo) até as fibras de Purkinje, levando à sístole ventricular, após abertura das válvulas pulmonar e aórtica (CHRISTOFFELS & MOORMAN, 2009). Na **figura 3**, são mostradas, de forma simplificada, a diástole e a sístole ventriculares.

A quantidade de sangue bombeada pelo coração por minuto é denominada débito cardíaco (DC) e depende da frequência cardíaca (FC) e do volume sistólico (volume ejetado a cada sístole ventricular). A FC é modulada pelo sistema nervoso autônomo (SNA), podendo ser aumentada através da liberação de noradrenalina por fibras eferentes do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) ou diminuída em decorrência da liberação de acetilcolina pelo sistema nervoso autônomo parassimpático (SNP), através do nervo vago. A modulação da FC, induzindo seu aumento (taquicardia) ou diminuição (bradicardia) é denominada efeito cronotrópico positivo ou negativo, respectivamente. Além da FC, a contratilidade, a pré-carga e a pós-carga são fatores determinantes do DC. A contratilidade está relacionada à força de contração do músculo cardíaco (efeito inotrópico). A pré-carga está relacionada à distensão das fibras miocárdicas relaxadas. Dentro de limites fisiológicos, quanto maior a distensão das fibras, maior será a força de contração do músculo cardíaco, de forma que a pré-carga depende do enchimento dos ventrículos durante a diástole. A pós-carga é a força contra a qual os ventrículos devem atuar a fim de ejetar o sangue e depende principalmente da pressão arterial diastólica e do tônus vascular (VINCENT, 2008; ERNST, 2017). As sístoles ventriculares criam ondas de volume sanguíneo através dos vasos, cujas paredes se distendem para

receber o sangue (complacência). A complacência cria um potencial de força capaz de conduzir o fluxo sanguíneo para a região subsequente, onde a pressão está menor, contribuindo para um fluxo pulsátil através dos vasos. Como o sistema circulatório é um circuito fechado, o DC deve ser equivalente ao volume de sangue que retorna ao coração a partir das vênulas e veias (retorno venoso). O retorno venoso (RV) depende da pressão no sistema venoso, a qual é determinada pela complacência e pelo volume sanguíneo das vênulas e veias (MAGDER, 2016).

Para que o bombeamento do sangue seja eficiente, as células cardíacas devem receber constantemente os nutrientes e oxigênio através das artérias coronárias. O fluxo sanguíneo coronariano é regulado por múltiplos e complexos mecanismos, como as forças compressivas extravasculares a cada batimento cardíaco, a pressão de perfusão coronariana, além da modulação miogênica, metabólica local, endotelial, neural e hormonal (GOODWILL *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Esquema mostrando a diástole e a sístole ventriculares de forma simplificada.

3. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/sistole-e-diastole/> (acesso em 21/10/2021)

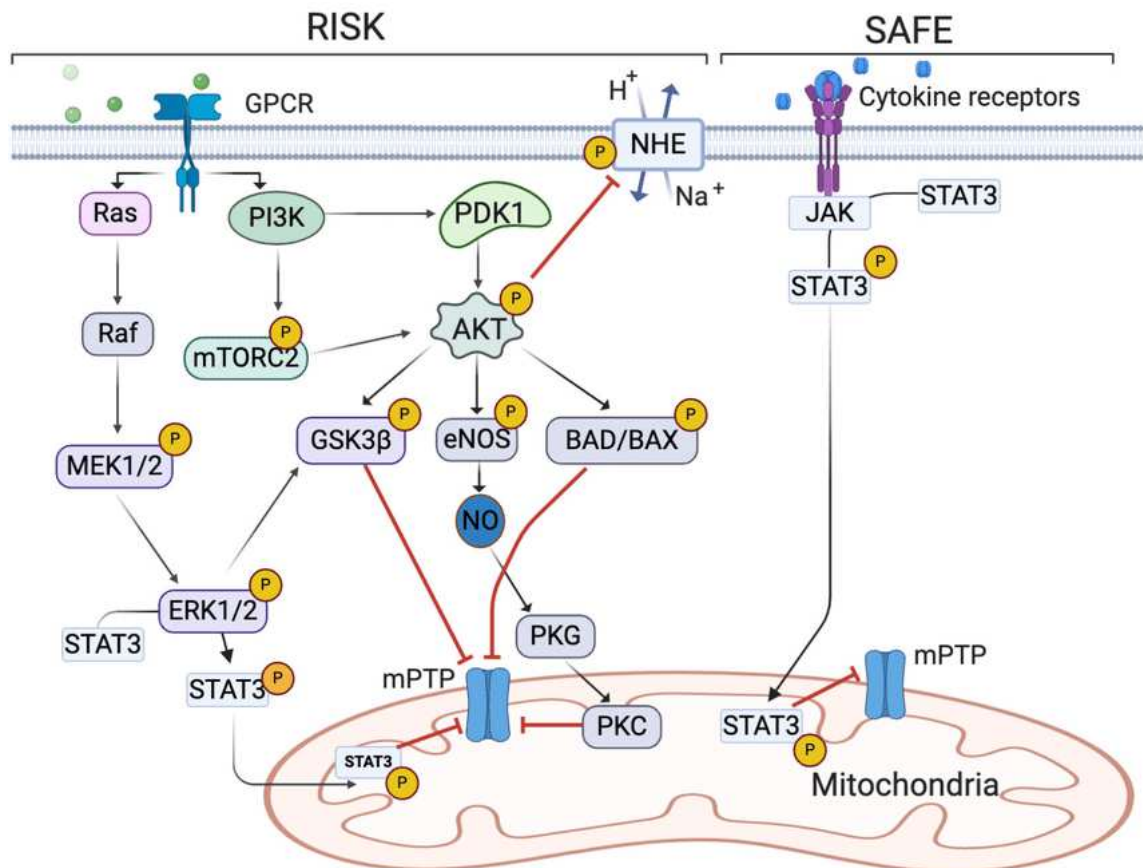
### 1.3 Cardiopatia Isquêmica e Infarto Agudo do Miocárdio

A doença arterial coronariana (DAC), principal causa de morbidade e mortalidade mundialmente, ocorre principalmente em decorrência da aterosclerose, que acarreta a diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo, comprometendo o suprimento de nutrientes e oxigênio em regiões do coração (SIQUEIRA *et al.*, 2006; KOJIMA *et al.*, 2016; TABAS, 2016; LIBBY *et al.*, 2019). A DAC é a principal causa da cardiopatia isquêmica que, na clínica, pode se manifestar como angina (dor torácica), infarto agudo do miocárdio (IAM), além de morte súbita, como discutido por MURRAY & LOPEZ (1997); CARVALHO & SOUSA (2001); WENGER (2003). O IAM é caracterizado por distúrbios eletrolíticos, como a sobrecarga celular de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), arritmias cardíacas, lesões teciduais e morte dos cardiomiócitos na região afetada pela isquemia. O IAM é uma das causas mais frequentes de insuficiência cardíaca, morbidade que diminui a qualidade de vida e a sobrevida do paciente (BARRETO *et al.*, 1998). Devido à sua abrangência global, considera-se o IAM uma pandemia, que acomete pelo menos 26 milhões de pessoas em todo o mundo (SAVARESE & LUND, 2017).

O atendimento ao indivíduo que sofre um IAM deve ser imediato para que, em ambiente hospitalar, possa haver uma rápida reperfusão coronariana. Restabelecer o fluxo sanguíneo e, com ele, o suprimento de oxigênio e nutrientes na região afetada, diminui a extensão do comprometimento cardíaco e possibilita alcançar um prognóstico mais favorável para o paciente. Apesar da necessidade da reperfusão coronariana, o restabelecimento do fluxo sanguíneo causa danos teciduais. Esses efeitos deletérios, denominados lesões de perfusão, se devem, principalmente, ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações no transiente de cálcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), culminando em arritmias cardíacas e morte celular, que, dependendo da gravidade e extensão, podem levar o paciente a óbito (BOLLI & MARBAN, 1999; PESARO *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2013; MOKHTARI-ZAER *et al.*, 2018). Em razão disso, vários grupos de pesquisa vêm buscando alternativas cardioprotetoras que possam minimizar essas lesões.

## 1.4 Cardioproteção

KUBLER & HAASS (1996) apresentaram a definição de cardioproteção como a preservação da função cardíaca através de mecanismos que, direta ou indiretamente, reduzem ou previnem danos ao tecido cardíaco. Diversas pesquisas, como as de SANTOS *et al.* (2004); LOCHNER *et al.* (2009); BASALAY *et al.* (2012); DE BRITO *et al.* (2018) e SILVA *et al.* (2021) têm sido feitas com o objetivo de elucidar os mecanismos de cardioproteção e, assim, desenvolver medicamentos ou técnicas para a melhora da função cardíaca em doenças cardiovasculares (DCVs), como após o IAM. Essas pesquisas têm apontado que os mecanismos envolvidos na cardioproteção após eventos de isquemia/reperfução (I/R) envolvem a ativação de vias que reduzem ROS, normalizam o transiente de cálcio e protegem as células cardíacas da morte celular. Na **figura 4**, são apresentadas as duas principais vias cardioprotetoras estudadas atualmente: a RISK (sigla em inglês para: cinases de recuperação de lesão de reperfusão), que está associada a vias canônicas PI3K/Akt/eNOS e MAPK/ERK, e a SAFE (sigla em inglês para: aumento do fator de ativação de sobrevivência), que induz cardioproteção através da cascata de transdução de sinais JAK/STAT.



**Figura 4.** Principais vias de cardioproteção resumidas (RØSAND & HØYDAL, 2021). GPCR: Receptor acoplado à proteína G; PI3K: Fosfatidilinositol-3 cinase; Akt: Proteína cinase B; GSK3β: Glicogênio Sintase Cinase 3 β; mPTP: Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial; eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial; NO: Óxido nítrico; PKG: Proteína cinase G; mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; ERK 1/2: cinase 1/2 regulada por sinal extracelular; Ras: proteína do vírus Sarcoma de rato; Raf: enzima codificada pelo gene RAF1; Mek: cinase ativadora da MAPK; STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição; JAK: Janus cinase; Bax e Bad: proteínas pro-apoptóticas; NHE: trocador de sódio e hidrogênio.

MURRY *et al.* (1986) descreveram um método de cardioproteção denominado pré-condicionamento isquêmico, que consiste em episódios breves e repetidos de isquemia antes de um período sustentado de isquemia cardíaca. Esse procedimento reduziu a taxa de depleção de ATP e a morte celular cardíaca, diminuindo a área infartada. Nas últimas décadas, vários estudos têm utilizado diversas formas de condicionamento que ativam vias cardioprotetoras em protocolos de I/R cardíaca. O condicionamento é dividido em isquêmico, caracterizado por breves episódios de isquemia, e farmacológico, pela utilização de algum fármaco cardioprotetor. O condicionamento isquêmico (CI) pode ser realizado no próprio órgão que sofrerá a

isquemia sustentada, podendo ocorrer antes (pré-condicionamento isquêmico) ou depois (pós-condicionamento isquêmico) do período sustentado de isquemia (PINHEIRO *et al.*, 2009; HEUSCH, 2015). Além disso, pode ser feito em órgão ou tecido distante daquele que passará pela isquemia sustentada, sendo denominado condicionamento isquêmico remoto (CIR). Este procedimento tem sido utilizado em cirurgias de pacientes com infarto do miocárdio e submetidos a revascularização do coração (THIELMANN *et al.*, 2013; HEUSCH *et al.*, 2015; WHITE *et al.*, 2015; HAUSENLOY *et al.*, 2019). O CIR pode ser efetuado antes (pré-condicionamento isquêmico remoto), durante a isquemia (percondicionamento isquêmico remoto) ou após o início da reperfusão cardíaca (pós-condicionamento isquêmico remoto), como explica BASALAY *et al.* (2016).

O condicionamento farmacológico é baseado na administração de fármacos que mimetizam o efeito cardioprotetor do CI e pode ser realizado antes ou após a isquemia. Tal condicionamento pode ativar várias vias que culminam na cardioproteção, como as vias eNOS/PKG, RISK e SAFE (**figura 4**). Na via RISK, após ativação de GPCR (receptor acoplado a proteína G) ocorre a ativação da PI3K (Fosfatidilinositol-3 cinase), da Akt (proteína cinase B) e inativação da GSK3 $\beta$  (Glicogênio Sintase Cinase 3  $\beta$ ), atenuando a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e evitando a morte celular. Na via da eNOS/PKG, através da ativação de PI3K e Akt, ocorre a ativação da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e consequente liberação de óxido nítrico (NO), culminando na abertura de canais mitocondriais de potássio sensíveis a ATP ( $mK_{ATP}$ ). Com a abertura desses canais, ocorre influxo de potássio ( $K^+$ ) na mitocôndria, diminuindo o influxo de  $Ca^{2+}$  e protegendo a mitocôndria de sobrecarga deste cátion, além de diminuir a produção de ROS e promover a ativação de cascatas de cinases relacionadas à cardioproteção (CHEN *et al.*, 2018; MARCK & PIERRE, 2018; SAEID *et al.*, 2018; ROTH *et al.*, 2021). Quando realizado antes da isquemia, o condicionamento farmacológico é denominado pré-condicionamento farmacológico e tem sido utilizado por diversos grupos de pesquisa para estudar o efeito cardioprotetor de moléculas tais como alguns anestésicos (RIESS *et al.*, 2004). Quando efetuado logo antes ou após o início da reperfusão, como ocorreu nos estudos de WU *et al.* (2020), é classificado como pós-condicionamento farmacológico. Em vários estudos, como o de FERREIRA *et al.* (2001), que reportaram os efeitos cardioprotetores da

Angiotensina-(1-7), o condicionamento farmacológico ocorreu durante todo ou quase todo o tempo de perfusão do coração.

Tanto o condicionamento isquêmico quanto o farmacológico têm sido estudados em outros órgãos além do coração, ativando vias que protegem os órgãos do estresse oxidativo e da morte celular. DERYAGIN *et al.* (2017), por exemplo, pesquisaram os efeitos protetores do pré-condicionamento em protocolo de I/R no cérebro. DAL *et al.* (2020) estudaram os efeitos farmacológicos da bradicinina (BK) em intestino de ratos em protocolo de I/R e demonstraram que, assim como o pré-condicionamento isquêmico, o farmacológico com BK também protege o órgão das lesões causadas pela I/R – mostrando o potencial efeito protetor deste peptídeo endógeno.

## 1.5 Sistema Calicreína-Cininogênio-Cininas

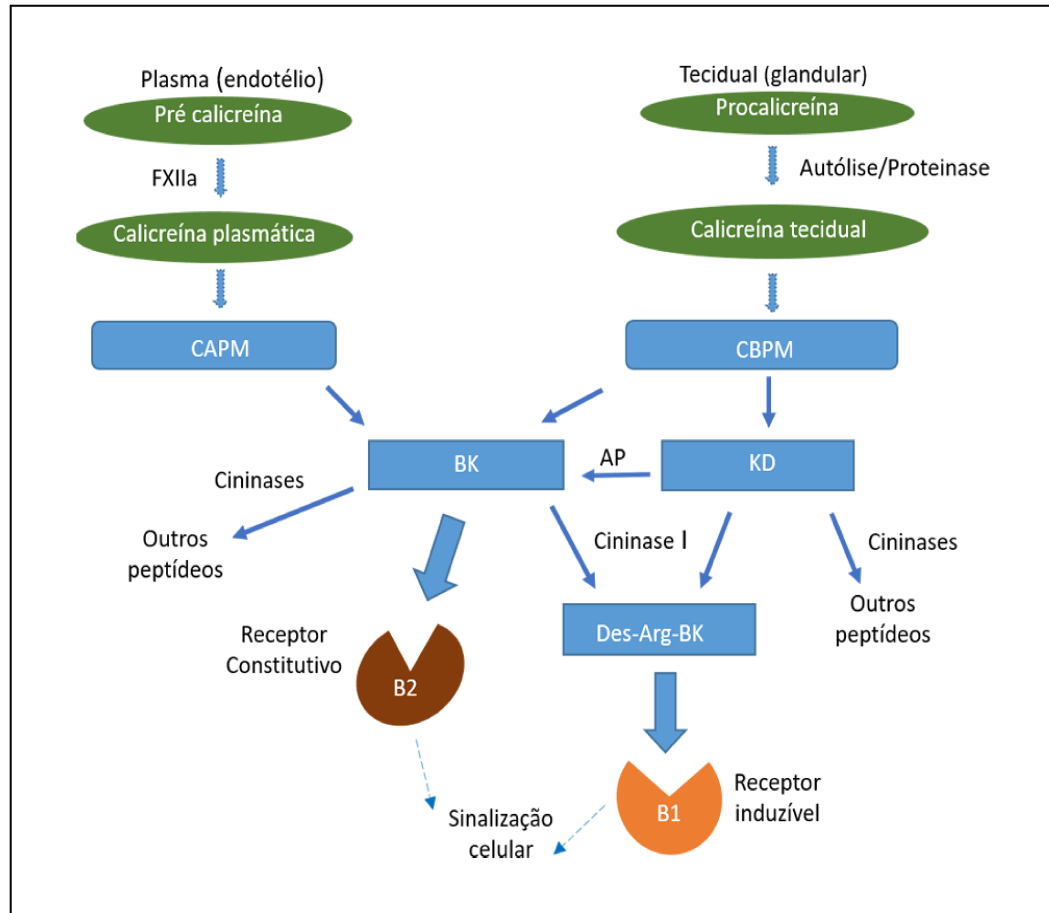
Cininas são oligopeptídeos vasoativos endógenos envolvidos em processos fisiológicos e fisiopatológicos, como, por exemplo, a regulação da pressão arterial (DUKA *et al.*, 2006), inflamação (CAMPBELL, 2000) e cardioproteção (GOTO *et al.*, 1995). Esses oligopeptídeos são formados a partir de diferentes isoformas de cininogênio (de alta massa molecular e de baixa massa molecular), principalmente através de clivagem pela cininogenase denominada calicreína. Existem várias cininas e as mais importantes fisiologicamente são a calidina (Lys-bradicinina), a BK e a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (des-Arg-BK), sendo a calidina (KD) e a BK formadas pela ação da calicreína. Calicreínas são serino-proteases divididas em duas grandes categorias: calicreínas plasmáticas e calicreínas teciduais ou glandulares. Os precursores das calicreínas (pré-calicreínas) e o cininogênio plasmáticos são sintetizados no fígado (BAXTER & EBRAHIM, 2002; MARCEAU *et al.*, 2018). MANDLE & KAPLAN (1977) demonstraram que a calicreína plasmática é formada a partir da clivagem de sua precursora, a pré-calicreína, pelo fator XII ativado (fator XIIa) ou por fragmentos do fator XII (fator XII<sub>f</sub>). A partir da ação da calicreína plasmática no cininogênio de alta massa molecular (CMM), é formada a BK que, por estar no plasma, atua de forma sistêmica. As calicreínas teciduais podem ser expressas, por exemplo, nos rins, nos testículos, seios, útero, ovários e são muito



estudadas como possíveis marcadores em pesquisas com diversos tipos de câncer e outras doenças (CLEMENTS *et al.*, 2004; YOUSEF *et al.*, 2005).

Em estudo com corações de ratos, NOLLY *et al.* (1994) demonstraram que as calicreínas teciduais, assim como o cininogênio, são sintetizadas no tecido cardíaco. Eles consideraram que as calicreínas produzidas no tecido cardíaco podem clivar tanto o cininogênio tecidual quanto aquele proveniente do plasma para formar as cininas. Tanto a BK quanto a KD são peptídeos com uma meia vida curta (~ 30 segundos) na circulação sanguínea (CYR *et al.*, 2001), sendo rapidamente degradados por diversas cininases, como a enzima conversora de angiotensina (ECA), a endopeptidase neutra (NEP), a carboxipeptidase N (CPN) e a carboxipeptidase M (CPM) (QADRI & BADER, 2013).

