

**Renata da Cunha Ribeiro**

Liberação de Angiotensina-(1-7) e Alamandina no Pós-  
Condicionamento Cardíaco Isquêmico e Farmacológico em  
Coração Isolado de Ratos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Belo Horizonte  
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Liberação de Angiotensina-(1-7) e Alamandina no Pós-  
Condicionamento Cardíaco Isquêmico e Farmacológico em  
Coração Isolado de Ratos

Dissertação de mestrado  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas -  
Fisiologia e Farmacologia da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais

Aluna: Renata da Cunha Ribeiro  
Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte, 2014

043

Ribeiro, Renata da Cunha.

Liberção de angiotensina-(1-7) e alamandina no pós-condicionamento cardíaco isquêmico e farmacológico em coração isolado de ratos. [manuscrito] / Renata da Cunha Ribeiro. - 2014.

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

Orientador: Robson Augusto Souza dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.


1. Pós-condicionamento cardíaco. 2. Pós-condicionamento isquêmico. 3. Pós-condicionamento farmacológico. 4. Angiotensina- (1-7). 5. Alamandina. 6. Sevoflurano. 7. Sistema renina angiotensina - Teses. 8. Fisiologia - Teses. I. Santos, Robson Augusto Souza dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

**"LIBERAÇÃO DE ANGIOTENSINA-(1-7) E ALAMANDINA NO  
PÓS-CONDICIONAMENTO CARDÍACO ISQUÊMICO E  
FARMACOLÓGICO EM CORAÇÃO ISOLADO DE RATOS"**

**RENATA DA CUNHA RIBEIRO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 07 de janeiro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. ROBERTO QUEIROGA LAUTNER**  
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 07 de janeiro de 2015

## **Agradecimentos**

A Deus para que continue guiando minhas escolhas.

Aos amigos que entenderam minha ausência e apoiaram meus projetos.

Ao professor doutor Robson Santos pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo enriquecimento pessoal.

Aos professores da pós-graduação que me ensinaram a rever conceitos sob uma nova óptica.

A dra. Walkíria Wingester por incentivar e viabilizar o aprimoramento profissional dos anestesiológicos do Hospital Municipal Odilon Behrens.

Às novas amizades feitas no laboratório que deixaram meu trabalho mais leve e prazeroso e minh'alma mais serena.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste estudo.

RIBEIRO, Renata da Cunha. **Liberação de Angiotensina-(1-7) e Alamandina no Pós-Condicionamento Cardíaco Isquêmico e Farmacológico em Coração Isolado de Ratos.** Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia – da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

## Resumo

**Introdução:** Sabem-se que as lesões isquêmicas são muitas vezes letais a diversos órgãos como coração, cérebro, pulmões e intestino.

Paradoxalmente, a reperfusão pode ser tão ou mais danosa que a isquemia. Na tentativa de minimizar os danos causados pela reperfusão diversas técnicas de proteção miocárdica foram estudadas nos últimos anos.

Técnicas de condicionamento antes da isquemia (pré-condicionamento), durante a isquemia (per-condicionamento) e após a isquemia foram testadas por diversos autores com taxas variadas de sucesso. Alguns trabalhos demonstraram efeito cardioprotetor da Angiotensina-(1-7) em corações isolados expostos ao fenômeno de isquemia/reperfusão.

**Objetivos:** O objetivo deste estudo é esclarecer se o sistema renina-angiotensina, principalmente através da Angiotensina-(1-7), da Angiotensina II e da Alamandina, participa da cardioproteção determinada por métodos de pós-condicionamento cardíaco (isquêmico e farmacológico) no fenômeno de isquemia/reperfusão em corações isolados de ratos Sprague-Dawley.

**Materiais e Métodos:** 18 ratos Sprague-Dawley machos com idade entre 12 e 16 semanas foram decapitados e tiveram o coração isolado e colocado no aparato de Langendorff onde foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e oxigenados com uma mistura de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>.

Após serem colocados no aparato foi inserido através da aurícula esquerda um balão posicionado dentro do ventrículo esquerdo para aferir os parâmetros fisiológicos estudados. O ECG foi registrado através da colocação de eletrodos na superfície cardíaca.

Todos os parâmetros foram registrados em tempo real pelo software LabChart Pro®.

Todos os grupos foram submetidos a 30 minutos de estabilização seguidos por 30 minutos de infarto. O infarto foi realizado através da técnica descrita por Lubbe et al.(1) No início da reperfusão os animais foram divididos em três grupos (n=6): no grupo controle foi realizado 60 minutos de reperfusão sem interferências. No grupo pós-condicionamento isquêmico, no início da reperfusão foram realizados três ciclos de isquemia/reperfusão com 10s de duração cada. No grupo pós-condicionamento farmacológico o anestésico inalatório sevoflurano foi conectado ao circuito de oxigênio durante os primeiros 10 minutos da reperfusão a 2,5% (1 CAM).

Em todos os corações houve coleta periódica do perfusato para a realização das dosagens das enzimas CK-MB, LDH, Troponina I e dos peptídeos angiotensina-(1-7), angiotensina II e alamandina.

**Resultados:** Diversos parâmetros oscilaram em direção oposta ao esperado e na maioria deles não houve diferença significativa entre os grupos. Observamos o mesmo resultado com as enzimas e os peptídeos dosados. As dosagens de Alamandina e Angiotensina-(1-7) evidenciaram diminuição das mesmas no período de reperfusão quando comparadas ao período de isquemia em grupos submetidos a técnicas de pós-condicionamento farmacológico. No grupo submetido a pós-condicionamento isquêmico houve aumento da Alamandina em relação ao período de isquemia, porém a mesma não recuperou os valores da estabilização. A Angiotensina-(1-7) apresentou diminuição quando comparada ao período de isquemia. A Angiotensina II teve um comportamento variável, diminuindo durante a reperfusão dos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico e aumentando durante a reperfusão do grupo pós-condicionamento isquêmico. O grupo pós-condicionamento farmacológico apresentou a maior incidência de arritmias dos três grupos. O grupo controle apresentou menor incidência de arritmias em todo o período de reperfusão e o grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou menor incidência nos primeiros 5' de reperfusão.

**Conclusão:** Em nosso estudo a isquemia realizada não foi suficiente para desencadear os mecanismos de proteção observados no pós-condicionamento e já descritos em outros estudos, porém a Angiotensina-(1-7) parece diminuir com técnicas de pós-condicionamento, enquanto a Alamandina e a Angiotensina II apresentam um comportamento variável. A Angiotensina-(1-7) e a Alamandina parecem ter efeito antiarrítmico.

**Palavras-chave:** pós-condicionamento cardíaco, angiotensina-(1-7), alamandina, sevoflurano, pós-condicionamento isquêmico, pós-condicionamento farmacológico, sistema renina angiotensina.



RIBEIRO, Renata da Cunha. **Release of Angiotensin-(1-7) and Alamandine in the Ischemic and Pharmacological Cardiac Post Conditioning in Isolated Rats Heart.** Dissertation presented to the Postgraduate program in Biological Sciences – Physiology and Pharmacology – Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014

## **Abstract**

**Background:** It's know that ischemic lesions are often lethal to various organs such as heart, brain, lungs and intestines.

Paradoxically, reperfusion may be as or more damaging than ischemia.

In an attempt to minimize the damage caused by reperfusion different myocardial protection techniques have been studied in recent years.

Conditioning techniques before ischemia (preconditioning) during ischemia (per-conditioning) and after ischemia (postconditioning) were tested by several authors with varying success rates. Some studies have demonstrated cardioprotective effect of angiotensin (1-7) in isolated hearts exposed to the phenomenon of ischemia / reperfusion.

**Objectives:** The aim of this study is to clarify whether the renin angiotensin system, mainly through the angiotensin-(1-7), Angiotensin II and Alamandine, participates in the cardioprotection determined by cardiac post-conditioning methods (ischemic and pharmacological) in ischemic phenomenon / reperfusion in isolated hearts of male Sprague-Dawley rats.

**Materials and Methods:** 18 male Sprague-Dawley rats, aged between 12 and 16 weeks were decapitated and their hearts were isolated and placed in the Langendorff apparatus where they were perfused with Krebs-Henseleit solution oxygenated with a mixture of 95% O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>.

After being placed in the apparatus, was inserted through the left atrium one balloon positioned within the left ventricle in order to measure the physiological parameters. The ECG was recorded by placing electrodes on the heart surface. All parameters were recorded in real time by LabChart Pro® software.

All groups were subjected to 30 min of stabilization followed by 30 minutes of infarction. The infarction was performed using the technique described by Lubbe et al (1). At the beginning of reperfusion, the animals were divided

in three groups (n = 6):. In the control group was performed 60 minutes of reperfusion without interference. In ischemic postconditioning group at the beginning of reperfusion were performed three cycles of ischemia / reperfusion with 10s duration each. In the pharmacological postconditioning group inhalational anesthetic sevoflurane was connected to the oxygen circuit during the first 10 minutes of reperfusion 2.5% (CAM 1).

In every heart there was periodic collection of perfusate to carry out the measurements of CK-MB, LDH, troponin I enzymes and angiotensin peptides angiotensin-(1-7), angiotensin II and alamandine.

**Results:** Several parameters varied in the opposite direction than expected and in most of them there was no significant difference between groups. We observed the same result with enzymes and peptides measured. Dosages of Alamandina and Angiotensin- (1-7) showed reduction as the reperfusion period compared to the period of ischemia in groups submitted to pharmacological postconditioning techniques. In the ischemic postconditioning group submitted was increased Alamandina for the period of ischemia, but it does not recovered the stabilization values. Angiotensin-(1-7) had a decrease when compared to the period of ischemia. Angiotensin II had a variable behavior, decreasing during reperfusion of the control group and pharmacological post-conditioning and increasing during reperfusion of ischemic post-conditioning group. Pharmacological post-conditioning group had the highest incidence of arrhythmias of the three groups. The control group had a lower incidence of arrhythmias in the whole period of reperfusion and ischemic post-conditioning group had a lower incidence in the first 5' de reperfusion.

**Conclusion:** In our study, ischemia conducted was not sufficient to trigger the protection mechanisms observed in the post-conditioning and already described in other studies, but the angiotensin-(1-7) seem to decrease with post-conditioning techniques as alamandine and angiotensin II features a variable behavior. The angiotensin-(1-7) and alamandine suggest the antiarrhythmic effect.

**Key words:** cardiac post-conditioning, angiotensin-(1-7), alamandine, sevoflurane, ischemic post-conditioning, pharmacological post-conditioning, renin angiotensin system.

## Lista de Figuras

Figura 1: esquema simplificado das vias ativadas na cardioproteção	21
Figura 2: sistema renina-angiotensina	24
Figura 3: esquema simplificado sistema renina-angiotensina	28
Figura 4: Aparato de Langendorff e bomba peristáltica	32
Figura 5: registro dos parâmetros eletrofisiológicos	33

## Lista de Gráficos

Gráfico 6.1.1: pressão sistólica final	44
Gráfico 6.1.2: pressão sistólica final	44
Gráfico 6.2.1: pressão diastólica final	45
Gráfico 6.2.2: pressão diastólica final	46
Gráfico 6.3.1: pressão desenvolvida	47
Gráfico 6.3.2: pressão desenvolvida	48
Gráfico 6.4.1: máxima dP/dT	49
Gráfico 6.4.2: máxima dP/dT	50
Gráfico 6.5.1: mínima dP/dT	51
Gráfico 6.5.2: mínima dP/dT	51
Gráfico 6.6.1: frequência cardíaca	52
Gráfico 6.6.2: frequência cardíaca	53
Gráfico 6.7.1: QRS (largura QRS)	54
Gráfico 6.7.2: QRS (largura QRS)	54
Gráfico 6.8.1: intervalo RR	55
Gráfico 6.8.2: intervalo RR	56
Gráfico 6.9.1: infradesnivelamento ST	57
Gráfico 6.9.2: infradesnivelamento ST	58
Gráfico 6.10.1: intervalo QTc	58
Gráfico 6.10.2: intervalo QTc	59
Gráfico 6.11.1: Arritmias	60
Gráfico 6.11.2: Arritmias 5'	61
Gráfico 6.12.1: fluxo no 20º minuto da estabilização e 1º minuto da isquemia	62
Gráfico 6.12.2: fluxo	63
Gráfico 6.12.3: fluxo	64
Gráfico 6.13.1: CK-MB	65
Gráfico 6.13.2: CK-MB	66
Gráfico 6.14.1: LDH	67
Gráfico 6.14.2: LDH	68
Gráfico 6.15.1: Troponina I	69
Gráfico 6.15.2: Troponina I	70
Gráfico 6.16.1: alamandina – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	73
Gráfico 6.16.2: alamandina – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	74

Gráfico 6.17.1: angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	77
Gráfico 6.17.2: angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	78
Gráfico 6.18.1: angiotensina II – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	80
Gráfico 6.18.2: angiotensina II – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão.	81

## Lista de Tabelas

Tabela 6.16.1 – valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos. 71

Tabela 6.16.2 – valores médios de cada tempo do período de reperfusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos. 72

Tabela 6.17.1 – valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos. 74

Tabela 6.17.2 – valores médios de cada tempo do período de reperfusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos. 76

Tabela 6.18.1 – valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos. 78

Tabela 6.18.2 – valores médios de cada tempo do período de reperfusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos. 80

## Abreviaturas

CETEA: Comitê de Ética e Pesquisa em Animais  
CK-MB: fração MB (muscle, brain) da enzima creatinofosfoquinase  
LDH: lactato desidrogenase  
Máxima dP/dT: máximo aumento pressão ventrículo esquerdo  
Mínima dP/dT: máxima queda pressão ventrículo esquerdo  
CAM: Concentração Alveolar Mínima  
ISA: Índice de Severidade de Arritmias  
mPTP: poros mitocondriais de transição e permeabilidade  
RISK: cinase salvadora de lesão de reperfusão (reperfusion injury salvage kinase)  
PI3K: fosfoenositídeo cinase 3  
Akt/PKB: proteína cinase B  
SAFE: cinase pró-sobrevivência  
ERK: cinase reguladora de sinal extracelular  
GSK3 $\beta$ : glicogênio sintase cinase 3 beta  
Ang I: Angiotensina I  
Ang II: Angiotensina II  
Ang-(1-7): angiotensina-(1-7)  
Ang-(1-9): angiotensina-(1-9)  
Receptor AT1: receptor de angiotensina 2  
Receptor AT2: receptor de angiotensina 2  
ECA: enzima conversora de angiotensina  
NaCl: cloreto de sódio  
KCl: cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato monopotássico  
MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O: sulfato de magnésio heptahidratado  
CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O: cloreto de cálcio dihidratado  
NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio  
pOHHgHz: Para-hidroximercúrio-benzoato  
PMSF: Fenilmetilsulfonil fluorídrico  
EDTA: Ácido etilenodinitrilotetra-acético  
ACN: acetonitrila  
HFBA: ácido heptafluorobutírico

BSA: albumina sérica bovina

2,3,5 TTC: 2,3,5 cloreto de trifenil tetrazólio

Est: estabilização

Isq: isquemia

Rep: reperfusão



## Sumário

Resumo	iv
Abstract	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Gráficos	x
Lista de Tabelas	xii
Abreviaturas	xiii
1. Introdução	17
1.1. Lesões secundárias a reperfusão de órgãos	17
1.2. Pós-Condicionamento Isquêmico	19
1.3. Pós-Condicionamento Farmacológico	21
1.4. Sistema Renina-Angiotensina	23
1.5. Angiotensina-(1-7)	25
1.6. Alamandina	27
2. Justificativa	29
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. Materiais e Métodos	31
4.1. Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFMG	31
4.2. Animais	31
4.3. Langendorff	31
4.4. Solução Nutridora	33
4.5. Extração do Coração	34
4.6. Modelo do Infarto	34
4.7. Pós-Condicionamento Isquêmico	35
4.8. Pós-Condicionamento Farmacológico	35
4.9. Avaliação da Área Infartada	35
4.10. Parâmetros Eletrofisiológicos	36
4.11. Avaliação de Arritmias	36
4.12. Coleta do Perfusato	37
4.13. Inibidores de Protease	38
4.14. Extração de Proteínas por Coluna de Bond Elut	38

4.15. Espectrometria de Massa	39
4.16. Protocolo Experimental	39
4.17. Critérios de Exclusão	41
5. Análise Estatística	42
6. Resultados	43
7. Discussão	82
8. Conclusões	97
9. Referências Bibliográficas	99
10. Apêndice	109

# 1.Introdução

## 1.1. Lesões secundárias a reperfusão de órgãos

As lesões isquêmicas são muitas vezes letais a diversos órgãos como coração, cérebro, pulmões e intestino(Zhao 2010)(Xin et al. 2010)(Fang et al. 2010). Paradoxalmente, a reperfusão pode ser tão ou mais danosa que a isquemia. (Zhao 2010)(Y. Yao et al. 2010)

Na tentativa de minimizar os danos causados pela reperfusão, diversas técnicas de proteção miocárdica foram estudadas nos últimos anos sendo que na década de 60 foi concebido o conceito de cardioproteção (Andreka et al. 2007a)

As vias envolvidas na cardioproteção ainda não foram totalmente elucidadas apesar do fenômeno ser estudado há aproximadamente 50 anos. (Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)

A lesão por reperfusão envolve vários mecanismos, dentre eles sobrecarga de cálcio e radicais livres, além de aberrações no metabolismo miocárdico, disfunção endotelial, inflamação, hipercontratura e necrose/apoptose celular.(Andreka et al. 2007a) (Gomes et al. 2011)

A isquemia cardíaca leva a danos na cadeia de transporte de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio e sobrecarga mitocondrial de cálcio. Esses fatores levam a abertura de poros mitocondriais de transição e permeabilidade (mPTP) durante o período de reperfusão, etapa fundamental na morte celular. O pós-condicionamento isquêmico diminui a injúria cardíaca e previne a abertura desses poros em corações adultos.(Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010) Diversos estudos demonstraram a participação de algumas vias de sobrevivência como a cascata RISK e PI3K/Akt em lesões de isquemia/reperfusão.(Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)(H. Chen et al. 2008)(He et al. 2008)(Zhao 2010)

O pós-condicionamento isquêmico diminui a injúria cardíaca e previne a abertura desses poros em corações adultos. (Q. Chen et al. 2012)

O pós-condicionamento ativa várias vias cardioprotetoras que são a cascata das cinases salvadoras de reperfusão (RISK) (Fang et al. 2010), que inclui a fosfatidil inositol-3-cinase/Akt (PI3K/Akt) e a ERK1/2, cinase

reguladora do sinal extracelular (Moriguchi et al. 2010) e a cascata do fator de ativação e melhoria da sobrevivência (SAFE) que inclui a transcrição do sinal transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ). (Q. Chen et al. 2012)(Lacerda et al. 2009) (Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)(Xin et al. 2010)(Feng et al. 2005)(Duan et al. 2011) (Rahman et al. 2011)

Alguns estudos mostraram a via SAFE associada ao pós-condicionamento isquêmico (Lacerda et al. 2009), enquanto a via RISK associada ao pós-condicionamento farmacológico.(Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)(Zhang et al. 2011) A ERK 1/2, cinase reguladora de sinal extracelular, é um dos candidatos a participar do condicionamento isquêmico e farmacológico diminuindo as injúrias relacionadas ao fenômeno isquemia/reperfusão. (H. Chen et al. 2008)(Ma et al. 2013)

Outro estudo sugere a participação da via PKB/Akt e também da GSK3 $\beta$  na cardioproteção induzida pelo sevoflurano e isoflurano.(Feng et al. 2005)(Fang et al. 2010)

Um estudo sugere a participação de canais mitocondriais de potássio cálcio ativado e canais mitocondriais de potássio ATP sensível no pós-condicionamento isquêmico e no pós-condicionamento farmacológico. O pós-condicionamento farmacológico atua inibindo a abertura desses poros mitocondriais no período de reperfusão aparentemente via ativação dos canais mitocondriais de potássio ATP sensíveis e via PI3K e ERK1/2. A participação destes canais já foi estudada no fenômeno do pré-condicionamento.(C. Jin et al. 2012)(Y. Yao et al. 2010) (Feng et al. 2005)(Rahman et al. 2011)

A maior parte dos estudos elucidando as vias cardioprotetoras são realizadas com pós-condicionamento isquêmico.(Lacerda et al. 2009)(Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)(Tang et al. 2010)(Zhao 2010)(Yu et al. 2010)(Bopassa et al. 2006)

Técnicas de condicionamento antes da isquemia (pré-condicionamento), durante a isquemia (per-condicionamento) e após a isquemia foram testadas por diversos autores com taxas variadas de sucesso. (Deyhimy et al. 2007) (Bopassa et al. 2006)(Rahman et al. 2011)(H. Chen et al. 2008)

Um estudo testou o uso de Intralipid como possível fármaco com propriedades cardioprotetoras e concluiu que os primeiros cinco minutos da reperfusão são os mais críticos para se interferir no fenômeno. (Rahman et al. 2011)(Feng et al. 2005)

Alguns trabalhos demonstraram efeito cardioprotetor da Angiotensina-(1-7) em corações isolados expostos ao fenômeno de isquemia/reperfusão, porém esses estudos não realizaram técnicas de condicionamento cardíaco. (Ferreira, Santos, and Almeida 2001).(Ferreira, Santos, and Almeida 2002)

A maioria dos estudos são realizados em corações de animais “*in vitro*” e a dosagem de enzimas envolvidas em lesão celular como CK-MB, LDH e Troponina I é realizada no perfusato refluído diretamente das coronárias.(Yu et al. 2010)(Bopassa et al. 2006)

## 1.2. Pós-Condicionamento Isquêmico

O coração seria protegido de um episódio letal de isquemia/reperfusão aguda pela aplicação de um período breve de isquemia/reperfusão não letal no próprio coração ou em um órgão distante. Este breve período de isquemia poderia ser aplicado antes (pré-condicionamento isquêmico) ou durante (per condicionamento isquêmico) o período isquêmico ou ainda imediatamente no início da reperfusão (pós-condicionamento isquêmico). (Ludman, Yellon, and Hausenloy 2010)(Xin et al. 2010)(Pinheiro et al. 2010)

A aplicação prática do pré-condicionamento é limitada pelo fato de muitas vezes não conseguirmos prever com exatidão o período isquêmico. Este fato motivou a pesquisa do pós-condicionamento isquêmico.

Vários estudos foram realizados na tentativa de identificar quais são as vias implicadas na lesão de reperfusão e na cardioproteção, sendo que a via ERK1/2 já foi identificada na cardioproteção proporcionada tanto pelo pós-condicionamento isquêmico quanto pelo pós-condicionamento farmacológico.(H. Chen et al. 2008)

Além de prevenir a abertura de poros mitocondriais de transição e

permeabilidade (mPTP) durante o período de reperfusão, que é uma etapa fundamental na morte celular, o pós-condicionamento isquêmico também ativa cascatas de sinalização citoprotetoras como a cascata RISK e a cascata SAFE.(Q. Chen et al. 2012)

Bopassa et al. demonstraram em corações de coelho efeitos do pós-condicionamento isquêmico na prevenção da abertura de poros mitocondriais de transição e permeabilidade (mPTP). (Bopassa et al. 2006)

Em outro estudo este mesmo grupo também identificou a ativação da via PI3K-Akt por técnicas de pós-condicionamento isquêmico, sugerindo que a ativação desta via e a prevenção da abertura de poros mitocondriais de transição e permeabilidade (mPTP) podem estar relacionadas.(Bopassa et al. 2006)

Xin e colaboradores estudaram o per e pós-condicionamento isquêmico e obtiveram resultados que sugerem a participação de cascatas citoprotetoras como a RISK, PI3K-Akt e ERK1/2 em ambos os fenômenos.(Xin et al. 2010)

Tamarelle et al. também observaram ativação das cascatas RISK, PI3K-Akt e ERK1/2 pelo pós-condicionamento isquêmico e por outros fármacos, como a eritropoetina. (Tamarelle et al. 2009)

Zhang et al. estudaram a proteína MG53 e seu papel no pós-condicionamento isquêmico. A MG53 é uma proteína expressa em músculo esquelético e cardíaco que está envolvida em vesículas de transporte celular, miogênese e reparo de membrana esquelética e cardíaca. A MG53 participa da cardioproteção através da ativação das cinases PI3K, Akt, GSK3 $\beta$  e ERK1/2.(Zhang et al. 2011)

A presença de múltiplas vias cardioprotetoras já foi sugerida no pré-condicionamento isquêmico. (Z.-Q. Jin, Goetzl, and Karliner 2004)(Lecour et al. 2005) Lacerda et al. estudaram a ativação paralela das vias SAFE e RISK pelo pós-condicionamento isquêmico. A via RISK atua através da fosforilação da ERK1/2 e Akt, que por sua vez inibiriam a GSK3 $\beta$ , a qual atua nos poros mitocondriais de transição e permeabilidade efetivando assim a cardioproteção. (Lacerda et al. 2009)

A via SAFE atua através do TNF $\alpha$ , cuja ativação do sinal transdutor e ativador de transcrição STAT 3 atua nos poros mitocondriais de transição e permeabilidade e também nas cinases ERK1/2 e Akt, levando em última instância à cardioproteção.(Lacerda et al. 2009)

Esfingolípides como a esfingosina-1 fosfato também podem ativar as vias cardioprotetoras, parecendo mimetizar a forma de ativação do STAT 3 como ocorre no pré-condicionamento. (Lacerda et al. 2009)

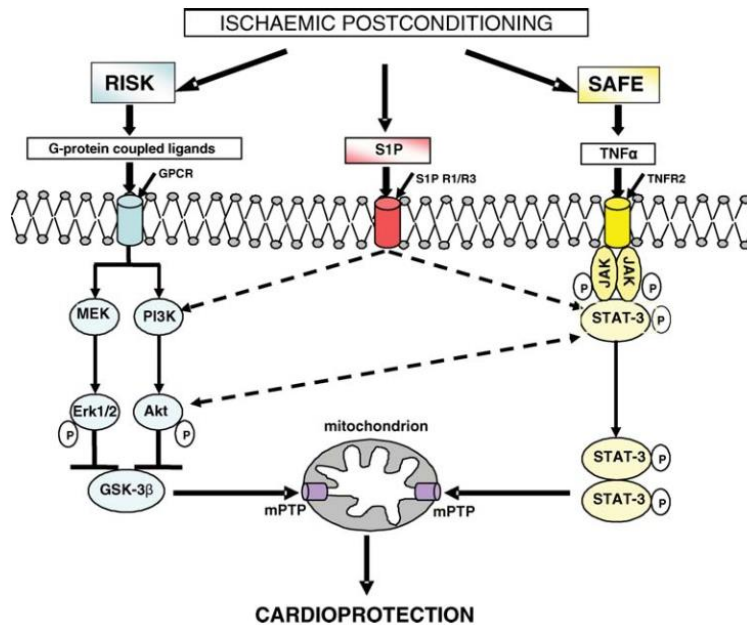


Figura 1: esquema simplificado das vias ativadas na cardioproteção. Fonte: Lacerda et al., 2009.

### 1.3. Pós-Condicionamento Farmacológico

O papel de alguns fármacos como anestésicos inalatórios, propofol e morfina no pré e pós-condicionamento cardíaco é amplamente estudado. (Y. Yao et al. 2010)(He et al. 2008)(Ling Ling et al. 2010).

O uso de anestésicos inalatórios no início da reperfusão para proteção miocárdica contra lesões resultantes da própria reperfusão foi proposto nos anos 90, é o chamado pós-condicionamento anestésico.(Yu et al. 2010)

Diversas pesquisas demonstraram que o pós-condicionamento anestésico reduz lesões miocárdicas resultantes de isquemia/reperfusão como a apoptose (Yu et al. 2010). Os anestésicos inalatórios, principalmente o sevoflurano, tem mostrado resultado positivo em diversos estudos comparando pré-condicionamento farmacológico e controle.(Deyhimy et al. 2007)(Dai et al. 2010)

Vários estudos utilizando sevoflurano no pós-condicionamento

farmacológico também tiveram resultado positivo quando comparado ao controle.(Yu et al. 2010)(Y. Yao et al. 2010)(He et al. 2008)(Ling Ling et al. 2010)(Fang et al. 2010)(H. Chen et al. 2008)

Fang et al. estudou o pós-condicionamento farmacológico utilizando 2% de sevoflurano durante os primeiros 15 minutos de reperfusão (60 minutos), após 40 minutos de isquemia e demonstrou, via western blot que ocorre a fosforilação da PKB/Akt juntamente com o aumento da GSK3 $\beta$  em corações expostos à técnica. (Fang et al. 2010)

Um estudo comparando a eficácia do pós-condicionamento farmacológico com sevoflurano em ratos machos e fêmeas mostrou que embora as fêmeas sejam mais resistentes às lesões por isquemia/reperfusão elas são pouco responsivas ao pós-condicionamento farmacológico. Machos são menos resistentes às lesões mas respondem melhor ao pós-condicionamento. (Zheng et al. 2011)

A via PI3K/Akt está envolvida tanto na maior resistência a lesão isquemia/reperfusão apresentada pelas fêmeas quanto na resposta ao pós-condicionamento evidenciada pelos machos. (Zheng et al. 2011)

Outro estudo comparando a eficácia do pós-condicionamento isquêmico e farmacológico em corações saudáveis e portadores de hipertrofia de VE obtiveram resultados apontando para a ineficácia de ambos os pós-condicionamentos em corações com hipertrofia de VE. Essa ineficácia parece ser devido a não fosforilação de Akt, ERK1/2 levando a não inativação da GSK3 $\beta$ . (Ma et al. 2013)

Alguns autores estudaram o impacto do pós-condicionamento farmacológico com sevoflurano e observaram a diminuição da incidência/gravidade das arritmias de reperfusão quando comparado ao grupo controle. (Gong et al. 2012)(Zheng et al. 2011)(Yu et al. 2010)(Y.-T. Yao et al. 2010)

Estudos comparando separadamente condicionamento remoto isquêmico, pré e pós-condicionamento cardíaco isquêmico ou farmacológico com controles tem mostrado resultados positivos levando a diminuição no tamanho da área de infarto e redução de enzimas ligadas a lesão celular como CK-MB, LDH e Troponina I. (Andreka et al. 2007a)(Tang et al. 2010)(Xin et al. 2010)(Gritsopoulos et al. 2009)



O próprio fenômeno do pós-condicionamento necessita de mais estudos e ainda não temos estudos sobre o comportamento do sistema renina-angiotensina em corações que sofreram o pós-condicionamento isquêmico ou farmacológico.

#### 1.4. Sistema Renina-Angiotensina

A primeira observação ligando doença renal a hipertrofia de ventrículo esquerdo foi realizada por Richard Bright em 1836. (Basso and Terragno 2001)

O termo hipertensão foi usado pela primeira vez em 1872 por F. A. Mahomed, que relacionou a hipertensão a hipertrofia de ventrículo esquerdo e a nefrite e descreveu ainda a hipertensão em pacientes sem doença renal. (Basso and Terragno 2001)

A história do sistema renina-angiotensina começou em 1898 com estudos realizados por Tigerstedt e Bergman, que relataram o efeito pressor de extratos renais. Eles chamaram esta substância renal de renina.(Basso and Terragno 2001)

A partir daí diversos estudos foram feitos simultaneamente por pesquisadores argentinos e americanos. Os resultados do grupo argentino foram publicados em 1943 e as pesquisas continuam até hoje. (Basso and Terragno 2001)

O sistema renina-angiotensina desempenha um papel importante na regulação central e periférica da pressão arterial e no equilíbrio hidro-eletrolítico, além de estar envolvido na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Peach 1977)(R. A. Santos, Campagnole-Santos, and Andrade 2000).

É um modulador autócrino e parácrino de funções teciduais, identificado em vários tecidos, como coração e artérias. (Phillips, Speakman, and Kimura 1993)(Wollert and Drexler 1999) Seus principais componentes são o angiotensinogênio, a renina, a Angiotensina I, a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a Angiotensina II.

A formação dos peptídeos angiotensinérgicos ocorre por meio de

proteólise limitada iniciada pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina, formando o decapeptídeo Angiotensina I (Campbell 2003)(Carey and Siragy 2003). A Angiotensina I é um peptídeo biologicamente inativo que, sob ação da ECA, é convertida no octapeptídeo Angiotensina II. (Wright and Harding 1995)(Turner and Hooper 2002)(Bader et al. 2001)

As ações da Angiotensina II são mediadas por receptores específicos de membrana, amplamente distribuídos. Existem dois principais subtipos de receptores para a Angiotensina II: o receptor AT<sub>1</sub>, bloqueado especificamente pelo Losartan, e o receptor AT<sub>2</sub>, bloqueado pelo PD123319.(Donoghue et al. 2000) Ambos apresentam sete domínios transmembrana e são acoplados à proteína G (GPCRs) (Loot et al. 2002) (Kim and Iwao 2000).

A expressão dos receptores AT<sub>2</sub> é mais limitada. Sabe-se que estão presentes principalmente em tecidos fetais em desenvolvimento. (Kim and Iwao 2000)

Nos últimos anos novos componentes do sistema foram descritos, e existem vários estudos sobre a Angiotensina-(1-7), a ECA 2 e a Alamandina, que parecem formar um eixo cardioprotetor. (R. A. Santos, Campagnole-Santos, and Andrade 2000)(Lautner et al. 2013)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

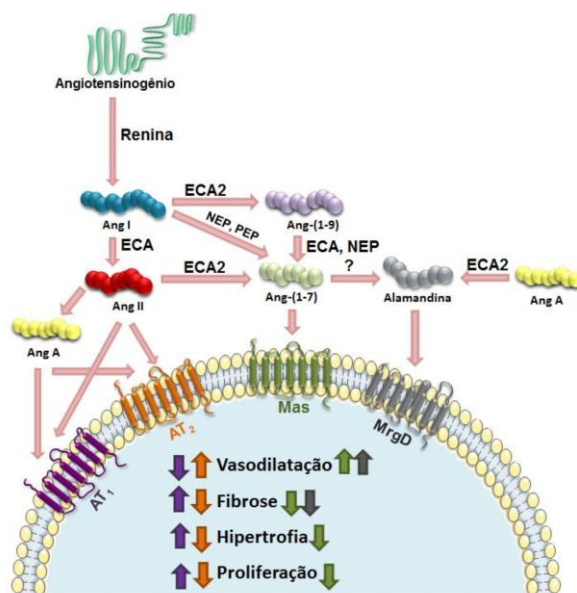


Figura 2: Sistema renina-angiotensina. Ang: Angiotensina; AT1: receptor da Ang II tipo 1; AT2: receptor da Ang II tipo 2; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; Mas: receptor da Ang-(1-7); MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas tipo- D; NEP: Endopeptidase neutra; PEP: Prolil-endopeptidase. Fonte: A.A. Peluso,2014. 24

### 1.5. Angiotensina-(1-7)

A Angiotensina II era considerada o único peptídeo biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina. Foram identificadas importantes ações periféricas e centrais induzidas por peptídeos menores, antes considerados fragmentos inativos.

A Angiotensina-(1-7), um heptapeptídeo com ausência da fenilalanina na posição 8 do peptídeo Angiotensina II, é um componente ativo do sistema renina-angiotensina, podendo ser gerada a partir da Angiotensina I por via independente da ECA. Outra via de formação ocorre a partir da Angiotensina II pela ação da prolil-endopeptidase neutra (PEP) e prolil-carboxipeptidase (PCP), ou através da ação da enzima conversora da angiotensina II (ECA2) (Braszko et al. 1991)(R. A. Santos and Campagnole-Santos 1994)(Chappell et al. 1998)(R. A. Santos, Campagnole-Santos, and Andrade 2000, 200)(R. a. S. Santos, Frézard, and Ferreira 2005). A Angiotensina-(1-7) atua de forma contra-reguladora às ações da Angiotensina II. (R. A. Santos, Campagnole-Santos, and Andrade 2000, 200)

Além da Angiotensina-(1-7), novos componentes do sistema renina-angiotensina foram identificados incluindo o receptor Mas para a Angiotensina-(1-7), o receptor da pró-renina, a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) e o heptapeptídeo Alamandina, juntamente com seu receptor (R. A. S. Santos et al. 2003)(Nguyen 2007)(Donoghue et al. 2000)(Tipnis et al. 2000)(Lautner et al. 2013).

A ECA 2 está presente principalmente em células endoteliais e artérias, arteríolas e veias do coração e dos rins e não pode ser bloqueada pelos clássicos fármacos inibidores da ECA. Ela catalisa a conversão da Angiotensina I em Angiotensina-(1-9) e degrada a Angiotensina II em Angiotensina-(1-7) prevenindo, desta forma, o acúmulo de Angiotensina II enquanto favorece a formação de Angiotensina-(1-7). (Donoghue et al. 2000)(Kucharewicz et al. 2002a)(Ye et al. 2004)

Em 2003, Santos e colaboradores identificaram o receptor Mas como um receptor funcional para a Angiotensina-(1-7) (R. A. S. Santos et al. 2003, 2). O protooncogene Mas é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembrana, altamente expresso nos testículos e

cérebro (Metzger et al. 1995)(Walther et al. 2000). Estudos têm demonstrado que a Angiotensina-(1-7) exerce efeitos fisiológicos que, em sua maioria, são opostos aos efeitos da Angiotensina II.

Em um estudo conduzido por Ferreira e colaboradores em 2001, a Angiotensina-(1-7) na concentração de 0,22 nmol/L produziu efeito antiarritmogênico em corações isolados perfundidos de ratos, reduzindo a duração e incidência das arritmias de reperfusão. . O efeito antiarritmogênico da Angiotensina-(1-7) parece estar relacionado a liberação de prostaglandinas, as quais atuam estimulando receptores EP3 que por sua vez ativariam correntes de repolarização de membrana e inibiriam os danos causados pela liberação de catecolaminas que ocorre na isquemia. Este efeito cardioprotetor foi bloqueado pelo antagonista e pelo pré-tratamento com indometacina. (Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

Um estudo prévio utilizando Angiotensina-(1-7) na dose de 27 nmol/L encontrou um efeito arritmogênico da mesma através da liberação de norepinefrina em nervos de átrio direito de corações isolados.(Gironacci et al. 1994)

A análise desses dois estudos sugere o papel antiarritmogênico da Angiotensina-(1-7) em concentrações próximo às fisiológicas.

De acordo com Loot e colaboradores (2002), a infusão intravenosa de Angiotensina-(1-7) preservou a função cardíaca, a perfusão coronariana, e a função endotelial aórtica, após a indução do infarto do miocárdio em ratos vivos. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nestas respostas provavelmente está associado à liberação de prostaciclina e/ou de NO. (Loot et al. 2002)

A Angiotensina-(1-7) potencializa a vasodilatação induzida pela bradicinina (BK), o que pode ser parcialmente responsável pelo efeito cardioprotetor deste peptídeo. (Kucharewicz et al. 2002a)(Almeida et al. 2000a) O fenômeno parece ser mediado por um receptor e está associado a liberação de prostaglandina e óxido nítrico. Na dose utilizada nesse estudo (2,5 e 5,0 ng) a Angiotensina-(1-7) não influenciou o inotropismo cardíaco. (Almeida et al. 2000b)

A Angiotensina-(1-7) tem sido considerada um componente

importante na modulação do remodelamento cardíaco.

Averill e colaboradores observaram que o infarto agudo do miocárdio induzido pela oclusão da artéria coronária esquerda aumentou significativamente a imunorreatividade para Angiotensina-(1-7) ao redor da área infartada, sugerindo uma participação deste peptídeo na recuperação das injúrias teciduais.(Averill et al. 2003)

Um grupo observou em animais transgênicos (produção crônica e aumentada de Angiotensina-(1-7) efeitos cardioprotetores relacionados a Angiotensina-(1-7) como diminuição de arritmias de reperfusão e diminuição da fibrose em corações com insuficiência cardíaca induzida pelo isoproterenol. Não se sabe se os efeitos são devidos diretamente a Angiotensina-(1-7) ou a diminuição de Angiotensina II.(R. A. S. Santos et al. 2004)

Ainda não foi estudado o papel da Angiotensina-(1-7) em técnicas de condicionamento cardíaco.

### 1.6. Alamandina

Trata-se do heptapeptídeo Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro presente em humanos, ratos e camundongos e descrito por Lautner e colaboradores em 2013 (Lautner et al. 2013).

A sequência da Alamandina é muito semelhante à da Angiotensina-(1-7), diferindo somente pela presença do resíduo alanina no local do resíduo aspartato na terminação amino. (Lautner et al. 2013)

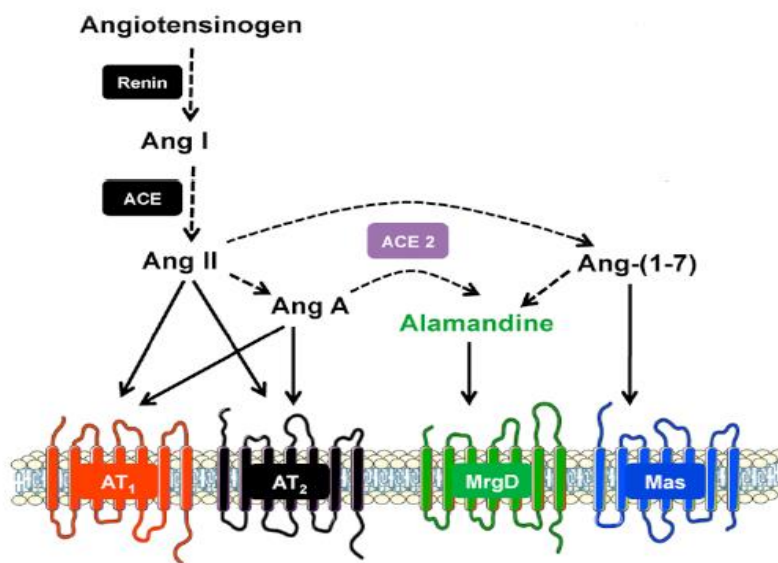
Este mesmo estudo identificou a Alamandina como um produto da hidrólise catalítica da Angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina II em humanos. Em ratos a Alamandina pode ser formada após a perfusão cardíaca com Angiotensina-(1-7) através da descarboxilação do resíduo aspartato aminoácido N-terminal.(Lautner et al. 2013)

A Alamandina produz vasodilatação endotélio dependente em anéis de aorta de camundongos FVB/N e ratos Wistar. Essa vasodilatação é

atenuada pelo inibidor de óxido nítrico sintase (L-NAME). Em contrapartida, o tratamento com o antagonista do receptor Mas (A-779) não bloqueia a vasodilatação induzida pela Alamandina, sugerindo que o seu receptor não é o Mas, embora suas ações sejam semelhantes às da Angiotensina-(1-7).

Habiyakare B. et al. estudaram o papel da Alamandina e do seu precursor Angiotensina A em anéis de aorta de coelhos saudáveis e com aterosclerose e concluíram que a vasoatividade tanto da Angiotensina A quanto da Alamandina estão diminuídas em animais com aterosclerose. (Habiyakare et al. 2014)

A Angiotensina-(1-7) é um agonista do receptor Mas e um fraco agonista do receptor relacionado ao Mas, MrgD. Os resultados do estudo de Lautner et al. sugerem que a Alamandina é o ligante do receptor MrgD. (Lautner et al. 2013)



**Simplified updated view of the renin–angiotensin system cascade.**

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; ACE 2, angiotensin-converting enzyme type 2; Ang, angiotensin; AT1, Ang II type 1 receptor; AT2, Ang II type 2 receptor; Mas, Ang(1–7) receptor; MrgD, MAS-related G-protein coupled receptor D;

Figura 3: esquema simplificado do sistema renina angiotensina. Fonte: Lautner et al., 2013

## **2. Justificativa**

Tanto a Angiotensina-(1-7) quanto as técnicas de pós-condicionamento cardíaco isquêmico e farmacológico demonstraram efeito cardioprotetor quando estudadas separadamente. (Y. Yao et al. 2010)(Zhang et al. 2011)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

No presente estudo hipotetizamos que uma das vias de cardioproteção ativadas por técnicas de condicionamento cardíaco é o sistema renina-angiotensina.

Para estudar tal hipótese, comparamos, em corações isolados de ratos Sprague-Dawley, os efeitos do fenômeno isquemia/reperfusão sem pós-condicionamento e com pós-condicionamento isquêmico e farmacológico.

### **3. Objetivos**

#### 3.1. Objetivo Geral:

O objetivo deste estudo é esclarecer se o sistema renina angiotensina, principalmente através da Angiotensina-(1-7), da Angiotensina II e da Alamandina, participa da cardioproteção determinada por métodos de pós-condicionamento cardíaco (isquêmico e farmacológico) no fenômeno de isquemia/reperfusão em corações isolados de ratos Sprague-Dawley machos.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1. Avaliar se há eficácia do pós-condicionamento isquêmico e farmacológico quando comparados entre si e ao grupo controle através da análise de parâmetros fisiológicos, eletrocardiográficos e bioquímicos.

3.2.2. Avaliar a presença de arritmias durante o fenômeno de isquemia/reperfusão em todos os grupos;

3.2.3. Avaliar a repercussão do fenômeno isquemia/reperfusão através da dosagem de marcadores de isquemia cardíaca: CK-MB, LDH e Troponina I em todos os grupos;

3.2.4. Avaliar a participação do sistema renina-angiotensina no fenômeno de isquemia/reperfusão através da dosagem de Angiotensina-(1-7), Angiotensina II e Alamandina via espectrometria de massa em todos os grupos;



## **4. Materiais e Métodos**

### 4.1. Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFMG

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo CETEA-UFMG sob o protocolo 317/2013.

### 4.2. Animais

Os animais utilizados neste estudo são oriundos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG onde permaneceram alojados em gaiolas em sala climatizada com ciclo claro/escuro padronizado (14 horas de luz) e com livre acesso a água e ração até o momento do experimento. Foram utilizados 18 ratos Sprague-Dawley machos com idade entre 12 e 14 semanas e peso entre 350 e 450g.

### 4.3. Langendorff

O aparato de Langendorff foi inicialmente descrito pelo fisiologista alemão Oscar Langendorff em 1895. Foi modificado ao longo dos anos e é utilizado para o estudo de órgãos isolados permitindo a observação de diversos parâmetros eletrofisiológicos e seu comportamento diante de drogas sem a influência de fatores humorais. (Bell, Mocanu, and Yellon 2011)

O aparato utilizado em nosso laboratório consiste de um reservatório externo que deve ser preenchido com água deionizada e um termostato que mantém a temperatura do mesmo no valor previamente estabelecido (37,5° C neste estudo). Apresenta dois reservatórios internos e um conjunto de cânulas que perfundem o órgão escolhido de forma uni ou bidirecional com solução nutritora. Existe ainda uma saída de gases em cada reservatório interno que possibilita a oxigenação contínua do aparato com o gás escolhido.

Acoplado ao aparato existe uma bomba peristáltica que mantém a solução nutritora circulando a um fluxo pré-estabelecido, dois transdutores de pressão que foram utilizados para aferir a pressão de perfusão do ventrículo esquerdo e a pressão intraventricular e três cabos para aferição contínua do ECG.

Todo o sistema é ligado a um desktop através do equipamento PowerLab, AdInstruments® (Bridge Amp e Bio Amp) que capta e amplifica os sinais produzidos no Langendorff os quais foram analisados pelo software Labchart 7 Pro, AdInstruments®, que registra os parâmetros cardiovasculares previamente selecionados em tempo real.

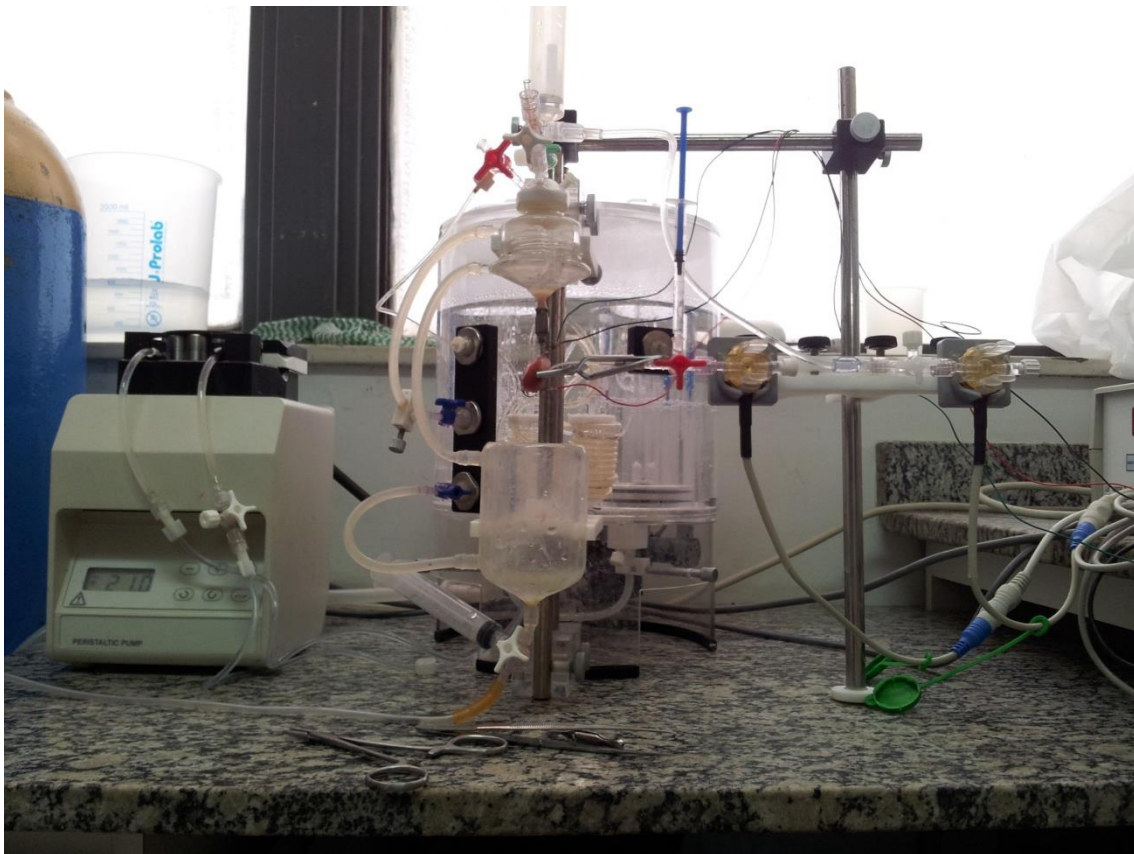


Figura 4: Aparato de Langendorff e bomba peristáltica

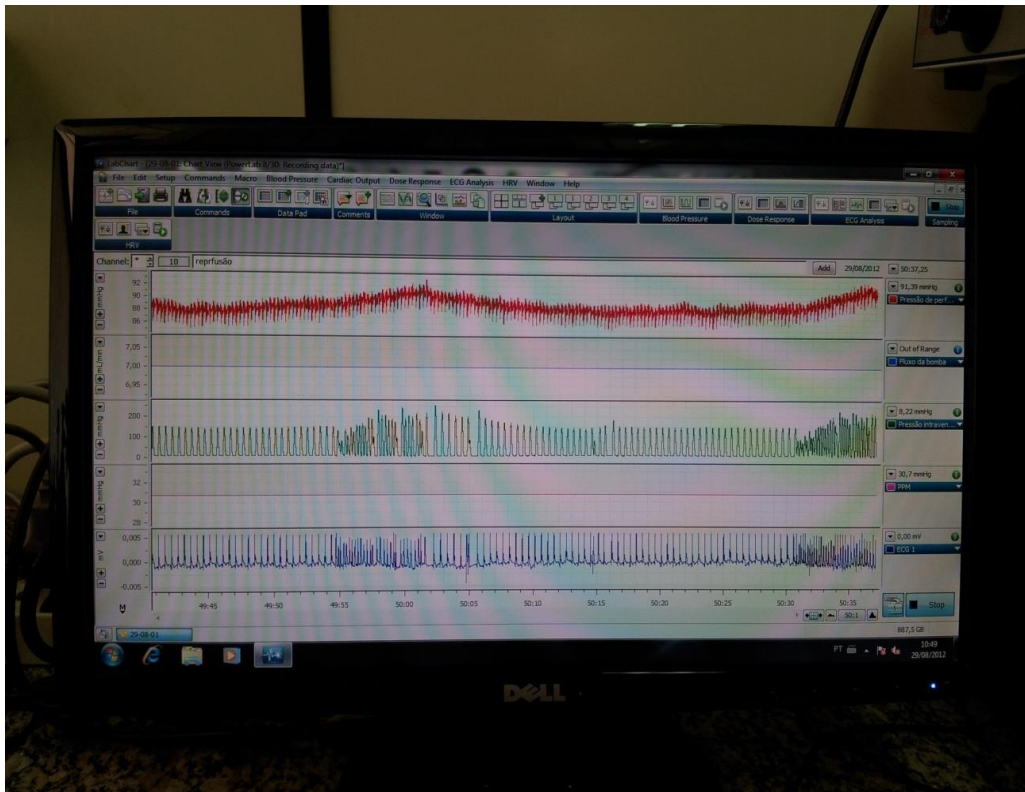


Figura 5: registro dos parâmetros eletrofisiológicos

#### 4.4. Solução Nutridora

A solução de Krebs-Henseleit, cuja composição é descrita a seguir é amplamente utilizada no estudo de corações isolados e serve para manter a viabilidade do órgão, juntamente com a oxigenação do mesmo através de uma mistura de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. (Rahman et al. 2011)(Bopassa et al. 2006)(Fang et al. 2010)

Solução de Krebs-Henseleit

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO em mM
NaCl	118
KCl	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,0
Dextrose anidra (glicose)	11,1
NaHCO <sub>3</sub>	25

#### 4.5. Extração do Coração

Os animais receberam 500UI de heparina intraperitoneal e dez minutos depois foram decapitados. O tórax foi aberto com uma incisão mediana e o coração foi retirado juntamente com pequena porção da aorta e acondicionado em uma placa de Petri com solução de Krebs-Henseleit fria.

O coração foi conectado ao aparato previamente aquecido, oxigenado e contendo a solução nutritora através de uma cânula de aproximadamente 1,3 cm na qual a aorta foi encaixada e fixada com um fio Nylon®3.0, realizando assim a perfusão retrógrada do órgão.

Após devidamente posicionado na cânula, um pequeno corte no átrio esquerdo era realizado. Através deste corte era inserido primeiramente um dreno que ultrapassava a válvula átrio ventricular e era exteriorizado no ápice cardíaco cuja finalidade era evitar o acúmulo da solução nutritora dentro do órgão.

Através deste mesmo orifício um balão previamente confeccionado com cânula P50 e filme de PVC era inserido desinsuflado e acondicionado dentro do ventrículo esquerdo. O balão estava conectado a um transdutor e foi calibrado desinsuflado.

Por último, foram colocados os três cabos do ECG, sendo o cabo verde fixado na cânula (terra), o cabo vermelho fixado no ápice do ventrículo esquerdo e o cabo preto fixado no átrio direito.

#### 4.6. Modelo do Infarto

Após trinta minutos de estabilização no Langendorff, o infarto foi realizado através da técnica descrita por Lubbe et al., (1978).(Lubbe, Daries, and Opie 1978)

Foi dado um ponto em topografia de artéria coronária esquerda com fio Nylon® 4.0, o qual foi fixado com o auxílio de um pedaço de madeira e uma pinça tipo Bulldog que foram mantidos no local durante trinta minutos.

#### 4.7. Pós-Condicionamento Isquêmico

O pós-condicionamento isquêmico foi realizado através de três ciclos de dez segundos de duração e dez segundos de intervalo entre eles.

Cada ciclo consistiu na soltura da pinça Bulldog por dez segundos e novo pinçamento após dez segundos. (Pinheiro et al. 2010)

Os ciclos foram realizados durante o primeiro minuto de reperfusão.

Após a realização do pós-condicionamento isquêmico a reperfusão continuou até completar sessenta minutos.

#### 4.8. Pós-Condicionamento Farmacológico

O pós-condicionamento farmacológico foi realizado com o anestésico inalatório sevoflurano.

O anestésico devidamente acondicionado em vaporizador calibrado próprio modelo “vai e vem” foi acoplado ao sistema de fluxo de gases. O circuito foi saturado com sevoflurano a 1 CAM - Concentração Alveolar Mínima (2,5%) durante os dez primeiros minutos da reperfusão (Yu et al. 2010). Após este tempo o vaporizador foi fechado e a reperfusão continuou até completar sessenta minutos.

#### 4.9. Avaliação da Área Infartada

Ao final do experimento os corações foram cuidadosamente retirados do aparato e preparados de acordo com a técnica descrita por Feng, J., et al (2005). (Feng et al. 2005)

Os corações foram extraídos e congelados por 2h e partidos em fatias de 2 mm ao longo de seu maior eixo. As fatias foram incubadas a 37°C durante 30 minutos com 2,3,5 triphenyltetrazolium clorídrico em solução de fosfato 0,1 M (pH 7,4) e então fixados em formaldeído 10% durante 24h.

Após este período as peças foram fotografadas e a área infartada apresentou-se como uma área esbranquiçada em contraste com a área saudável em vermelho.

As fotos estão no apêndice dessa dissertação.