Os efeitos das cininas são mediados por dois receptores (B1 e B2) que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR). O receptor B1 geralmente é expresso após uma injúria tecidual, tem afinidade maior pela des-Arg<sup>9</sup>-BK e está relacionado a hiperalgesia e inflamação crônica. O receptor B2, por outro lado, é expresso constitutivamente nos vasos sanguíneos, no cérebro, no útero, nos testículos, nos pulmões, nos rins e no coração, por exemplo, com maior afinidade pela BK e sua ativação é relacionada à vasodilatação e hipotensão, broncoconstrição, dor e inflamação (HESS *et al.*, 1992; MENKE *et al.*, 1994; PATHAK *et al.*, 2013). A ativação desses receptores leva à liberação de inositol fosfato (IP) e ao aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  dependentes de fosfolipase C (PLC). Em células endoteliais, o aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  resulta na ativação do ácido araquidônico via fosfolipase A2 (PLA2) e no aumento da produção de NO, que está relacionado com a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), exercendo efeitos como vasodilatação e proteção contra injúria isquêmica (TSCHÖPE *et al.*, 2000). As cascatas de formação e degradação das cininas, assim como a ativação dos receptores B1 e B2, estão resumidas na **figura 5**.



**Figura 5.** Adaptada de PATHAK *et al.* (2013). Resumo das cascatas de formação e degradação de cininas e ativação dos receptores B1 e B2. FXIIa: Fator XII ativado; CAPM: Cininogênio de alto peso molecular; CBPM: Cininogênio de baixo peso molecular; BK: Bradicinina; KD: Calidina; Des-Arg-BK: Des-Arg-bradicinina; AP: Aminopeptidase; B1: Receptor B1 de bradicinina; B2: Receptor B2 de bradicinina.

O nome bradicinina foi dado por ROCHA E SILVA *et al.* (1949), devido às contrações lentas que o peptídeo causava no íleo de cobaia (*Cavia porcellus*) na presença de peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. Além dos experimentos com íleo, os pesquisadores também verificaram um efeito hipotensor da BK quando injetada pela via intravenosa em coelhos. Em estudo com o coração isolado de rato, BAYDOUN & WOODWARD (1991) demonstraram que o efeito vasodilatador da BK era mediado pela ativação do receptor B2 de bradicinina. Além de ser um modulador da pressão arterial, a BK pode desencadear efeitos protetores no tecido cardíaco. ITO *et al.* (2003) estudaram o efeito da BK nos receptores B2 em modelo *in vivo* de infarto do miocárdio (IM) em ratos. A ativação dos receptores B2 reduziu a extensão da área infartada e, conseqüentemente, a severidade do IM. Eles atribuíram a

cardioproteção ao aumento do fluxo sanguíneo próximo à região afetada pela isquemia. CHAO *et al.* (2008) demonstraram que a ativação do receptor B2 melhorou a função das células cardíacas através da inibição de apoptose e inflamação, tanto em modelo de infarto do miocárdio *in vivo* quanto em cultura de cardiomiócitos de rato. DONG *et al.* (2013) estudaram o efeito da administração de BK exógena em linhagem H9C2 de cardiomiócitos de rato tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa senescência celular, induzindo dano no DNA, pois aumenta a atividade da NADPH oxidase, um complexo enzimático que constitui uma das principais fontes de produção de ROS, além de regular negativamente a expressão e a atividade de superóxido dismutases (SOD), enzimas com função antioxidante. O pré-tratamento com BK reduziu o número de células com dano no DNA, diminuiu a geração de ROS ao reduzir a atividade da NADPH oxidase e preveniu a diminuição da expressão e da atividade das SOD, sendo esses efeitos protetores mediados pela liberação de NO. No trabalho de POTIER *et al.* (2013), foi utilizado um protocolo de I/R *in vivo* em camundongos saudáveis e foi verificado o efeito cardioprotetor da ativação dos receptores B2 pelo agonista sintético [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradicinina aplicado pela via intravenosa no período de reperfusão. Através da ativação dos receptores B2, esse agonista, que é resistente à inativação por peptidases pulmonares, foi responsável por hipotensão, ativação da cascata cardioprotetora da Akt/PI3K e redução da área infartada. SGARRA *et al.* (2014) comprovaram o efeito cardioprotetor da ativação de receptores B2 por losartan, que é um medicamento utilizado como bloqueador de receptores AT1 de angiotensina (BRA), mas atuou como agonista de receptores B2. Após a ativação dos receptores B2, foi constatada a redução da área infartada e fosforilação da cinase B (Akt) e Glicogênio Sintase Cinase 3 β (GSK3β). Essas duas cinases pertencem a um complexo integrado de sinalização responsável pelo efeito protetor (**figura 4**), em que Akt ativada por fosforilação (no sítio de serina 473) induz a inativação da GSK3β através de fosforilação (no sítio de serina 9). Esse efeito cardioprotetor do losartan foi alcançado somente quando ele foi administrado intermitentemente no início do período de reperfusão, após protocolo de I/R em corações isolados de ratos. JEAN *et al.* (2016) compararam, em experimentos *in vivo* com ratos Sprague-Dawley (SD), o efeito vasodilatador e hipotensor da BK e dos peptídeos sintéticos B-9972 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,Oic7,Igl8]-BK), BK-Arg, BK-His-Leu e BK-Ala-Pro, demonstrando que esses peptídeos sintéticos se

comportam como agonistas do receptor B2 ativados por peptidases. Sendo assim, fica claro o potencial efeito protetor da via BK/B2 no coração.

## 1.6 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina

FERREIRA (1965) descreveu os efeitos de uma molécula isolada da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* que potencializou as ações da BK *in vitro* e *in vivo*. Como foi verificado que se tratava de um peptídeo, a molécula foi denominada peptídeo potenciador de bradicinina (PPB). Baseando-se no conhecimento sobre o PPB descrito por FERREIRA e em estudos com outros peptídeos isolados de *B. jararaca* e sobre as propriedades da enzima conversora de angiotensina (ECA) e seus potenciais inibidores, CUSHMAN e ONDETTI alteraram um desses peptídeos potenciadores de BK e desenvolveram o Captopril, um fármaco anti-hipertensivo capaz de inibir a ECA, que é amplamente conhecido e utilizado atualmente no tratamento da hipertensão arterial (CUSHMAN & ONDETTI, 1991). Vários PPB têm sido isolados de peçonhas de algumas espécies de serpentes e escorpiões, e de venenos secretados pela pele de sapos (PIMENTA & DE LIMA, 2005). IANZER *et al.* (2004) identificaram cinco novos PPB extraídos da peçonha de *B. jararaca* que contraíram íleo de *Cavia porcellus*, assim como ocorre com a BK. Em seu trabalho de revisão sobre os PPB encontrados na peçonha de *B. jararaca*, CAMARGO *et al.* (2012) enfatizaram a importância de um decapeptídeo que foi responsável pelo aumento da formação de NO e consequente efeito vasodilatador similar ao da BK. JIANG *et al.* (2014) isolaram, clonaram e testaram oito PPB da secreção da pele de três gêneros de sapos em diferentes preparações de músculo liso de rato. Eles verificaram que alguns tinham uma maior afinidade pelo receptor B1, porém a maioria dos peptídeos descritos eram ligantes preferenciais do receptor B2, promovendo a contração de músculo liso e vasodilatação, tendo um dos PPB, o Hyp<sup>3</sup>-RD-11, apresentado vasodilatação maior que a BK. GAO *et al.* (2020) identificaram um decapeptídeo que apresentou contração potente em preparações de músculo liso de rato e afinidade pelo receptor B2.

VERANO-BRAGA *et al.* (2008) trabalharam com uma nova família de PPB descoberta por eles, denominada hipotensina, presente na peçonha do escorpião

amarelo *Tityus serrulatus*. Os peptídeos dessa família possuem um efeito hipotensor dose-dependente e independente da administração de BK. A Ts14, inicialmente denominada Hipotensina-I e o membro mais estudado dessa família, foi capaz de induzir o relaxamento de anéis de artéria aorta de ratos Wistar, de uma maneira dependente de concentração, da presença de endotélio funcional e da produção de óxido nítrico (NO). Diferentemente dos PPB clássicos, que são inibidores da ECA, a Ts14 não foi capaz de inibir essa enzima.

Em cardiomiócitos isolados de ventrículo esquerdo de camundongos, o Ts14 induziu a liberação de NO mediada pelo seu efeito agonista no receptor B2, sendo o primeiro estudo que demonstrou que um PPB poderia ativar esse receptor. Foi verificado que haveria clivagem dessa molécula de 25 aminoácidos por carboxipeptidases, que são enzimas presentes no organismo (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008). Sendo assim, foram produzidos peptídeos minimizados a partir dela e testados para verificar quais continuavam com a mesma função. Um tripeptídeo (H-Lyz-Pro-Pro-OH) produzido através de minimização estrutural do Ts14 mostrou os mesmos resultados que a molécula original, causando o relaxamento de anéis de aorta (*ex vivo*), potenciação dos efeitos cardiovasculares da BK e redução da pressão arterial em ratos Wistar acordados (*in vivo*), tudo isso sem inibir a ECA em ensaios *in vitro* (VERANO-BRAGA *et al.*, 2010).

Em um estudo que avaliou o proteoma e o fosfoproteoma de cardiomiócitos isolados de camundongos C57BL/6 após tratamento com o tripeptídeo, GÓMEZ-MENDOZA *et al.* (2020) demonstraram que, após 5 minutos de tratamento, o tripeptídeo aumentou a fosforilação e consequente ativação da Akt, induziu a fosforilação de ERK 1/2 e, consistente com a ativação da via RISK de cardioproteção (**figura 4**), além disso, provocou a redução da contratilidade dos miócitos cardíacos.

## **1.7 Modelos experimentais disponíveis para estudar as doenças isquêmicas do coração**

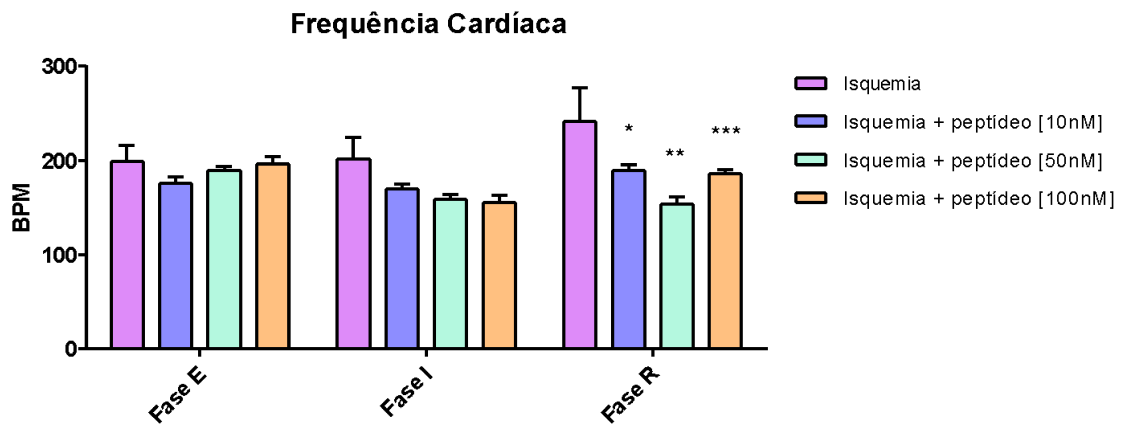
Para estudar os mecanismos envolvidos nas doenças isquêmicas e desenvolver novas terapias, vários modelos experimentais (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*)

podem ser utilizados e são escolhidos de acordo com a abordagem dada em cada projeto. Apesar de o coração ser composto por vários tipos celulares, os cardiomiócitos são maioria e estão diretamente relacionados à função cardíaca, portanto são muito estudados em modelos *in vitro*. Quando não é possível utilizar as células primárias, são utilizados cardiomiócitos induzidos de linhagens celulares imortalizadas ou de células-tronco. A vantagem do estudo *in vitro* é que os efeitos da hipóxia e da reoxigenação podem ser verificados sem interferência de outros tipos celulares ou de fatores circulantes. Para avaliar a função cardíaca em estudos de I/R, o coração isolado (modelo *ex vivo*) é muito utilizado, pois os resultados são reproduzíveis, é possível verificar a região infartada, vários mecanismos podem ser estudados, além de serem eliminadas as interferências dos fatores circulantes sistêmicos e neuro-hormonais. Quando o objetivo é entender as influências sistêmicas relacionadas à função cardíaca, os modelos *in vivo* são utilizados. Neste caso, podem ser estudados desde animais invertebrados até mamíferos, sendo os roedores os mais utilizados, sendo empregadas várias linhagens, de acordo com as necessidades de cada estudo (LINDSEY et al., 2018; OH et al., 2019).

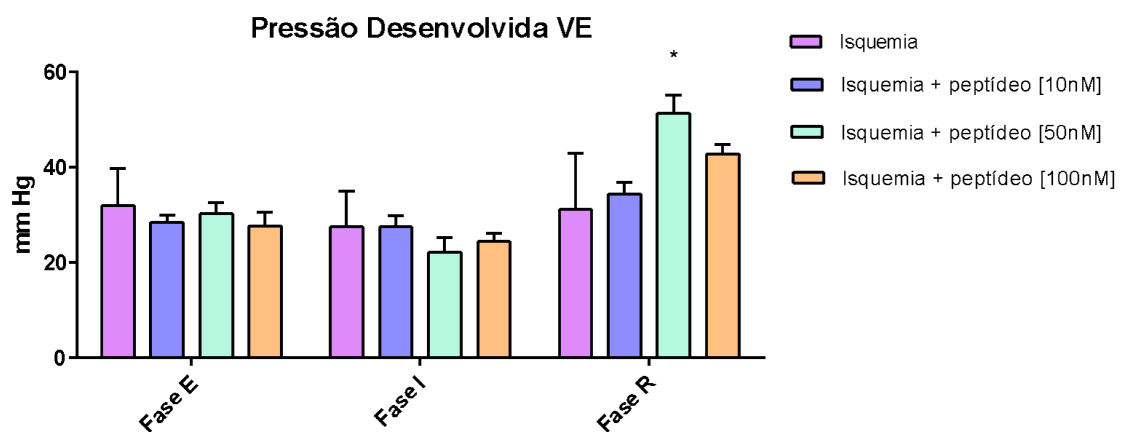
A técnica de Langendorff é um modelo de perfusão de coração isolado desenvolvido no final do século XIX e utilizado até os dias atuais após adaptações que se fizeram necessárias. No aparato de Langendorff, uma solução-tampão fisiológica, a solução de Krebs-Ringer, cuja composição é descrita na **Tabela 1** (no tópico de materiais e métodos) e na qual há injeção constante de mistura carbogênio (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono) é retrogradamente perfundida através da aorta de um coração isolado acoplado a este aparato. O sistema é preenchido pela solução nutritora e deve ser retirada qualquer bolha que se forme antes do experimento ser iniciado, a fim de evitar interferências nos resultados. A solução é mantida aquecida continuamente, permanecendo a 37°C durante todo o experimento. O sistema possui dois transdutores: um acoplado ao circuito de passagem da solução nutritora, que possibilita a obtenção da pressão de perfusão. O outro é inserido dentro do ventrículo esquerdo do coração isolado após este estar acoplado ao sistema, permitindo a obtenção da pressão intraventricular e possibilitando verificar parâmetros cardíacos e hemodinâmicos, tais como frequência cardíaca e pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. (ZIMMER, 1998; BELL et al., 2011).

## 1.8 Resultados preliminares indicam um efeito cardioprotetor do tripeptídeo derivado de Ts14

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa, utilizando o modelo experimental *ex vivo* de I/R em coração isolado de ratos Wistar, sugerem um efeito cardioprotetor do tripeptídeo. Foram testadas três concentrações diferentes deste peptídeo: 10 nM, 50 nM e 100 nM, que foram dissolvidas na solução de Krebs, perfundindo os corações a partir de 20 minutos de estabilização até o final da reperfusão (pré-condicionamento). O tripeptídeo induziu alterações significativas e dependentes de concentração na frequência cardíaca (FC), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE),  $dP/dT$  máxima (velocidade de contração dos miócitos) e no índice de gravidade de arritmias (IGA). Foi observado um efeito cronotrópico negativo na fase de reperfusão nas três concentrações testadas, com maior redução na concentração de 50 nM (**Figura 6**). O peptídeo induziu um efeito inotrópico positivo, pois aumentou significativamente a PDVE, mostrando uma melhora da força de contratilidade cardíaca apenas na concentração de 50 nM (**Figura 7**). Houve também um aumento da derivada máxima da  $dP/dt$ , evidenciando uma melhora da contratilidade, nas concentrações de 50 nM e 100 nM (**Figura 8**). Os corações também foram protegidos das arritmias cardíacas que são muito comuns durante o período de reperfusão, tanto na concentração de 50 nM quanto na de 100 nM (**Figura 9**).

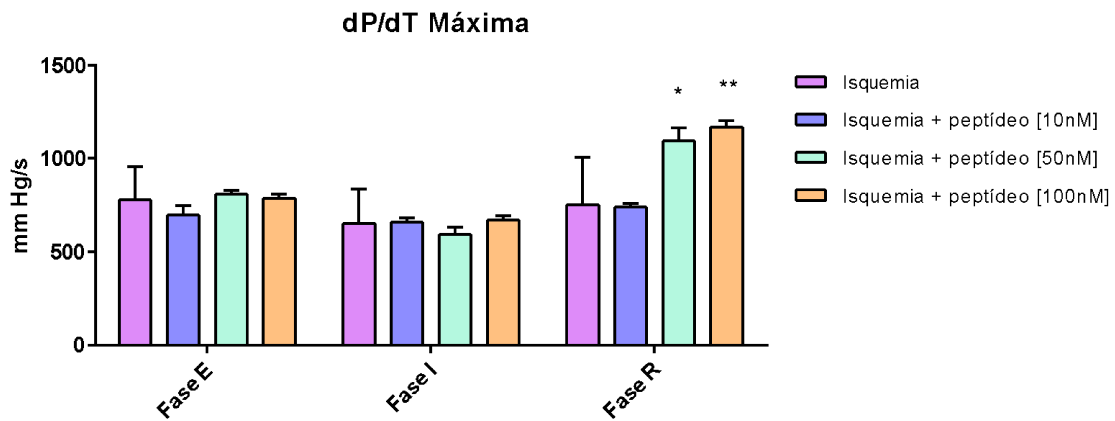


**Figura 6.** Frequência cardíaca dos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 10 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM” e “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 100 nM”. BPB: batimentos cardíacos por minuto. Fase E: fase de estabilização. Fase I: fase de isquemia. Fase R: fase de reperfusão.  $P < 0,05$ : \* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 10 nM versus isquemia; \*\* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 50 nM versus isquemia; \*\*\* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 100 nM versus isquemia (one-way ANOVA).