#### 4.10. Parâmetros Eletrofisiológicos

Através do software LabChart 7 Pro, AdInstruments® os seguintes parâmetros eletrofisiológicos foram aferidos em tempo real:

Pressão máxima	Pressão mínima
Pressão média	Pressão desenvolvida
Pressão sistólica	Pressão diastólica
Máxima dP/dT	Mínima dP/dT
Frequência cardíaca	QRS (largura complexo QRS)
Intervalo RR	Intervalo QTc
ST (supra ou infradesnivelamento ST)	Fluxo Coronariano

#### 4.11. Avaliação de Arritmias

Para avaliar quantitativamente as arritmias, existe na literatura o “Índice de Severidade de Arritmias”, descrito previamente e utilizado em vários estudos.(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)(R. A. S. Santos et al. 2004)(Bernauer and Ernenputsch 1988)

Este índice gradua as arritmias arbitrariamente de acordo com sua duração sendo consideradas irreversíveis as arritmias com duração de 30 minutos. Neste estudo nós optamos por modificar este índice a fim de torná-lo mais sensível.

Para tal nós incluímos dois novos índices: 0,5 para arritmias até 30 segundos e 1 para arritmias com duração entre 30 segundos (meio minuto) e 1 minuto.

Índice de Severidade de Arritmias. (modificado)

**Duração (min)      Índice (unidades arbitrárias)**

< 0,5	0,5
0,5 a 1	1
1 a 3	2
3 a 6	4
6 a 10	6
10 a 15	8
15 a 20	10
20 a 25	11
25 a 30	12

#### 4.12. Coleta do Perfusato

O perfusato que gotejava do coração foi coletado nos tempos abaixo discriminados para posterior dosagens de CK-MB, LDH, Troponina I, Angiotensina-(1-7) e Alamandina.

As enzimas CK-MB e LDH foram dosadas via fluorescência. Troponina I foi dosada via o método ELISA. Todas as dosagens foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante de cada kit.

Os peptídeos do sistema renina angiotensina foram dosados através de espectrometria de massa.

O perfusato destinado à dosagem de CK-MB, LDH e Troponina I foi armazenado puro em eppendorfs de 2 mL.

O perfusato destinado à dosagem de Angiotensina-(1-7) e Alamandina foi colhido em tubos de polietileno tipo Falcon contendo o coquetel de Inibidores de Protease para adequada preservação dos peptídeos.

Todo o perfusato foi acondicionado no gelo durante a coleta e imediatamente após o experimento foi armazenado a -80° C.

As dosagens foram realizadas nos seguintes tempos:

Estabilização		Isquemia			Reperusão	
1º. minuto	5º. minuto	1º. minuto	15º. minuto	30º. minuto	5º. minuto	30º. minuto

#### 4.13. Inibidores de Protease

Foi realizada coleta de aproximadamente 5 mL de perfusato em tubo de polietileno tipo Falcon mantido em gelo contendo 140µL de coquetel de inibidores de proteases.

##### Coquetel de Inibidores de Proteases

Para-hidroximercúrio-benzoato (pOHHgHz), 1 mM 10 µL

Orto-fenantrolina, 30 mM 50 µL

Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF), 1 mM 10 µL

Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA), 7,5 % 50 µL

Pepstatin A, 1 mM 20 µL

As soluções de pOHHgBz e PMSF foram preparadas no dia da coleta. As demais soluções foram preparadas nos dias anteriores, sendo a pepstatin A e orto-fenantrolina conservados em freezer -20° C e EDTA 7,5% mantido em geladeira. O coquetel de inibidores de proteases foi preparado imediatamente antes da coleta do perfusato.

#### 4.14. Extração de Proteínas por Coluna de Bond Elut

O perfusato armazenado no coquetel de inibidores de protease passou inicialmente pelo processo de extração de proteínas por Coluna de Bond Elut.

Para a extração dos peptídeos do sistema renina angiotensina do perfusato, as colunas Bond Elut foram pré-ativadas com 10 mL de ACN 99,9%/HFBA 0,1% e 10 mL de HFBA 0,1%. Após pré-ativação, as colunas foram ativadas usando-se: 10 mL de ACN99,9%/HFBA 0,1%, 10 mL de HFBA 0,1%, 3 mL de BSA 0,1%/HFBA 0,1%, 10 mL de ACN 10%/HFBA 0,1%, 3 mL de HFBA 0,1%. Após ativação da coluna as amostras foram aplicadas, seguindo-se de lavagem seqüencial com 20 mL de HFBA 0,1% e 3 mL de ACN 20%/HFBA 0,1%.



Os peptídeos foram eluídos com 3 mL de ACN 99,9%/HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1% e armazenados a -20° C até a dosagem dos mesmos por espectrometria de massa.

#### 4.15. Espectrometria de Massa

A quantificação dos peptídeos alamandina, angiotensina-(1-7) e angiotensina 2 foram realizada por espectrometria de LC-MS/MS em um Espectrômetro de Massa Waters Xevo TQ-S ESI+ triplo quadrupolo acoplado a um sistema Waters UPLC Acquity I-Class System. Todos os reagentes e aditivos foram de grau MS. As amostras solubilizadas na fase móvel (Acetonitrila 3,0%) foram purificadas com o auxílio de um sistema UPLC (Waters®) em uma coluna de fase reversa C18 (BEH C<sub>18</sub> 2,1 x 5,0 mm, Waters) utilizando acetonitrila e ácido fórmico 0,1% na fase móvel em um fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente da fase móvel consistiu de uma concentração crescente de 10% até 60 % de acetonitrila em 10 minutos. O espectrômetro de massa é equipado com uma fonte de ionização Z-spray e é controlado pelo software MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). A ionização por ESI no modo positivo foi feita utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar: 3,5 KV; voltagem do cone: 15 V; temperatura de dessolvatação: 300 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 1000L/h; temperatura da fonte: 120 °C.

#### 4.16. Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em três grupos, cada um deles com seis elementos. Em todos os grupos a pressão de perfusão ventricular foi fixada em 70 mmHg e o balão intraventricular foi insuflado para ter uma pressão mínima de 5 mmHg no início do experimento.

Cada experimento durou 120 minutos assim distribuídos:

30 minutos: estabilização (minuto 1 a minuto 30)

30 minutos: isquemia (minuto 31 a minuto 60)

60 minutos: reperfusão (minuto 61 a minuto 120)

Grupo 1: Controle

Grupo 2: Pós-Condicionamento Isquêmico (PCI)

Grupo 3: Pós-Condicionamento Farmacológico (PCF)

Grupo 01 (Controle): os animais foram heparinizados, decapitados e os corações colocados no aparato de Langendorff e preparados conforme descrito no item 4.5.

Após o preparo permaneceram 30 minutos estabilizando seus parâmetros. Após os 30 minutos iniciais foi realizado o infarto conforme descrito no item 4.6. A coronária foi pinçada por 30 minutos e então a pinça foi removida e o coração foi reperfundido durante 60 minutos.

Foi colhido perfusato nos tempos especificados no item 4.12 para posterior realização das dosagens descritas no mesmo item.

Ao final do período de reperfusão o coração foi preparado para aferição da área infartada conforme descrito no item 4.9.

Grupo 02 (Pós-Condicionamento Isquêmico): os animais foram heparinizados, decapitados e os corações colocados no aparato de Langendorff e preparados conforme descrito no item 4.5.

Após o preparo permaneceram 30 minutos estabilizando seus parâmetros. Após os 30 minutos iniciais foi realizado o infarto conforme descrito no item 4.6. Ao fim de 30 minutos de isquemia a pinça foi removida de acordo com a técnica de pós-condicionamento isquêmico descrita no item 4.7. Após a realização do pós-condicionamento isquêmico a reperfusão seguiu sem interferências até completar 60 minutos.

Foi colhido perfusato nos tempos especificados no item 4.12 para posterior realização das dosagens descritas no mesmo item.

Ao final do período de reperfusão o coração foi preparado para aferição da área infartada conforme descrito no item 4.9.

Grupo 03 (Pós-Condicionamento Farmacológico): os animais foram heparinizados, decapitados e os corações colocados no aparato de Langendorff e preparados conforme descrito no item 4.5.

Após o preparo permaneceram 30 minutos estabilizando seus parâmetros.

Após os 30 minutos iniciais foi realizado o infarto conforme descrito no item 4.6. A coronária permaneceu com a pinça por 30 minutos. Imediatamente com a remoção da pinça foi introduzido o sevoflurano no circuito de gases na dose de 1 CAM durante dez minutos, conforme descrito no item 4.8. Após a realização do pós-condicionamento farmacológico a reperfusão seguiu sem interferências até completar 60 minutos.

Foi colhido perfusato nos tempos especificados no item 4.12 para posterior realização das dosagens descritas no mesmo item.

Ao final do período de reperfusão o coração foi preparado para aferição da área infartada conforme descrito no item 4.9.

#### 4.17. Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste estudo os corações que:

4.17.1 - Levaram mais de 3 minutos para serem preparados: decaptação até canulação da aorta e retirada dos fragmentos;

4.17.2 - Necessitaram de fluxo acima de 20 mL/min para manter pressão de perfusão ventricular em 70 mmHg;

4.17.3 - Não mantiveram pressão de perfusão intraventricular mínima de 5 mmHg mesmo após ajuste do balão intraventricular.

4.17.4 - Apresentaram arritmia irreversível, segundo descrito no item 4.11 em algum momento do estudo.

## 5. Análise Estatística

Nossos resultados foram inicialmente analisados quanto a distribuição gaussiana ou não através do teste d'Agostino and Pearson. Parâmetros cujo resultado não respeitava a distribuição gaussiana foram analisados através do teste T seguido por Mann-Whitney ou one ANOVA seguido de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's e Dunnet's. Parâmetros que obedeciam a distribuição gaussiana foram analisados através de testes ANOVA two-way seguido de Bonferroni, Tukey's ou Sidak's. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Prisma® 6.0. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 6. Resultados

Analizamos cada parâmetro de acordo com as seguintes combinações:

- Grupos: Controle x Isquêmico x Farmacológico
- Grupos: Controle x Isquêmico
- Grupos: Controle x Farmacológico
- Grupos: Isquêmico x Farmacológico

Os peptídeos do sistema renina angiotensina foram analisados em grupo e em cada animal separadamente.

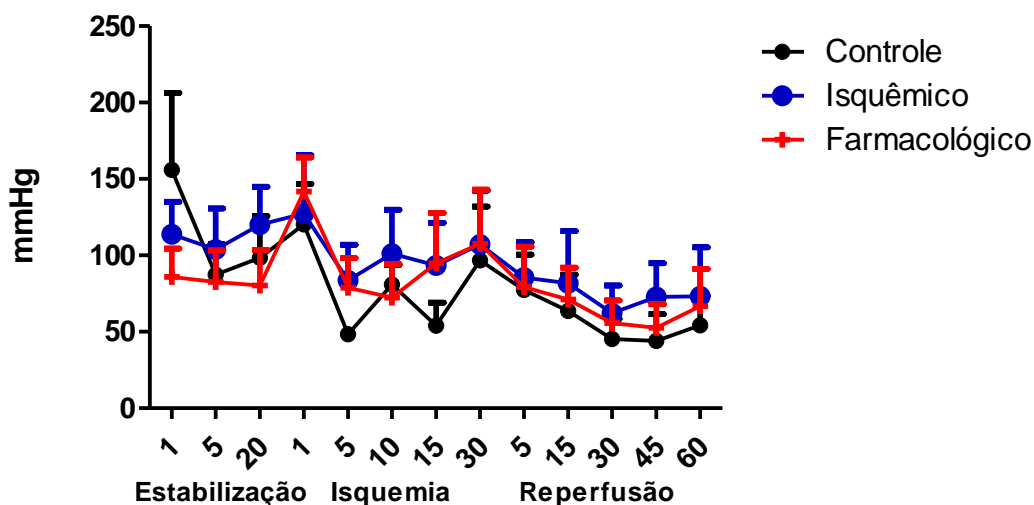
Os dados obtidos com a análise dos grupos dois a dois estão apresentados no Apêndice desta dissertação, assim como os gráficos da pressão máxima, média e mínima.

A área infartada foi aferida conforme descrito no item 4.9 e as fotos estão apresentadas no Apêndice.

### 6.1. Pressão Sistólica Final

A pressão sistólica manteve-se oscilante no período de isquemia. No período de reperfusão ocorreu queda da mesma. No grupo controle e pós-condicionamento farmacológico ocorreu aumento da pressão sistólica só no final da reperfusão (60 minutos). No grupo pós-condicionamento isquêmico ocorreu aumento da pressão a partir dos 45 minutos de reperfusão. Nenhum grupo atingiu os valores basais. Não houve diferença estatística entre os grupos.

### Pressão Sistólica Final

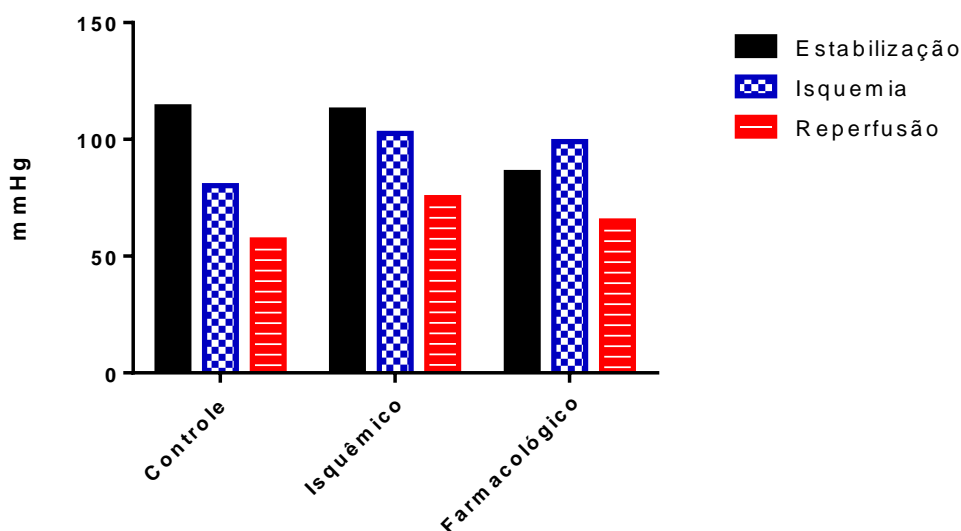


**Gráfico 6.1.1:** pressão sistólica alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste: Bonferroni

A análise dos valores médios da pressão sistólica final evidencia menor queda da mesma durante a reperusão no grupo pós-condicionamento isquêmico. O grupo controle apresentou a maior queda no valor da pressão sistólica final.

Não houve diferença significativa entre os grupos. Em nenhum grupo a pressão sistólica final voltou aos valores do período de estabilização.

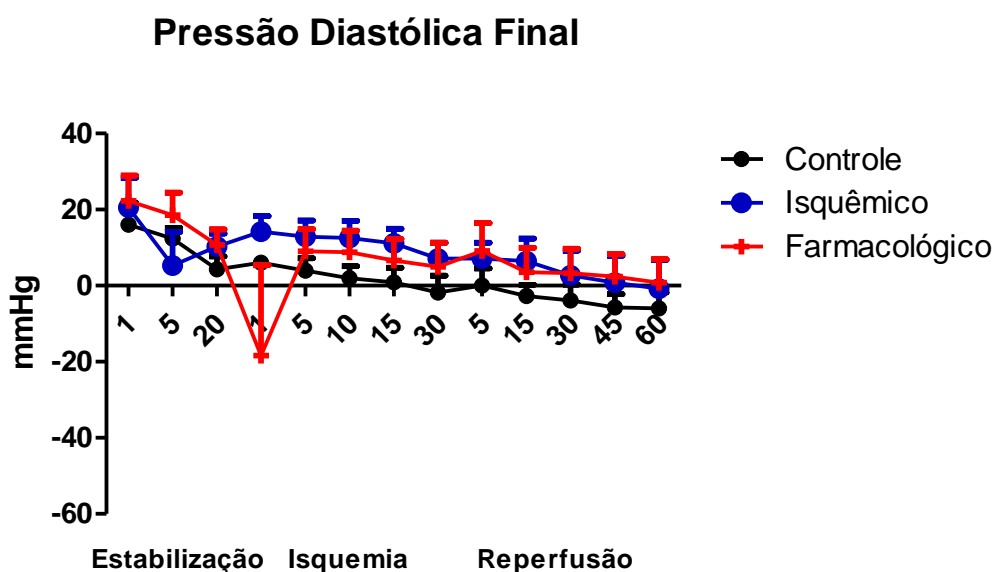
### Pressão Sistólica Final



**Gráfico 6.1.2:** valor médio da pressão sistólica final alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

## 6.2. Pressão Diastólica Final

Houve queda progressiva da pressão diastólica a partir do período de isquemia em todos os grupos, sendo mais pronunciada no grupo controle. O valor observado no primeiro minuto de isquemia do grupo pós-condicionamento farmacológico pode ser um artefato. Não houve diferença estatística entre os grupos.

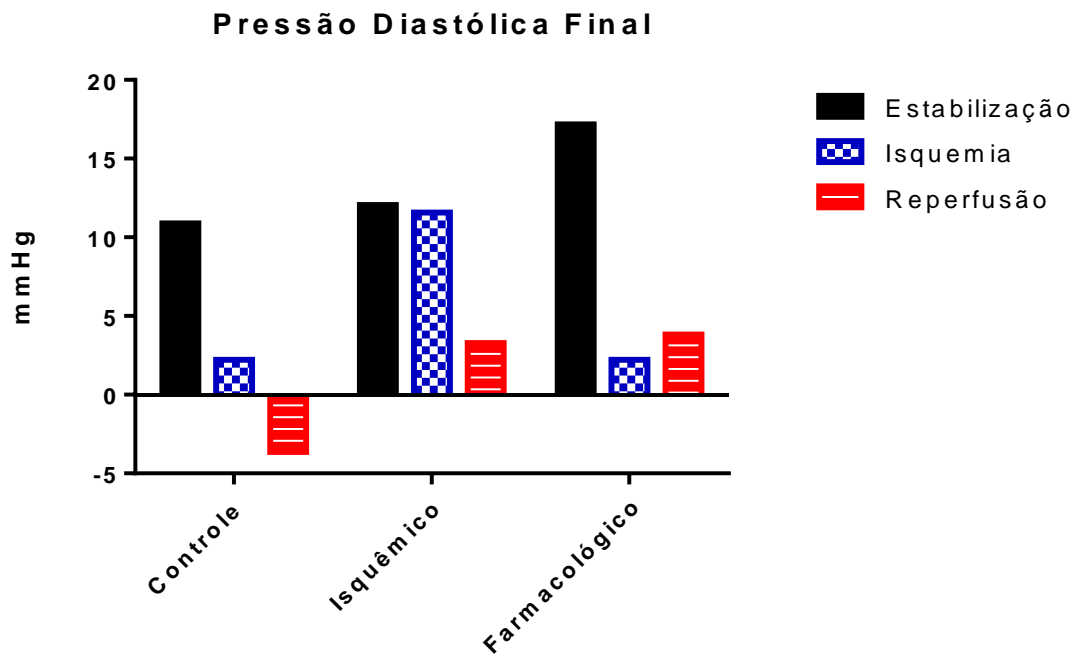


**Gráfico 6.2.1:** pressão diastólica alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni

O valor médio da pressão diastólica final durante a reperfusão diminuiu em todos os grupos quando comparada ao período de estabilização. Nos grupos pós-condicionamento farmacológico e pós-condicionamento isquêmico esta diminuição foi menor.

No grupo controle a pressão diastólica final assumiu valores negativos.

Não houve diferença significativa entre os grupos. Em nenhum grupo a pressão diastólica final atingiu os valores da estabilização.

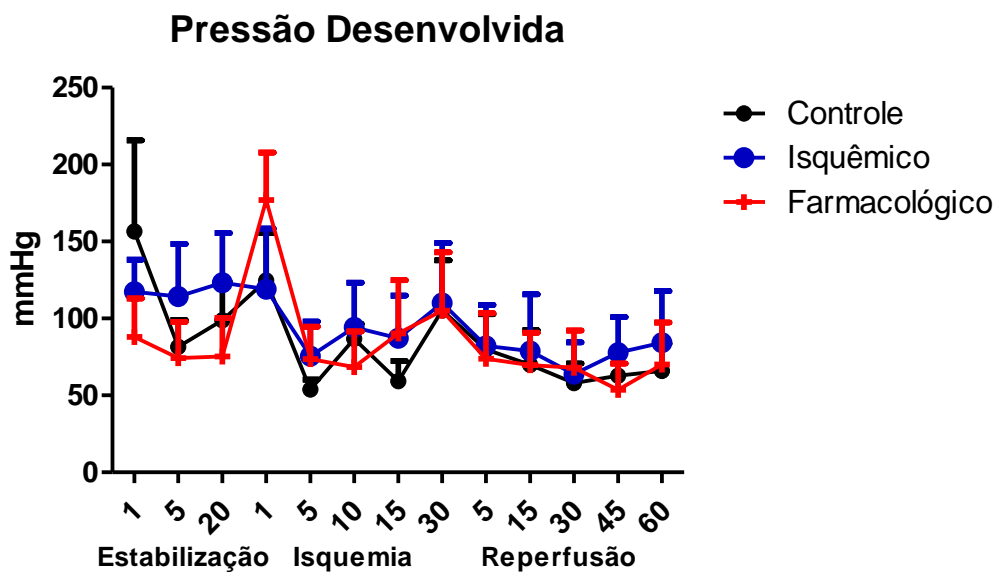


**Gráfico 6.2.2:** valor médio da pressão diastólica alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.3. Pressão desenvolvida

Durante o período de isquemia a pressão desenvolvida pelo coração mostrou-se oscilante. No período de reperusão houve queda da mesma, porém novo aumento de pressão foi evidenciado aos 45 minutos no grupo pós-condicionamento isquêmico e grupo controle e aos 60 minutos no grupo de pós-condicionamento farmacológico. Em nenhum grupo a pressão desenvolvida retornou aos valores basais.





**Gráfico 6.3.1:** pressão desenvolvida alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste kruskal-Wallis seguido de Dunn.

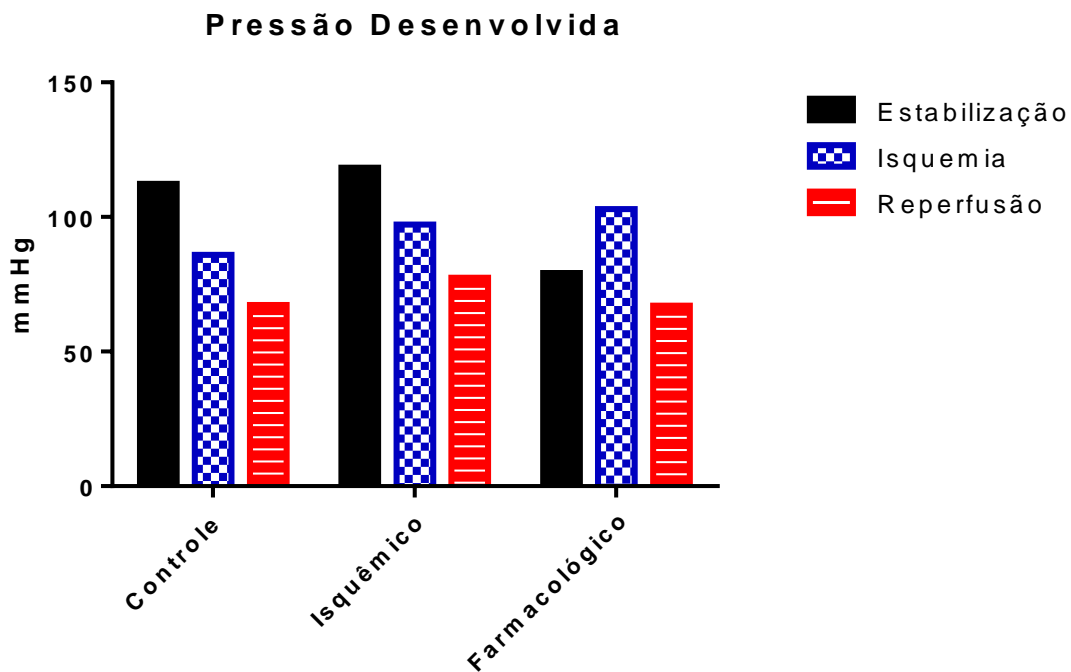
A comparação das médias entre os grupos mostrou aumento da mesma durante o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor da pressão desenvolvida durante a isquemia foi maior que aquele durante a estabilização.

Em todos os grupos os valores da pressão média durante o período de reperusão foi menor que aquele encontrado nos períodos de isquemia e estabilização.

O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou a menor diminuição da pressão desenvolvida durante a reperusão.

Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 6.3.2:** valor médio da pressão desenvolvida alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

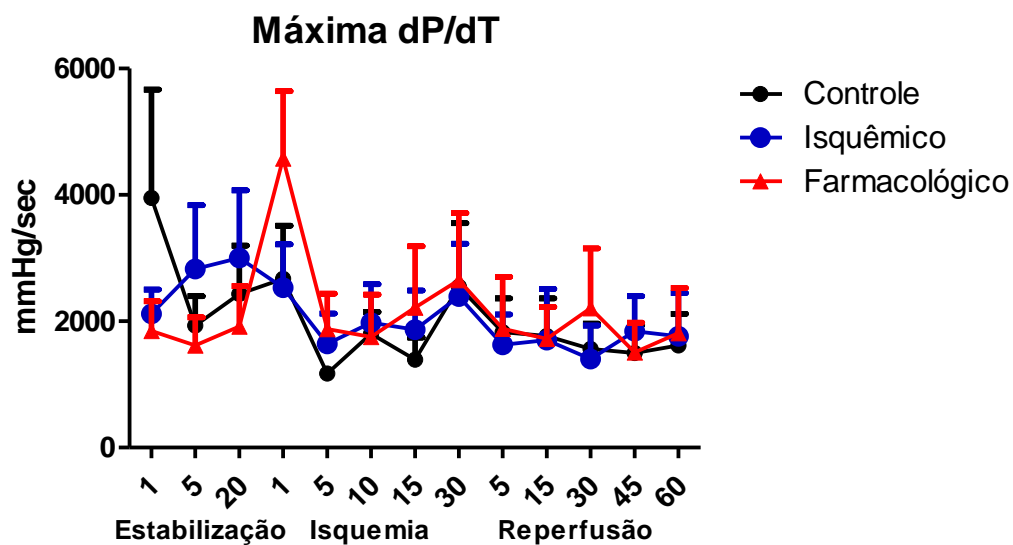
#### 6.4. Máxima dP/dT

Em todos os grupos observamos oscilação da máxima dP/dT durante o período de isquemia. No grupo controle houve uma queda constante ao longo do período de reperusão com aumento apenas aos 60 minutos.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve aumento deste parâmetro 15 e 45 minutos do período de reperusão.

No grupo pós-condicionamento farmacológico observamos aumento da máxima dP/dT aos 30 e 60 minutos da reperusão.

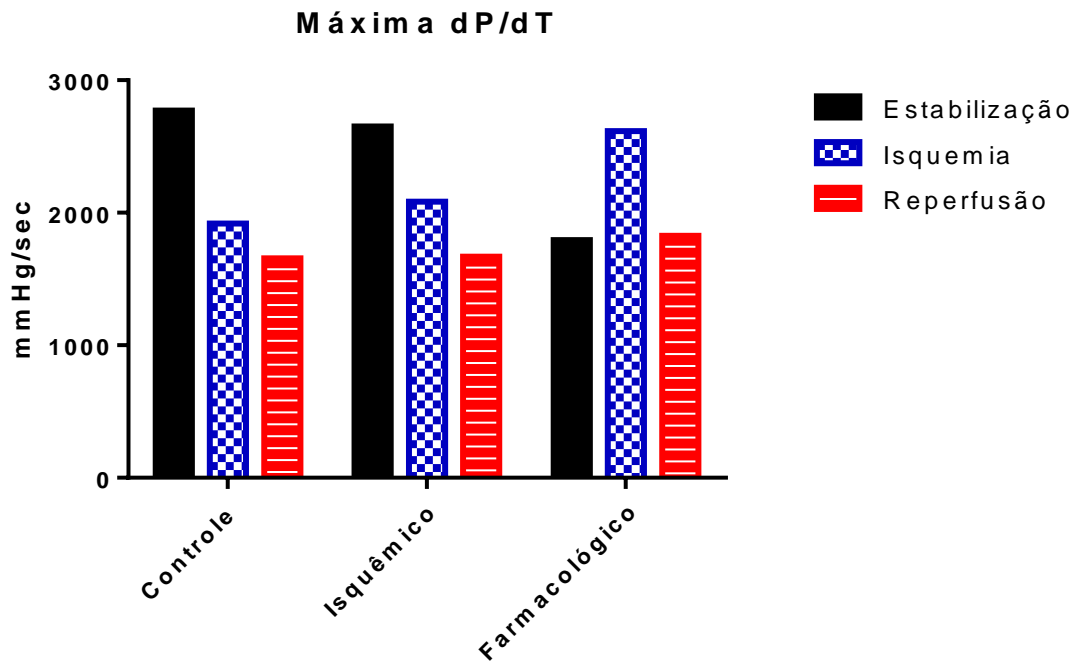
Os três grupos apresentaram valores praticamente iguais de máxima dP/dP sugerindo que nenhum tipo de pós-condicionamento foi efetivo.



**Gráfico 6.4.1:** máxima dP/dT alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn

Houve diminuição nos valores médios da máxima dP/dT durante o período de reperfusão quando comparado ao período de isquemia em todos os grupos. O grupo pós-condicionamento farmacológico mostrou menor queda deste parâmetro quando comparado aos grupos pós-condicionamento isquêmico e controles, que tiveram valores semelhantes.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor da máxima dP/dT durante o período de reperfusão alcançou os valores obtidos durante o período de estabilização.

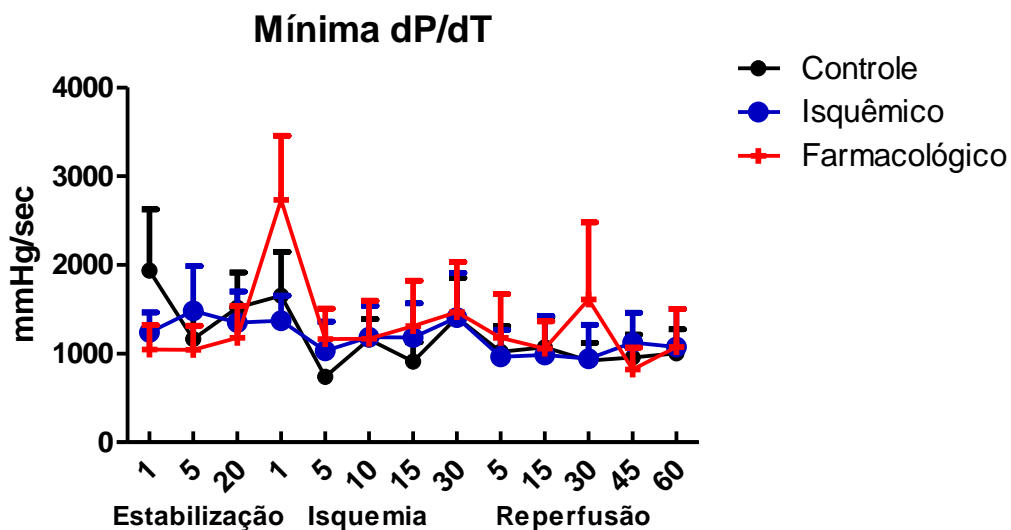


**Gráfico 6.4.2:** valor médio da máxima dP/dT alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.5. Mínima dP/dT

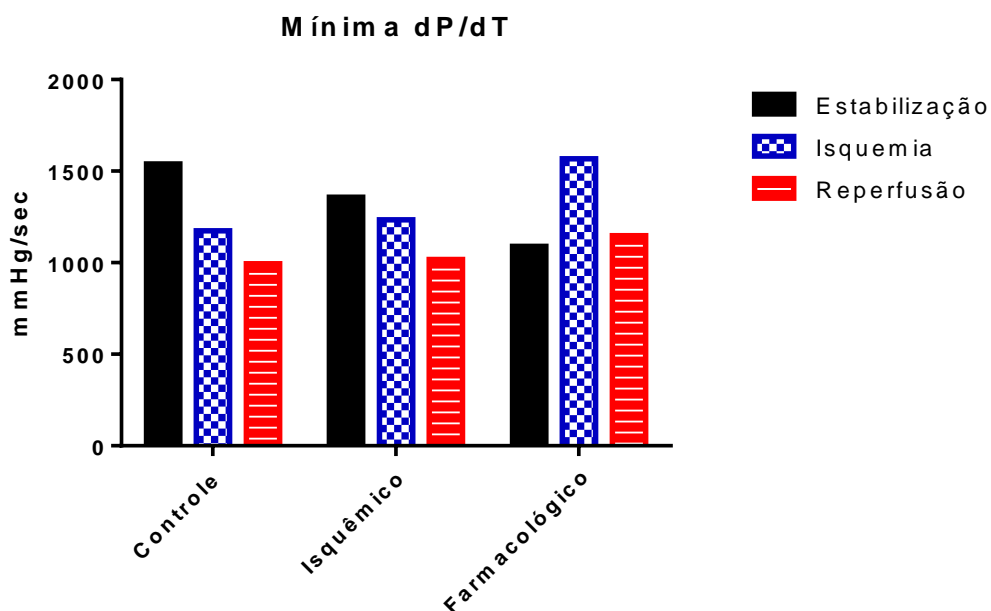
O grupo controle apresentou durante a isquemia valores oscilantes da mínima dP/dT. Durante o período de reperfusão ocorreu diminuição deste parâmetro em todos os grupos, com posterior aumento aos 15, 45 e 60 minutos, sem no entanto atingir os valores basais.

O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou comportamento semelhante ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 6.5.1:** mínima dP/dT alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média ± epm. Teste: Bonferroni

O valor médio da mínima dP/dT durante o período de reperfusão caiu nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico quando comparados ao período de estabilização. No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor médio da mínima dP/dT foi discretamente maior durante a reperfusão quando comparado ao período de estabilização.



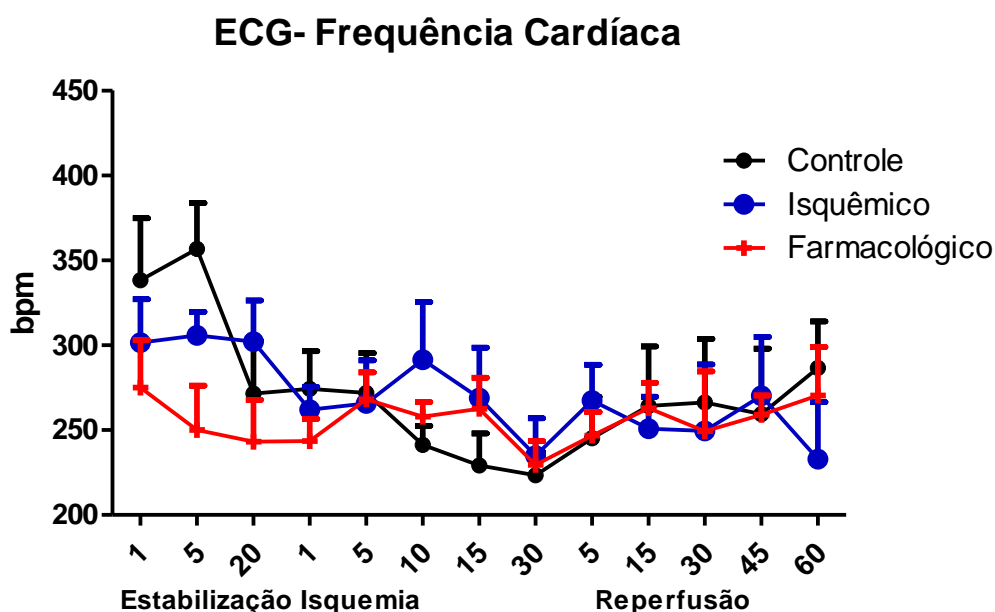
**Gráfico 6.5.2:** valor médio da mínima dP/dT alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

## 6.6. Frequência Cardíaca

Houve diminuição da frequência cardíaca durante o período de isquemia e reperfusão nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico.

No grupo pós-condicionamento farmacológico houve aumento da frequência cardíaca durante os períodos de isquemia e reperfusão, quando comparado ao período de estabilização.

Não houve diferença estatística entre os grupos.



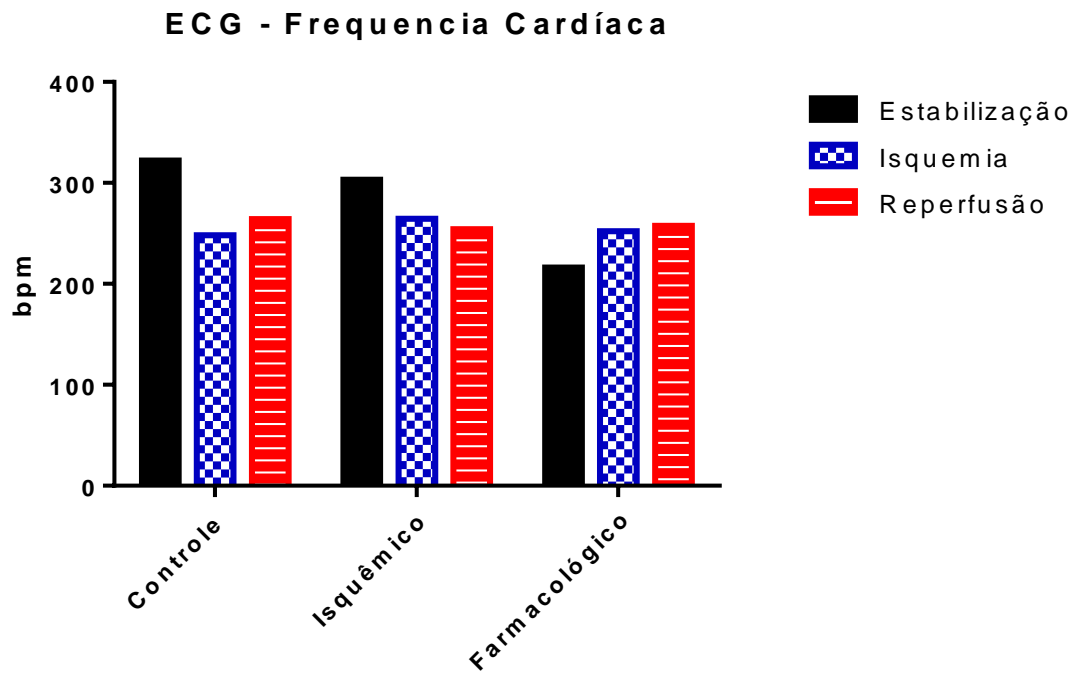
**Gráfico 6.6.1:** frequência cardíaca alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste: Bonferroni

O valor médio da frequência cardíaca mostra que houve variação mínima da mesma durante todos os períodos de reperfusão.

Nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico o valor da frequência cardíaca aumentou durante o período de reperfusão quando comparado ao período de isquemia. Ocorreu o inverso no grupo pós-condicionamento isquêmico.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor médio da frequência cardíaca no período de reperfusão foi maior do que no período de estabilização. Ocorreu o inverso nos outros dois grupos.

Não houve diferença entre os grupos.



**Gráfico 6.6.2:** valor médio da frequência cardíaca alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.7. QRS (largura complexo QRS)

Não houve diferença no valor do QRS entre os grupos durante todos os períodos do experimento.

## QRS

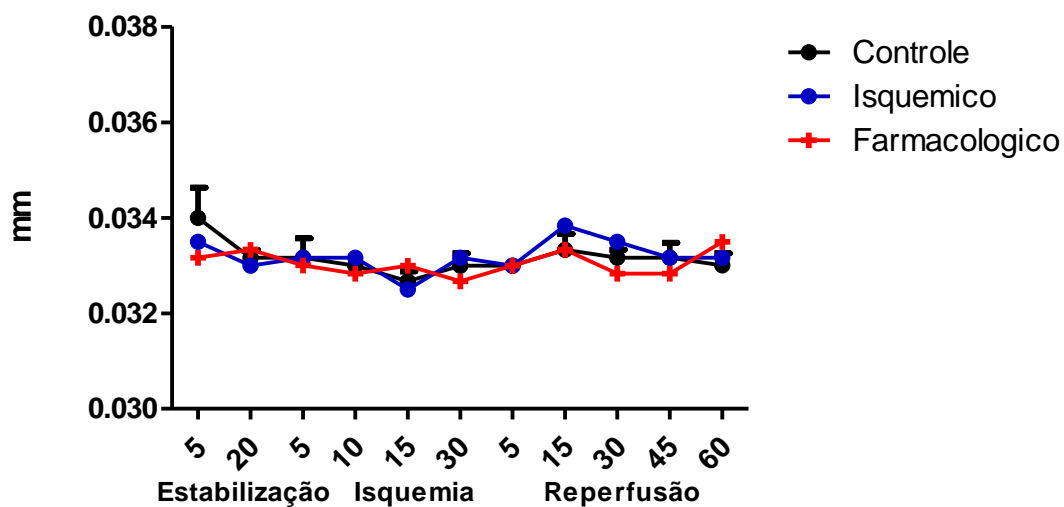


Gráfico 6.7.1: largura do complexo QRS alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O valor médio do complexo QRS praticamente não sofreu variações durante todos os períodos do experimento.

## ECG QRS

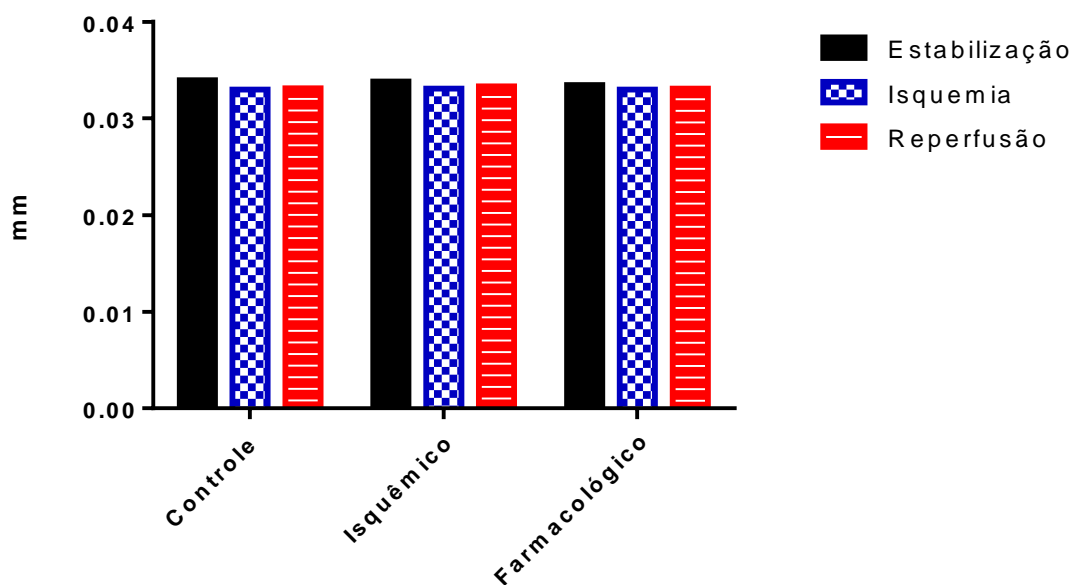


Gráfico 6.7.2: valor médio da largura do complexo QRS alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).



## 6.8. Intervalo RR

Não ocorreram variações significativas no intervalo RR em nenhum período do experimento nos três grupos.

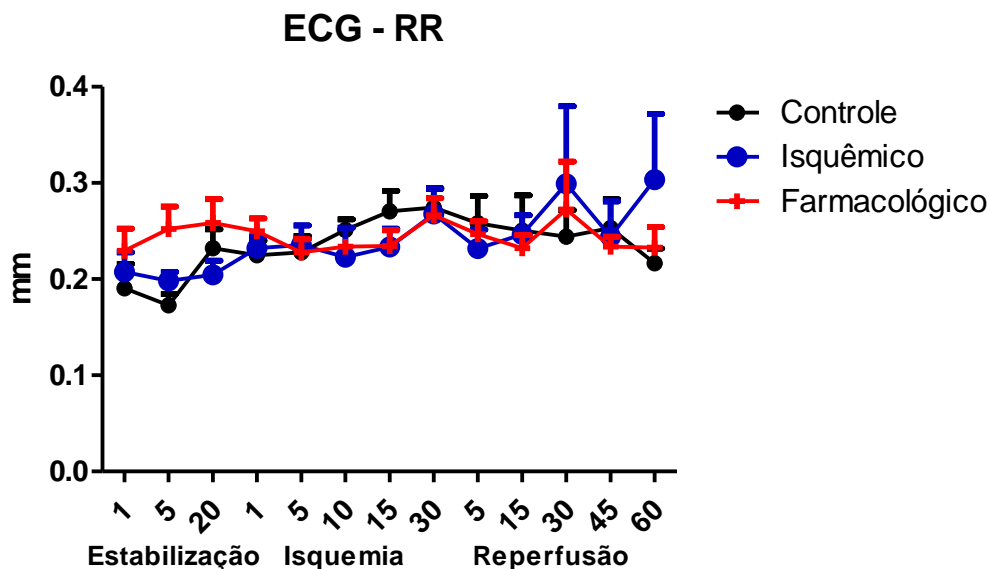


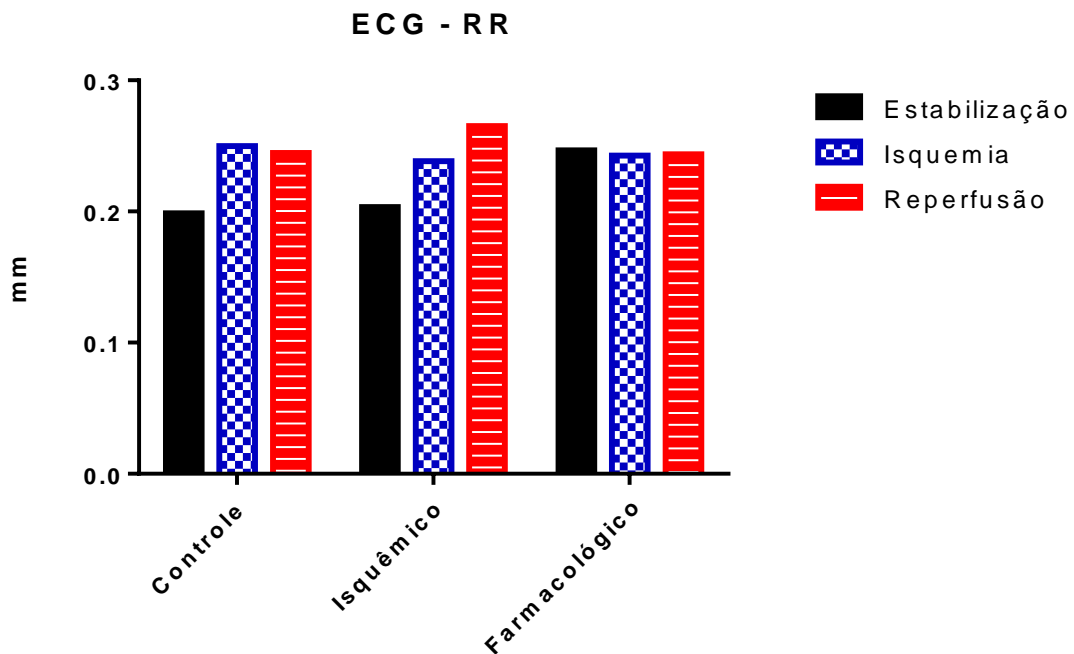
Gráfico 6.8.1: intervalo RR alcançado durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni

O valor médio do intervalo RR no período de reperusão mostra que no grupo controle houve discreta diminuição do mesmo quando comparada ao período de isquemia e aumento do mesmo comparado ao período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento isquêmico o valor do intervalo RR durante o período de reperusão foi maior que aquele durante os períodos de isquemia e estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico houve discreta diminuição no valor do intervalo RR durante os períodos de isquemia e reperusão quando comparados ao período de estabilização.

Não houve diferença estatística entre os grupos.



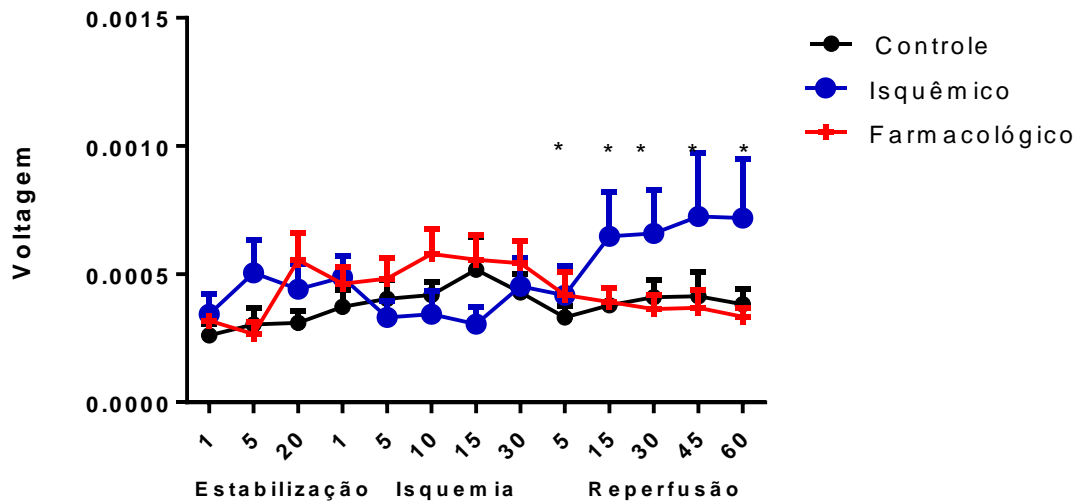
**Gráfico 6.8.2:** valor médio do intervalo RR alcançado durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.9. ST (infradesnivelamento ST)

Observamos que o grupo submetido a pós-condicionamento isquêmico apresentou alterações mais pronunciadas no segmento ST que os demais grupos. Em nosso estudo o pós-condicionamento isquêmico foi inefetivo em minimizar as alterações do segmento ST posteriores a isquemia.

Houve diferença estatística na comparação entre o grupo controle e isquêmico e entre o grupo isquêmico e farmacológico.

## ECG - ST

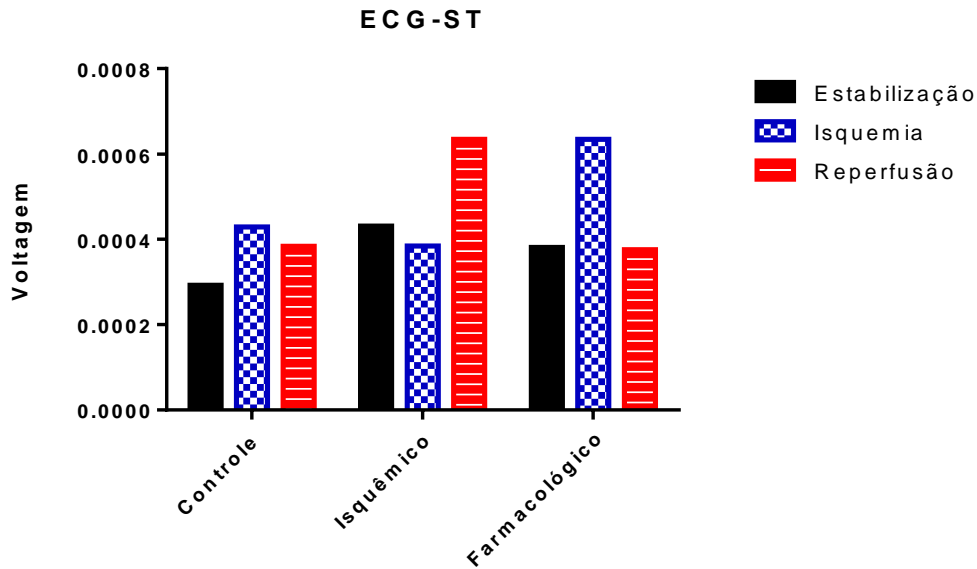


**Gráfico 6.9.1:** desnívelamento do segmento ST durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm.  $p < 0,05$ . Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O valor médio do segmento ST no período de reperusão do grupo controle foi menor que aquele no período de isquemia e maior que o do período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento isquêmico o valor médio do segmento ST durante a reperusão foi significativamente maior que aquele durante o período de isquemia e durante o período de estabilização.

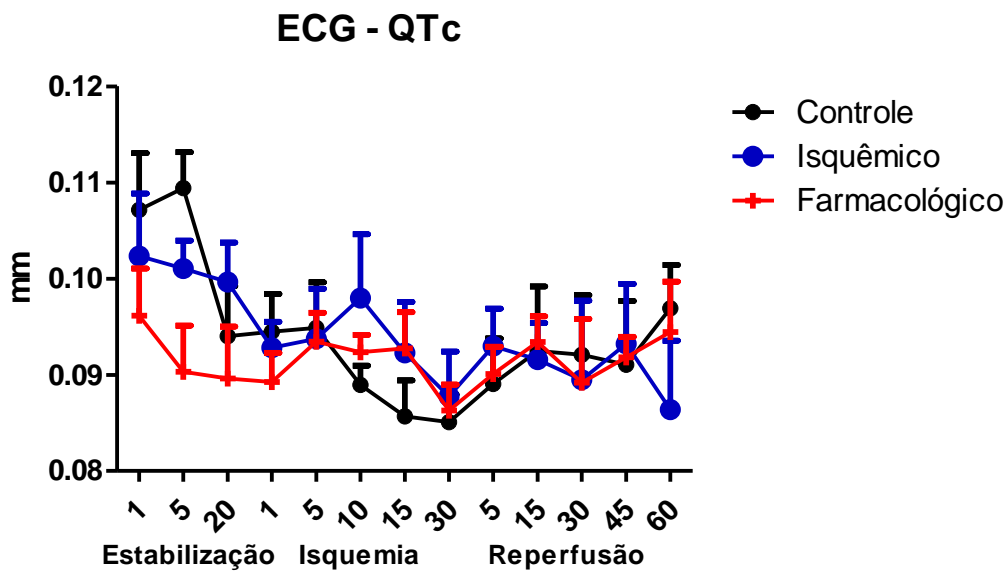
No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor médio do segmento ST durante a reperusão foi menor do que aquele durante o período de isquemia e semelhante àquele encontrado durante o período de estabilização.



**Gráfico 6.9.2:** valor médio do desnivelamento do segmento ST durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.10. Intervalo QTc

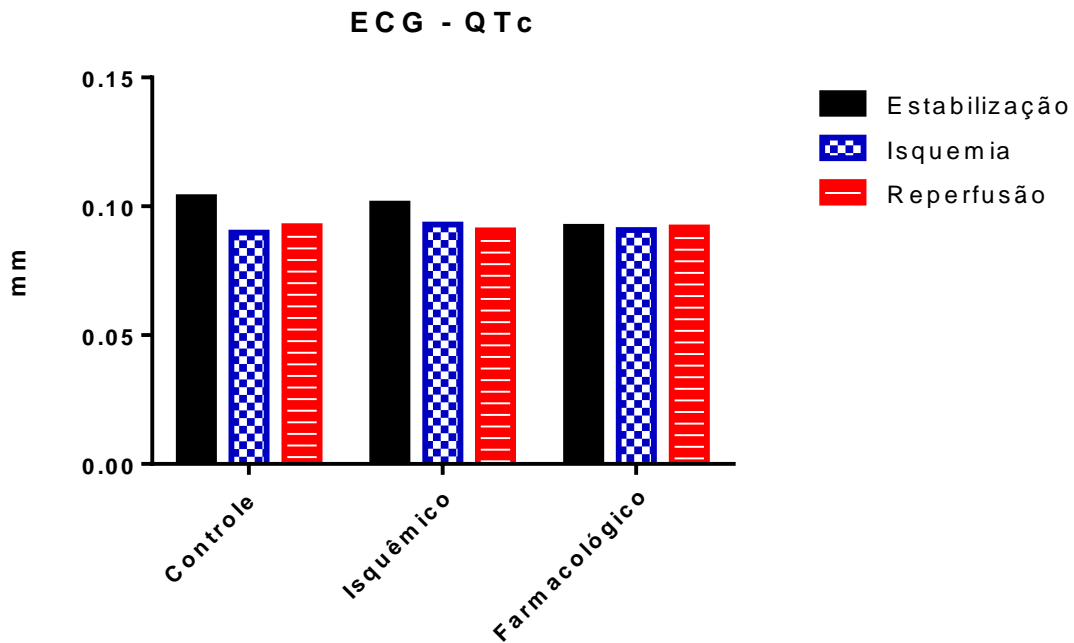
Observamos diminuição do intervalo QTc em todos os grupos durante o experimento quando comparados ao período de estabilização. Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 6.10.1:** alterações do intervalo QTc durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste: Bonferroni

O valor médio do intervalo QTc durante os períodos de isquemia e reperfusão foi semelhante em todos os grupos.