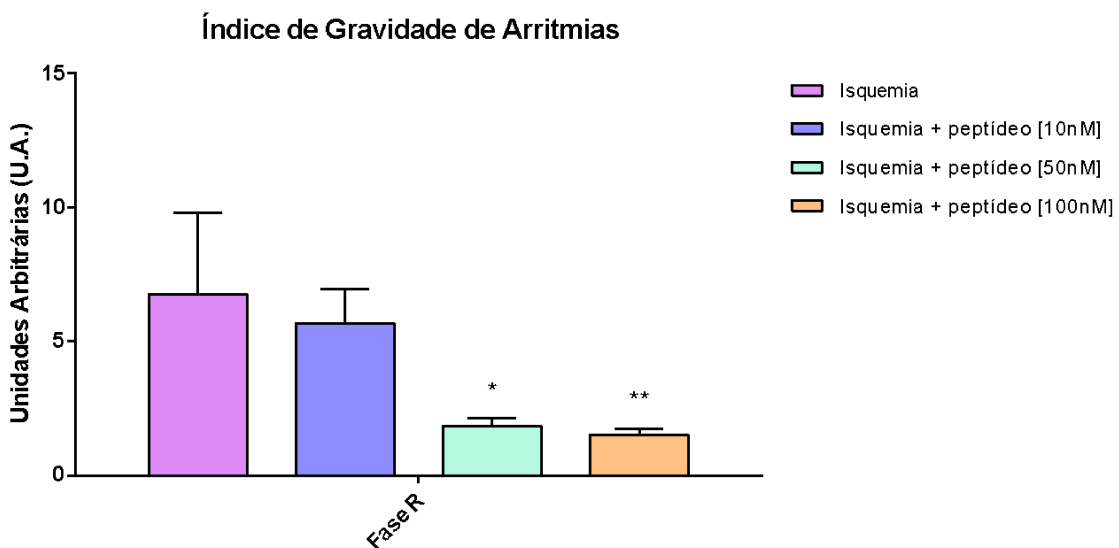


**Figura 7.** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) dos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 10 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM” e “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 100 nM”. Fase E: fase de estabilização. Fase I: fase de isquemia. Fase R: fase de reperfusão.  $P < 0,05$ : \* isquemia com perfusão de peptídeo na concentração do 50 nM versus isquemia (one-way ANOVA).



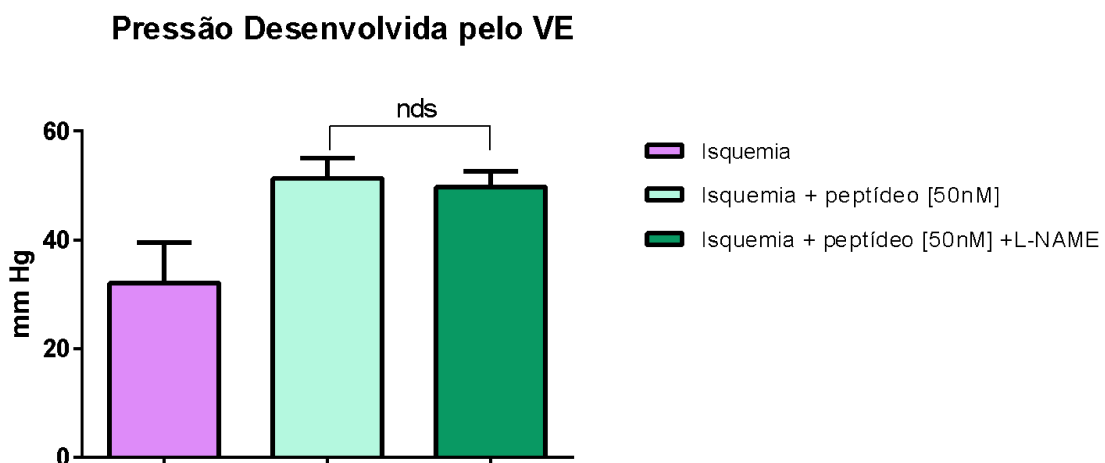


**Figura 8.** Derivada máxima ou positiva da dP/dt dos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 10 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM” e “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 100 nM”. Fase E: fase de estabilização. Fase I: fase de isquemia. Fase R: fase de reperfusão.  $P < 0,05$ : \* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 50 nM versus isquemia; \*\* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 100 nM versus isquemia (one-way ANOVA).

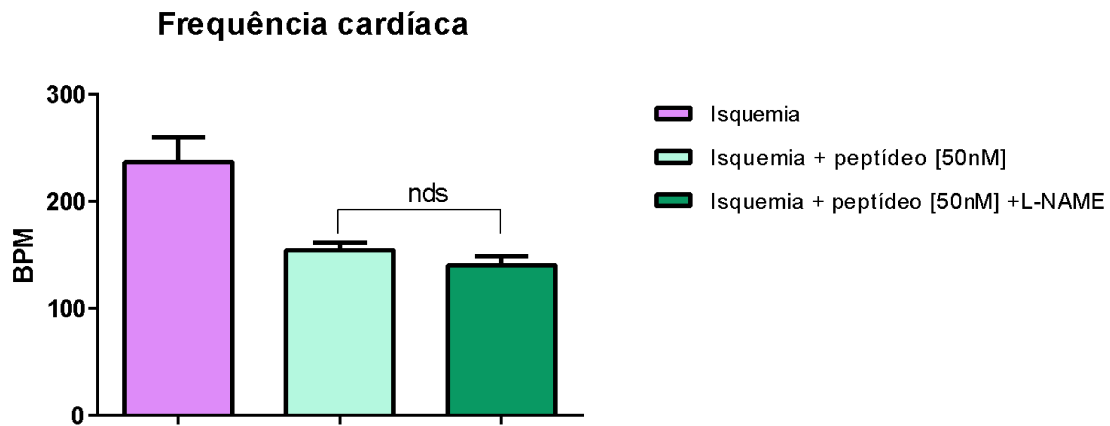


**Figura 9.** Índice de Gravidade de Arritmias (IGA) de reperfusão dos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 10 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM” e “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 100 nM”. Fase R: fase de reperfusão.  $P < 0,05$ : \* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 50 nM versus isquemia; \*\* isquemia com perfusão do peptídeo na concentração de 100 nM versus isquemia (one-way ANOVA).

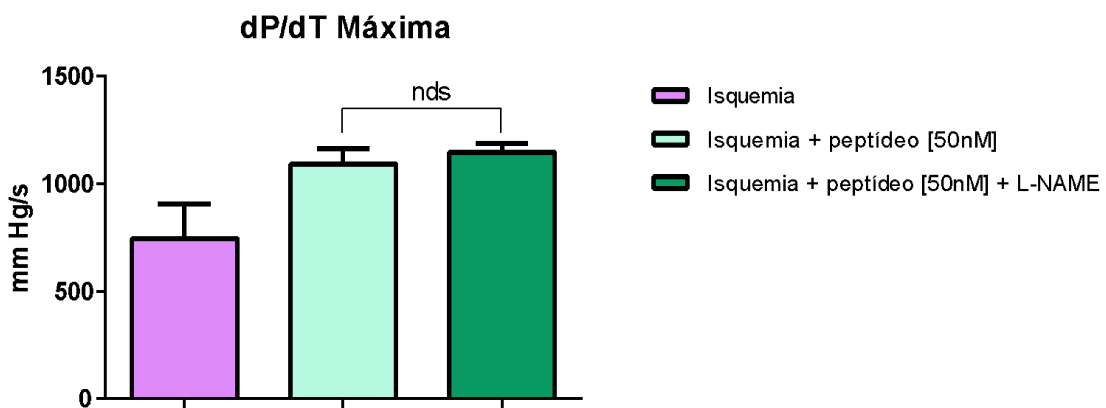
Após observar uma melhor indução de cardioproteção com 50 nM do peptídeo, essa concentração foi escolhida para os experimentos posteriores. Nesse sentido, o próximo passo foi verificar se os efeitos cardioprotetores observados dependiam da liberação de NO pelo tecido cardíaco. Para isso, o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), foi adicionado à solução de perfusão e o efeito cardioprotetor não sofreu alterações, demonstrando que não há dependência de NO para ocorrerem os efeitos cardioprotetores desencadeados pelo peptídeo. Resumidamente, não houve diferença significativa na PDVE entre o grupo tratado com o peptídeo e o tratado com o peptídeo na presença de L-NAME (**Figura 10**). O mesmo foi observado em relação à FC (**Figura 11**), dP/dt (**Figura 12**), e ao IGA (**Figura 13**).



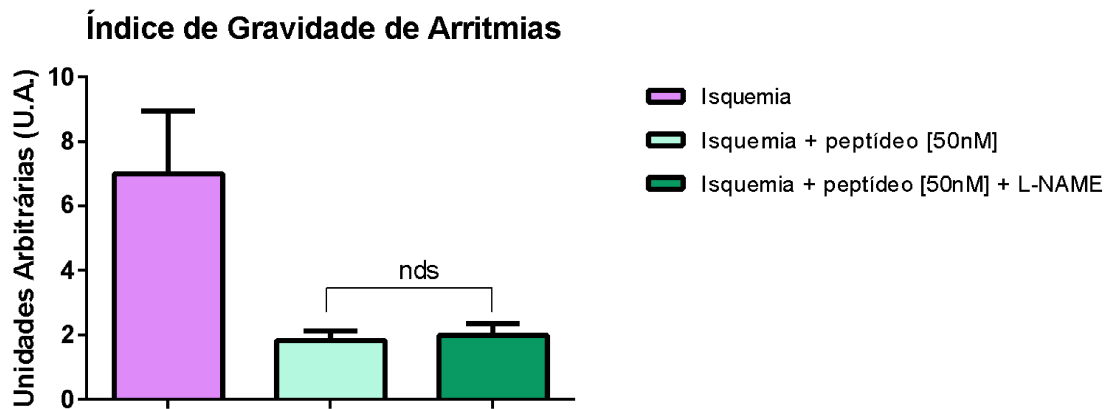
**Figura 10.** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) nos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM com L-NAME”.  $P < 0,05$ : Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo e o tratado com o peptídeo na presença de L-NAME: nds. (one-way ANOVA).



**Figura 11.** Frequência cardíaca nos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM com L-NAME”.  $P < 0,05$ : Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo e o tratado com o peptídeo na presença de L-NAME: nds. (one-way ANOVA).



**Figura 12.** Derivada máxima da dP/dt nos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM com L-NAME”.  $P < 0,05$ : Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo e o tratado com o peptídeo na presença de L-NAME: nds. (one-way ANOVA).



**Figura 13.** Índice de gravidade de arritmias (IGA) nos grupos “isquemia”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM”, “isquemia com perfusão do tripeptídeo na concentração de 50 nM com L-NAME”.  $P < 0,05$ : Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo e o tratado com o peptídeo na presença de L-NAME: nds. (one-way ANOVA).

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Por décadas, numerosos estudos em todo o mundo como, por exemplo, os de KRISHNAMURTHI *et al.* (2013), BARQUERA *et al.* (2015), SAVARESE & LUND (2017), têm relatado a alta prevalência e a importância das DCVs nas populações humanas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS (2021), em 2019, 32% das mortes no mundo foram em decorrência de DCVs, sendo que 85% desses óbitos ocorreram em consequência da doença arterial coronariana (DAC) ou do acidente vascular encefálico (AVE). No Brasil, em 2016, a doença coronariana isquêmica era a principal causa de mortes prematuras no Brasil, enquanto o AVE era a quarta (MARINHO *et al.*, 2018).

A DAC pode ser tratada farmacologicamente com diferentes classes de medicamentos, como os beta-bloqueadores (BBs), antagonistas de cálcio e nitratos. Ao bloquear os receptores adrenérgicos  $\beta_1$ , os BBs reduzem a FC, a contratilidade miocárdica, a tensão da parede ventricular esquerda e a pressão arterial. A redução da FC aumenta a duração da diástole, permitindo uma melhora na perfusão coronária. Dessa forma, há um aumento do equilíbrio entre a demanda e o suprimento de oxigênio. Os antagonistas de cálcio bloqueiam os receptores de cálcio do tipo L, diminuindo o influxo de cálcio nas células, produzindo vasodilatação e diminuição na pós-carga. Os nitratos aumentam a liberação de NO para o músculo liso vascular, causando vasodilatação (SANTUCCI *et al.*, 2020). Outros medicamentos também utilizados no tratamento das DAC são os inibidores da ECA e os bloqueadores do receptor de angiotensina II (BRAs) por reduzirem a pressão arterial e a resistência vascular. Quando ocorre o IAM e é verificada a obstrução arterial, é realizada a reperfusão o mais rápido possível para minimizar o comprometimento da função cardíaca, pois a restauração da circulação coronária limita a extensão da área infartada, melhorando o prognóstico do paciente. A reperfusão, porém, também causa injúrias, tais como arritmias cardíacas, que podem ser fatais. Devido aos danos causados tanto pela I/R, muitos pacientes que sofrem IAM desenvolvem insuficiência cardíaca, doença que diminui a qualidade de vida e sobrevida. Para reduzir os problemas causados pela I/R é importante encontrar formas de proteger o coração dessas lesões. Muitas pesquisas têm sido

feitas nas últimas décadas, utilizando diversos protocolos de condicionamento em modelos animais, mostrando mecanismos de cardioproteção. Poucas técnicas ou drogas, porém, chegam aos estudos translacionais. Por isso, é importante continuar pesquisando potenciais fármacos cardioprotetores (HEUSCH & RASSAF, 2016; IBANEZ *et al.*, 2018; TROMP *et al.*, 2021).

Considerando o potencial efeito cardioprotetor induzido pelo tripeptídeo sintético derivado de Ts14, é importante aprofundar os estudos e analisar os efeitos relacionados à cardioproteção, o que justifica a pesquisa proposta nesta dissertação.

### 3. OBJETIVOS

**3.1 Objetivo geral:** Estudar o efeito cardioprotetor desencadeado pelo tripeptídeo sintético derivado de Ts14 em modelo *ex vivo* de isquemia-reperfusão, tanto em ratos normotensos quanto hipertensos.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- 3.2.1** Estabelecer o modelo de isquemia-reperfusão com obstrução do ramo descendente da artéria coronária esquerda de corações isolados de ratos Wistar em aparato de Langendorff.
- 3.2.2** Estudar o modelo de isquemia-reperfusão com interrupção global do fluxo de solução de Krebs-Ringer + carbogênio em ratos normotensos Sprague dawley.
- 3.2.3** Estudar o potencial efeito cardioprotetor do peptídeo em linhagens de ratos normotensos e hipertensos.
- 3.2.4** Verificar o possível envolvimento da via RISK, incluindo Akt e ERK, no efeito protetor induzido pelo tripeptídeo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos das linhagens Wistar, Sprague dawley (SD) e espontaneamente hipertensos (SHR), com peso entre 250-350g. Os ratos Wistar foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os ratos SD e SHR foram gentilmente cedidos pelo Biotério de Ratos do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG. Os animais receberam alimento e água *ad libitum* até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram realizados em consonância com o Comitê de Ética em Uso de Animais, CEUA-UFMG, com o protocolo CEUA 213/2016.

É pertinente relatar que foram utilizadas duas linhagens de ratos normotensos (Wistar e SD) em virtude de limitações técnicas durante os experimentos realizados no período de pandemia do coronavírus SARS-CoV-2. Ou seja, em princípio, apenas os ratos Wistar seriam utilizados, pois essa linhagem é o controle experimental de SHR.

### 4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Protocolo experimental I – Isquemia regional em corações de ratos Wistar: O desenho experimental foi organizado em 3 grupos de corações:

- Grupo Controle: o coração foi perfundido com a solução de Krebs-Ringer (**Tabela 1**) e a mistura de carbogênio durante 1 hora e 50 minutos (tempo total de todos os experimentos) sem nenhuma intervenção;
- Grupo Isquemia: após 50 minutos de estabilização (fase de estabilização), foi realizada a obstrução do ramo descendente esquerdo da artéria coronária (fase de isquemia) por 30 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão), por 30 minutos.



- Grupo Tratamento (pré-condicionamento com o tripeptídeo): após 20 minutos de estabilização, a solução de Krebs-Ringer + mistura carbogênica que estava perfundindo o coração passou a conter o peptídeo na concentração de 50 nM por 30 minutos, totalizando 50 minutos (fase de estabilização). Foi realizada a obstrução do ramo descendente da artéria coronária esquerda (fase de isquemia) por 30 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão) por 30 minutos. Do total de 1 hora e 50 minutos de protocolo, o tecido cardíaco foi perfundido com a solução de Krebs-Ringer + carbogênio + peptídeo (50 nM) por 1 hora e 30 minutos.

#### 4.2.2 Protocolo experimental II – Isquemia regional em corações de ratos SHR: O desenho experimental foi organizado em 3 grupos de corações:

- Grupo Controle: o coração foi perfundido com a solução de Krebs-Ringer e a mistura de carbogênio durante 1 hora e 50 minutos (tempo total de todos os experimentos) sem nenhuma intervenção;
- Grupo Isquemia: após 50 minutos de estabilização (fase de estabilização), foi realizada a obstrução do ramo descendente esquerdo da artéria coronária (fase de isquemia) por 30 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão), por 30 minutos.
- Grupo Tratamento (pré-condicionamento com o tripeptídeo): após 20 minutos de estabilização, a solução de Krebs-Ringer + mistura carbogênica que estava perfundindo o coração passou a conter o peptídeo na concentração de 50 nM por 30 minutos, totalizando 50 minutos (fase de estabilização). Foi realizada a obstrução do ramo descendente da artéria coronária esquerda (fase de isquemia) por 30 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão) por 30 minutos. Do total de 1 hora e 50 minutos de protocolo, o tecido cardíaco foi perfundido com a solução de Krebs-Ringer + carbogênio + peptídeo (50 nM) por 1 hora e 30 minutos.

#### 4.2.3 Protocolo experimental III – Isquemia global em corações de ratos SD: O desenho experimental foi organizado em 3 grupos de corações:

- Grupo Controle: o coração foi perfundido com a solução de Krebs-Ringer e a mistura de carbogênio durante 2 horas (tempo total de todos os experimentos) sem nenhuma intervenção;
- Grupo Isquemia: após 35 minutos de estabilização (fase de estabilização), foi realizada isquemia global (fase de isquemia) por 25 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão), por 60 minutos. Na isquemia global, ocorre a interrupção total do fluxo tanto de carbogênio quanto da solução de Krebs-Ringer nos corações.
- Grupo Tratamento (pré-condicionamento com o tripeptídeo): após 20 minutos de estabilização, a solução de Krebs-Ringer + mistura carbogênica que estava perfundindo o coração passou a conter o peptídeo na concentração de 50 nM por 15 minutos, totalizando 35 minutos (fase de estabilização). Foi realizada isquemia global (fase de isquemia) por 25 minutos, seguida de reperfusão (fase de reperfusão) por 60 minutos.

Convém mencionar que, inicialmente, seriam realizados apenas os protocolos experimentais com os ratos Wistar e SHR, com isquemia regional através da obstrução do ramo descendente da artéria coronária esquerda. Devido a problemas técnicos, principalmente durante o período pandêmico causado pelo coronavírus SARS-CoV-2, optou-se por realizar também o protocolo experimental com ratos SD com isquemia global, através da interrupção total do fluxo de solução Krebs-Ringer + carbogênio nos corações. O objetivo de usar outra linhagem de rato normotenso, na falta temporária de ratos Wistar saudáveis, foi ter dados relacionados à área infartada, porém não é possível comparar os resultados dos ratos SD com os de SHR.

**Tabela 1.** Concentração final da solução de Krebs-Ringer

Reagentes	Concentração final (mM)
NaCl	118,4
KCl	4,69
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,17
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,17
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2
Glicose	11,62
NaHCO <sub>3</sub>	26,24

### 4.3 Preparação do coração e o Aparato de Langendorff

Para iniciar o experimento, foi injetada heparina 100U.I. intraperitonealmente e, após pelo menos 10 minutos, foi realizada a decaptação do animal, seguida de incisão da pele e músculos a partir do processo xifoide até as margens costais de ambos os lados e, então, feito o levantamento do esterno para a dissecação e retirada do coração com parte da artéria aorta. Cada coração foi colocado imediatamente em solução gelada de Krebs-Ringer, separado dos pulmões e outras estruturas, acoplado através da artéria aorta a uma cânula que foi anexada ao aparato de Langendorff (ADInstruments, São Paulo, Brasil), como pode ser visto na **figura 14**. Logo após o acoplamento, foi inserido balão de material flexível no ventrículo esquerdo através da valva mitral. Este balão é conectado a um transdutor de pressão que registra a pressão intraventricular para aquisição dos parâmetros cardíacos. Após sua inserção no ventrículo, o balão é preenchido com água deionizada e seu volume é ajustado para conseguir uma pressão diastólica entre 10 e 15 mmHg no início do experimento e mantido constante até o final do mesmo. A partir do acoplamento, cada coração passou a ser perfundido em fluxo constante de 8 mL/min., em temperatura constante de 37°C com a solução de Krebs Ringer: 118,4 mM de NaCl, 4,69 mM de KCl, 1,17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,17 mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 11,62 mM de glicose e 26,24 mM de NaHCO<sub>3</sub>, com pH igual a 7,4. Todos os reagentes utilizados nos experimentos com os corações isolados possuem

grau analítico. Os dados hemodinâmicos foram obtidos pelo sistema de aquisição de dados PowerLab, LabChart 7 (ADInstruments, São Paulo, Brasil).

Os parâmetros foram medidos no final da estabilização, em intervalos na isquemia regional e em intervalos na reperfusão. Os resultados dos parâmetros na isquemia parcial e na reperfusão são médias desses intervalos.



**Figura 14.** Foto de parte do aparato de Langendorff com coração acoplado evidenciando obstrução parcial do ramo descendente da artéria coronária.

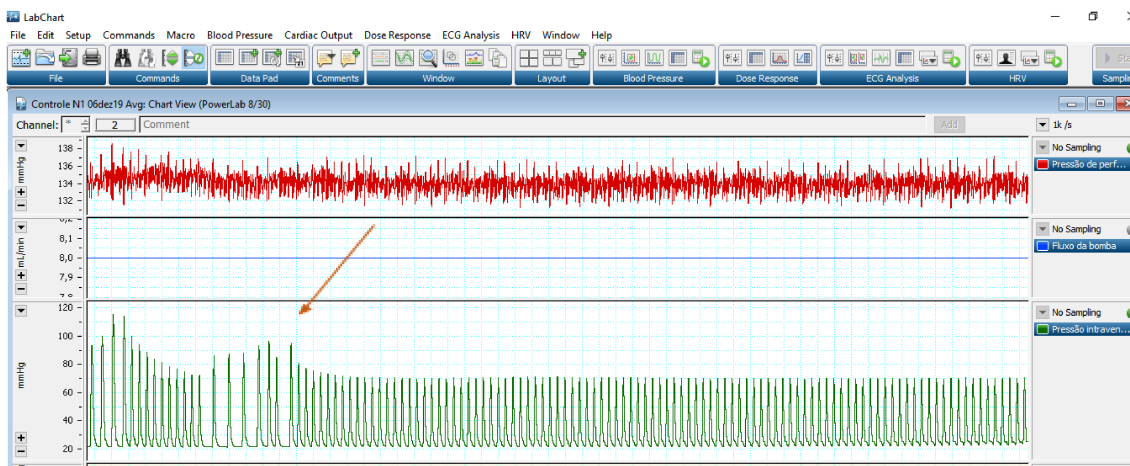
#### **4.4 Concentração do Peptídeo derivado do Ts14**

O tripeptídeo (H-Lys-Pro-Pro-OH) foi gentilmente cedido por pesquisadores colaboradores do Departamento de Química da Universidade de Alberta, no Canadá, e purificado no Laboratório de Hipertensão para a utilização nos experimentos. Foi utilizado na concentração de 50nM, por ter mostrado melhor efeito cardioprotetor nos estudos preliminares em coração isolado.

#### 4.5 Índice de Gravidade de Arritmias

Para o cálculo das arritmias durante todo o período de reperfusão dos corações dos protocolos I e II, que passaram por isquemia regional, foi utilizado o Índice de Gravidade de Arritmias (IGA), de acordo com NEVES *et al.* (1997). O índice é calculado de acordo com a duração das arritmias, sendo consideradas irreversíveis aquelas com duração de 30 minutos. É utilizada uma pontuação arbitrária de 1 a 12 da seguinte forma: para arritmias de até 5min é creditada uma pontuação arbitrária de 1, até 10min será dado valor 2, até 15min valor 3, até 20min, valor 6, até 25min valor 9 e até 30min valor 12. A duração das arritmias é conferida no LabChart a partir da pressão intraventricular, registrada em verde, como pode ser verificado na **figura 15**.

Para as arritmias durante o período de reperfusão dos corações do protocolo III, que passaram por isquemia global (sem fluxo) por 30 minutos, seguida de reperfusão de 60 minutos, foi calculada a razão do tempo em que coração apresentou arritmia/tempo total de reperfusão.



**Figura 15.** Detalhe ilustrativo de registro da pressão intraventricular em verde e da pressão de perfusão em vermelho. A seta laranja aponta para um curto intervalo apresentando arritmia cardíaca.

#### 4.6 Área infartada

Após a perfusão, os corações foram retirados do aparato de Langendorff e preparados de acordo com a técnica descrita por FENG *et al.* (2005). Os corações foram congelados por 2 h em freezer de -20°C, depois divididos em fatias de 2 mm de espessura. As fatias foram incubadas a 37°C durante 30 minutos com cloreto de tetrazólio (2,3,5 triphenyltetrazolium chloride) em solução de fosfato a 0,1M, com pH de 7,4 e, logo após, foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 24h. Após este período, as fatias foram fotografadas e analisadas no software ImageJ. O tecido que não foi afetado pela isquemia aparece em vermelho, corado pelo cloreto de tetrazólio (TTZ), enquanto a área infartada fica esbranquiçada. O formaldeído aumenta o contraste entre as regiões sadias e infartadas.

#### 4.7 Western Blot

Os corações foram retirados do aparato após o término da reperfusão e pesados. A região apical do ventrículo esquerdo de cada órgão, cerca de 3 mm abaixo da região em que foi feita a obstrução da artéria coronária, foi separada. O tecido cardíaco foi rapidamente congelado por nitrogênio líquido e guardado para análise posterior em freezer a -80°C.

O tecido cardíaco foi homogeneizado em equipamento ULTRA-TURRAX® (IKA) em tampão de lise (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA) contendo inibidores de fosfatases (50 mM de pirofosfato de sódio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), 50 mM de fluoreto de sódio (NaF), 1 mM de pervanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) e inibidores de proteases (Roche, Estados Unidos). O homogenato cardíaco foi submetido a ultrassonicação (3 vezes de 10 segundos em gelo) e centrifugado a 14000 RPM, 4°C por 20 minutos para separar o sobrenadante, contendo as proteínas, dos “debris” celulares. O sobrenadante foi recolhido e a concentração proteica estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) em espectrofotômetro (695 nm). Para cada amostra, 50 µg de proteína total foram ressuspendidos em tampão de carregamento Laemmli 5X (Tris-HCl 312,5 mM/pH 6,8, 50% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 10% de SDS, 0,01% azul de bromofenol) e

o volume final (10  $\mu$ L) corrigido com água *Milli-Q*, quando necessário. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos para redução das pontes de sulfeto. Logo após, foram carregadas em gel de SDS-poliacrilamida 10% (1,5 M Tris HCl/pH 8,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em tampão de eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 120V por aproximadamente 1 hora e meia. Para transferência, o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados de forma sobreposta em uma solução tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4°C durante todo o processo (Tris 25mM, glicina 190 mM e Metanol 20%) com corrente constante de 100V por 2 horas.

Para minimizar potenciais ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com solução de bloqueio - leite desnatado 5% em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,6). Em seguida, as membranas foram incubadas overnight a 4°C, sob agitação, em TBS-T adicionado dos seguintes anticorpos primários: p-AKT Ser473 (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA - diluição 1:1000), AKT (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA - diluição 1:1000), p-ERK1/2 – Thr202/Tyr204 (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA - diluição 1:1000), ERK1/2 (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA - diluição 1:1000). Após lavagem com TBS-T por três vezes de 10 minutos, as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário quimioluminescente (HRP) (Sigma-Aldrich – diluição 1:20.000), imunoglobulina IgG anti-coelho (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA - diluição 1:3000) para os anticorpos primários de p-AKT Ser473, AKT, p-ERK1/2 – Thr202/Tyr204 e ERK1/2. A detecção das proteínas foi realizada por scanner de quimioluminescência (GE). A expressão proteica foi estimada por densitometria (*Image Studio Lite™*).

#### **4.8 Análise estatística**

Para a análise de Western blot, foi utilizada one-way ANOVA com correção de Tukey. Os testes foram realizados utilizando o Programa Prisma 6.0. Foi considerado significativo  $P < 0,05$ .



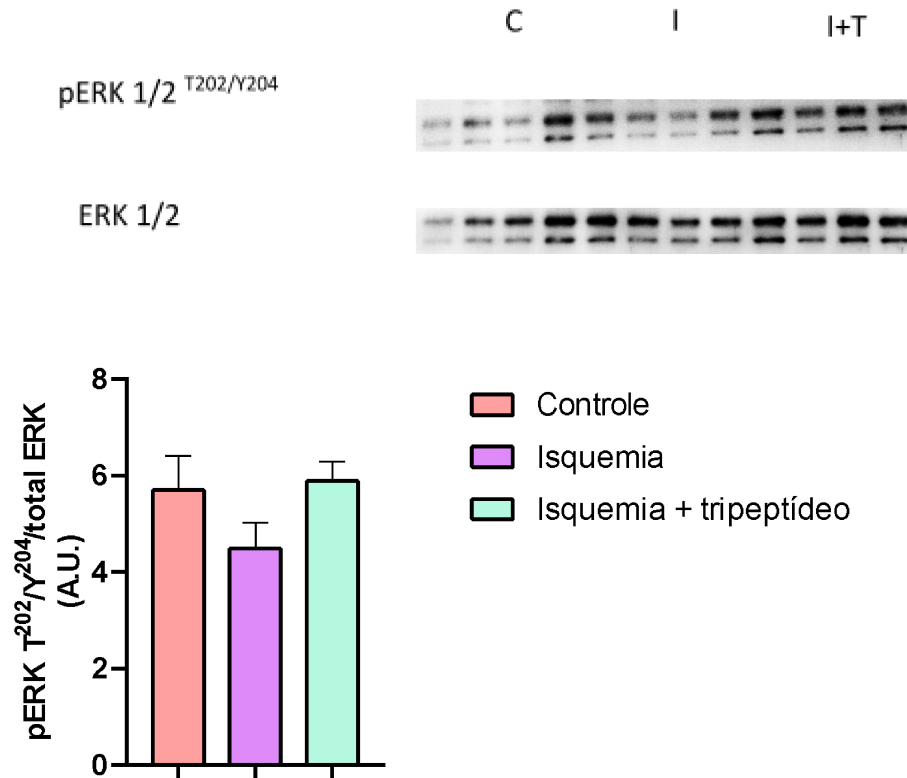
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análises Moleculares com Pré-condicionamento com o Tripeptídeo (Protocolo I)

O Western Blot foi realizado com três grupos de corações de ratos Wistar: I. controle, no qual o coração foi mantido por 1 hora e 50 minutos acoplado ao aparato de Langendorff, II. isquemia e III. grupo tratado com o peptídeo a 50 nM, concentração que mostrou melhor desempenho no tratamento de corações que passaram por isquemia parcial (resultados não publicados e apresentados na introdução desta dissertação).

#### 5.1.1 Western Blot - ERK fosforilada normalizada pela ERK total

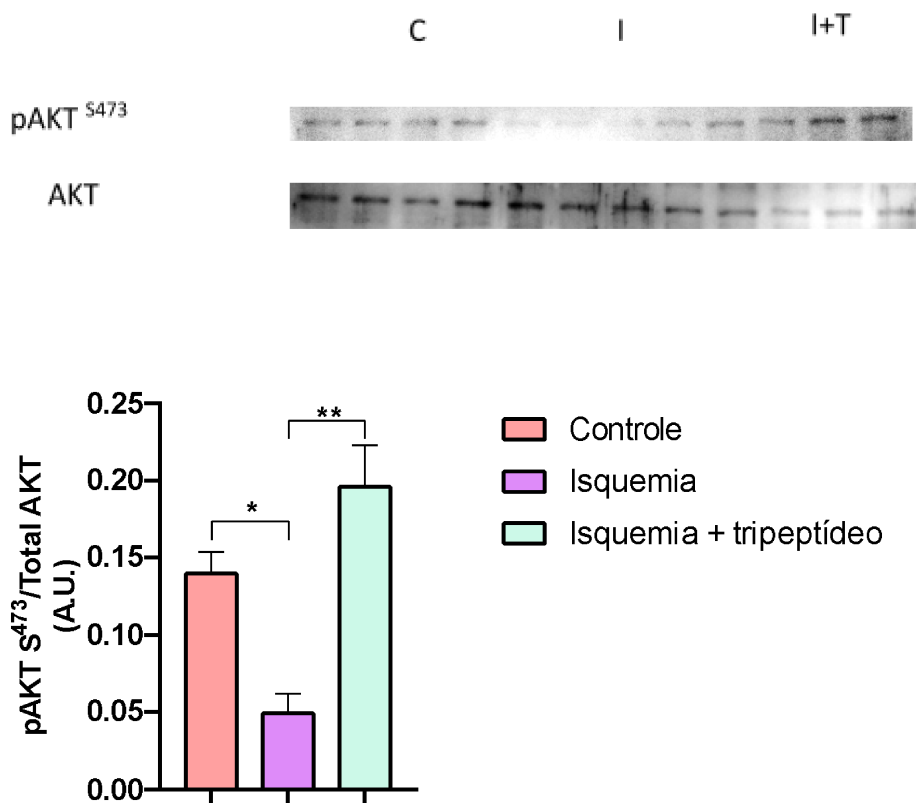
Não houve diferença significativa na fosforilação de ERK nos sítios Treonina-202 e Tirosina-204 entre os 3 grupos (**figura 16**), embora houvesse uma tendência para a sua desfosforilação, em decorrência da isquemia, tendo o tratamento com o peptídeo também apresentado uma tendência para normalização dos níveis de fosforilação da ERK.



**Figura 16.** Efeito do peptídeo na fosforilação da ERK após isquemia parcial/reperfusão em coração isolado de ratos Wistar. Os valores estão representados em média  $\pm$  EPM. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4). Grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia regional (n=4); Grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4). ANOVA unidirecional com Correção de Tukey.

### 5.1.2 Western Blot - AKT fosforilada normalizada pela AKT TOTAL

O tratamento com o tripeptídeo promoveu um aumento significativo da fosforilação de Akt, a Proteína Cinase B, no sítio da Treonina-308. Foi possível perceber uma redução significativa da fosforilação de Akt no grupo “isquemia”, além de um aumento significativo da fosforilação desta molécula no grupo “tratado” tanto em relação ao grupo “controle” quanto ao grupo “isquemia” (**figura 17**).



**Figura 17.** Efeito do peptídeo na fosforilação da AKT após isquemia parcial/reperfusão em coração isolado. Os valores estão representados em média  $\pm$  EPM. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4). Grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); Grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4). ANOVA unidirecional com Correção de Tukey.

## 5.2 Efeito do tripeptídeo na função cardíaca

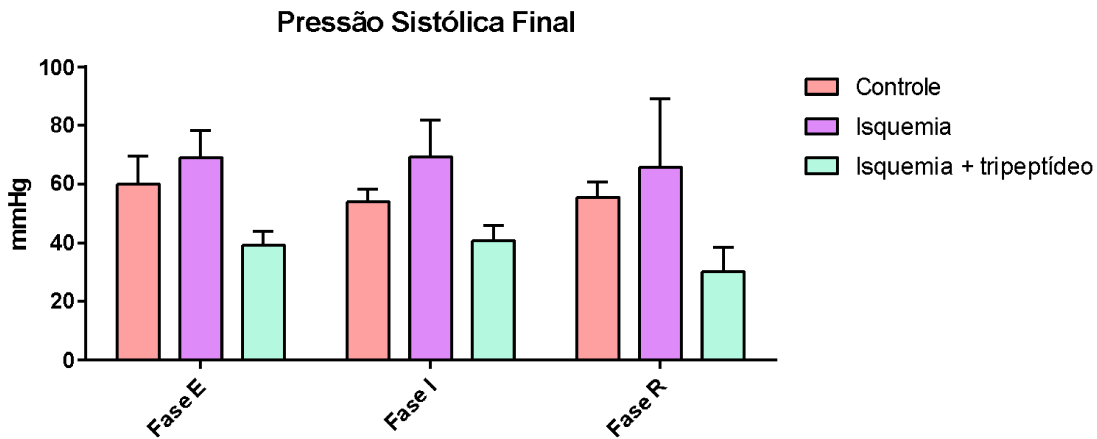
Como ficará evidenciado a seguir, os dados da função cardíaca referentes aos protocolos experimentais I, II e III não foram conclusivos, devido a vários problemas enfrentados durante a implementação da técnica, ocasionando em dados não confiáveis. Decidimos incluir estes resultados como uma forma didática para demonstrar problemas que podem ser enfrentados durante a implementação da técnica de coração isolado mantido em aparato de Langendorff e submetido ao protocolo de isquemia/reperfusão.

### 5.2.1 Protocolo experimental I: ratos Wistar

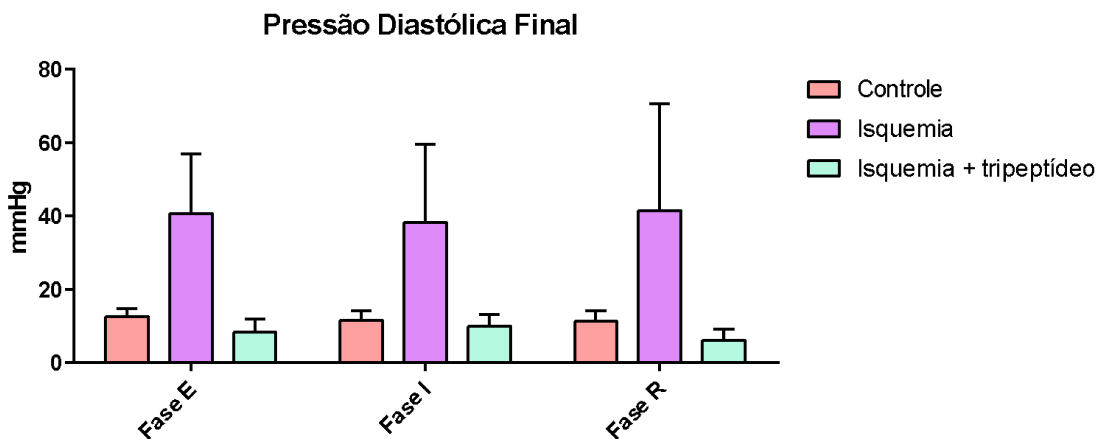
O efeito do tripeptídeo sobre a pressão sistólica final (PSF, **figura 18**), pressão diastólica final (PDF, **figura 19**), frequência cardíaca (FC, **figura 20**),  $dP/dT$  máxima ( $+dP/dT$ , **figura 21**) e mínima ( $-dP/dT$ , **figura 22**), que indicam, respectivamente, a velocidade de contração ( $+dP/dT$ ) e relaxamento ( $-dP/dT$ ) das fibras cardíacas, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE, **figura 23**) e índice de gravidade de arritmias (IGA, **figura 24**) estão representados a seguir.