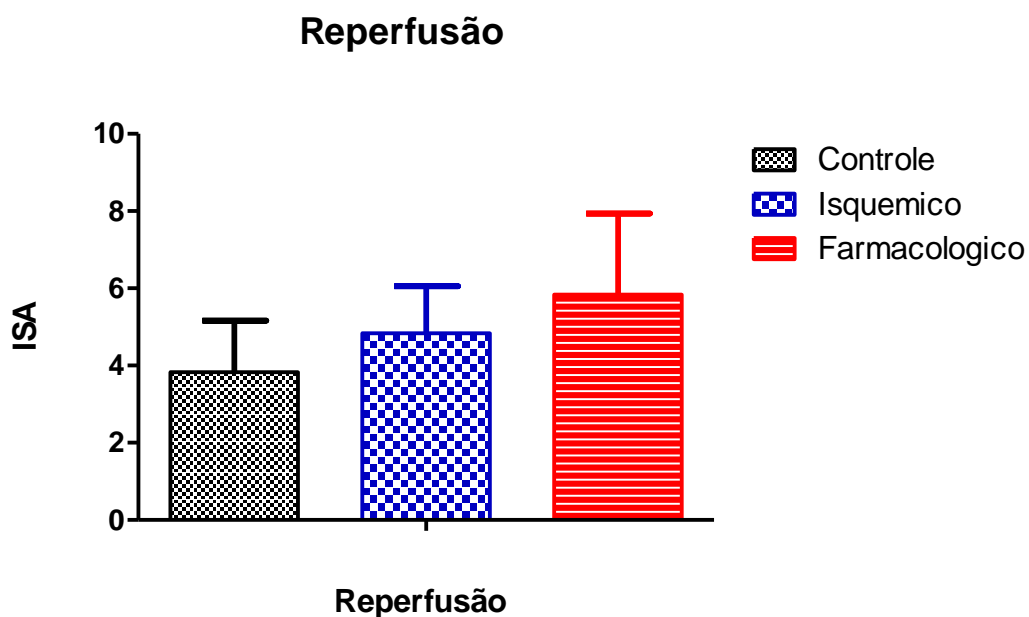
Nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico o valor médio do intervalo QTc durante o período de estabilização foi um pouco maior do que aqueles dos períodos de isquemia e reperfusão.



**Gráfico 6.10.2:** valor médio das alterações do intervalo QTc durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.11. Arritmia

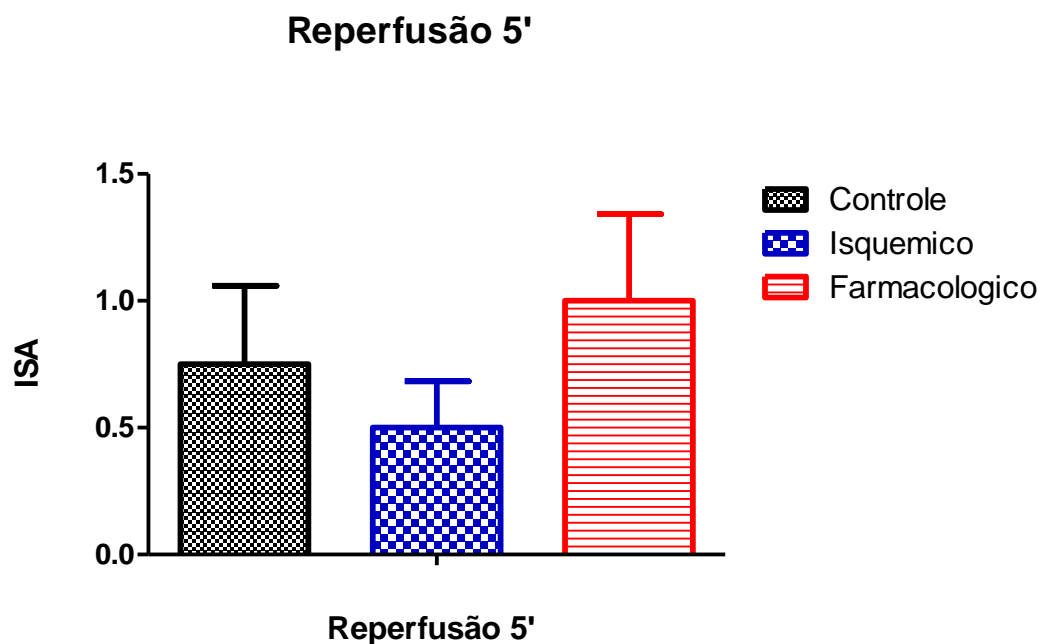
Contagem manual do período de arritmia durante toda a reperfusão e aplicação do ISA evidenciou que o grupo submetido a pós-condicionamento farmacológico permaneceu maior tempo em arritmia do que os outros grupos, inclusive o controle.



**Gráfico 6.11.1:** somatório dos períodos de arritmia de cada grupo durante a reperusão nos três grupos (n=6). Valores expressos como média ± epm. Teste: Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O mesmo procedimento foi feito durante os cinco primeiros minutos da reperusão e novamente o grupo pós-condicionamento farmacológico apresentou período maior de arritmia que os demais. O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou menor período de arritmia durante os primeiros cinco minutos da reperusão do que o grupo controle, diferente do que observamos ao analisar todo o período de reperusão. A diferença entre os grupos não foi significativa do ponto de vista estatístico.

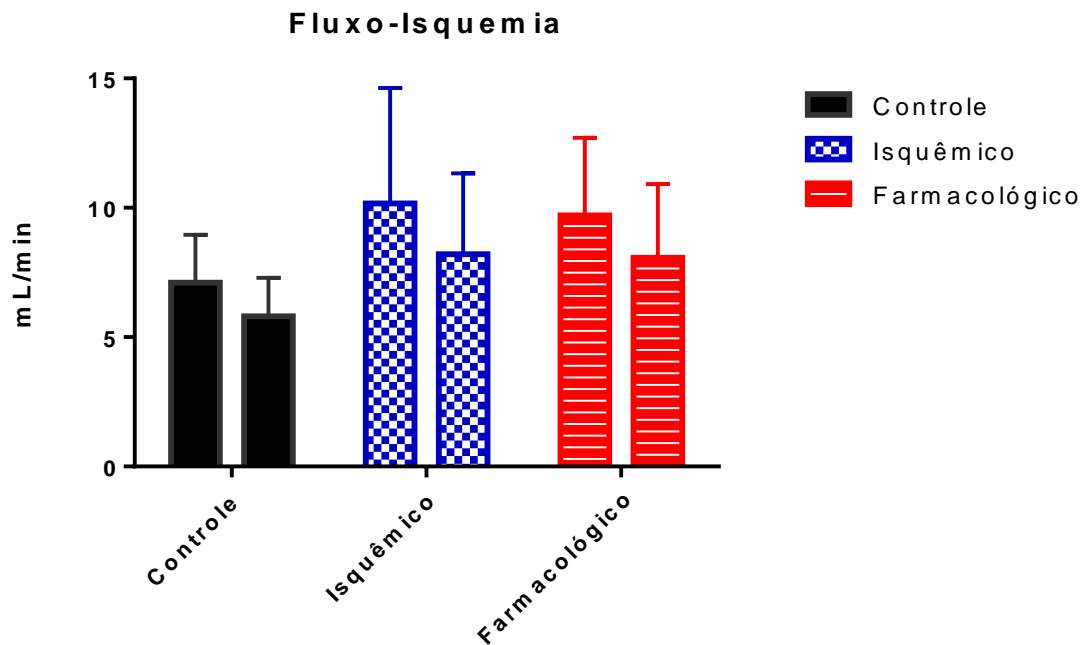
O fato do grupo pós-condicionamento farmacológico ter permanecido maior tempo em arritmia que os demais grupos sugere ineficiência deste tipo de pós-condicionamento.



**Gráfico 6.11.2:** somatório dos períodos de arritmia de cada grupo durante os cinco primeiros minutos da reperusão nos três grupos (n=6). Valores expressos como média ± epm. Teste: Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

## 6.12. Fluxo

Observamos no gráfico 6.12.1 que houve isquemia através da queda de aproximadamente 18% do fluxo coronariano em todos os grupos. Não houve diferença estatística entre o fluxo coronariano aos 20 minutos de estabilização e 1 minuto de isquemia.



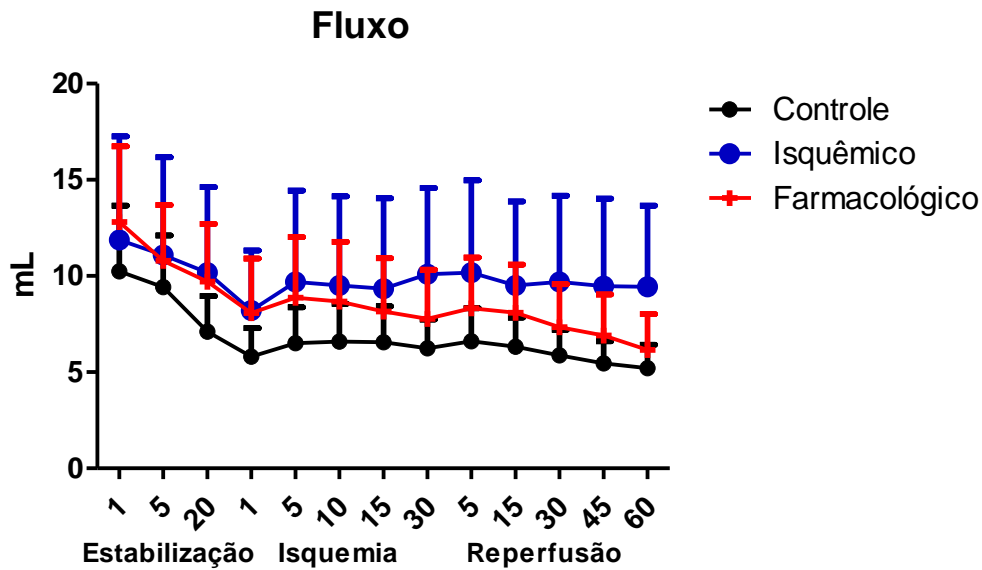
**Gráfico 6.12.1:** fluxo coronariano durante aos 20 minutos de estabilização e 1 minuto de isquemia nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

No grupo controle houve aumento do fluxo durante o período de isquemia exceto pelo fluxo aos 30 minutos de isquemia, que diminuiu. Durante o período de reperfusão o fluxo aumentou aos 5 e 30 minutos, diminuindo nos demais.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve aumento do fluxo aos 5 e 30 minutos de isquemia. Durante o período de reperfusão houve aumento do fluxo no minuto 5 e 30. Porém em nenhum momento o fluxo da estabilização foi recuperado.

No grupo condicionamento farmacológico houve aumento do fluxo no minuto 10 da isquemia. Durante a reperfusão houve diminuição constante do fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos.



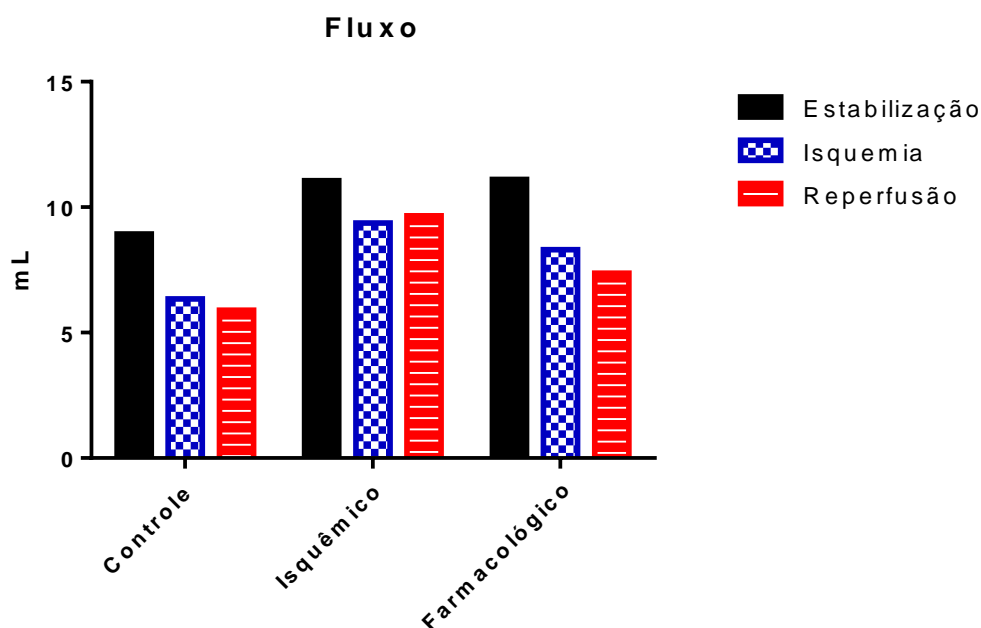


**Gráfico 6.12.2:** fluxo coronariano durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O valor médio do fluxo no período de reperusão nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico foi menor que aquele nos períodos de isquemia e estabilização.

No grupo pós-condicionamento isquêmico o valor médio do fluxo foi discretamente maior no período de reperusão que no período de isquemia, porém foi menor que no período de estabilização.

Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 6.12.3:** valor médio do fluxo coronariano durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.13. CK-MB

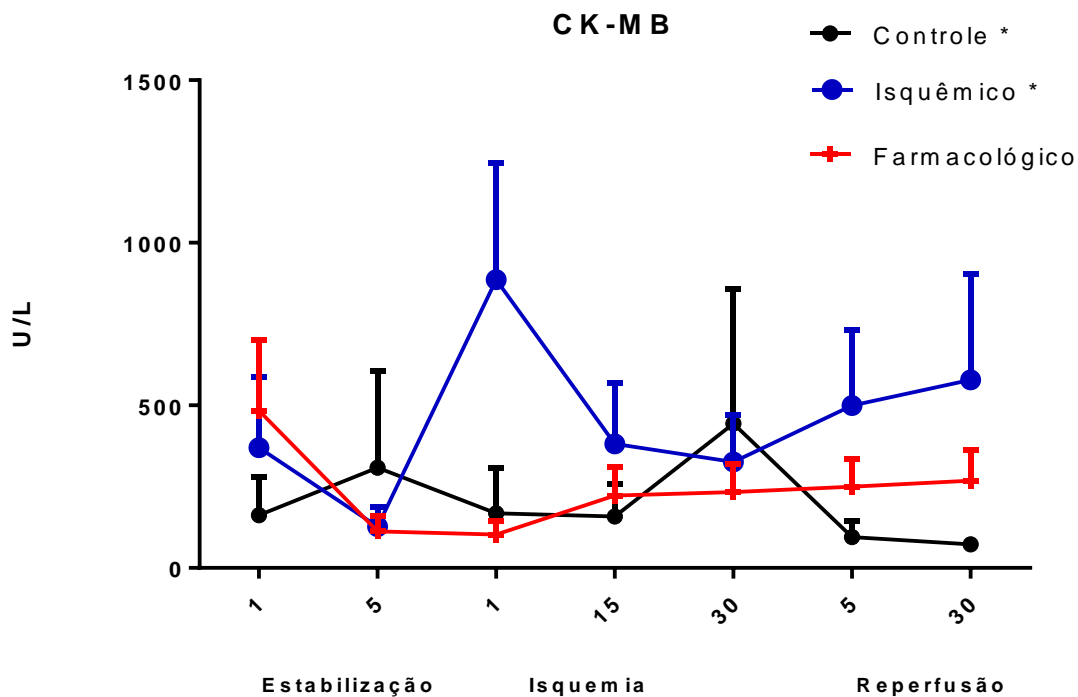
No grupo controle houve queda desta enzima durante o período de isquemia exceto por seu aumento abrupto no final da isquemia aos 30 minutos. Durante o período de reperusão houve diminuição dos valores de CK-MB.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve aumento progressivo da enzima durante os períodos de isquemia e reperusão.

No grupo pós-condicionamento farmacológico houve aumento da enzima aos 5 e 10 minutos de isquemia, seguido por queda progressiva até o final da reperusão.

Nenhum dos grupos tornou a atingir os níveis enzimáticos da estabilização.

A análise dos grupos mostrou diferença significativa entre o grupo controle e pós-condicionamento isquêmico. Porém os dados sugerem que essa diferença foi devido aos valores obtidos no período de isquemia.

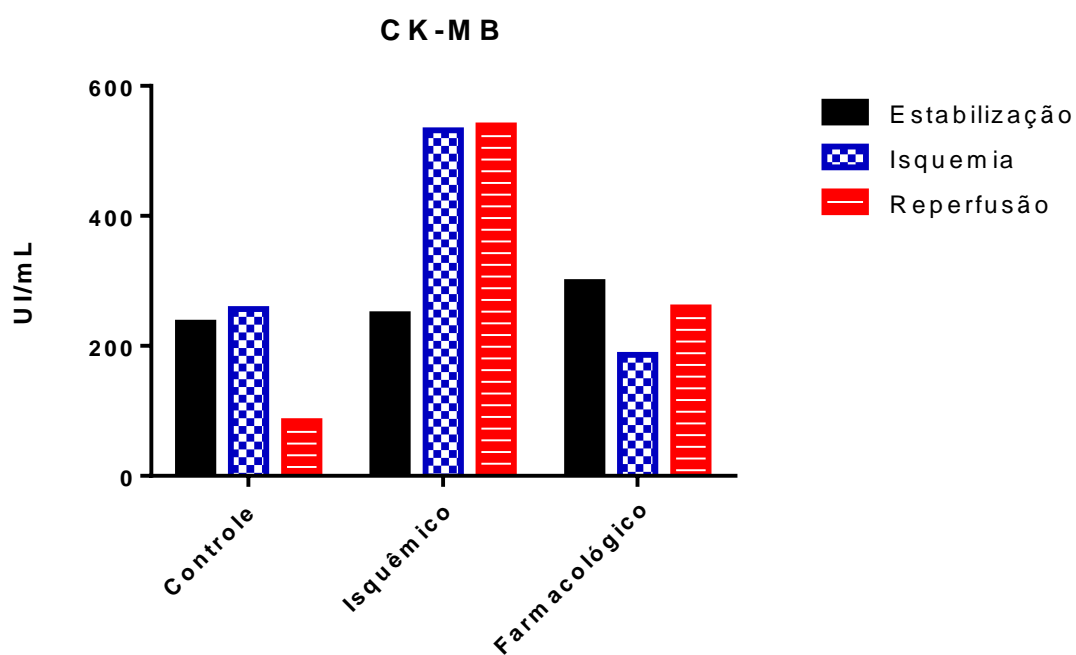


**Gráfico 6.13.1:** valores da enzima CK-MB durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste kruskal-Wallis seguido de Dunn.

A análise da média dos valores de CK-MB no período de reperfusão evidenciou aumento da mesma nos grupos submetidos ao pós-condicionamento quando comparado ao período de isquemia, mostrando inefetividade do pós-condicionamento em reduzir os marcadores de lesão tecidual. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico o valor da CK-MB durante a isquemia foi maior que durante o período de estabilização. Ocorreu o oposto no grupo pós-condicionamento farmacológico.

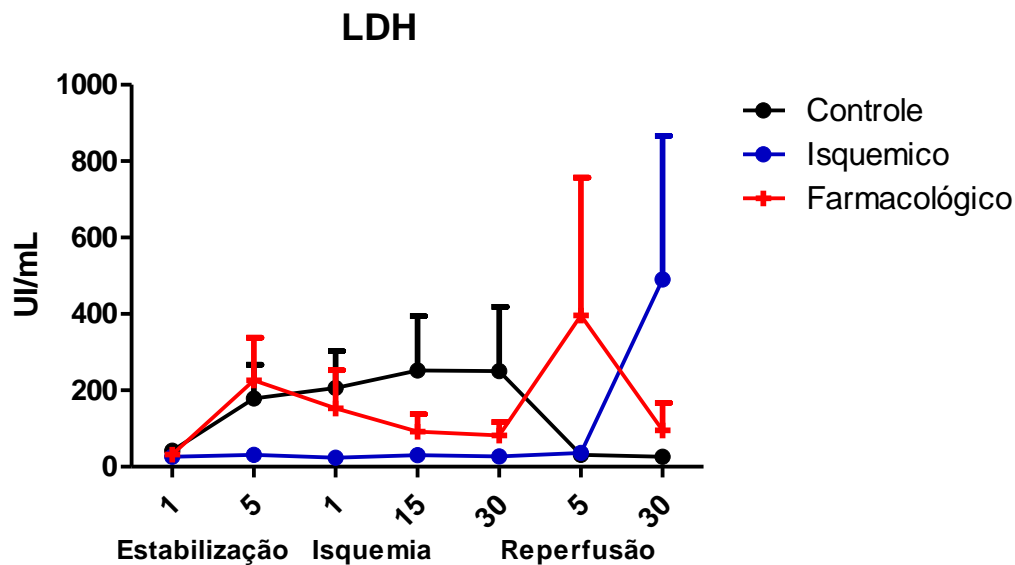
Apesar do pico plasmático da CK-MB ocorrer em 24h, estudos semelhantes utilizando esse marcador em corações isolados conseguiram obter diferença significativa entre os grupos controle e pós-condicionamento com 60 minutos de reperfusão. (Bopassa et al. 2006)



**Gráfico 6.13.2:** valor médio da enzima CK-MB durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

#### 6.14. LDH

Observamos que durante a reperusão o grupo controle manteve seus valores de LDH baixos nos dois tempos em que foram efetuadas as medidas. No grupo pós-condicionamento isquêmico podemos observar um aumento da LDH aos 30 minutos da reperusão. O inverso ocorreu no grupo pós-condicionamento farmacológico que evidenciou aumento da LDH com 5 minutos de reperusão e apresentou posterior queda da mesma aos 30 minutos. Não houve diferença estatística entre os grupos.

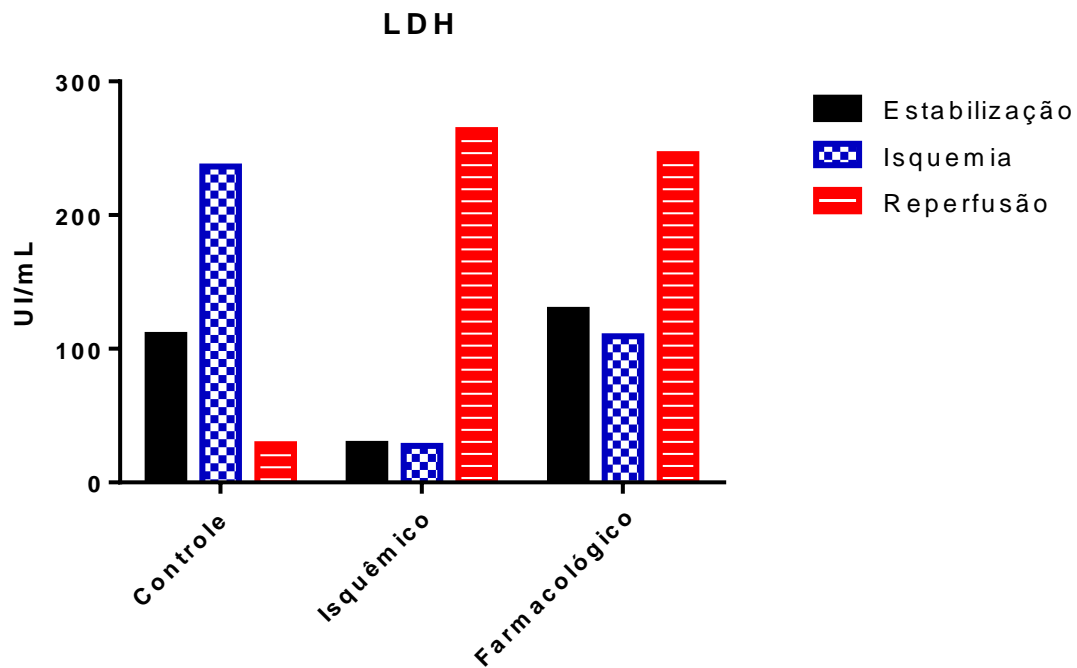


**Gráfico 6.14.1:** valores da enzima LDH durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O valor médio durante o período de reperusão nos grupos pós-condicionamento isquêmico e farmacológico foi bem superior àqueles encontrados nos períodos de isquemia e estabilização.

No grupo controle houve diminuição do valor médio da LDH no período de reperusão quando comparado aos períodos de isquemia e estabilização.

Esta enzima apresenta pico plasmático em 48h pós isquemia, porém, estudos semelhantes conseguiram identificar diferenças entre os grupos controle e pós-condicionamento com períodos de reperusão de até 60 minutos. (Bopassa et al. 2006)



**Gráfico 6.14.2:** valor médio da enzima LDH durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.15. Troponina I

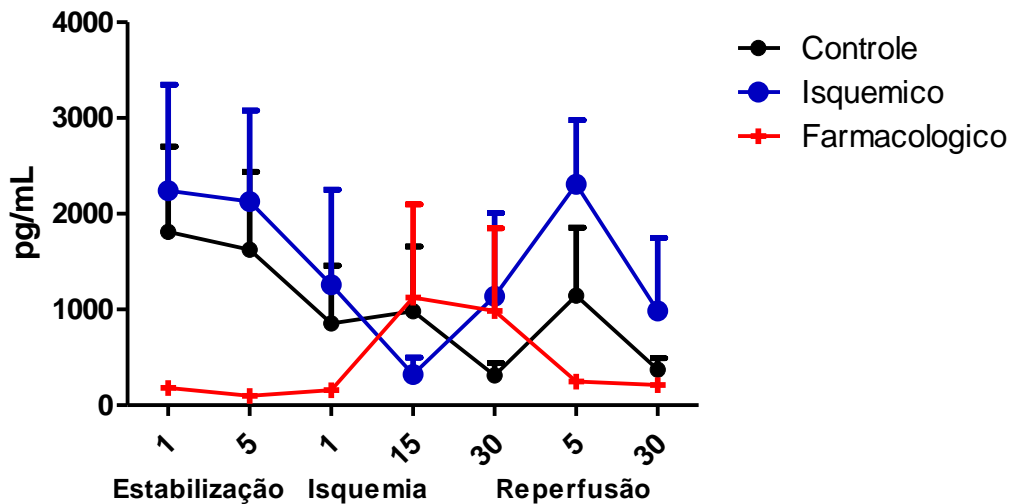
A análise de todos os períodos do experimento e do período de reperusão isoladamente evidenciaram diminuição da Troponina I no grupo que recebeu pós-condicionamento farmacológico. A comparação entre os grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sugerindo eficiência do pós-condicionamento farmacológico em diminuir o valor deste marcador no período pós isquemia.

Houve aumento da Troponina I durante o primeiro minuto do período de isquemia nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Aos 15 minutos de isquemia houve diminuição da Troponina I e aos 30 minutos da reperusão ela cai novamente.

No grupo pós-condicionamento farmacológico houve aumento da Troponina I até 15 minutos de reperusão e a partir daí diminuição até os 30 minutos de reperusão.

Apesar de alcançar pico plasmático em 36h, estudos prévios identificaram diferenças significativas entre os grupos controle e pós-condicionamento em períodos de 60 minutos de reperfusão. (Bopassa et al. 2006)

### Troponina I

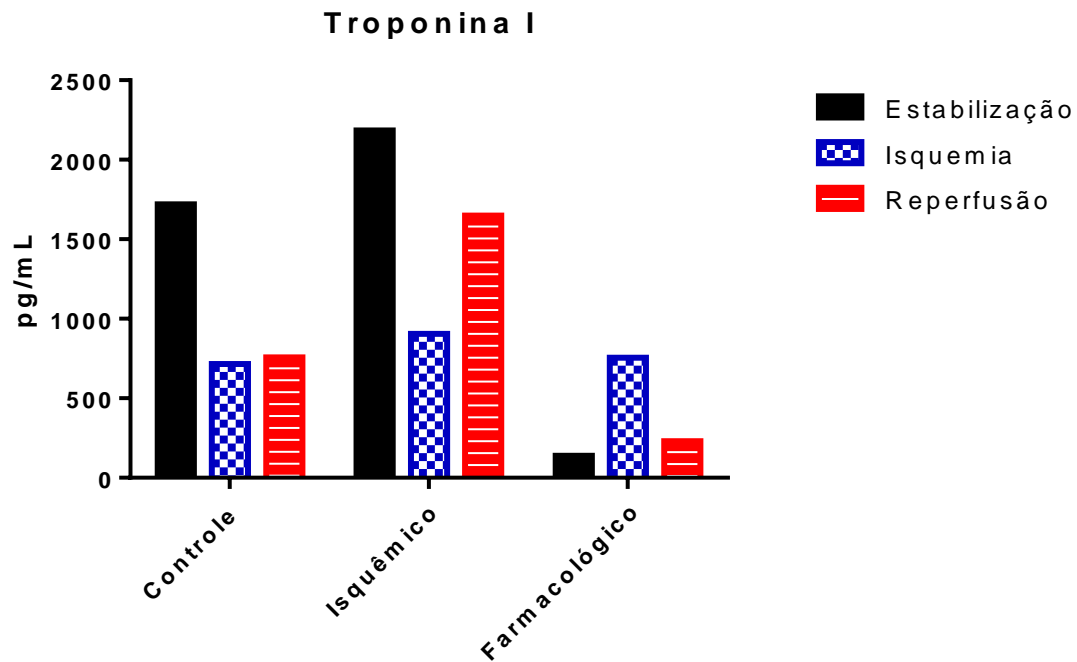


**Gráfico 6.15.1:** valores da enzima Troponina I durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste kruskal-Wallis seguido de Dunn.

O valor médio da Troponina I durante o período de reperfusão do grupo controle foi discretamente maior que aquele durante o período de isquemia e foi menor que o valor encontrado no período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento isquêmico o valor médio durante o período de reperfusão foi maior que aquele durante o período de isquemia e menor que aquele encontrado durante o período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor da Troponina I no período de reperfusão foi menor que aquele encontrado no período de isquemia e ligeiramente maior que aquele encontrado no período de estabilização.



**Gráfico 6.15.2:** valor médio da enzima Troponina I durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6).

### 6.16. Alamandina

Uma análise mais detalhada dos dados comparando a média do período de estabilização de todos os grupos com a média de cada tempo de isquemia em todos os grupos mostra diminuição de aproximadamente 40% do valor da alamandina no 1º. e 15º. minuto de isquemia. No 30º. minuto ocorre aumento da mesma, chegando a 77% do valor inicial da estabilização. Durante a isquemia, em média, houve uma diminuição de 40% no valor da alamandina quando comparado ao valor durante a estabilização.



Alamandina (pg/min) – Isquemia

Tempos	(1'+5' ):14	1'	15'	30'	(1'+15''+30' ):14
Estabilização	2,38				
Isquemia		1,414	1,377	1,835	1,396
Percentual		59,41	57,85	77,1	58,65

Tabela 6.16.1 - valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos.

A mesma análise foi feita comparando os valores de cada tempo da reperfusão em cada grupo com aqueles obtidos na estabilização e isquemia de todos os grupos.

O grupo controle apresentou diminuição de 97% da alamandina no 5º. minuto da reperfusão quando comparado ao período de estabilização. No 30º. minuto houve diminuição de 65%. Em média, houve diminuição de 80% do valor da alamandina durante a reperfusão no grupo controle quando comparada ao período de estabilização.

A comparação do período de reperfusão com o período de isquemia nos mostra diminuição de 95% no valor da alamandina no 5º. minuto de reperfusão e de 40% no 30º. minuto. Houve uma diminuição média de 68% no valor da alamandina durante o período de reperfusão quando comparada ao valor médio da isquemia em todos os grupos.

O grupo pós-condicionamento isquêmico teve diminuição de aproximadamente 40% no valor da alamandina durante o 5º. minuto e de 48% no 30º. minuto da reperfusão quando comparada ao período de estabilização. O período de reperfusão como um todo apresentou queda de 52% dos valores da alamandina quando comparada ao período de estabilização.

Ao compararmos o comportamento da alamandina no grupo pós-condicionamento isquêmico durante o período de reperfusão com o seu comportamento durante a isquemia, percebemos um aumento de 3% no valor da mesma durante o 1º. minuto e diminuição de 11% no 30º. O período de reperfusão como um todo diminuiu 18% quando comparado ao período de isquemia.

O grupo pós-condicionamento farmacológico apresentou 15% de diminuição dos valores de alamandina no 5º. minuto de reperfusão e 60% de diminuição aos 30 minutos de reperfusão quando comparada ao período de estabilização. A alamandina aumentou em média 37% durante o período de reperfusão quando comparada ao período de estabilização.

A comparação entre os períodos de reperfusão e isquemia no grupo

pós-condicionamento farmacológico nos mostra um aumento de 45% no valor da alamandina no 5º. minuto da reperfusão. No 30º. minuto de reperfusão houve diminuição de 40% no valor da alamandina. Houve aumento médio de 7% no valor da alamandina durante o período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia.

Alamandina (pg/min) – Reperfusão

Tempos	5'	30'	(5'+ 30'):14
Controle (3)	0,06	0,85	0,4567
Percentual Est	2,52	35,71	19,18
Percentual Isq	4,29	60,88	32,71
Pós- Condicionamento Isquêmico (5)	1,432	1,236	1,134
Percentual Est	60,16	51,93	47,64
Percentual Isq	102,57	88,53	81,23
Pós- Condicionamento Farmacológico (6)	2,032	0,9717	1,502
Percentual Est	85,37	40,82	63,1
Percentual Isq	145,55	60,69	107,59

Tabela 6.16.2 – valores médios de cada tempo do período de reperfusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos.

Podemos observar neste gráfico o comportamento de cada animal durante o experimento, mostrando que houve variabilidade inclusive entre os corações submetidos ao mesmo protocolo.

Em um animal do grupo controle e em alguns animais do grupo pós-condicionamento farmacológico o valor da alamandina não foi detectável pelos métodos utilizados.

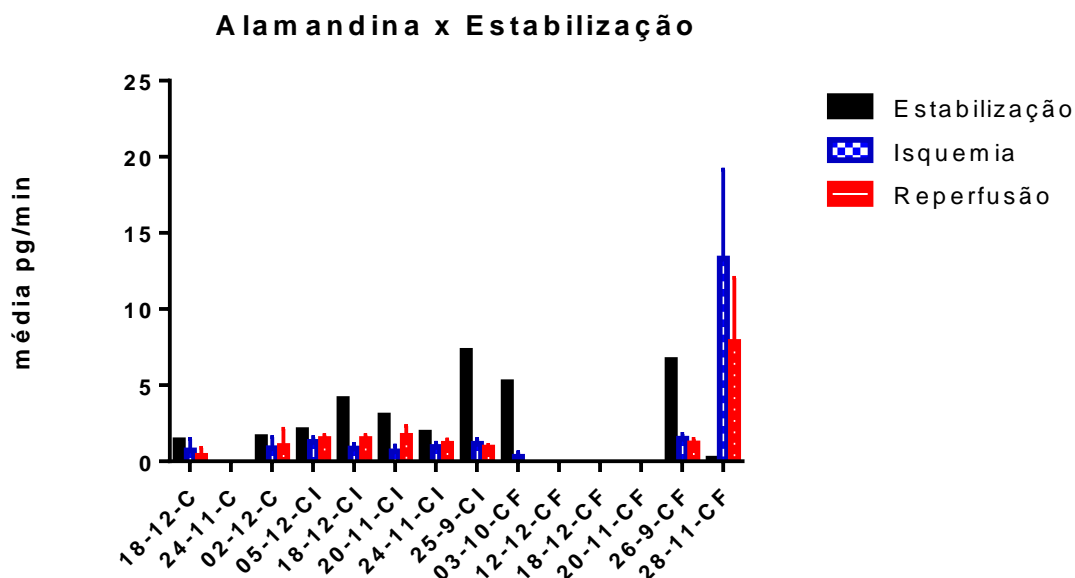


Gráfico 6.16.1:Alamandina – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

A comparação entre o valor médio do período de estabilização e os valores médios dos períodos de isquemia e reperusão nos mostra que no grupo controle o valor da alamandina nos períodos de estabilização e isquemia foram bem próximos.

Nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico houve diminuição deste peptídeo durante o período de isquemia quando comparado ao período de estabilização.

No grupo controle houve aumento da alamandina durante o período de reperusão quando comparado ao período de estabilização e isquemia.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve discreto aumento da alamandina durante o período de reperusão quando comparada ao período de isquemia e diminuição da mesma quando comparada ao período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico houve diminuição da alamandina no período de reperusão quando comparado ao período de isquemia e estabilização.

Um animal teve um comportamento discrepante dos demais e seus dados não foram levados em conta na análise estatística.

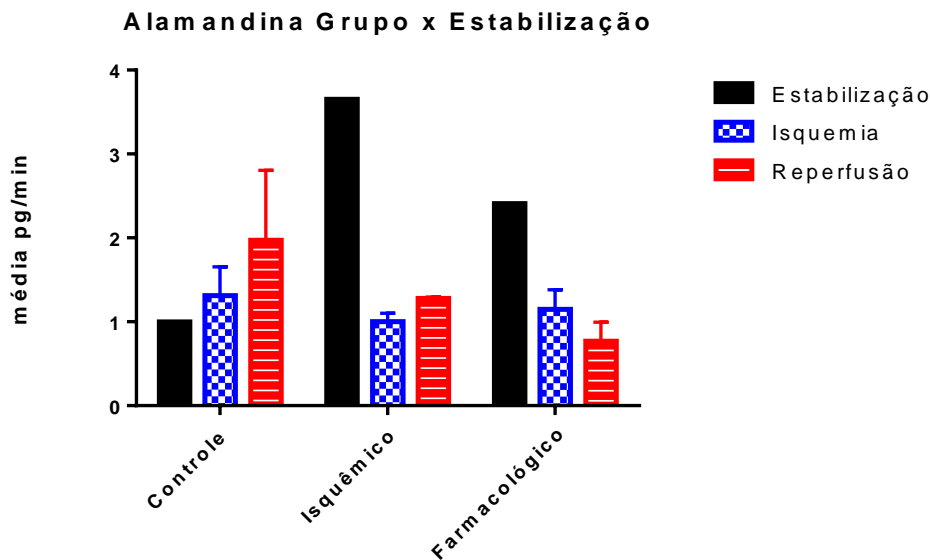


Gráfico 6.16.2: Alamandina – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

### 6.17. Angiotensina-(1-7)

A comparação entre o valor médio da angiotensina-(1-7) durante o período de estabilização em todos os grupos e os valores de cada tempo de isquemia em todos os grupos mostra que no 1º. minuto houve queda de 90% no valor da angiotensina 1-7. No 15º. minuto houve queda de 95% no valor da angiotensina 1-7 e no 30º. houve queda de 70%. Durante o período de isquemia ocorreu diminuição de 85% do valor da angiotensina-(1-7) quando comparada ao período de estabilização.

Angiotensina-(1-7) (pg/min) – Isquemia

Tempos	(1'+5'):14	1'	15'	30'	(1'+15''+30''):14
Estabilização	10,92				
Isquemia		0,9214	0,6086	3,384	1,638
Percentual		8,43	5,57	30,98	15

Tabela 6.17.1 – valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos.

Comparamos os valores encontrados durante a reperfusão de cada grupo com aqueles encontrados nos períodos de estabilização e isquemia de todos os grupos.

No grupo controle houve aumento de 150% no 5º. minuto da reperfusão. No 30º. minuto houve um aumento de 600% . Durante o período de reperfusão houve um aumento médio de 60% da angiotensina-(1-7) quando comparada ao período de estabilização.

A comparação do período de reperfusão com o de isquemia mostrou aumento de 1500% no valor da angiotensina-(1-7) no 5º. minuto da reperfusão e um aumento de 4700% aos 30 minutos. O aumento médio da angiotensina 1-7 durante a reperfusão quando comparada a isquemia no grupo controle foi de 900%.

No grupo pós-condicionamento isquêmico a comparação entre o período de estabilização e o 5º. minuto da reperfusão mostrou uma diminuição de 90% no valor da angiotensina-(1-7). Aos 30 minutos houve uma diminuição de 91%. Em média, durante a reperfusão, a angiotensina-(1-7) diminuiu 90% quando comparada ao período de estabilização.

A comparação entre o período de reperfusão do grupo pós-condicionamento isquêmico e o período de isquemia mostra diminuição de 30% no 5º. da reperfusão e de 38% no 30º. minuto. Em média, houve diminuição de 44% nos valores da angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão quando comparado ao período de isquemia.

No grupo pós-condicionamento farmacológico nós observamos diminuição de 98,5% no 5º. minuto da reperfusão quando comparado ao período de estabilização. No 30º. minuto o valor da angiotensina-(1-7) diminuiu 98% quando comparada ao período de estabilização. Em média, durante o período de reperfusão os valores de angiotensina-(1-7) diminuíram 99% quando comparados ao período de estabilização.

A comparação entre a reperfusão e a isquemia mostra no 5º. minuto diminuição de 90% dos valores da angiotensina-(1-7). No 30º. minuto o valor da angiotensina-(1-7) diminuiu 92% quando comparado ao período de isquemia. Durante o período de reperfusão houve uma diminuição média de 90% no valor da angiotensina-(1-7) quando comparada ao período de isquemia.

Angiotensina-(1-7) (pg/min) – Reperfusão

Tempos	5'	30'	(5' + 30'):14
Controle (3)	26,54	79,73	17,26
Percentual Est	243,04	730,12	158,05
Percentual Isq	1620,26	4867,52	1053,72
Pós- Condicionamento Isquêmico (5)	1,136	1,02	1,078
Percentual Est	10,40	9,34	9,87
Percentual Isq	69,35	62,27	65,81
Pós- Condicionamento Farmacológico (6)	0,165	0,133	0,1492
Percentual Est	1,51	1,21	1,36
Percentual Isq	10,07	8,11	9,1

Tabela 6.17.2 – valores médios de cada tempo do período de reperfusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos.

Uma análise individual de cada animal mostra que em diversos corações o valor da Angiotensina-(1-7) não foi detectado pelos métodos utilizados principalmente nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico.

O valor da Angiotensina-(1-7) durante o período de estabilização mostrou-se maior que aquele do período de isquemia e reperfusão em todos os animais, exceto um do grupo controle.

Um dos animais teve um comportamento discrepante dos demais evoluindo com um aumento exacerbado da angiotensina-(1-7) no 30º. minuto da isquemia. Este animal não foi incluído na análise dos grupos.

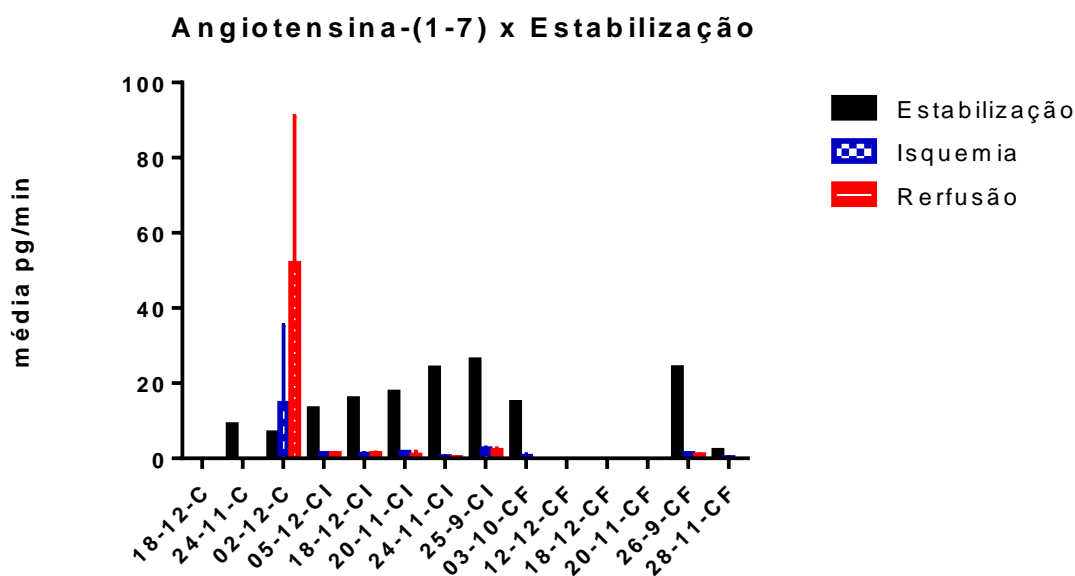


Gráfico 6.17.1: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Ao compararmos as médias dos períodos nós observamos que nos grupos que receberam pós-condicionamento houve diminuição da angiotensina-(1-7) no período de isquemia e reperfusão quando comparados ao período de estabilização.

O grupo controle praticamente não aumentou o valor da angiotensina-(1-7) durante o período de isquemia quando comparado ao período de estabilização. O grupo controle apresentou aumento da angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão e este valor foi maior que aquele dos períodos de isquemia e estabilização.

O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou valores de Angiotensina-(1-7) semelhantes durante os períodos de isquemia e reperfusão, e estes foram menores que os valores do período de estabilização.

O grupo pós-condicionamento farmacológico apresentou valores de Angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão discretamente menores que aqueles encontrados no período de isquemia. Os valores dos períodos de isquemia e reperfusão foram menores que aqueles encontrados no período de estabilização.

### Angiotensina-(1-7) Grupo x Estabilização

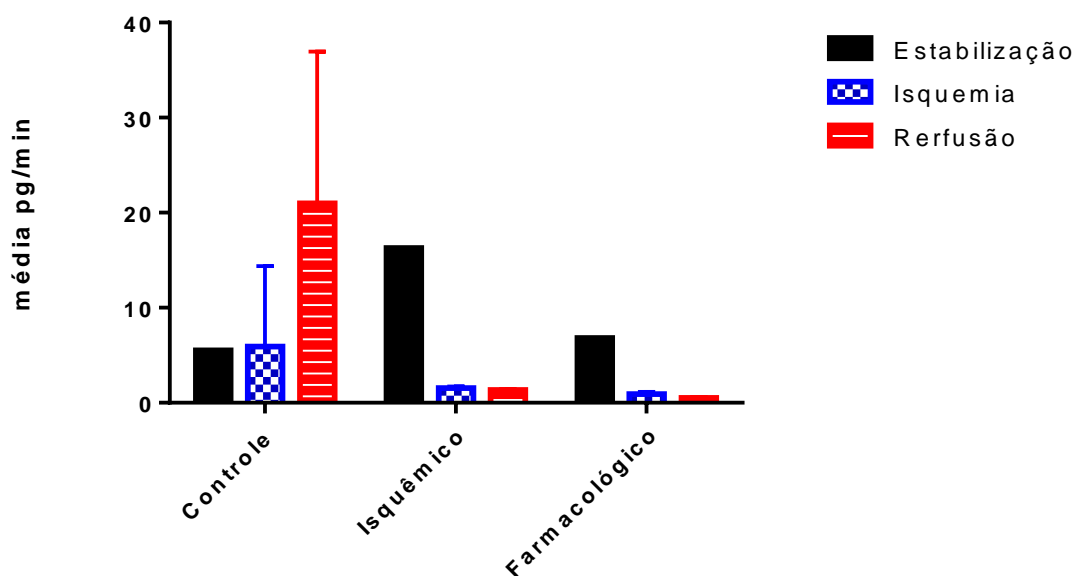


Gráfico 6.17.2: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

### 6.18. Angiotensina II

A comparação entre o valor médio encontrado no período de estabilização em todos os grupos e aquele encontrado durante o período de isquemia de todos os grupos mostra que no 1º. minuto de isquemia a angiotensina II diminuiu em 70%. No 15º. minuto de isquemia houve uma diminuição de 10% e aos 30 minutos de isquemia houve um aumento de 379% no valor da angiotensina II. Durante a reperfusão houve um aumento médio de 111% no valor da angiotensina II quando comparada ao período de estabilização.

Angiotensina II (pg/min) – Isquemia

Tempos	(1'+5'):14	1'	15'	30'	(1'+15''+30''):14
Estabilização	1,635				
Isquemia		0,5531	1,492	7,845	3,456
Percentual		33,82	91,25	479,81	211,37

Tabela 6.18.1 – valores médios do período de estabilização, de cada tempo do período de isquemia e média do período de isquemia de todos os grupos.



Realizamos a comparação entre o período de reperfusão de cada grupo e o período de estabilização de todos os grupos.

No grupo controle, o valor da angiotensina II foi zero durante o período de reperfusão.

No grupo pós-condicionamento isquêmico, quando comparado ao período de estabilização, houve um aumento de 700% no valor da angiotensina II no 5º. minuto da reperfusão. No 30º. minuto da reperfusão houve um aumento da angiotensina II de 90%. Em média, durante a reperfusão, angiotensina II aumentou 396% quando comparada ao período de estabilização.

Quando comparada ao período de isquemia, a angiotensina II aumentou 280% no primeiro minuto. No 30º. minuto houve diminuição de 20% no valor da angiotensina II. Houve um aumento médio de 130% na angiotensina II durante o período de reperfusão do grupo pós-condicionamento isquêmico quando comparado ao período de isquemia de todos os grupo.

No grupo pós-condicionamento farmacológico nós podemos observar diminuição de 94% no valor da angiotensina II no 5º. minuto de reperfusão quando comparado ao período de estabilização. No 30º. minuto de reperfusão houve diminuição de 94% no valor da angiotensina II. A angiotensina II diminuiu em média 95% durante o período de reperfusão no grupo pós-condicionamento farmacológico quando comparada ao período de estabilização.

Quando comparamos a reperfusão com a isquemia, observamos que no 5º. minuto houve diminuição de 96% no valor da angiotensina II. No 30º. minuto houve diminuição de 94% no valor da mesma. Houve uma diminuição média de 95% no valor da angiotensina II durante a reperfusão quando comparada ao período de isquemia.

### Angiotensina II (pg/min) – Reperusão

Tempos	5'	30'	(5' + 30'):3
Controle (1)	0	0	0
Percentual Est	0	0	0
Percentual Isq	0	0	0
Pós- Condicionamento Isquêmico (5)	13,14	3,108	8,124
Percentual Est	803,66	190,09	496,88
Percentual Isq	380,20	89,93	235,06
Pós- Condicionamento Farmacológico (6)	0,06	0,09	0,08
Percentual Est	3,66	5,5	4,89380
Percentual Isq	1,73	2,6	2,31

Tabela 6.18.2 – valores médios de cada tempo do período de reperusão de cada grupo e comparação entre os períodos de isquemia e estabilização de todos os grupos.

O comportamento de cada animal foi variado e em boa parte deles não foi possível detectar a angiotensina II em algum dos períodos do experimento.

Em contrapartida um dos animais teve um comportamento diferente dos demais apresentando um alto valor de angiotensina II aos 30 minutos da reperusão. Este animal não foi utilizado na análise estatística dos grupos.

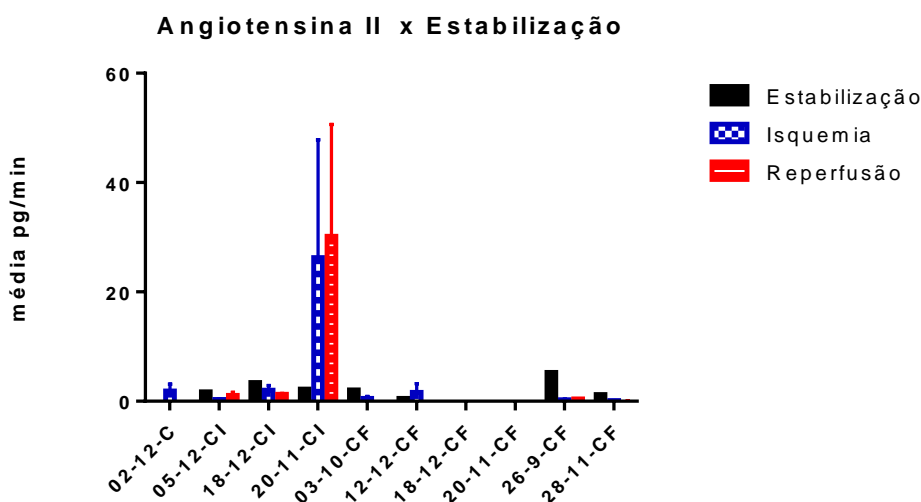


Gráfico 6.18.1: Angiotensina II – valor médio encontrado em cada animal nos períodos de estabilização, isquemia e reperusão. Valores expressos como média ± epm. Teste Dunnett's.

A análise da média dos períodos de todos os grupos mostrou valores indetectáveis de angiotensina II em todos os períodos do grupo controle.

O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou valores de angiotensina II no período de isquemia maiores que aqueles encontrados no período de estabilização. O valor encontrado durante o período de reperfusão foi maior que aqueles encontrados nos períodos de isquemia e estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico os valores de angiotensina II durante a isquemia foram menores que aqueles durante a estabilização e praticamente não foi detectado angiotensina II durante o período de reperfusão do grupo pós-condicionamento farmacológico.

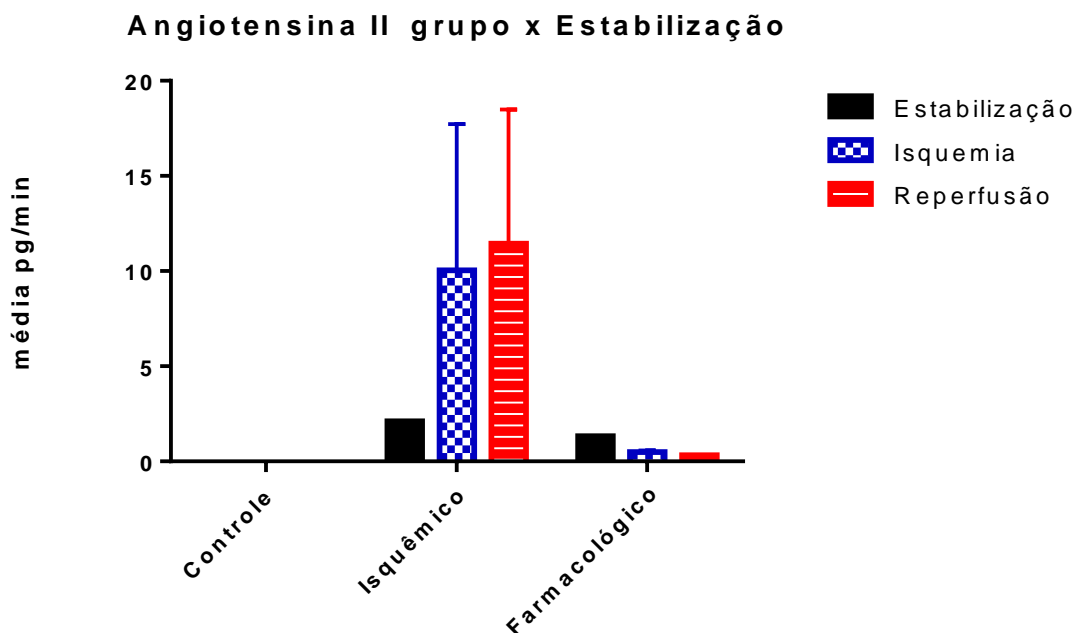


Gráfico 6.18.2: Angiotensina II – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização, isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

## 7. Discussão

Nosso estudo tentou reproduzir os resultados do pós-condicionamento cardíaco já observado por diversos autores e ainda avaliar se o sistema renina-angiotensina participa deste fenômeno.

Mesmo com os resultados conflitantes é válido ressaltar os benefícios do condicionamento cardíaco.

A eficácia tanto do pós-condicionamento isquêmico quanto do pós-condicionamento farmacológico em coração isolado de roedores já foi demonstrada em diversos estudos.(Zhang et al. 2011)(Dai et al. 2010)(Yu et al. 2010)(Andreka et al. 2007b)(C. Jin et al. 2012)

Em nosso estudo reproduzimos as técnicas de pós-condicionamento isquêmico e farmacológico em coração isolado de ratos perfundidos no sistema de Langendorff.

Nossos resultados foram conflitantes e vários parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos que receberam pós-condicionamento.

A pressão máxima apresentou queda em todos os grupos durante a reperfusão. Mesmo a queda sendo mais acentuada no grupo controle, não houve diferença significativa entre os grupos.

A pressão mínima caiu em todos os grupos no período de reperfusão, porém houve recuperação parcial aos 45 minutos nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico e aos 60 minutos no grupo pós-condicionamento farmacológico. Novamente não houve diferença estatística entre os grupos.

Houve queda da pressão média em todos os grupos durante os períodos de isquemia e reperfusão. Esta queda foi maior no grupo controle e menor no grupo que recebeu pós-condicionamento isquêmico. Houve diferença estatística entre os grupos controle e pós-condicionamento isquêmico.

Pressão máxima, mínima e média não foram analisadas em estudos prévios.

O que observamos é que nenhum dos três parâmetros reassumiram o padrão observado durante o período de estabilização, permitindo concluir que houve algum grau de dano pós isquemia. É pouco provável que as técnicas de pós-condicionamento tenham minimizado este dano pois observamos diferença significativa apenas na pressão média entre os grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Os gráficos destes parâmetros encontram-se no apêndice desta dissertação.

A pressão sistólica final apresentou queda nos três grupos durante o período de reperfusão. No grupo controle e pós-condicionamento farmacológico ocorreu aumento da pressão sistólica só no final da reperfusão (60 minutos). No grupo pós-condicionamento isquêmico ocorreu aumento da pressão a partir dos 45 minutos de reperfusão. Nenhum grupo atingiu os valores basais. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Um estudo analisou este parâmetro e encontrou aumento do valor médio do mesmo durante o período de reperfusão quando comparou o grupo controle ao grupo que recebeu pós-condicionamento isquêmico, porém este estudo analisou isoladamente a reperfusão e mostrou o valor médio do parâmetro somente durante este período.(Bopassa et al. 2006) Nosso estudo analisou este parâmetro levando em conta o período de estabilização.

Assim evidenciamos queda da pressão sistólica final em todos os grupos. A queda foi menor no valor médio da pressão sistólica final no grupo pós-condicionamento isquêmico. Não houve diferença estatística entre os grupos. Se analisarmos somente a reperfusão os valores encontrados em nosso estudo foram semelhantes aqueles encontrados por Bopassa et al., porém não houve diferença estatística entre os grupos.(Bopassa et al. 2006)

A pressão diastólica final é um parâmetro avaliado na maioria dos estudos sobre pós-condicionamento.

Em nosso estudo houve queda progressiva da pressão diastólica final em todos os grupos, principalmente no grupo controle.

Vários estudos semelhantes evidenciaram queda maior da pressão

diastólica final em grupos que receberam pós-condicionamento quando comparados ao grupo controle. (Bopassa et al. 2006)(H. Chen et al. 2008)(Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Chen HT et al. compararam a média dos valores encontrados durante o período de reperfusão com a média dos valores durante o período de estabilização. Em todos os grupos ocorreu aumento da pressão diastólica final quando comparada ao período de estabilização. Porém esse aumento é significativamente menor em grupos submetidos ao pós-condicionamento.