A análise dos gráficos permite concluir que os resultados são preliminares e que os experimentos deverão ser repetidos, seja por problemas na aquisição dos parâmetros funcionais do coração e/ou na indução da isquemia/reperfusão. Por exemplo, ao analisar a pressão diastólica final (PDF, **figura 19**), percebe-se que a PDF está elevada já no período de estabilização (fase E) no grupo “isquemia”, evidenciando que havia corações insuficientes antes da fase de isquemia (fase I), o que compromete a análise dos parâmetros cardíacos. Outro problema encontrado foi em relação à velocidade de contração, representada pela  $dP/dT$  máxima, que estava diminuída tanto no grupo “isquemia” quanto no grupo “isquemia + tripeptídeo” na fase de estabilização (fase E) (**figura 21**).

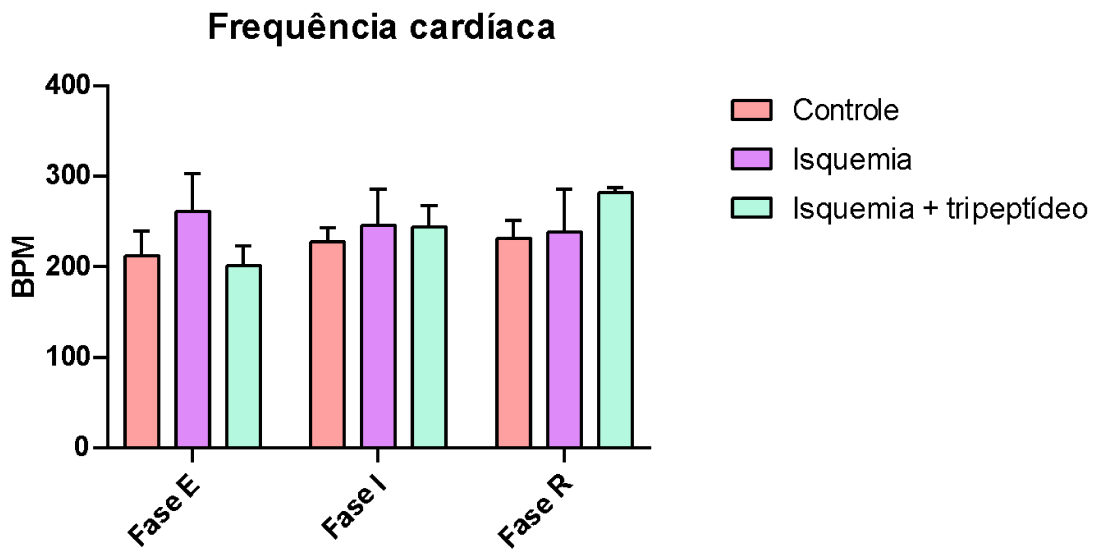
Enquanto todos os corações que passaram apenas por isquemia apresentaram poucos intervalos curtos de arritmia, um coração do grupo “controle” e um do grupo “isquemia + tripeptídeo” apresentou arritmia por longos intervalos, o que causou o aumento geral no seu IGA, como pode ser visualizado na **figura 24**, mais uma vez evidenciando os problemas com estes resultados.



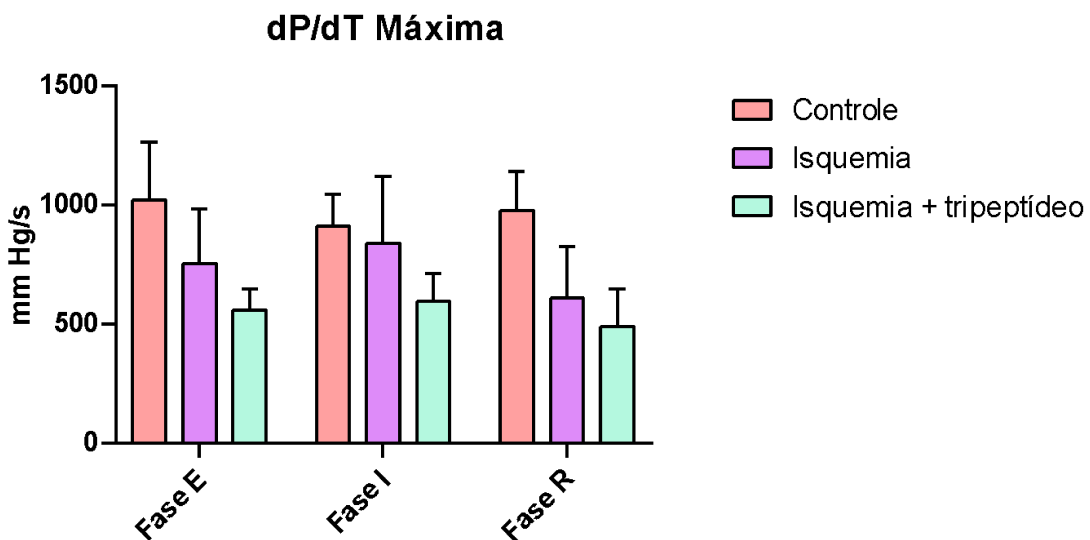
**Figura 18.** Efeito do tripeptídeo na pressão sistólica final (PSF) de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); Grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); Grupo “isquemia + tripeptídeo” é o que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).



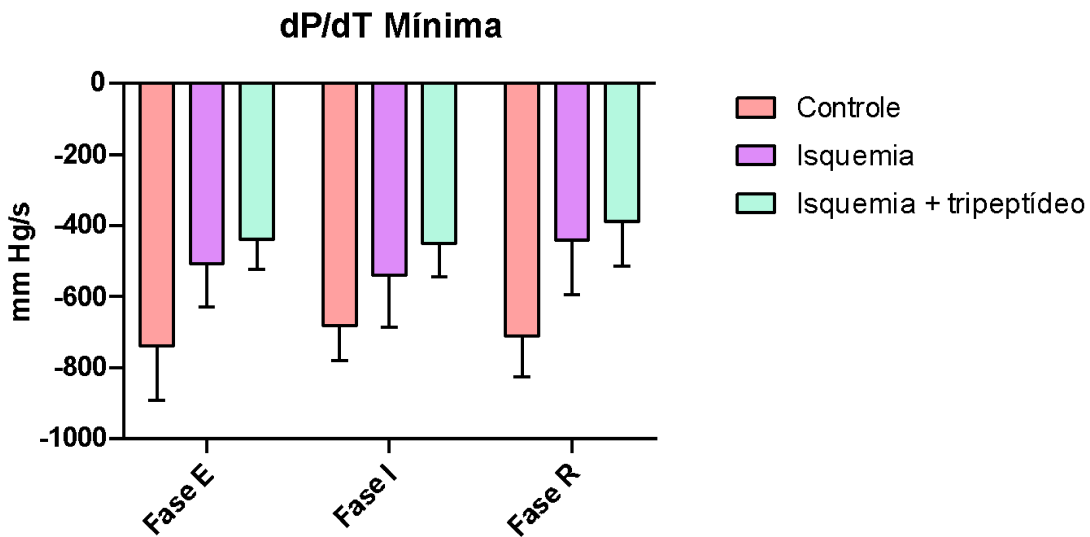
**Figura 19.** Efeito do tripeptídeo na pressão diastólica final (PDF) de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).



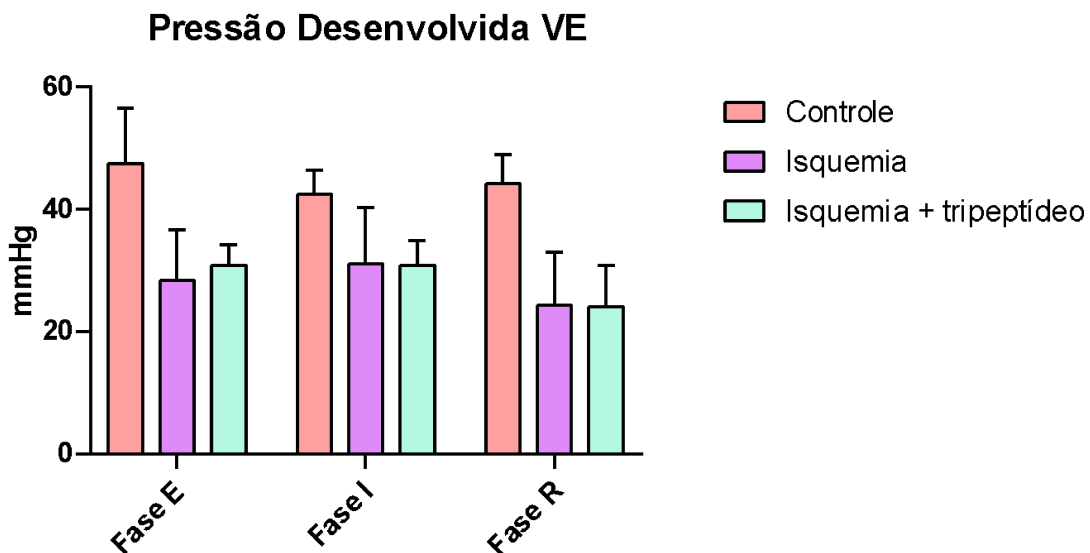
**Figura 20.** Efeito do tripeptídeo na frequência cardíaca (FC) de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).



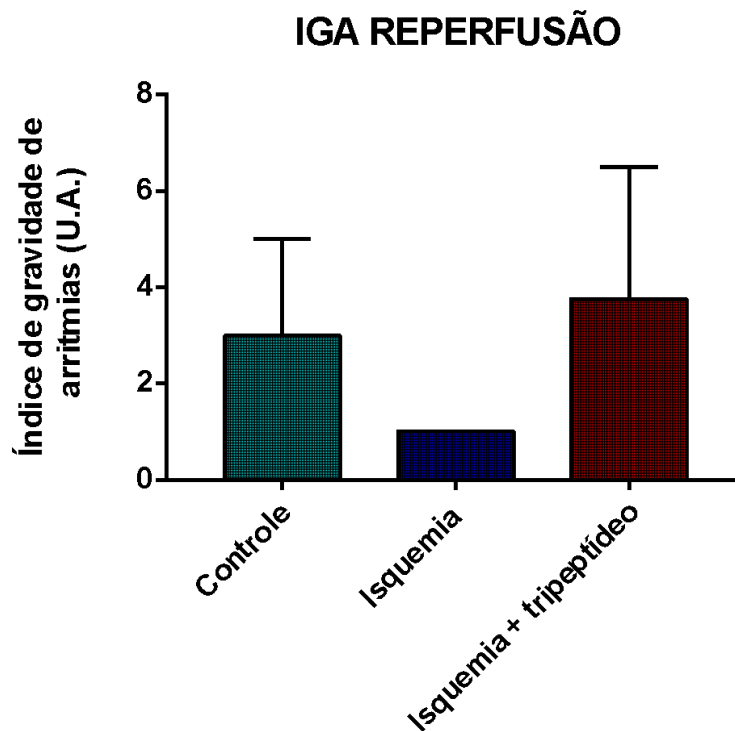
**Figura 21.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT máxima de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).



**Figura 22.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT mínima de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).



**Figura 23.** Efeito do tripeptídeo na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).

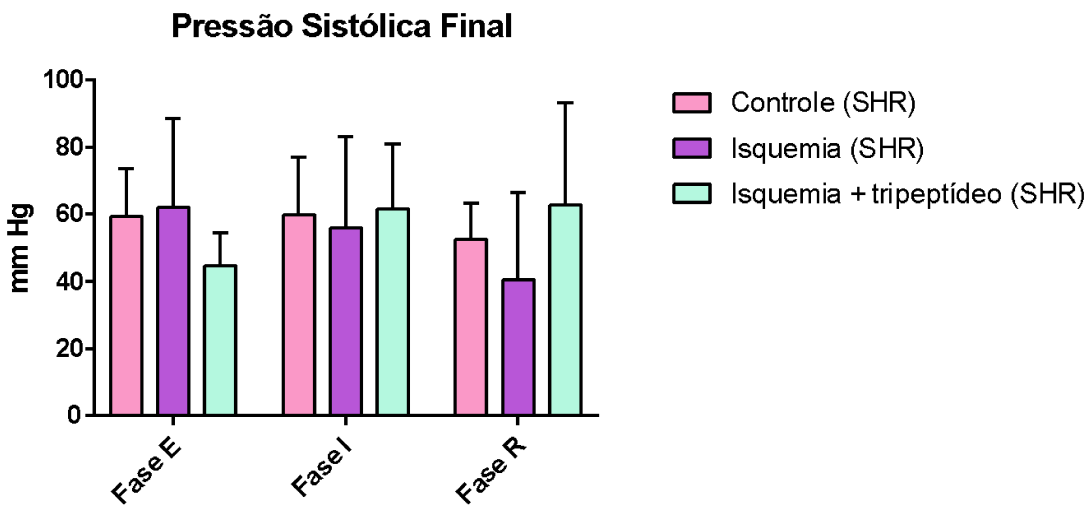


**Figura 24.** Efeito do tripeptídeo no índice de gravidade de arritmias (IGA) de corações isolados de ratos Wistar. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=4); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=4); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=4).

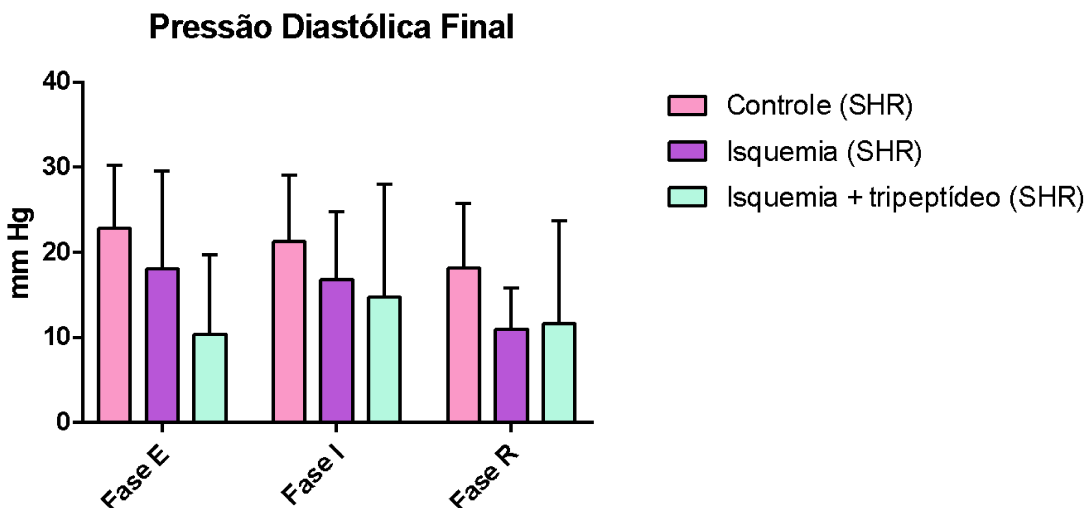
### 5.2.2 Protocolo experimental II: ratos SHR

Neste protocolo foram utilizados corações isolados de animais espontaneamente hipertensos (SHR). Apresentamos, a seguir, os dados referentes à pressão sistólica final (figura 25), pressão diastólica final (figura 26), frequência cardíaca (figura 27), +dP/dT (figura 28), -dP/dT (figura 29), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (figura 30) e índice de gravidade de arritmias (figura 31). Não foram realizadas análises estatísticas porque os grupos “controle” e “isquemia + tripeptídeo” não possuem um tamanho amostral suficiente (n=2).

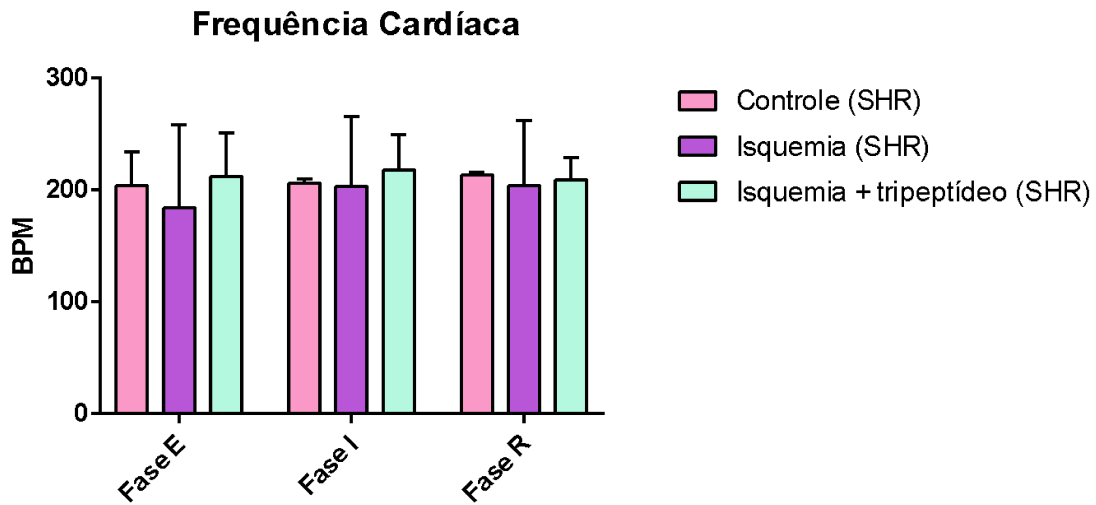




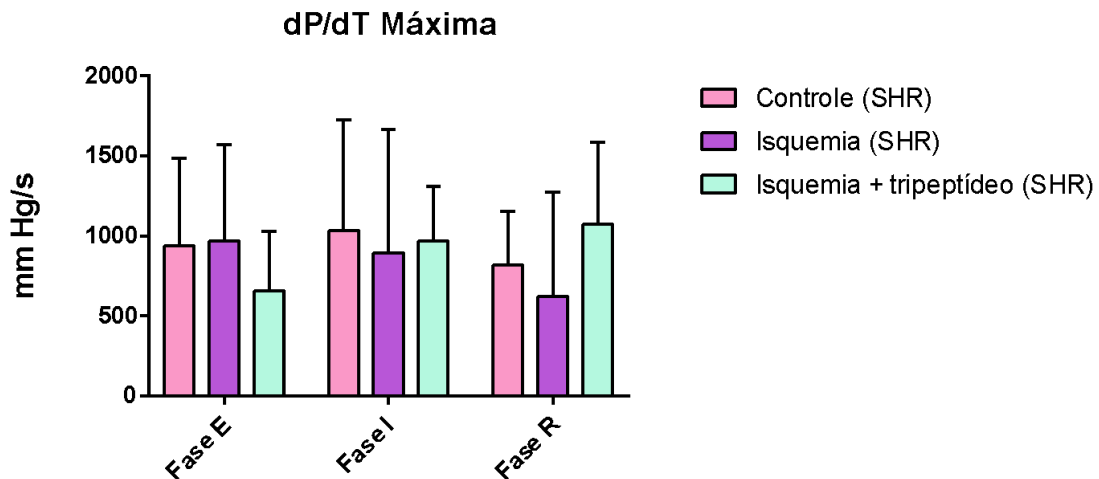
**Figura 25.** Efeito do tripeptídeo na pressão sistólica final em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



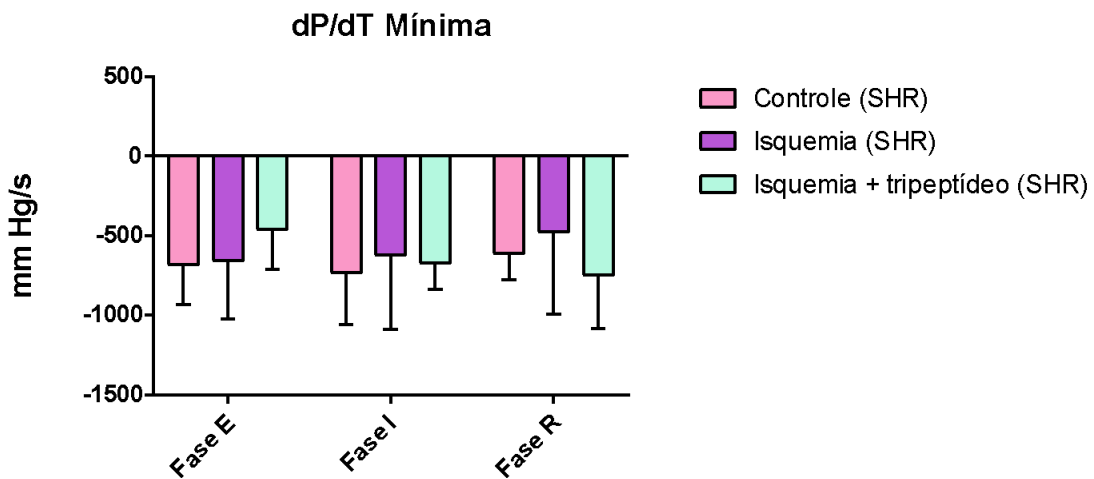
**Figura 26.** Efeito do tripeptídeo na pressão diastólica final em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



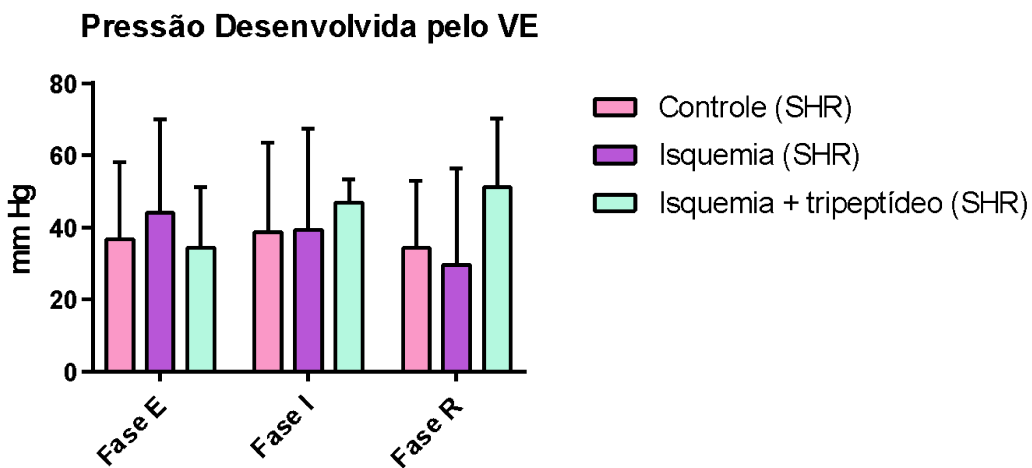
**Figura 27.** Efeito do tripeptídeo na FC em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



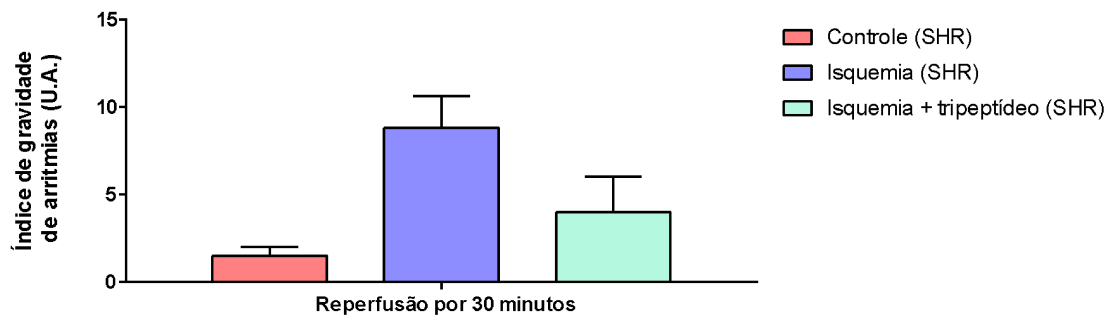
**Figura 28.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT Máxima em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



**Figura 29.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT Mínima em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



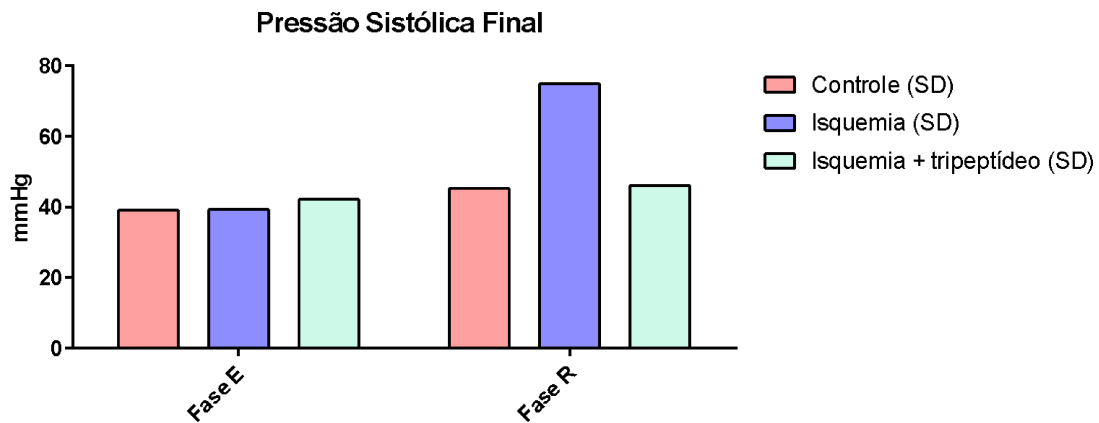
**Figura 30.** Efeito do tripeptídeo na PDVE em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).



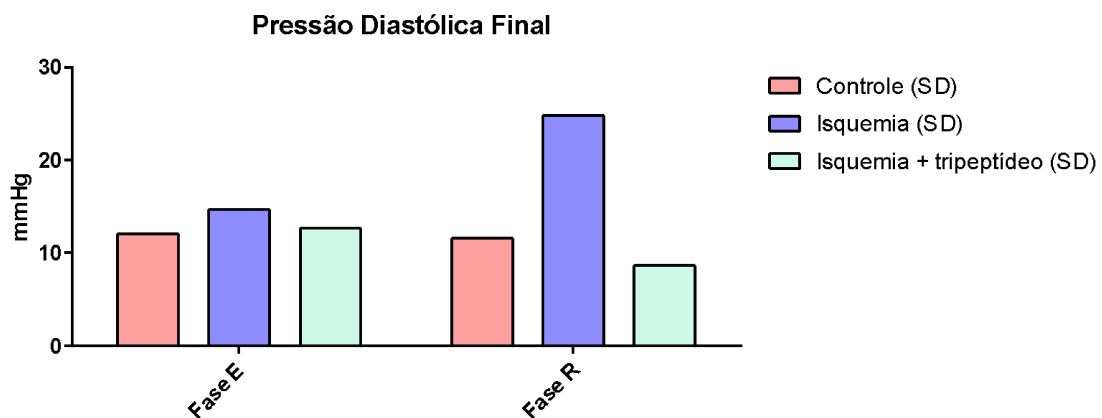
**Figura 31.** Efeito do tripeptídeo no índice de gravidade de arritmias (IGA) em ratos SHR. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=2); grupo “isquemia” é o grupo que passou por apenas isquemia parcial (n=5); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=2).

### 5.2.3 Protocolo experimental III: ratos SD

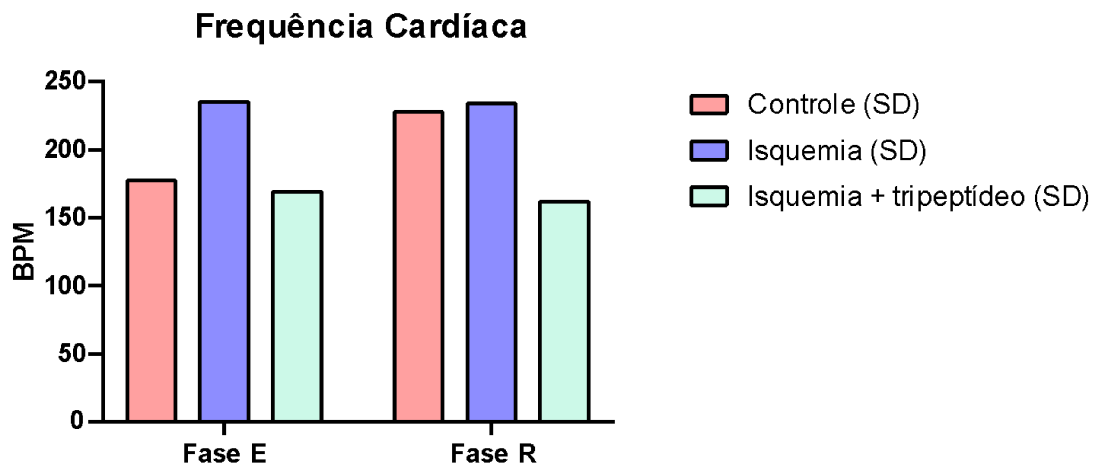
No protocolo III, os corações foram isolados de ratos normotensos Sprague Dawley (SD). O protocolo III foi realizado devido a problemas encontrados em vários ratos normotensos Wistar, isto é, foi uma tentativa de ter resultados em ratos normotensos suficientes para fazer a análise estatística e, posteriormente, fazer análises também em rato hipertenso comparável com SD. Devido à dificuldade experimental de se conseguir uma isquemia regional eficiente, como sugerem os dados anteriores, foi realizada a isquemia global (equivalente ao que ocorre em coração que será transplantado). Como os resultados apresentados são preliminares, compostos apenas por um indivíduo por grupo experimental, os dados não apresentam erro padrão da média (EPM) e são insuficientes para fazer a análise estatística.



**Figura 32.** Efeito do tripeptídeo na pressão sistólica final em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



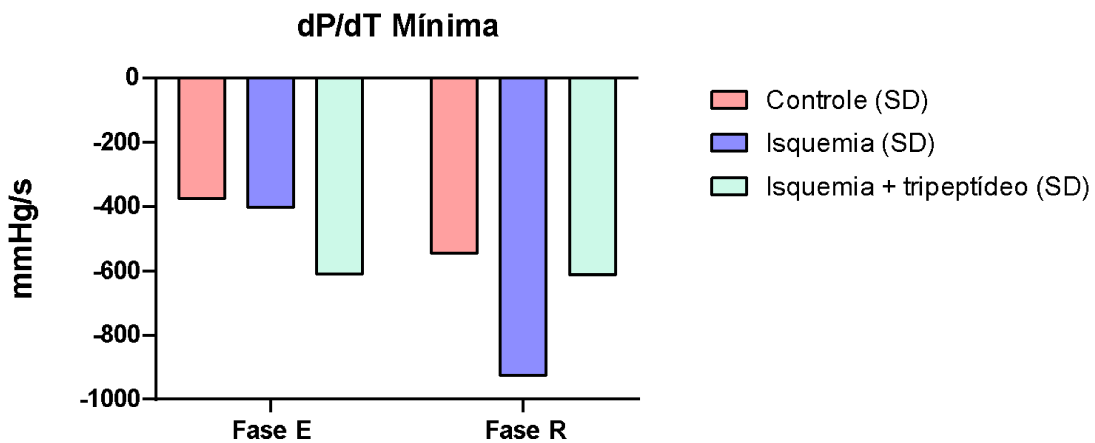
**Figura 33.** Efeito do tripeptídeo na pressão diastólica final (PDF) em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



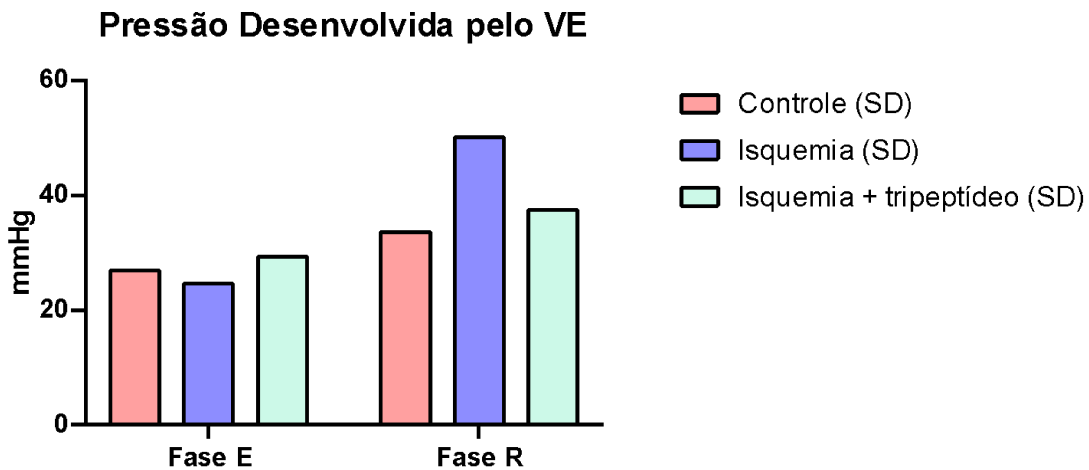
**Figura 34.** Efeito do tripeptídeo na FC em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



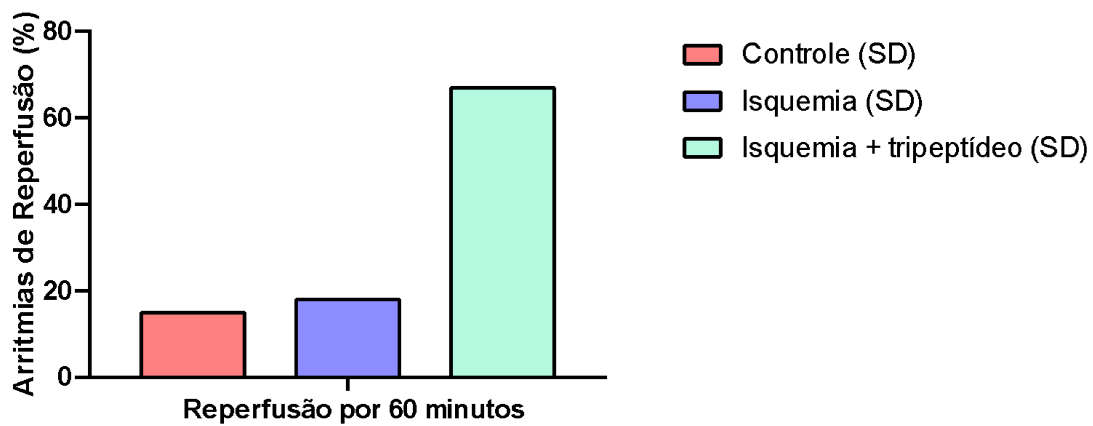
**Figura 35.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT Máxima em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



**Figura 36.** Efeito do tripeptídeo na dP/dT Mínima em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



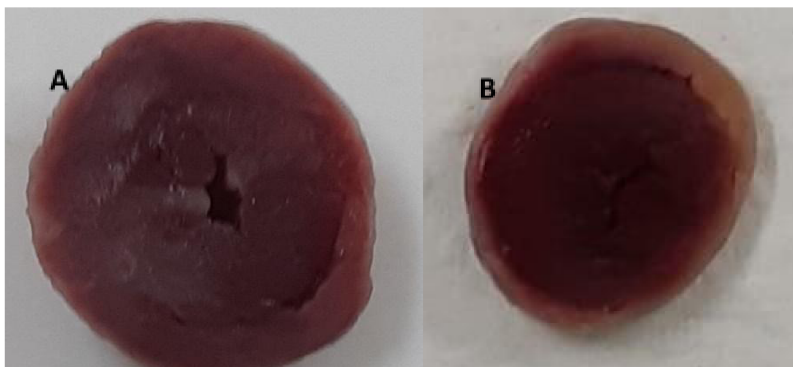
**Figura 37.** Efeito do tripeptídeo na PDVE em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).



**Figura 38.** Efeito do tripeptídeo nas arritmias de reperusão em ratos SD. Grupo “controle” é aquele em que os corações não passaram por nenhuma interferência durante o tempo de perfusão no aparelho de Langendorff (n=1); grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o grupo que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).

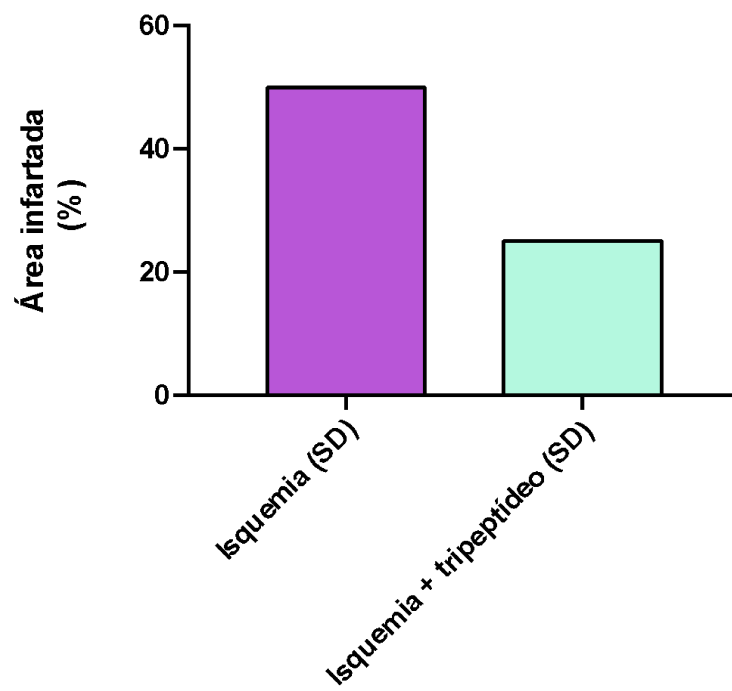
### 5.3 Efeito do tripeptídeo na área infartada (Protocolo experimental III)

Como nos outros resultados do protocolo experimental III, não é possível fazer a análise estatística, uma vez que cada grupo contém apenas um exemplar.



**Figura 39.** Fotografias das fatias após técnica com TTZ. Em **A**, fatia do coração do grupo “isquemia”; em **B**, fatia do coração do grupo “isquemia + tripeptídeo”.





**Figura 40.** Efeito do tripeptídeo na área infartada em ratos SD com isquemia global. Grupo “isquemia” é o grupo que passou por isquemia global (n=1); grupo “isquemia + tripeptídeo” é o que passou por tratamento com o peptídeo a 50 nM a partir dos 20 minutos de estabilização (n=1).

## 6 DISCUSSÃO

A isquemia parcial causada pela diminuição temporária do diâmetro do lúmen do ramo descendente da artéria coronária causa várias alterações moleculares e danos teciduais ao coração. Para simular o que geralmente ocorre na clínica, que é a isquemia regional do coração, os experimentos preliminares referentes aos protocolos I e II do presente trabalho empregaram a isquemia regional, com obstrução parcial do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda. O tripeptídeo já havia mostrado efeitos protetores em estudos feitos em artéria aorta de ratos, cardiomiócitos de camundongos e corações isolados de ratos normotensos após isquemia e foi demonstrado em cardiomiócitos de camundongos que os receptores B2 de bradicinina participam dessa cardioproteção (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008; VERANO-BRAGA *et al.*, 2010; GÓMEZ-MENDOZA *et al.*, 2020).