Nosso estudo evidenciou queda progressiva deste parâmetro nos três grupos quando comparados ao período de estabilização, sendo a queda mais acentuada no grupo controle, diferente do resultado de estudos prévios.

A pressão desenvolvida sofreu queda em todos os grupos quando comparada ao período de estabilização. Durante a reperfusão, o grupo que sofreu menor queda deste parâmetro foi aquele submetido ao pós-condicionamento isquêmico. Estudos prévios encontraram menor queda da pressão desenvolvida em grupos submetidos a técnicas de pós-condicionamento. (H. Chen et al. 2008)(Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Chen HT et al. encontraram queda da pressão desenvolvida em todos os grupos durante o período de reperfusão quando comparados o período de estabilização. Em nosso estudo esta queda foi menor no grupo submetido ao pós-condicionamento isquêmico, mostrando algum grau de cardioproteção, porém não houve diferença significativa entre os grupos.

A análise da máxima  $dP/dT$  mostrou redução da mesma durante o período de reperfusão quando comparado aos valores basais nos três grupos. Estudos similares evidenciaram que durante a reperfusão, nos grupos que foram submetidos ao pós-condicionamento ocorre uma tentativa de retorno aos valores basais evidenciado pelo aumento da máxima  $dP/dT$ .(H. Chen et al. 2008)(Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Em nosso estudo o valor da máxima  $dP/dT$  durante o período de reperfusão foi semelhante entre os três grupos sugerindo que o pós-condicionamento não foi efetivo.

Nosso estudo evidenciou queda da mínima  $dP/dT$  durante o período de reperfusão quando comparado aos valores basais. Outros estudos tiveram resultados semelhantes. (H. Chen et al. 2008)

Em nosso estudo nós não observamos o aumento da mínima  $dP/dT$  durante a reperfusão nos grupos submetidos a pós-condicionamento como já foi observado em estudos prévios. (H. Chen et al. 2008)(Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Em nosso estudo não houve diferença entre os valores da mínima  $dP/dT$  durante o período de reperfusão em todos os grupos sugerindo ineficácia do pós-condicionamento.

A avaliação do ritmo cardíaco em nosso estudo foi realizada por cinco parâmetros eletrocardiográficos e pelo índice de severidade de arritmias (ISA), que foi aplicado durante os cinco primeiros minutos da reperfusão e durante todo este período (60 minutos), ambos utilizados em estudos prévios. (H. Chen et al. 2008)(Assis et al. 2004)(Savergnini et al. 2012)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

Em nosso estudo nós fizemos uma modificação do ISA publicado previamente na tentativa de realizar uma análise mais efetiva das arritmias.

A arritmia de reperfusão é descrita em diversos estudos e está presente em maior ou menor intensidade quando ocorre a soltura do clamp da coronária. (H. Chen et al. 2008)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)(Savergnini et al. 2012)

O método usado para quantificar as arritmias varia entre os estudos e a maioria deles trabalha com frequência cardíaca e usa o segmento ST para confirmar a isquemia.(Pinheiro, Fiorelli, and Gomes 2009)(Bopassa et al. 2006)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

Nós analisamos cinco parâmetros eletrocardiográficos isolados, aferimos a duração das arritmias durante os cinco minutos iniciais da reperfusão e durante todo o período de reperfusão.

Estudos prévios mostraram diminuição da frequência cardíaca durante a reperfusão quando comparada ao período de estabilização em grupos não submetidos a pós-condicionamento. Grupos que receberam pós-condicionamento apresentaram menor queda deste parâmetro.

Ao longo da reperfusão houve melhora da frequência cardíaca em

todos os grupos porém nenhum deles atingiu os valores pré-isquêmicos. (Duan et al. 2012)(Tamareille et al. 2009) (Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Outro estudo encontrou taquicardia no início da reperfusão em corações submetidos ou não a pós-condicionamento isquêmico. Porém, esta taquicardia foi mais pronunciada no grupo controle. Em todos eles houve diminuição da frequência ao longo do período de reperfusão.(Pinheiro, Fiorelli, and Gomes 2009)

Nosso estudo mostrou queda da frequência cardíaca em todos grupos, principalmente no grupo controle quando comparados os períodos de estabilização e reperfusão. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Nosso estudo analisou a largura do complexo QRS e não encontrou diferença significativa entre os períodos de estabilização e reperfusão em todos os grupos. Não encontramos estudos prévios avaliando o comportamento do complexo QRS em corações isolados submetidos a isquemia.

Nosso estudo aferiu o valor do intervalo RR e não encontrou diferença significativa entre o período de estabilização e reperfusão ou entre os grupos. Não encontramos estudos prévios avaliando este parâmetro em coração isolado, porém estudos realizados em corações *in vivo* utilizam o segmento ST como marcador de isquemia. (Xin et al. 2010)(Rahman et al. 2011)

Em nosso estudo observamos que o grupo submetido a pós-condicionamento isquêmico apresentou alterações mais pronunciadas no segmento ST que os demais grupos, sugerindo que o pós-condicionamento isquêmico piorou a lesão miocárdica uma vez que as alterações do segmento ST posteriores a isquemia foram mais pronunciadas que aquelas durante a isquemia neste grupo.

Houve diferença estatística na comparação entre o grupo controle e isquêmico e entre o grupo isquêmico e farmacológico.

A análise do intervalo QTc demonstrou diminuição do mesmo durante o período de reperfusão quando comparado ao período de estabilização em todos os grupos sem diferença significativa entre eles.



Fizemos ainda a análise do ritmo cardíaco através do ISA - índice de Severidade de Arritmias, já utilizado em estudos prévios. (Savergnini et al. 2012)(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

A aplicação do ISA durante os cinco primeiros minutos de reperfusão demonstrou que o grupo submetido ao pós-condicionamento farmacológico permaneceu mais tempo em arritmia que os demais, enquanto o grupo submetido a pós-condicionamento isquêmico permaneceu menos tempo em arritmia que o grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A mesma análise foi feita durante todo o período de reperfusão e novamente o grupo pós-condicionamento farmacológico permaneceu mais tempo em arritmia que o grupo controle e o grupo pós-condicionamento isquêmico.

O grupo controle permaneceu menos tempo em arritmia que os grupos que receberam pós-condicionamento sugerindo que o pós-condicionamento não apenas foi inefetivo em proteger o coração das arritmias de isquemia/reperfusão como ainda agravou o fenômeno.

Ferreira et al. estudou o fenômeno de isquemia/reperfusão sem submeter os corações a técnicas de pós-condicionamento. Este grupo perfundiu os corações com Angiotensina-(1-7) durante o período de estabilização, isquemia e reperfusão e concluiu que a Angiotensina-(1-7) tem efeito cardioprotetor, diminuindo a incidência de arritmias de reperfusão. (Ferreira, Santos, and Almeida 2001)

Estudos prévios encontraram menor queda do fluxo coronariano em corações submetidos a pós-condicionamento isquêmico e farmacológico quando comparados ao grupo controle. (Pinheiro, Fiorelli, and Gomes 2009)(Tamareille et al. 2009)(Duan et al. 2012)(Y. Yao et al. 2010)(Feng et al. 2005)

Nosso estudo obteve resultado semelhante. Todos os grupos sofreram queda do fluxo coronariano quando comparados o período de estabilização e o de reperfusão, porém o grupo controle sofreu queda mais pronunciada e o grupo pós-condicionamento isquêmico sofreu diminuição mínima do fluxo coronariano durante o período de reperfusão. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A cardioproteção proporcionada pelo pós-condicionamento é vista não apenas em parâmetros eletrofisiológicos mas também através da dosagem de marcadores de isquemia como a LDH, CK-MB e fração I da Troponina. (Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010)

Em nosso estudo realizamos as dosagens de LDH e CK-MB através de fluorescência e a dosagem de Troponina I através do método ELISA.

Estudos prévios encontraram aumento da LDH durante o período de isquemia. (Bopassa et al. 2006) Em nosso estudo o único grupo que aumentou o valor da LDH durante a isquemia foi o grupo controle, enquanto o grupo pós-condicionamento isquêmico manteve os valores do período de estabilização e o grupo pós-condicionamento farmacológico mostrou valores descendentes desta enzima durante este período.

A dosagem da enzima LDH não evidenciou diferença significativa entre os grupos, diferente do que já foi observado em outros estudos, cujos grupos submetidos a pós-condicionamento mostraram valores diminuídos da LDH durante a reperfusão. O grupo controle manteve o mesmo valor da enzima encontrado no período de isquemia.

Estudos prévios mostraram queda do valor desta enzima durante a reperfusão em grupos submetidos a qualquer técnica de pós-condicionamento.(Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010)

A dosagem de CK-MB efetuada durante todos os períodos do experimento não evidenciou diferença significativa entre os grupos.

Diferente de estudos prévios que encontraram um aumento da CK-MB durante o período de isquemia (Bopassa et al. 2006), em nosso estudo, durante o período de isquemia, os grupos pós-condicionamento isquêmico e controle apresentaram aumento de CK-MB, porém o grupo pós-condicionamento farmacológico iniciou o período de isquemia com valores elevados de CK-MB que depois diminuíram.

A análise separada do período de reperfusão não evidenciou diferença estatística entre os grupos, porém esta enzima esteve mais elevada entre os grupos que receberam pós-condicionamento quando comparada ao controle.

Observamos que os grupos que foram submetidos a pós-condicionamento iniciaram o período de reperfusão com o valor de CK-MB

elevado, mas houve diminuição do mesmo ao longo do tempo, enquanto observamos o inverso no grupo controle, que apresentou elevação desta enzima em um segundo momento durante a reperfusão.

Estudos prévios encontraram diminuição desta enzima durante o período de reperfusão em grupos que foram expostos a técnicas de pós-condicionamento quando comparados ao grupo controle. (Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010)

A Troponina I foi dosada em dez dos dezoito animais através do método ELISA por kit próprio e seguindo as orientações do fabricante.

Durante o período de isquemia os grupos pós-condicionamento farmacológico e controle aumentaram os valores de Troponina I ao longo deste período, porém o grupo pós-condicionamento isquêmico iniciou o período de isquemia com valores menores de Troponina I mas, a partir do 1º. minuto de isquemia ocorreu aumento da Troponina I até o final da mesma.

A análise isolada do período de reperfusão não evidenciou diferença estatística entre os grupos, porém observamos que o grupo pós-condicionamento farmacológico teve menor valor desta enzima quando comparada ao grupo controle, enquanto o grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou aumento desta enzima quando comparado ao grupo controle. A dosagem da Troponina I durante todo o experimento não evidenciou diferença entre os grupos, embora observamos a mesma tendência nos valores de Troponina I que observamos isoladamente no período de reperfusão.

Estudos prévios evidenciaram queda da Troponina I durante o período de reperfusão de grupos submetidos a pós-condicionamento quando comparado ao grupo controle (Bopassa et al. 2006)(Y. Yao et al. 2010), porém, em nosso estudo, nós observamos este comportamento apenas no grupo submetido a pós-condicionamento farmacológico.

Por outro lado, o comportamento das enzimas LDH, CK-MB e Troponina I durante o período de isquemia nos levam a questionar a efetividade da isquemia realizada em nosso estudo.

Descrito por Lautner et al., a Alamandina é um dos mais novos peptídeos do sistema renina angiotensina. (Lautner et al. 2013)

Ainda não existem estudos sobre o papel da Alamandina no fenômeno isquemia/reperfusão e no pós-condicionamento.

Em nosso estudo fizemos duas comparações. Calculamos a médias dos períodos de estabilização e isquemia e comparamos com o período de reperfusão de cada grupo e comparamos também os períodos de estabilização, isquemia e reperfusão de cada grupo separadamente.

Observamos uma diminuição média de 85% da Alamandina durante o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização.

Essa diminuição da Alamandina ocorreu principalmente nos primeiros 15 minutos da isquemia. Ao final da isquemia (30 minutos) ocorreu recuperação discreta do valor encontrado na estabilização.

No grupo controle nós observamos diminuição da Alamandina de 68% no período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia e de 81% quando comparada ao período de estabilização deste grupo.

No grupo pós-condicionamento isquêmico observamos diminuição da Alamandina de 19% no período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia e de 53% quando comparada ao período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico observamos um aumento de 7% no valor médio da Alamandina durante o período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia, principalmente às custas do 5º. minuto. Houve diminuição da mesma durante todo o período de reperfusão quando comparada ao período de estabilização.

Se analisarmos os períodos de estabilização e isquemia de todos os grupos e compararmos ao período de reperfusão somente do grupo controle encontraremos diminuição no valor da Alamandina no período de reperfusão quando comparado aos períodos de isquemia e estabilização, apesar de alguns animais submetidos ao pós-condicionamento terem apresentado valores elevados durante o período de estabilização, elevando a média do grupo e o valor durante o período de isquemia também ter sido mais elevado no grupo de pós-condicionamento farmacológico.

No grupo controle houve uma diminuição de 95% no valor da Alamandina no 5º. minuto de reperfusão quando comparada ao período de isquemia.

Nos grupos que receberam pós-condicionamento ocorreu aumento da Alamandina no 5º. minuto da reperfusão que variou de 2% (comparada ao valor da isquemia no pós-condicionamento isquêmico) até 45% (comparada ao valor da isquemia no pós-condicionamento farmacológico).

No 30º. também ocorreu diminuição da Alamandina quando comparada ao valor da isquemia. No grupo controle observamos uma diminuição de 40% no valor da Alamandina, no grupo pós-condicionamento isquêmico ocorreu diminuição de 12% e no grupo pós-condicionamento farmacológico ocorreu diminuição de 40%.

Ao compararmos o valor médio da Alamandina durante a reperfusão, nós observamos que nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico houve diminuição da mesma quando comparada ao período de isquemia, enquanto no grupo pós-condicionamento farmacológico houve aumento da mesma (7%).

Ao analisarmos cada grupo separadamente observamos que no grupo controle o valor da Alamandina no período de isquemia foi maior que aquele no período de estabilização. Porém, houve aumento da mesma durante o período de reperfusão, que superou o valor encontrado tanto no período de estabilização quanto no de isquemia.

No grupo pós-condicionamento isquêmico observamos que houve aumento da Alamandina no período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia, o qual apresentou diminuição de seus valores quando comparado ao período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico ocorreu diminuição no valor da Alamandina durante o período de reperfusão. O maior valor encontrado foi durante o período de estabilização. Depois houve uma queda durante o período de isquemia e uma queda um pouco maior durante o período de reperfusão.

Tais resultados nos levam a questionar se a cardioproteção conferida pelo pós-condicionamento estaria relacionada ao aumento ou diminuição da Alamandina, uma vez que ocorreu aumento da mesma no período de reperfusão dos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico e ocorreu diminuição na reperfusão do grupo pós-condicionamento farmacológico.

Uma das hipóteses para o seu aumento durante a reperfusão seria a diminuição da sua degradação, porém mais estudos são necessários para esclarecer o fenômeno.

Observamos também que o grupo que apresentou diminuição do valor da Alamandina durante a reperfusão quando comparada a isquemia foi aquele que apresentou maior incidência de arritmia, sugerindo que a Alamandina possa ter algum efeito antiarritmogênico.

Porém, não podemos afirmar que houve efeito cardioprotetor relacionado a Alamandina, uma vez que os grupos que receberam pós-condicionamento isquêmico e farmacológico tiveram comportamentos diferentes.

A Angiotensina-(1-7) é um membro ativo do sistema renina-angiotensina. Ela contrabalança efeitos da Angiotensina II como vasoconstrição, arritmias e efeito pró-trombótico e por isso tem sido foco de diversos estudos.(Kucharewicz et al. 2002b)(R. a. S. Santos, Frézard, and Ferreira 2005)

Alguns autores já estudaram o papel da Angiotensina-(1-7) na cardioproteção. Seja na melhora da performance cardíaca após a isquemia ou na diminuição das arritmias de reperfusão, existe benefício na infusão de Angiotensina-(1-7) antes da isquemia e durante o período de reperfusão.(Ferreira, Santos, and Almeida 2001)(Ferreira, Santos, and Almeida 2002)

Não encontramos estudos mostrando o papel da Angiotensina-(1-7) no fenômeno do pós-condicionamento.

Analisamos a Angiotensina-(1-7) do mesmo modo que analisamos a Alamandina.

Ocorreu uma diminuição média de 15% da mesma durante todo o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização.

No grupo controle ocorreu aumento médio pronunciado da Angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão quando comparada ao período de estabilização (58%) e ao período de isquemia (900%).

Por outro lado, houve diminuição da Angiotensina-(1-7) durante toda a reperfusão de grupos expostos a técnicas de pós-condicionamento, principalmente do grupo pós-condicionamento farmacológico que teve

valores de Angiotensina-(1-7) próximos de zero durante a reperfusão, mostrando uma diminuição de 99% quando comparada ao período de estabilização e de 91% quando comparada ao período de isquemia.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve diminuição de 90% no valor da Angiotensina-(1-7) durante a reperfusão quando comparada ao período de estabilização e de 34% quando comparada ao período de isquemia.

No grupo controle, o valor da Angiotensina-(1-7) no período de reperfusão foi maior que aquele no período de isquemia, que assumiu um valor bem próximo àquele do período de estabilização.

Os grupos submetidos a técnicas de pós-condicionamento apresentaram diminuição de Angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia. Nesses grupos, contrariamente ao que observamos no grupo controle, houve diminuição da Angiotensina-(1-7) durante o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização.

Quando em infusão contínua em estudos sobre isquemia/reperfusão a Angiotensina-(1-7) mostrou um papel cardioprotetor com melhor recuperação de parâmetros fisiológicos e diminuição da incidência de arritmias de reperfusão.(Ferreira, Santos, and Almeida 2002)

Em nosso estudo, os grupos submetidos a métodos de cardioproteção apresentaram diminuição dos níveis de Angiotensina-(1-7), nos levando a questionar se há uma janela de dose para os efeitos benéficos da mesma.

Um estudo prévio mostrou que a Angiotensina-(1-7) em doses próximas às fisiológicas pode ser arritmogênica.(Neves et al. 1997)

Em nosso estudo, o grupo submetido a pós-condicionamento farmacológico apresentou maior incidência de arritmias de reperfusão nos primeiros cinco minutos e ao longo de todo o período de reperfusão que o grupo controle. Porém, houve queda dos valores de Angiotensina-(1-7) no período de reperfusão do grupo pós-condicionamento farmacológico a valores próximos de zero.

O grupo controle, que aumentou o valor da Angiotensina-(1-7) durante a reperfusão, quando comparada ao período de estabilização e

isquemia apresentou nos primeiros 5 minutos de reperfusão mais tempo de arritmia do que o grupo pós-condicionamento isquêmico, porém, durante todo o período de reperfusão, este grupo apresentou uma incidência menor de arritmia que os grupos submetidos a pós-condicionamento.

Tais resultados nos levam a questionar se o valor da Angiotensina-(1-7) durante o período de reperfusão no grupo controle não foi alto o suficiente para ser arritmogênica.

Observamos um comportamento semelhante entre a Alamandina e a Angiotensina-(1-7) no grupo controle. Ambas diminuíram durante o período de isquemia, quando comparada ao período de estabilização, sendo que a Angiotensina-(1-7) apresentou uma discreta diminuição durante o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização. Durante a reperfusão, houve um aumento importante da Angiotensina-(1-7), chegando a triplicar os valores do período de estabilização e neste mesmo período houve um aumento mais modesto da Alamandina.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o comportamento de ambas também foi bem semelhante com diminuição durante o período de isquemia quando comparada ao período de estabilização e diminuição durante a reperfusão, quando comparada ao período de isquemia.

Por outro lado, no grupo pós-condicionamento isquêmico ocorreu aumento da Alamandina durante o período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia e diminuição da Angiotensina-(1-7) durante a reperfusão, quando comparada ao período de isquemia. Ambos os peptídeos apresentaram seu maior valor durante o período de estabilização.

Nosso estudo não explica o por quê da diminuição do valor da Angiotensina-(1-7) nos grupos expostos a pós-condicionamento. A mesma pode ser devida a diminuição da produção ou aumento da degradação da Angiotensina-(1-7).

Realizamos também a dosagem da Angiotensina II em todos os períodos do experimento.



Durante o período de isquemia houve um aumento médio da Angiotensina II de 111%, principalmente às custas do 30º. minuto de isquemia, quando comparada ao período de estabilização.

Os valores encontrados no grupo controle não foram detectados pelos métodos utilizados em nosso estudo.

No grupo pós-condicionamento isquêmico houve um aumento da Angiotensina II durante o período de reperfusão de 396% quando comparada ao período de estabilização e de 135% quando comparada ao período de isquemia.

No grupo pós-condicionamento farmacológico nós observamos diminuição de 95% no valor da Angiotensina II no período de reperfusão quando comparada ao período de estabilização e de 98% quando comparada ao período de isquemia.

Ao analisarmos separadamente cada período de cada grupo, nós observamos que os valores encontrados no grupo controle não foram detectáveis pelo método utilizado.

No grupo pós-condicionamento isquêmico o valor deste peptídeo durante a isquemia foi menor que aquele encontrado durante o período de reperfusão, e os valores encontrados tanto no período de isquemia quanto no período de reperfusão foram menores que aqueles encontrados durante o período de estabilização. O valor encontrado durante o período de reperfusão foi maior que aquele encontrado durante o período de isquemia, porém foi menor que aquele encontrado durante o período de estabilização.

No grupo pós-condicionamento farmacológico o valor da Angiotensina II durante a isquemia foi menor que aquele durante o período de estabilização e discretamente maior que aquele encontrado no período de reperfusão.

Não podemos afirmar que houve efeito cardioprotetor relacionado a Angiotensina II uma vez que os grupos que receberam pós-condicionamento isquêmico e farmacológico tiveram comportamentos diferentes.

Uma vez que a Angiotensina II é responsável por vasoconstrição, efeito pró-fibrótico e proliferativo, deduzimos que seu aumento pode ser

um sinal de ineficiência da cardioproteção no grupo pós-condicionamento isquêmico. Por outro lado, o grupo pós condicionamento isquêmico foi o grupo que apresentou menor incidência de arritmias durante os primeiros 5 minutos de reperfusão.

O grupo pós-condicionamento farmacológico, que apresentou a maior incidência de arritmia nos primeiros 5 minutos de reperfusão e durante todo o período de reperfusão teve valores de Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II próximo de zero neste período e valores de Alamandina também inferiores àqueles encontrados durante o período de isquemia.

O grupo controle teve valores de Angiotensina II próximo a zero e valores de Angiotensina-(1-7) e Alamandina maiores que aqueles registrados na isquemia e apresentou menor incidência de arritmias durante todo o período de reperfusão, sugerindo um efeito antiarrítmico da Angiotensina-(1-7) e da Alamandina.

O grupo pós-condicionamento isquêmico teve a menor incidência de arritmia entre os grupos durante os primeiros 5 minutos de reperfusão. Neste grupo houve aumento da Angiotensina II e da Alamandina no período de reperfusão quando comparada ao período de isquemia e diminuição da Angiotensina-(1-7) quando comparada ao mesmo período.

Mesmo com valores elevados a Angiotensina II parece não ter alterado o efeito antiarrítmico da Angiotensina-(1-7). Porém, a proteção ocorreu apenas durante os primeiros 5 minutos da reperfusão.

Parece que a presença de Angiotensina-(1-7) e de Alamandina é mais importante na diminuição de arritmias do que a ausência de Angiotensina II.

A Alamandina elevada no grupo controle talvez tenha sido um fator antiarritmogênico juntamente com a Angiotensina-(1-7), porém, sozinha, não foi suficiente para proteger os corações do grupo pós-condicionamento farmacológico que tiveram nível de Angiotensina-(1-7) próximo de zero, porém, mais estudos são necessários.

## 8. Conclusões

Mesmo usando protocolos já descritos na literatura nosso estudo não reproduziu os resultados encontrados por outros autores.

Apesar de ter ocorrido isquemia em todos os grupos, conforme demonstrado através do gráfico 6.15.1, a mesma não parece ter sido suficiente para desencadear os mecanismos necessários à cardioproteção.

Ainda não temos na literatura estudos sobre o comportamento do sistema renina-angiotensina e as técnicas de pós-condicionamento, porém, nossos resultados sugerem que técnicas de cardioproteção diminuem a liberação de Angiotensina-(1-7) em corações isolados. Uma das explicações para isso talvez seria diminuição na produção deste peptídeo.

A Alamandina aumentou durante a reperfusão do grupo pós-condicionamento isquêmico e diminuiu durante a reperfusão do grupo pós-condicionamento farmacológico, sendo que no grupo pós-condicionamento isquêmico atingiu valores superiores aos do período de isquemia. Uma vez que a Alamandina durante o período de reperfusão do grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou comportamento semelhante àquele do grupo controle, nós deduzimos que a cardioproteção não foi efetiva em alterar os valores de Alamandina no grupo pós-condicionamento isquêmico. Apesar disso, o grupo pós-condicionamento isquêmico foi o grupo que apresentou a menor incidência de arritmias durante os primeiros 5 minutos de reperfusão, sugerindo que a Alamandina tem efeito antiarrítmico.

A Angiotensina II mostrou um comportamento variável, mostrando-se reduzida durante a reperfusão nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Porém, no grupo pós-condicionamento isquêmico a Angiotensina II alcançou níveis maiores que aqueles do período de isquemia.

No que se refere às arritmias, a presença de Angiotensina-(1-7) juntamente com a Alamandina parece ser fator protetor.

O grupo controle, que permaneceu maior tempo sem arritmias durante a reperfusão apresentou maiores níveis de Alamandina e Angiotensina-(1-7). Neste grupo, os valores de Angiotensina II não foram

detectáveis pelos métodos utilizados.

O grupo pós-condicionamento isquêmico apresentou níveis elevados de Alamandina e níveis próximo a zero de Angiotensina-(1-7) durante a reperfusão e apresentou a menor incidência de arritmias durante os primeiros 5 minutos de reperfusão. Os valores de Angiotensina II aferidos nesse grupo foram superiores àqueles encontrados durante o período de isquemia.

O grupo pós-condicionamento farmacológico apresentou durante o período de reperfusão valores baixos dos três peptídeos. Neste grupo nós observamos a maior incidência de arritmias não apenas durante os primeiros 5 minutos de reperfusão, mas durante todo este período.

A Alamandina parece atuar de modo semelhante a Angiotensina-(1-7) na diminuição das arritmias de reperfusão, e nosso estudo sugere que a presença desses peptídeos é mais importante que a ausência de Angiotensina II na prevenção dessas arritmias. Porém, mais estudos são necessários antes de uma resposta definitiva.

## 9. Referências Bibliográficas

Almeida, A. P., B. C. Frábregas, M. M. Madureira, R. J. Santos, M. J. Campagnole-Santos, and R. A. Santos. 2000a. "Angiotensin-(1-7) Potentiates the Coronary Vasodilatory Effect of Bradykinin in the Isolated Rat Heart." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 33 (6): 709–13.

———. 2000b. "Angiotensin-(1-7) Potentiates the Coronary Vasodilatory Effect of Bradykinin in the Isolated Rat Heart." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 33 (6): 709–13.

Andreka, Gyorgy, Marton Vertesaljai, Gergely Szantho, Gusztav Font, Zsolt Piroth, Geza Fontos, Eszter D. Juhasz, et al. 2007a. "Remote Ischaemic Postconditioning Protects the Heart during Acute Myocardial Infarction in Pigs." *Heart (British Cardiac Society)* 93 (6): 749–52. doi:10.1136/hrt.2006.114504.

———. 2007b. "Remote Ischaemic Postconditioning Protects the Heart during Acute Myocardial Infarction in Pigs." *Heart (British Cardiac Society)* 93 (6): 749–52. doi:10.1136/hrt.2006.114504.

Assis, Nilcéa Leal de Moraes, Otoni Moreira Gomes, Silvério Leonardo Macedo Garcia, and Guilherme Gustavo do Valle. 2004. "Effects of Propafenone Associated with Propofol on Myocardial Contractility, Heart Rate, Coronary Flow, and the Incidence of Arrhythmia in Isolated Hearts of Rats." *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 82 (1): 88–93, 82–87.

Averill, David B., Yuichiro Ishiyama, Mark C. Chappell, and Carlos M. Ferrario. 2003. "Cardiac Angiotensin-(1-7) in Ischemic Cardiomyopathy." *Circulation* 108 (17): 2141–46. doi:10.1161/01.CIR.0000092888.63239.54.

Bader, M., J. Peters, O. Baltatu, D. N. Müller, F. C. Luft, and D. Ganten. 2001. "Tissue Renin-Angiotensin Systems: New Insights from Experimental Animal Models in Hypertension Research." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 79 (2-3): 76–102.