A BK induz efeitos cardioprotetores quando interage com os receptores B2 acoplados à proteína G, desencadeando a ativação da via GPCR/PI3K/Akt/NO, conseqüentemente regulando o aumento da expressão e atividade de proteínas antioxidantes, além da redução da atividade da NADPH oxidase, e resultando na diminuição da produção de ROS, e culminando na redução das injúrias de isquemia/reperfusão miocárdicas (DONG *et al.*, 2013; POTIER *et al.*, 2013). Em estudos anteriores com anéis de aorta de ratos e cardiomiócitos de camundongos, o tripeptídeo mostrou efeitos protetores através da liberação de NO (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008; VERANO BRAGA *et al.*, 2010; GÓMEZ-MENDOZA *et al.*, 2020).

No estudo que reportou o tratamento de cardiomiócitos isolados de camundongos C57BL/6 com o tripeptídeo, em normóxia, verificou-se o aumento significativo da fosforilação de Akt e ERK1/2 (GÓMEZ-MENDOZA *et al.*, 2020). No presente estudo, o tripeptídeo não alterou a fosforilação de ERK1/2 (**figura 16**), porém aumentou significativamente a fosforilação de Akt (**figura 17**) nos corações isolados de ratos Wistar. Contudo, esse efeito parece não depender de NO, já que o bloqueio da síntese de NO através do L-NAME não diminuiu os efeitos protetores do tripeptídeo nos estudos preliminares com corações isolados de rato (**figuras 10-13**). MARTIN *et al.* (2007) verificaram que uma quantidade significativa de NO é formada de maneira não enzimática durante o período de isquemia cardíaca, sugerindo que

ele pode estar disponível para participar de mecanismos cardioprotetores no período de reperfusão. Porém, geralmente, os estudos com outras moléculas com efeitos cardioprotetores dependentes de NO mostram que o efeito cardioprotetor é perdido quando há o bloqueio da NOS. GAO *et al.* (2002) estudaram o efeito cardioprotetor de insulina exógena em modelo de I/R miocárdica *in vivo* em ratos SD. A administração de insulina ativou Akt através de mecanismo dependente de PI3K e reduziu a morte celular por apoptose. Foi verificada a contribuição da fosforilação de eNOS e a consequente liberação de NO no efeito antiapoptótico da insulina.

Tem sido demonstrado em diversos estudos que a ativação da cascata de Akt, através de sua fosforilação, está envolvida na proteção do tecido cardíaco após os efeitos deletérios da isquemia seguida de reperfusão (YUAN *et al.*, 2017). No músculo cardíaco, a Akt é fosforilada via PI3K, impedindo a expressão de várias proteínas pró-apoptóticas, como p53, Bad, Bax, além de caspases, culminando na sobrevivência celular (YAO *et al.*, 2013). Por esse motivo, realizamos a análise de Western Blot para avaliar se havia alteração da Bad em consequência do tratamento do coração com o tripeptídeo. Devido a problemas técnicos, porém, não foi possível identificar se houve alteração.

A proteção contra morte celular também pode estar relacionada com a modulação da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) que ocorre em casos de estresse oxidativo e sobrecarga de cálcio, sendo a maior causa de injúria de reperfusão. Alguns autores sugerem a via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ , em que a Akt regula negativamente a GSK-3 $\beta$ , atenuando a abertura do MPTP, consequentemente protegendo as células de depleção de adenosina trifosfato (ATP) e morte celular por necrose (HALESTRAP, 2009; YI *et al.*, 2010; VÉLEZ *et al.*, 2020). Pretende-se, então, avaliar futuramente se há alteração da abertura do MPTP em consequência do tratamento de corações com o tripeptídeo.

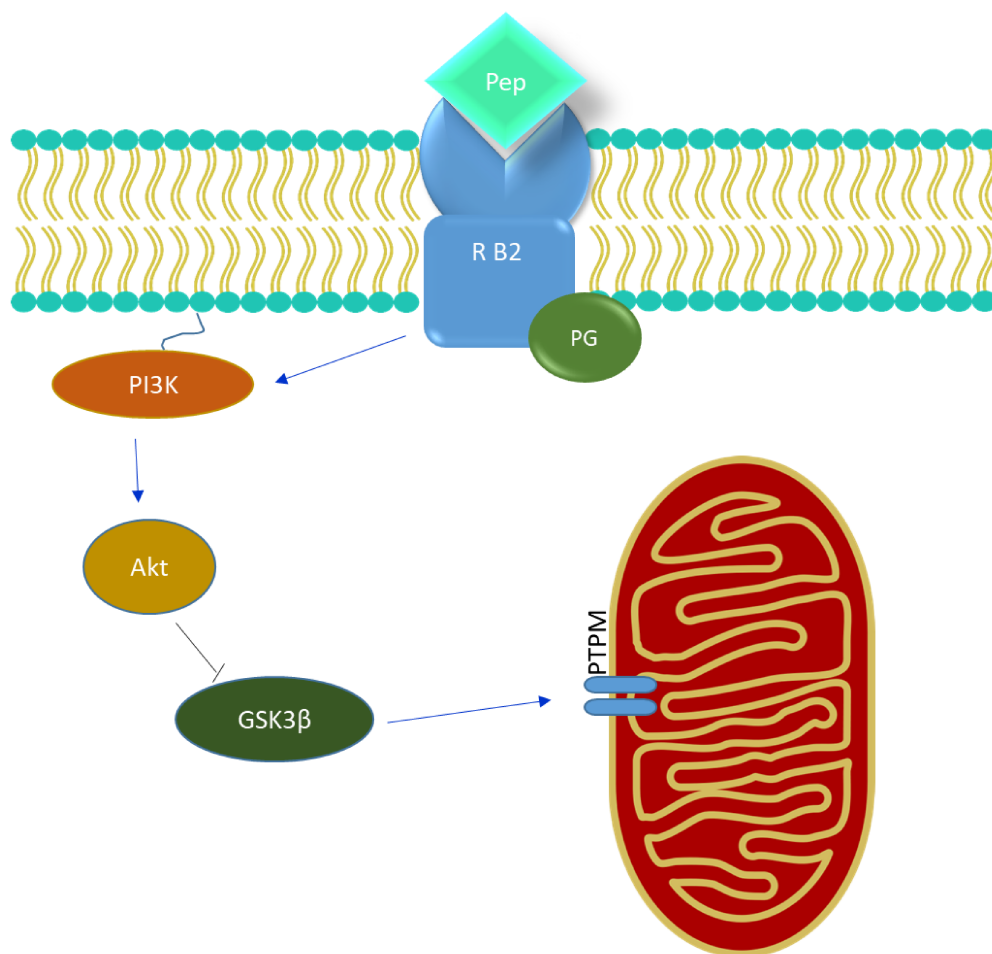
Após análise dos resultados da função cardíaca nos protocolos I e II, verificou-se que ocorreram problemas durante o registro dos parâmetros cardíacos que impossibilitaram a utilização desses resultados para avaliação da função cardíaca. Durante o período de estabilização, em muitos corações não foi possível fazer os ajustes necessários para que a pressão diastólica ficasse entre 10 e 15mmHg (BELL *et al.*, 2011), para assegurar o registro correto dos dados. A pressão diastólica de

alguns corações estava acima de 20 mmHg, apontando a inviabilidade destas preparações. Os dados inviáveis foram mostrados a fim de apresentar as tentativas de conclusão do trabalho com maior robustez.

Os resultados de função cardíaca, IGA e área infartada dos protocolos I, II e III não foram conclusivos, pois o número amostral em cada grupo, após exclusão dos corações que apresentaram arritmia irreversível ou que não mantiveram pressão de perfusão intraventricular mínima de 5mmHg, não foi suficiente para avaliação estatística. Apesar disso, percebe-se, no protocolo III, que a área infartada no coração tratado com o peptídeo é menor que a área infartada no coração não tratado, como pode ser visualizado nas **figuras 39 e 40**. No protocolo III, foi realizada isquemia global (YUAN *et al.*, 2015) para verificar os efeitos do tripeptídeo em relação à área infartada, apesar de ser comum na clínica a obstrução regional de artéria coronária com consequente isquemia regional. Contudo, os estudos com isquemia global são importantes quando se trata de promover cardioproteção em corações que serão transplantados (FARINE *et al.*, 2016).

## 7 CONCLUSÃO

O tripeptídeo aumentou a fosforilação de Akt, que está envolvida na cardioproteção após isquemia/reperfusão, havendo a possibilidade de a via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  estar sendo ativada, uma vez que o efeito cardioprotetor parece não depender da liberação de NO. Considerando as principais vias de cardioproteção e os resultados moleculares, sugere-se uma possível via de cardioproteção ativada pelo tripeptídeo, como pode ser visualizado na **figura 41**. Foi verificada uma tendência de cardioproteção através da análise da área infartada, como pode ser verificado nas **figuras 39 e 40**, corroborando com os resultados preliminares descritos no **item 1.8**. Devido a esse achado, pretende-se realizar novos experimentos e fazer a análise estatística para entender melhor essa tendência.



**Figura 41.** Sugestão de via de ativação cardioprotetora do tripeptídeo. RB2: Receptor B2 de BK acoplado à proteína G. Pep: tripeptídeo; PI3K: Fosfatidilinositol-3 cinase; Akt: Proteína cinase B; GSK3 $\beta$ : Glicogênio Sintase Cinase 3  $\beta$ ; MPTM: Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial. PG: Proteína G.

## 8 PERSPECTIVAS

A intenção é analisar outros marcadores que possam estar alterados após o tratamento com o peptídeo, como Bad, Bad-p, Bax-p, Bax, GSK-3 $\beta$ , PLN, PLN-p, p91-phox e PTPM para entender melhor os mecanismos de ação do tripeptídeo e avançar na caracterização do mecanismo de cardioproteção em que ele está envolvido.

## 9 LIMITAÇÕES

O desenvolvimento do presente projeto teve início após o projeto inicial ter sido abandonado, devido ao defeito de um equipamento essencial para os experimentos e à inviabilidade de conserto do mesmo. Houve a necessidade, então, de aprender novas técnicas num cenário em que não foi possível um treinamento minucioso para alcançar a maestria, de forma que o aprendizado se deu muito em função de tentativas e erros, após explicações básicas de funcionamento do aparato de Langendorff. Além dessas dificuldades, o aparato e outros equipamentos apresentaram problemas no funcionamento, inclusive a leitura do eletrocardiograma não pôde ser realizada porque o equipamento estava com defeito. Nos casos de outros equipamentos, como pHmetro, por exemplo, foi possível contornar o problema utilizando equipamentos de outros laboratórios. Contudo, alguns problemas no aparato de Langendorff e de calibração atrasaram bastante os experimentos por não terem substitutos em outros laboratórios e não haver assistência técnica disponível. Apesar das diversas dificuldades, algumas ocorridas durante a pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, os experimentos no aparato de Langendorff foram realizados, as regiões dos corações para análise molecular foram acondicionadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e foi possível fazer o western blot de ERK e Akt. Contudo, os experimentos de western blot de Bad, Bad-p, PLN, PLN-p e p91-phox não deram certo, mesmo após várias tentativas, apontando algum problema não identificado durante o processo. O projeto inicial em coração isolado incluía os protocolos I e II, pois o objetivo era verificar os efeitos do tripeptídeo em corações de ratos normotensos e hipertensos. Apesar de ter verificado a área infartada em ratos Wistar normotensos, a isquemia foi leve e não houve diferença entre os corações do grupo controle e isquemia, por este motivo os dados não foram apresentados. Como o desenvolvimento do projeto já estava muito atrasado, a reprodução de ratos SHR é limitada e os problemas com a técnica e o aparato ainda não haviam sido resolvidos, o número amostral com dados viáveis dos grupos não foi suficiente para avaliação estatística. O protocolo III com ratos SD e isquemia global foi desenvolvido em um momento em que muitos corações de ratos Wistar apresentaram arritmias irreversíveis e era importante verificar os efeitos do

tripeptídeo em relação à área infartada. Não foi possível, porém, alcançar número amostral suficiente para análise estatística.



## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARQUERA, S.; PEDROZA-TOBÍAS, A.; MEDINA, C.; HERNÁNDEZ-BARRERA, L.; BIBBINS-DOMINGO, K.; LOZANO, R.; MORAN, A.E. **Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease**. Archives of Medical Research, 2015.

BARRETO, A.C.P.; NOBRE, M.R.C.; WAJNGARTEN, M.; CANESIN, M.F.; BALLAS, D.; SERRO-AZUL, J.B. **Insuficiência cardíaca em grande hospital terciário de São Paulo**. Arq Bras Cardiol, 1998.

BASALAY, M.; BARSUKEVICH, V.; MASTITSKAYA, S.; MROCHEK, A.; PERNOW, J.; SJÖQUIST, P. O.; ACKLAND, G. L.; GOURINE, A.V.; GOURINE, A. **Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms**. Exp Physiol, 2012

BASALAY, M.; MASTITSKAYA, S.; MROCHEK, A.; ACKLAND, G. L.; DEL ARROYO, A. G.; SANCHEZ, J.; SJOQUIST, P-O.; PERNOW, J.; GOURINE, A. V.; GOURINE, A. **Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Mediates Cardioprotection by Remote Ischaemic Conditioning**. European Society of Cardiology, 2016.

BAXTER, G.F.; EBRAHIM Z. **Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium**. British Journal of Pharmacology, 2002.

BAYDOUN, A. R.; WOODWARD, B. **Effects of bradykinin in the rat isolated perfused heart: role of kinin receptors and endothelium-derived relaxing factor**. Br. J. Pharmacol., 1991.

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, 2011.

BOLLI, R.; MARBÁN, E. **Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning**. Physiological Reviews, 1999.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, 1976.

CAMARGO, A. C.M.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M.T. **Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril**. Toxicon, 2012.

CAMPBELL, D. J. **Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2000.

CARVALHO, A.C.C.; SOUSA, J.M.A. **Cardiopatia isquêmica**. Rev Bras Hipertens. 2001.

CHAO, J.; YIN, H.; GAO, L.; HAGIWARA, M.; SHEN, B.; YANG, Z-R.; CHAO, L. **Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin B2 receptor activation independent of kinin formation.** Hypertension, 2008.

CHEN, S.; LOTZ, C.; ROEWER, N.; BROSCHEIT, J-A. **Comparison of volatile anesthetic-induced preconditioning in cardiac and cerebral system: molecular mechanisms and clinical aspects.** European Journal of Medical Research, 2018.

CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A. F. M. **Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others?** Circ Arrhythmia Electrophysiol, 2009.

CLEMENTS, J. A.; WILLEMSSEN, N. M.; MYERS, S. A.; DONG, Y. **The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers.** Crit Rev Clin Lab Sci, 2004.

CYR, M.; LEPAGE, Y.; BLAIS, C. Jr.; GERVAIS, N.; CUGNO, M.; ROULEAU, J-L.; ADAM, A. **Bradykinin and des-Arg9 -bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001.

DAL, F.; KÜÇÜK, C.; TALIH, T.; SÖZÜER, E.; TOPAL, U.; DENİZ, K.; AKYILDIZ, H. **Effects of bradykinin preconditioning in an experimental intestinal ischemia reperfusion model on rats.** Acta Cir Bras., 2020.

DE BRITTO, R. M.; DA SILVA NETO, J. A.; MESQUITA, T. R. R.; DE VASCONCELOS, C. M. L.; DE ALMEIDA, G. K. M.; DE JESUS, I. C. G.; DOS SANTOS, P. H.; DE SOUZA, D. S.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; DE SÁ, L. A.; DOS SANTOS, F. S. M.; PEREIRA-FILHO, R. N.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUATIMOSIM, S.; LAUTON-SANTOS, S. **Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms.** Food and Chemical Toxicology, 2018.

DERYAGIN, O. G.; GAVRILOVA, S. A.; GAINUTDINOV, K. L.; GOLUBEVA, A. V.; ADRIANOV, V. V.; YAFAROVA, G. G.; BURAVKOV, S. V.; KOSHELEV, V. B. **Molecular bases of brain preconditioning.** Front. Neurosci., 2017.

DONG, R.; XU, X.; LI, G.; FENG, W.; ZHAO, G.; ZHAO, J.; WANG, D. W.; TU, L. **Bradykinin inhibits oxidative stress-induced cardiomyocytes senescence via regulating redox state.** Plos One, 2013.

DUKA, A.; DUKA, I.; GAO, G.; SHENOUDA, S.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. **Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation.** Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006.

ERNST, G. **Heart rate variability – more than heart beats?** Frontiers in Public Health, 2017.

FENG, 2005.

FARINE, E.; NIEDERBERGER, P.; WYSS, R. K.; MÉNDEZ-CARMONA, N.; GAHL, B.; FIEDLER, G. M.; CARREL, T. P.; STAHEL, H. T. T.; LONGNUS, S. L. **Controlled reperfusion strategies improve cardiac hemodynamic recovery after warm global ischemia in an isolated, working rat heart model of donation after circulatory death (DCD)**. *Frontiers in Physiology*, 2016.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. **Angiotensin-(1-7): Cardioprotective effect in myocardial Ischemia/Reperfusion**. *Hypertension*, 2001.

FERREIRA, S. H. **A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca**. *Brit. J. Pharmacol.*, 1965.

GAO, F.; GAO, E.; LI, T-Y.; OHLSTEIN, E. H.; LOPEZ, B. L.; CHRISTOPHER, T. A.; MA, X-L. **Nitric Oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial Ischemia-Reperfusion - The roles of PI3-Kinase, Akt, and endothelial Nitric Oxide Synthase phosphorylation**. *Circulation*, 2002.

GAO, Y.; LI, R.; YANG, W.; ZHOU, M.; WANG, L.; MA, C.; XI, X.; CHEN, T.; SHAW, C.; WU, D. **Identification of a new myotropic decapeptide from the skin secretion of the red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas***. *Plos One*, 2020.

GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; LEMOS, R. P.; JESUS, I.; GORSHKOV, V.; MCKINNIE, S. M. K.; VEDERAS, J. C.; KJELDSEN, F.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A.; PIMENTA, A. M. C.; VERANO-BRAGA, T. **Moving pieces in a cellular puzzle: a cryptic peptide from the scorpion toxin Ts14 activates AKT and ERK signaling and decreases cardiac myocyte contractility via dephosphorylation of phospholamban**. *Journal of Proteome Res.*, 2020.

GOODWILL, A. G.; DICK, G. M.; KIEL, A. M.; TUNE, J. D. **Regulation of Coronary Blood Flow**. *Compr Physiol*, 2018.

GOTO, M.; LIU, Y.; YANG, X-M.; ARDELL, J. L.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. **Role of Bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts**. *Circulation Research*, 1995.

HALESTRAP, A. P. **What is the mitochondrial permeability transition pore?** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009.

HAN, Y.; ZHAO, H.; TANG, H.; LI, X.; TAN, J.; ZENG Q.; SUN, C. **20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Mediates Isolated Heart Ischemia/Reperfusion Injury by Increasing NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Production**. *Circulation Journal*, 2013.

HAUSENLOY, D. J.; KHARBANDA, R. K.; MØLLER, U. K.; RAMLALL, M.; AARØE, J.; BUTLER, R.; BULLUCK, H.; CLAYTON, T.; DANA, A.; DODD, M.; Engstrom, T.; EVANS, R.; LASSEN, J. F.; CHRISTENSEN, E. F.; GARCIA-RUIZ, J. M.; GOROG, D. A.; HJORT, J.; HOUGHTON, R. F.; IBANEZ, B.; KNIGHT, R.; LIPPERT, F. K.; LØNBORG, J. T.; MAENG, M.; MILASINOVIC, D.; MORE, R.; Nicholas, J. M.; JENSEN, L. O.; PERKINS, A.; Radovanovic, N.; RAKHIT, R. D.; Ravkilde, J.; RYDING, A. D.; SCHMIDT, M. R.; RIDDERVOLD, I. S.; SØRENSEN, H. T.; STANKOVIC, G.; VARMA, M.; WEBB, I.; TERKELSEN, C. J.; GREENWOOD, J. P.; YELLON, D. M.; BØTKER, H. E. **Effect of**

**remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial.** *Lancet*, 2019.

HESS, J. F.; BORKOWSKI, J. A.; YOUNG, G. S.; STRADER, C. D.; RANSOM, R. W. **Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992.

HEUSCH, G. **Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning.** *Circ Res*, 2015.

HEUSCH, G.; BØTKER, H. E.; PRZYKLENK, K.; REDINGTON, A.; YELLON, D. **Remote ischemic conditioning.** *J Am Coll Cardiol*, 2015.

IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; PORTARO, F.C.V.; STÖCKLIN, R.; CAMARGO, A.C.M.; PIMENTA, D.C. **Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography.** *Peptides*, 2004.

IBANEZ, B.; JAMES, S.; AGEWALL, S.; ANTUNES, M. J.; BUCCIARELLI-DUCCI, C.; BUENO, H.; CAFORIO, A. L. P.; CREA, F.; GOUDEVENOS, J. A.; HALVORSEN, S.; HINDRICKS, G.; KASTRATI, A.; LENZEN, M. J.; PRESCOTT, E.; ROFFI, M.; VALGIMIGLI, M.; VARENHORST, C.; VRANCKX, P.; WIDIMSKY, P. **2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation - The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).** *European Heart Journal*, 2018.

ITO, H.; HAYASHI, I.; IZUMI, T.; MAJIMA, M. **Bradykinin inhibits development of myocardial infarction through B2 receptor signalling by increment of regional blood flow around the ischaemic lesions in rats.** *British Journal of Pharmacology*, 2003.

JEAN, M.; GERA, L.; CHAREST-MORIN, X.; MARCEAU, F.; BACHELARD, H. **In vivo effects of bradykinin B2 receptor agonists with varying susceptibility to peptidases.** *Frontiers in Pharmacology*, 2016.

JIANG, Y.; XI, X.; GE, L.; YANG, N.; HOU, X.; MA, J.; MA, C.; WU, Y.; GUO, X.; LI, R.; ZHOU, M.; WANG, L.; CHEN, T.; SHAW, C. **Bradykinin-related peptides (BRPs) from skin secretions of three genera of phyllomedusine leaf frogs and their comparative pharmacological effects on mammalian smooth muscles.** *Peptides*, 2014.

KOJIMA, Y.; VOLKMER, J-P.; MCKENNA, K.; CIVELEK, M.; LUSIS, A.J.; MILLER, C.; DIRENZO, D.; NANDA, V.; YE, J.; CONNOLLY, A.; SCHADT, E.; QUERTERMOUS, T.; BETANCUR, P.; MAEGDEFESSEL, L.; PERISIC, L.; HEDIN, U.; WEISSMAN, I.; LEEPER, N.J. **CD47 blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis.** *Nature*, 2016.

KRISHNAMURTHI, R.V.; FEIGIN, V.L.; FOROUZANFAR, M.H.; MENSAH, G.A.; CONNOR, M.; BENNETT, D.A.; MORAN, A.E.; SACCO, R.L.; ANDERSON, L.M.; TRUELSEN, T.; O'DONNELL, M.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; BARKER-COLLO, S.; LAWES, C.M.M.; WANG, W.; SHINOHARA, Y.; WITT, E.; EZZATI, M.; NAGHAVI, M.; MURRAY, C. **Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010.** *Lancet Glob Health*, 2013.

KUBLER, W.; HAASS, M. **Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles.** *Heart*, 1996.

LANGOWISKI A.R.; KOERICH, A. **Linha guia de infarto do miocárdio. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Atenção à Saúde.** Curitiba: SESA, 2016.

LIBBY, P.; BURING, J.E.; BADIMON, L.; HANSSON, G.K.; DEANFIELD, J.; BITTENCOURT, M.S.; TOKGÖZOĞLU, L.; LEWIS, E.F. **Atherosclerosis.** *Nature Review Disease Primer*, 2019.

LINDSEY, M. L.; BOLLI, R.; CANTY, J. M. Jr.; DU, X-J.; FRANGOGIANNIS, N. G.; FRANTZ, S.; GOURDIE, R. G.; HOLMES, J. W.; JONES, S. P.; KLONER, R. A.; LEFER, D. J.; LIAO, R.; MURPHY, E.; PING, P.; PRZYKLENK, K.; RECCHIA, F. A.; LONGACRE, L. S.; RIPPLINGER, C. M.; EYK, J. E. V.; HEUSCH, G. **Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018.

LITVIŇUKOVÁ, M.; TALAVERA-LÓPEZ, C.; MAATZ, H.; REICHART, D.; WORTH, C. L.; LINDBERG, E. L.; KANDA, M.; POLANSKI, K.; HEINIG, M.; LEE, M.; NADELMANN, E.; ROBERTS, K.; TUCK, L.; FASOULI, E. S.; DELAUGHTER, D. M.; MCDONOUGH, B.; WAKIMOTO, H.; GORHAM, J. M.; SAMARI, S.; MAHBUBANI, K. T.; SAEB-PARSY, K.; PATONE, G.; BOYLE, J. J.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; VIVEIROS, A.; OUDIT, G. Y.; BAYRAKTAR, O. A.; SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. E.; NOSEDA, M.; HUBNER, N.; TEICHMANN, S. A. **Cells of the adult human heart.** *Nature*, 2020.

LOCHNER, A.; MARAIS, E.; GENADE, S.; HUISAMEN, B.; DU TOIT, E. F.; MOOLMAN, J.A. **Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning.** *Cardiovascular Journal of Africa*, 2009.

MAGDER, S. **Volume and its relationship to cardiac output and venous return.** *Critical Care*, 2016.

MANDLE, R. J.; KAPLAN, A. P. **Hageman factor substrates: human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor-dependent fibrinolysis.** *J Biol Chem*, 1977.

MARCEAU, F.; BAWOLAK, M.T.; FORTIN, J.P.; MORISSETTE, G.; ROY, C.; BACHELARD, H.; GERA, L.; CHAREST-MORIN, X. **Bifunctional ligands of the bradykinin B2 and B1 receptors: An exercise in peptide hormone plasticity.** *Peptides*, 2018.

MARCK, P. V.; PIERRE, S. V. **Na/K-ATPase Signaling and Cardiac Pre/Postconditioning with Cardiotonic Steroids**. International Journal of Molecular Sciences, 2018.

MARINHO, F.; PASSOS, V.M.A.; MALTA, D.C.; FRANÇA, E.B.; ABREU, D.M.X.; ARAÚJO, V.E.M.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M.T.; CAMARGOS, P.A.M.; CUNHA, C.C.; DUNCAN, B.B.; FELISBINO-MENDES, M.S.; GUERRA, M.R.; GUIMARAES, M.D.C.; LOTUFO, P.A.; MARCENES, W.; OLIVEIRA, P.P.V.; PEDROSO, M.M.; RIBEIRO, A.L.; SCHMIDT, M.I.; TEIXEIRA, R.A.; VASCONCELOS, A.M.N.; BARRETO, M.L.; BENSENOR, I.M.; BRANT, L.C.C.; CLARO, R.M.; PEREIRA, A.C.; COUSIN, E.; CURADO, M.P.; SANTOS, K.P.B.; FARO, A.; FERRI, C.P.; FURTADO, J.M.; GALL, J.; GLENN, S.D.; GOULART, A.C.; ISHITANI, L.H.; KIELING, C.; LADEIRA, R.M.; MACHADO, I.E.; MARTINS, S.C.O.; MARTINS-MELO, F.R.; MELO, A.P.S.; MILLER-PETRIE, M.K.; MOONEY, M.D.; NUNES, B.P.; PALONE, M.R.T.; PEREIRA, C.C.; RASELLA, D.; RAY, S.E.; ROEVER, L.; SALDANHA, R.F.; Santos, I.S.; SCHNEIDER, I.J.C.; SILVA, D.A.S.; SILVEIRA, D.G.A.; SOARES FILHO, A.M.; SOUSA, T.C.M.; SZWARCOWALD, C.L.; TRAEBERT, J.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; WANG, Y-P.; LOZANO, R.; MURRAY, C.J.L.; NAGHAVI, M. **Burden of disease in Brazil, 1990–2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016**. Lancet, 2018.

MARTIN, C.; SCHULZ, R.; POST, H.; BOENGLER, K.; KELM, M.; KLEINBONGARD, P.; GRES, P.; SKYSCHALLY, A.; KONIETZKA, I.; HEUSCH, G. **Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ: NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia**. Cardiovasc Res., 2007.

MEILHAC, S. M.; BUCKINGHAM, M. E. **The deployment of cell lineages that form the mammalian heart**. Nat Rev Cardiol, 2018.

MENKE, J. G.; BORKOWSKI, J. A.; BIERILO, K. K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A. W.; SCHNECK, K. A.; RANSOM, R. W.; STRADER, C. D.; LINEMEYER, D. L.; HESS, J. F. **Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor**. The Journal of Biological Chemistry, 1994.

MERIGA, B.; GANJAY, M.S.; PARIM, B.N. **Phytochemicals as Potential Agents to Treat Obesity**. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2017.

MOKHTARI-ZAER, A.; MAREFATI, N.; ATKIN, S.L.; BUTLER, A.E.; SAHEBKAR, A. **The protective role of curcumin in myocardial ischemia–reperfusion injury**. Journal of Cellular Physiology, 2018.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. **Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study**. The Lancet, 1997.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium**. Circulation, 1986.

NEVES, L. A. A.; ALMEIDA, A. P.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S. **Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts**.

**Angiotensin-(1-7) and reperfusion arrhythmias.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1997.

NOLLY, H.; CARBINI, L. A.; SCICLI, G.; CARRETERO, O. A.; SCICLI, A. G. **A Local Kallikrein-Kinin System Is Present in Rat Hearts.** Hypertension, 1994.

OH, J. G.; KHO, C.; HAJJAR, R. J.; ISHIKAWA, K. **Experimental models of cardiac physiology and pathology.** Heart Fail Rev, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Cardiovascular Diseases.** 11 June 2021. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em 09 setembro de 2021.

PARK, D. S.; FISHMAN, G. I. **Development and Function of the Cardiac Conduction System in Health and Disease.** J. Cardiovasc. Dev. Dis., 2017.

PATHAK, M.; WONG, S. S.; DREVENY, I.; EMSLEY, J. **Structure of plasma and tissue kallikreins.** Thrombosis and Haemostasis, 2013.

PESARO, A.E.P.; SERRANO, J.R.C.V.; NICOLAU, J.C. **Infarto Agudo do miocárdio – Síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST.** Ver. Assoc. Med. Bras., 2004.

PIMENTA, A.M.C.; DE LIMA, M.E. **Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms.** J. Pept. Sci., 2005.

PINHEIRO, B. B.; FIORELLI, A. I.; GOMES, O. M. **Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts.** Rev Bras Cir Cardiovasc, 2009.

POLEGATO, B.F.; MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S.; GONÇALVES, A.F.; LIMA, A.F.; MARTINEZ, P.F.; OKOSHI, M.P.; OKOSHI, K.; PAIVA, S.A.R.; ZORNOFF, L.A. **Associação entre Variáveis Funcionais e Insuficiência Cardíaca após o Infarto do Miocárdio em Ratos.** Arq Bras Cardiol., 2016.

POTIER, L.; WAECKEL, L.; VINCENT, M-P.; CHOLLET, C.; GOBEIL JR, F.; MARRE, M.; BRUNEVALL, P.; RICHER, C.; ROUSSEL, R.; ALHENC-GELAS, F.; BOUBY, N. **Selective Kinin Receptor Agonists as Cardioprotective Agents in Myocardial Ischemia and Diabetes.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2013.

QADRI, F; BADER, M. **Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation.** Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2017.

QUIZHEN YUAN; RUI MING CHEN; XU ZHENG; MAIXIA MENG; YUPING KAO; JUNFENG LIU; XUEFENG GAN; MINJUAN SHI; JUNMING FU; SHANSHAN JIANG; HUIYAO YU. **Chinese herbal**

**medicine Xinji pill protects the heart from ischemia/reperfusion injury through the Akt/Nrf2 pathway.** *Molecular Medicine Reports*, 2017.

RIESS, M. L.; STOWE, D. F.; WARLTIER, D. C. **Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. **Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin.** American Physiological Society, 1949.

RØSAND, Ø.; HØYDAL, M. A. **Cardiac Exosomes in Ischemic Heart Disease— A Narrative Review.** *Diagnostics*, 2021.

ROTH, S.; TORREGROZA, C.; FEIGE, K.; PRECKEL, B.; HOLLMANN, M. W.; WEBER, N. C.; HUHN, R. **Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications.** *Int. J. Mol. Sci.*, 2021.

SAEID, F.; ANISEH, J.; REZA, B.; MANOUCHEHR, V. **Signaling mediators modulated by cardioprotective interventions in healthy and diabetic myocardium with ischaemia– reperfusion injury.** *European Journal of Preventive Cardiology*, 2018.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N.; ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BADER, M. **Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats.** *Physiological Genomics*, (2004).

SANTUCCI, A.; RICCINI, C.; CAVALLINI, C. **Treatment of stable ischaemic heart disease: the old and the new.** *European Heart Journal Supplements*, 2020.

SAVARESE, G.; LUND, L.H. **Global Public Health Burden of Heart Failure.** *Card Fail Rev.*, 2017.

SGARRA, L.; LEO, V.; ADDABBO, F.; IACOBAZZI, D.; CARRATU, M. R.; MONTAGNANI, M.; POTENZA, M. A. **Intermittent Losartan Administration Triggers Cardiac Post-Conditioning in Isolated Rat Hearts: Role of BK2 Receptors.** *Plos One*, 2014.

SILVA, M. M.; DE SOUZA-NETO, F. P., DE JESUS, I. C. G.; GONÇALVES, G. K.; SANTUCHI, M. C.; SANCHES, B. L.; DE ALCÂNTARA-LEONÍDIO, T. C.; MELO, M. B.; VIEIRA, M. A. R.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A. S.; DA SILVA, R. F. **Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic 2 constriction in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2021.

SIQUEIRA, A.F.A; ABDALLA, D.S.P; FERREIRA, S.R.G. **LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2006.

TABAS, I. **Death-defying plaque cells.** *Nature*, 2016.



THIELMANN, M.; KOTTENBERG, E.; KLEINBONGARD, P.; WENDT, D.; GEDIK, N.; PASA, S.; PRICE, V.; TSAGAKIS, K.; NEUHÄUSER, M.; PETERS, J.; JAKOB, H.; HEUSCH, G. **Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial.** *Lancet*, 2013.

TROMP, J.; OUWERKERK, W.; CLELAND, J. G. F.; Angermann, C. E.; DAHLSTROM, U.; TENG, K. T-H.; BAMADHAJ, S.; ERTL, G.; HASSANEIN, M.; PERRONE, S. V.; GHADANFAR, M.; SCHWEIZER, A.; OBERGFELL, A.; FILIPPATOS, G.; COLLINS, S. P.; LAM, C. S. P.; DICKSTEIN, K. **Global Differences in Burden and Treatment of Ischemic Heart Disease in Acute Heart Failure.** *J Am Coll Cardiol HF*, 2021.

TSCHÖPE, C.; HERINGER-WALTHER, S.; WALTHER, T. **Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000.

VÉLEZ, D. E.; MESTRE-CORDERO, V. E.; HERMANN, R.; PEREGO, J.; HARRIET, S.; FERNANDEZ-PAZOS, M. M.; MOURGLIA, J.; MARINA-PRENDES, M. G. **Rosuvastatin protects isolated hearts against ischemia-reperfusion injury: role of Akt-GSK-3 $\beta$ , metabolic environment, and mitochondrial permeability transition pore.** *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2020.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.A.S.; PIMENTA, A.M.C. **Tityus serrulatus Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008.

VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M.N.; LAUTNER, R.Q.; GOMES, E.R.M.; MATA-MACHADO, L.T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE, C.; DE LIMA, M.E.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R.A.S.; PIMENTA, A.M.C. **Structure–function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2 kinin receptor.** *Toxicon*, 2010.

VINCENT, J-L. **Understanding cardiac output.** *Critical Care*, 2008.

WATANABE, M.; OKADA, T. **Langendorff Perfusion Method as an Ex-Vivo Model to Evaluate Heart Functions in Rats.** Kiyotake Ishikawa (ed.), **Experimental Models of Cardiovascular Diseases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.** Springer Science+Business Media, LLC, Springer Nature, 2018.

WENGER, N. K. **Coronary Heart Disease: The Female Heart Is Vulnerable. Progress in Cardiovascular Diseases.** Elsevier, 2003.

WHITAKER, R. H. **Anatomy of the heart.** *Medicine*, 2018.

WU, Y.; LIU, H.; WANG, X. **Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury.** Life Sciences, 2020.

YAO, Yy.; ZHU, Mh.; ZHANG, Fj.; WEN Cy.; MA LI.; WANG Wn.; WANG Cc.; LIU, Xb.; YU, Ln.; QIAN Lb.; WANG Ja.; YAN M. **Activation of Akt and cardioprotection against reperfusion injury are maximal with only five minutes of sevoflurane postconditioning in isolated rat hearts.** J. Zhejiang Univ. Sci. B, 2013

YI, X. Q.; LI, T.; WANG, J. R.; WONG, V. K. W.; LUO, P.; WONG, I. Y. F.; JIANG, Z. H.; LIU, L.; ZHOU, H. **Total ginsenosides increase coronary perfusion flow in isolated rat hearts through activation of PI3K/Akt-eNOS signaling.** Phytomedicine, 2010.

YOUSEF, G. M.; OBIEZU, C. V.; LUO, L. Y.; MAGKLARA, A.; BORGONO, C. A.; KISHI, T.; MEMARI, N.; MICHAEL, I. P.; SIDIROPOULOS, M.; KURLENDER, L.; ECONOMOPOLOU, K.; KAPADIA, C.; KOMATSU, N.; PETRAKI, C.; ELLIOTT, M.; SCORILAS, A.; KATSAROS, D.; LEVESQUE, M. A.; DIAMANDIS, E. P. **Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications.** Adv Clin Chem, 2005.

YUAN, X.; NIU, H-T; WANG, P-L.; LU, J.; ZHAO, H; LIU, S-H; ZHENG, Q-S.; LI, C-G. **Cardioprotective Effect of Licochalcone D against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Langendorff-Perfused Rat Hearts.** Plos One, 2015.

YUAN, Q.; CHEN, R.; ZHENG, X.; MENG, M.; KAO, Y.; LIU, J.; GAN, X.; SHI, M.; FU, J.; JIANG, S.; YU, H. **Chinese herbal medicine Xinji pill protects the heart from ischemia/reperfusion injury through the Akt/Nrf2 pathway.** Molecular Medicine Reports, 2017.

ZIMMER, H.G. **The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers.** News Physiol. Sci., 1998.