Basso, N., and N. A. Terragno. 2001. "History about the Discovery of the Renin-Angiotensin System." *Hypertension* 38 (6): 1246–49.

Bell, Robert M., Mihaela M. Mocanu, and Derek M. Yellon. 2011. "Retrograde Heart Perfusion: The Langendorff Technique of Isolated Heart Perfusion." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (6): 940–50. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.

Bernauer, W., and I. Ernenputsch. 1988. "Antagonistic Effects of Alpha-Adrenoceptor Blocking Agents on Arrhythmias, Enzyme Release, and Myocardial Necrosis in Isolated Rat Hearts with Coronary Occlusion and Reperfusion." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338 (1): 88–95.

Bopassa, Jean-Christophe, René Ferrera, Odile Gateau-Roesch, Elisabeth Couture-Lepetit, and Michel Ovize. 2006. "PI 3-Kinase Regulates the Mitochondrial Transition Pore in Controlled Reperfusion and Postconditioning." *Cardiovascular Research* 69 (1): 178–85. doi:10.1016/j.cardiores.2005.07.014.

Braszko, J. J., J. Własienko, W. Koziółkiewicz, A. Janecka, and K. Wiśniewski. 1991. "The 3-7 Fragment of Angiotensin II Is Probably Responsible for Its Psychoactive Properties." *Brain Research* 542 (1): 49–54.

Campbell, Duncan J. 2003. "The Renin-Angiotensin and the Kallikrein-Kinin Systems." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (6): 784–91.

Carey, Robert M., and Helmy M. Siragy. 2003. "Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation." *Endocrine Reviews* 24 (3): 261–71. doi:10.1210/er.2003-0001.

Chappell, M. C., N. T. Pirro, A. Sykes, and C. M. Ferrario. 1998. "Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme." *Hypertension* 31 (1 Pt 2): 362–67.

Chen, Hong-tao, Cheng-xiang Yang, Heng Li, Cheng-jing Zhang, Xian-jie Wen, Jun Zhou, You-ling Fan, Teng Huang, and Yin-ming Zeng. 2008. "Cardioprotection of Sevoflurane Postconditioning by Activating Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 in Isolated Rat Hearts." *Acta Pharmacologica Sinica* 29 (8): 931–41. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00824.x.

Chen, Qun, Thomas Ross, Ying Hu, and Edward J. Lesnefsky. 2012. "Blockade of Electron Transport at the Onset of Reperfusion Decreases Cardiac Injury in Aged Hearts by Protecting the Inner Mitochondrial Membrane." *Journal of Aging Research* 2012: 753949. doi:10.1155/2012/753949.

Dai, An-lu, Li-hua Fan, Feng-jiang Zhang, Mei-juan Yang, Jing Yu, Jun-kuan Wang, Tao Fang, Gang Chen, Li-na Yu, and Min Yan. 2010. "Effects of Sevoflurane Preconditioning and Postconditioning on Rat Myocardial Stunning in Ischemic Reperfusion Injury." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 11 (4): 267–74. doi:10.1631/jzus.B0900390.

Deyhimy, David I., Neal W. Fleming, Ian G. Brodtkin, and Hong Liu. 2007. "Anesthetic Preconditioning Combined with Postconditioning Offers No Additional Benefit over Preconditioning or Postconditioning Alone." *Anesthesia and Analgesia* 105 (2): 316–24. doi:10.1213/01.ane.0000267524.71445.e7.

Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, et al. 2000. "A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9." *Circulation Research* 87 (5): E1–9.

Duan, Xin, Bingyang Ji, Xiaohua Wang, Jinping Liu, Zhe Zheng, Cun Long, Yue Tang, and Shengshou Hu. 2012. "Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in Different Protocols of Ischemic Conditioning in an Isolated Rat Heart Model." *Cardiology* 122 (1): 36–43. doi:10.1159/000338149.

Duan, Xin, Bingyang Ji, Kun Yu, Jinping Liu, Feilong Hei, and Cun Long. 2011. "Pharmacological Postconditioning Protects Isolated Rat Hearts against Ischemia-Reperfusion Injury: The Role of Mitochondrial Permeability Transition Pore." *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)* 57 (3): 197–202. doi:10.1097/MAT.0b013e31820bffc1.

Fang, Neng-Xin, Yun-Tai Yao, Chun-Xia Shi, and Li-Huan Li. 2010. "Attenuation of Ischemia-Reperfusion Injury by Sevoflurane Postconditioning Involves Protein Kinase B and Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Activation in Isolated Rat Hearts." *Molecular Biology Reports* 37 (8): 3763–69. doi:10.1007/s11033-010-0030-5.

Feng, Jianhua, Eliana Lucchinetti, Preeti Ahuja, Thomas Pasch, Jean-Claude Perriard, and Michael Zaugg. 2005. "Isoflurane Postconditioning Prevents Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore through Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3beta." *Anesthesiology* 103 (5): 987–95.

Ferreira, A. J., R. A. Santos, and A. P. Almeida. 2001. "Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/reperfusion." *Hypertension* 38 (3 Pt 2): 665–68.

Ferreira, A. J., R. a. S. Santos, and A. P. Almeida. 2002. "Angiotensin-(1-7) Improves the Post-Ischemic Function in Isolated Perfused Rat Hearts." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 35 (9): 1083–90.

Gironacci, M. M., E. Adler-Graschinsky, C. Peña, and M. A. Enero. 1994. "Effects of Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) on the Release of [3H]norepinephrine from Rat Atria." *Hypertension* 24 (4): 457–60.

Gomes, Otoni Moreira, Mônica de Mônico Magalhães, Rafael Diniz Abrantes, and Elias Kallás. 2011. "Pantoprazole Provides Myocardial Protection Similar to Ischemic Preconditioning: Experimental Study of Isolated Hearts of Rats." *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira De Cirurgia Cardiovascular* 26 (3): 433–39.

Gong, Jun-Song, Yun-Tai Yao, Neng-Xin Fang, and Li-Huan Li. 2012. "Sevoflurane Postconditioning Attenuates Reperfusion-Induced Ventricular Arrhythmias in Isolated Rat Hearts Exposed to Ischemia/reperfusion Injury." *Molecular Biology Reports* 39 (6): 6417–25. doi:10.1007/s11033-012-1447-9.

Gritsopoulos, G., E. K. Iliodromitis, A. Zoga, D. Farmakis, E. Demerouti, A. Papalois, I. A. Paraskevaidis, and D. T. Kremastinos. 2009. "Remote Postconditioning Is More Potent than Classic Postconditioning in Reducing the Infarct Size in Anesthetized Rabbits." *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 23 (3): 193–98. doi:10.1007/s10557-009-6168-5.



Habiyakare, Belthrand, Hiba Alsaadon, Michael L. Mathai, Alan Hayes, and Anthony Zulli. 2014. "Reduction of Angiotensin A and Alamandine Vasoactivity in the Rabbit Model of Atherogenesis: Differential Effects of Alamandine and Ang(1-7)." *International Journal of Experimental Pathology* 95 (4): 290–95. doi:10.1111/iep.12087.

He, Wei, Feng-jiang Zhang, Shao-ping Wang, Gang Chen, Cong-cong Chen, and Min Yan. 2008. "Postconditioning of Sevoflurane and Propofol Is Associated with Mitochondrial Permeability Transition Pore." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9 (2): 100–108. doi:10.1631/jzus.B0710586.

Jin, Chunhong, Jinrong Wu, Makino Watanabe, Takao Okada, and Takafumi Iesaki. 2012. "Mitochondrial K<sup>+</sup> Channels Are Involved in Ischemic Postconditioning in Rat Hearts." *The Journal of Physiological Sciences: JPS* 62 (4): 325–32. doi:10.1007/s12576-012-0206-y.

Jin, Zhu-Qiu, Edward J. Goetzl, and Joel S. Karliner. 2004. "Sphingosine Kinase Activation Mediates Ischemic Preconditioning in Murine Heart." *Circulation* 110 (14): 1980–89. doi:10.1161/01.CIR.0000143632.06471.93.

Kim, S., and H. Iwao. 2000. "Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases." *Pharmacological Reviews* 52 (1): 11–34.

Kucharewicz, I., R. Pawlak, T. Matys, E. Chabielska, and W. Buczek. 2002a. "Angiotensin-(1-7): An Active Member of the Renin-Angiotensin System." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 53 (4 Pt 1): 533–40.

———. 2002b. "Angiotensin-(1-7): An Active Member of the Renin-Angiotensin System." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 53 (4 Pt 1): 533–40.

Lacerda, Lydia, Sarin Somers, Lionel H. Opie, and Sandrine Lecour. 2009. "Ischaemic Postconditioning Protects against Reperfusion Injury via the SAFE Pathway." *Cardiovascular Research* 84 (2): 201–8. doi:10.1093/cvr/cvp274.

Lautner, Roberto Queiroga, Daniel C. Villela, Rodrigo A. Fraga-Silva, Neiva Silva, Thiago Verano-Braga, Fabiana Costa-Fraga, Joachim Jankowski, et al.

2013. "Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin System." *Circulation Research* 112 (8): 1104–11. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301077.

Lecour, Sandrine, Naushaad Suleman, Graeme A. Deuchar, Sarin Somers, Lydia Lacerda, Barbara Huisamen, and Lionel H. Opie. 2005. "Pharmacological Preconditioning with Tumor Necrosis Factor-Alpha Activates Signal Transducer and Activator of Transcription-3 at Reperfusion without Involving Classic Prosurvival Kinases (Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase)." *Circulation* 112 (25): 3911–18. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581058.

Ling Ling, J., G. T. C. Wong, L. Yao, Z. Xia, and M. G. Irwin. 2010. "Remote Pharmacological Post-Conditioning by Intrathecal Morphine: Cardiac Protection from Spinal Opioid Receptor Activation." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 54 (9): 1097–1104. doi:10.1111/j.1399-6576.2010.02295.x.

Loot, Annemarieke E., Anton J. M. Roks, Robert H. Henning, René A. Tio, Albert J. H. Suurmeijer, Frans Boomsma, and Wiek H. van Gilst. 2002. "Angiotensin-(1-7) Attenuates the Development of Heart Failure after Myocardial Infarction in Rats." *Circulation* 105 (13): 1548–50.

Lubbe, W. F., P. S. Daries, and L. H. Opie. 1978. "Ventricular Arrhythmias Associated with Coronary Artery Occlusion and Reperfusion in the Isolated Perfused Rat Heart: A Model for Assessment of Antifibrillatory Action of Antiarrhythmic Agents." *Cardiovascular Research* 12 (4): 212–20.

Ludman, Andrew J., Derek M. Yellon, and Derek J. Hausenloy. 2010. "Cardiac Preconditioning for Ischaemia: Lost in Translation." *Disease Models & Mechanisms* 3 (1-2): 35–38. doi:10.1242/dmm.003855.

Ma, Lei-Lei, Fei-Jiang Zhang, Fei-Juan Kong, Ling-Bo Qian, Hong Ma, Jian-An Wang, and Min Yan. 2013. "Hypertrophied Myocardium Is Refractory to Sevoflurane-Induced Protection with Alteration of Reperfusion Injury Salvage Kinase/glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Signals." *Shock (Augusta, Ga.)* 40 (3): 217–21. doi:10.1097/SHK.0b013e3182a0674b.

Metzger, R., M. Bader, T. Ludwig, C. Berberich, B. Bunnemann, and D. Ganten. 1995. "Expression of the Mouse and Rat Mas Proto-Oncogene in the Brain and Peripheral Tissues." *FEBS Letters* 357 (1): 27–32. 104

Moriguchi, Akira, Hajime Otani, Kei Yoshioka, Takayuki Shimazu, Masanori Fujita, Toru Okazaki, Daisuke Sato, Shiori Kyoji, and Toshiji Iwasaka. 2010. "Inhibition of Contractile Activity during Postconditioning Enhances Cardioprotection by Restoring Sarcolemmal Dystrophin through Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 74 (11): 2393–2402.

Neves, L. A., A. P. Almeida, M. C. Khosla, M. J. Campagnole-Santos, and R. A. Santos. 1997. "Effect of Angiotensin-(1-7) on Reperfusion Arrhythmias in Isolated Rat Hearts." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 30 (6): 801–9.

Nguyen, Geneviève. 2007. "The (pro)renin Receptor: Pathophysiological Roles in Cardiovascular and Renal Pathology." *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 16 (2): 129–33. doi:10.1097/MNH.0b013e328040bfab.

Peach, M. J. 1977. "Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action." *Physiological Reviews* 57 (2): 313–70.

Phillips, M. I., E. A. Speakman, and B. Kimura. 1993. "Levels of Angiotensin and Molecular Biology of the Tissue Renin Angiotensin Systems." *Regulatory Peptides* 43 (1-2): 1–20.

Pinheiro, Bruno Botelho, Alfredo Inácio Fiorelli, and Otoni Moreira Gomes. 2009. "Effects of Ischemic Postconditioning on Left Ventricular Function of Isolated Rat Hearts." *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira De Cirurgia Cardiovascular* 24 (1): 31–37.

Pinheiro, Bruno Botelho, Alfredo Inácio Fiorelli, Otoni Moreira Gomes, and Borut Gersak. 2010. "Cardiac Effects of Postconditioning Depend Critically on the Duration of Reperfusion and Reocclusion Episodes." *The Heart Surgery Forum* 13 (1): E52–56. doi:10.1532/HSF98.20091135.

Rahman, Siamak, Jingyuan Li, Jean Chrisostome Bopassa, Soban Umar, Andrea Iorga, Parisa Partownavid, and Mansoureh Eghbali. 2011. "Phosphorylation of GSK-3 $\beta$  Mediates Intralipid-Induced Cardioprotection against Ischemia/reperfusion Injury." *Anesthesiology* 115 (2): 242–53. doi:10.1097/ALN.0b013e318223b8b9.

Santos, R. A., and M. J. Campagnole-Santos. 1994. "Central and Peripheral Actions of Angiotensin-(1-7)." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 27 (4): 1033–47.

Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, and S. P. Andrade. 2000. "Angiotensin-(1-7): An Update." *Regulatory Peptides* 91 (1-3): 45–62.

Santos, R. a. S., F. Frézard, and A. J. Ferreira. 2005. "Angiotensin-(1-7): Blood, Heart, and Blood Vessels." *Current Medicinal Chemistry. Cardiovascular and Hematological Agents* 3 (4): 383–91.

Santos, Robson A. S., Anderson J. Ferreira, Ana Paula Nadu, Aline N. G. Braga, Alvair Pinto de Almeida, Maria José Campagnole-Santos, Ovidiu Baltatu, Radu Iliescu, Timothy L. Reudelhuber, and Michael Bader. 2004. "Expression of an Angiotensin-(1-7)-Producing Fusion Protein Produces Cardioprotective Effects in Rats." *Physiological Genomics* 17 (3): 292–99. doi:10.1152/physiolgenomics.00227.2003.

Santos, Robson A. S., Ana C. Simoes e Silva, Christine Maric, Denise M. R. Silva, Raquel Pillar Machado, Insa de Buhr, Silvia Heringer-Walther, et al. 2003. "Angiotensin-(1-7) Is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor Mas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8258–63. doi:10.1073/pnas.1432869100.

Savergnini, S. Q., A. M. Reis, R. a. S. Santos, P. E. B. Santos, A. J. Ferreira, and A. P. Almeida. 2012. "Effects of Short-Term Administration of Estradiol on Reperfusion Arrhythmias in Rats of Different Ages." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 45 (12): 1248–54.

Tamarelle, Sophie, Nehmat Ghaboura, Frederic Treguer, Dalia Khachman, Anne Croué, Daniel Henrion, Alain Furber, and Fabrice Prunier. 2009.

"Myocardial Reperfusion Injury Management: Erythropoietin Compared with Postconditioning." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (6): H2035–43. doi:10.1152/ajpheart.00472.2009.

Tang, Y., A. Mennander, N. Oksala, M. Atalay, H. Syvala, A. Lagerstedt, M. Kuuslahti, et al. 2010. "Postconditioning and Remote Postconditioning of Ischemic Rat Cardiac Grafts." *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes* 45 (1): 1–8. doi:10.1159/000315479.

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie, and A. J. Turner. 2000. "A Human Homolog of Angiotensin-Converting Enzyme. Cloning and Functional Expression as a Captopril-Insensitive Carboxypeptidase." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (43): 33238–43. doi:10.1074/jbc.M002615200.

Turner, Anthony J., and Nigel M. Hooper. 2002. "The Angiotensin-Converting Enzyme Gene Family: Genomics and Pharmacology." *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (4): 177–83.

Walther, T., N. Wessel, N. Kang, A. Sander, C. Tschöpe, H. Malberg, M. Bader, and A. Voss. 2000. "Altered Heart Rate and Blood Pressure Variability in Mice Lacking the Mas Protooncogene." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 33 (1): 1–9.

Wollert, K. C., and H. Drexler. 1999. "The Renin-Angiotensin System and Experimental Heart Failure." *Cardiovascular Research* 43 (4): 838–49.

Wright, J. W., and J. W. Harding. 1995. "Brain Angiotensin Receptor Subtypes AT1, AT2, and AT4 and Their Functions." *Regulatory Peptides* 59 (3): 269–95.

Xin, Ping, Wei Zhu, Jing Li, Shixin Ma, Lixing Wang, Mingya Liu, Jingbo Li, Meng Wei, and Andrew N. Redington. 2010. "Combined Local Ischemic Postconditioning and Remote Perconditioning Recapitulate Cardioprotective Effects of Local Ischemic Preconditioning." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 298 (6): H1819–31. doi:10.1152/ajpheart.01102.2009.

Yao, Yun-tai, Neng-xin Fang, Chun-xia Shi, and Li-huan Li. 2010. "Sevoflurane Postconditioning Protects Isolated Rat Hearts against Ischemia-Reperfusion Injury." *Chinese Medical Journal* 123 (10): 1320–28.

Yao, Yun-Tai, Li-Huan Li, Lei Chen, Wei-Peng Wang, Li-Bing Li, and Chang-Qing Gao. 2010. "Sevoflurane Postconditioning Protects Isolated Rat Hearts against Ischemia-Reperfusion Injury: The Role of Radical Oxygen Species, Extracellular Signal-Related Kinases 1/2 and Mitochondrial Permeability Transition Pore." *Molecular Biology Reports* 37 (5): 2439–46. doi:10.1007/s11033-009-9755-4.

Ye, Minghao, Jan Wysocki, Parveen Naaz, Mohammad Reza Salabat, Michael S. LaPointe, and Daniel Batlle. 2004. "Increased ACE 2 and Decreased ACE Protein in Renal Tubules from Diabetic Mice: A Renoprotective Combination?" *Hypertension* 43 (5): 1120–25. doi:10.1161/01.HYP.0000126192.27644.76.

Yu, Li-na, Jing Yu, Feng-jiang Zhang, Mei-juan Yang, Ting-ting Ding, Jun-kuan Wang, Wei He, Tao Fang, Gang Chen, and Min Yan. 2010. "Sevoflurane Postconditioning Reduces Myocardial Reperfusion Injury in Rat Isolated Hearts via Activation of PI3K/Akt Signaling and Modulation of Bcl-2 Family Proteins." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 11 (9): 661–72. doi:10.1631/jzus.B1000155.

Zhang, Yan, Fengxiang Lv, Li Jin, Wei Peng, Ruisheng Song, Jianjie Ma, Chun-Mei Cao, and Rui-Ping Xiao. 2011. "MG53 Participates in Ischaemic Postconditioning through the RISK Signalling Pathway." *Cardiovascular Research* 91 (1): 108–15. doi:10.1093/cvr/cvr029.

Zhao, Zhi-Qing. 2010. "Postconditioning in Reperfusion Injury: A Status Report." *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 24 (3): 265–79. doi:10.1007/s10557-010-6240-1.

Zheng, Zhoupeng, Meijuan Yang, Fengjiang Zhang, Jing Yu, Junkuan Wang, Leilei Ma, Yanbo Zhong, et al. 2011. "Gender-Related Difference of Sevoflurane Postconditioning in Isolated Rat Hearts: Focus on Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt Signaling." *The Journal of Surgical Research* 170 (1): e3–9. doi:10.1016/j.jss.2011.04.035.

## 10. Apêndice

Conforme discutido no item 6 da dissertação, os grupos foram analisados dois a dois ( $p < 0,05$ ):

- Grupo Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico
- Grupo Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico
- Grupo Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

Aferimos ainda a pressão máxima, mínima e média, analisamos os três grupos e também os grupos dois a dois.

A análise dos peptídeos foi realizada em grupos e também em animais individualmente. Foi feito também a análise da média dos grupos e de cada animal comparado ao período de estabilização.

Após o experimento os corações foram preparados conforme descrito no item 4.9 a fim de confirmar a efetividade da isquemia.

### 1. Pressão Máxima

Gráfico 1.1: pressão máxima - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

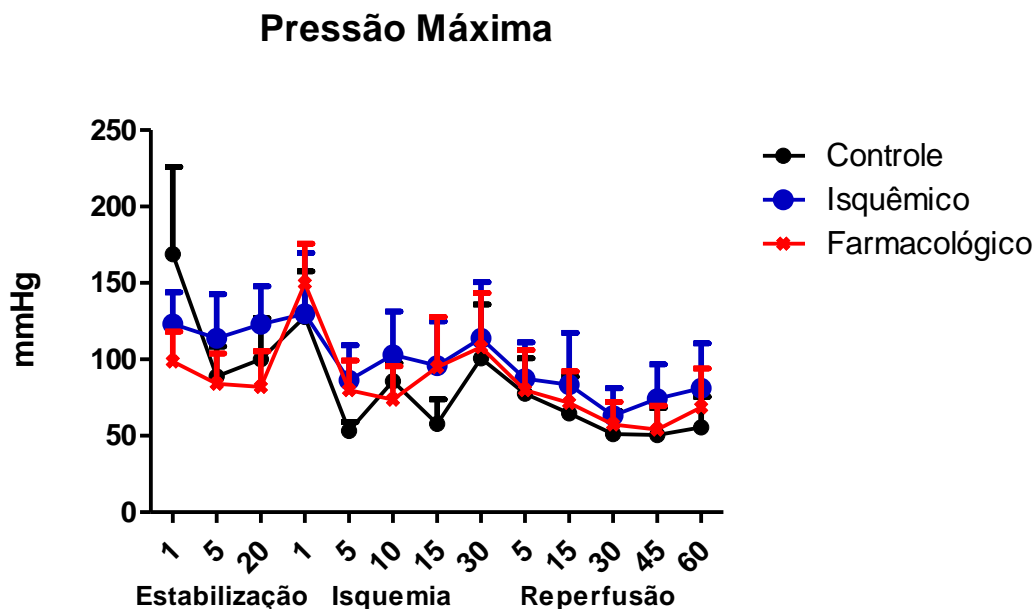


Gráfico 1.1: pressão máxima alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste aplicado: Bonferroni

Gráfico 1.2: pressão máxima - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

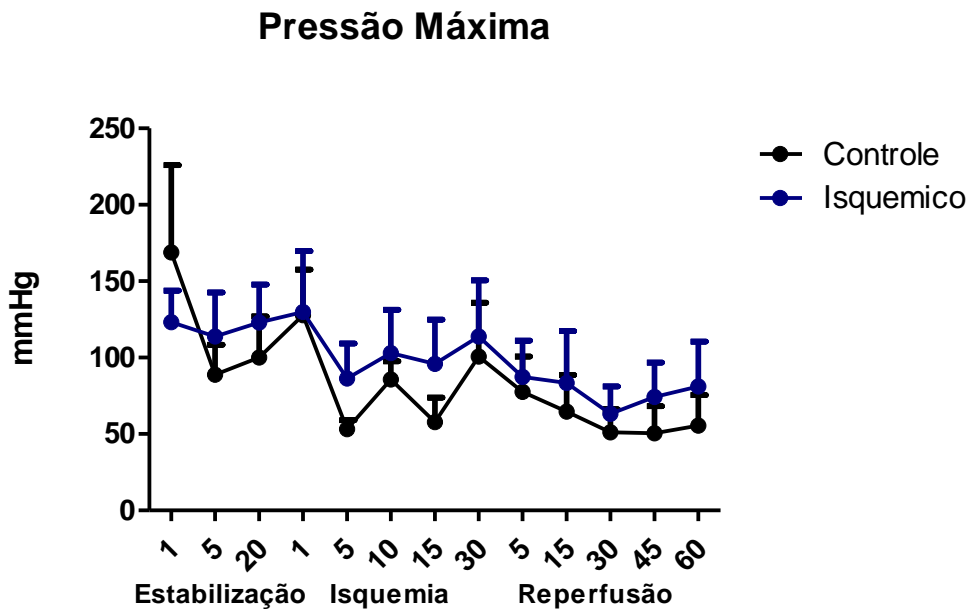


Gráfico 1.2: pressão máxima encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 1.3: pressão máxima - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

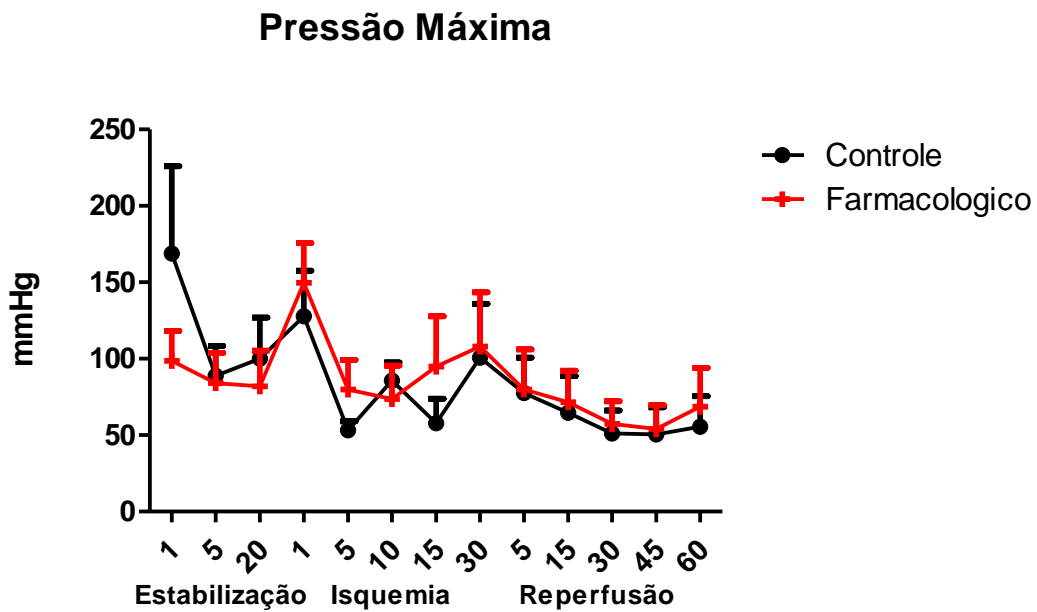


Gráfico 1.3: pressão máxima encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.



Gráfico 1.4: pressão máxima - Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

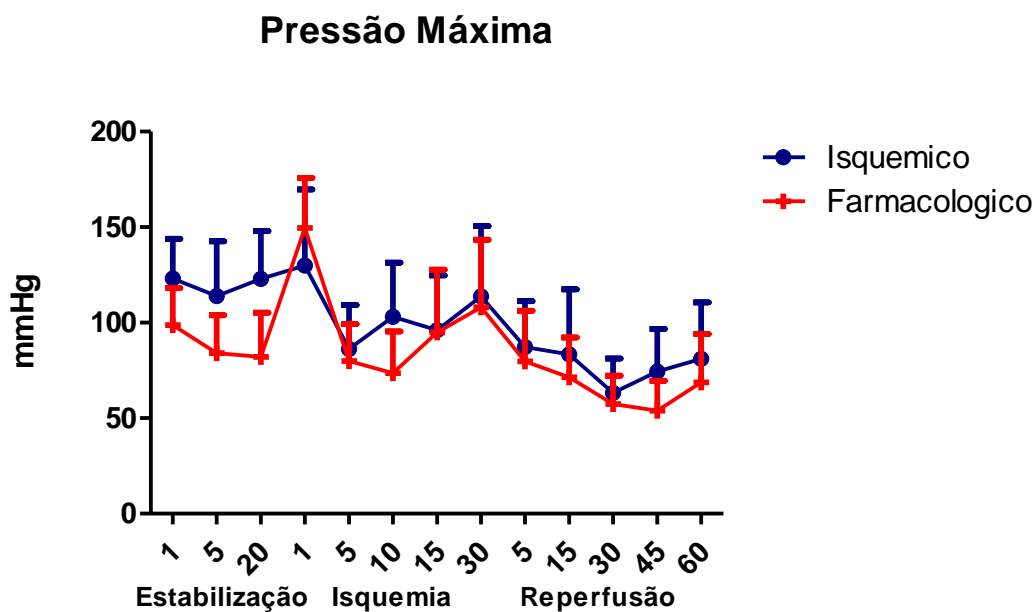


Gráfico 1.4: pressão máxima encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 2. Pressão Mínima

Gráfico 2.1: pressão mínima – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

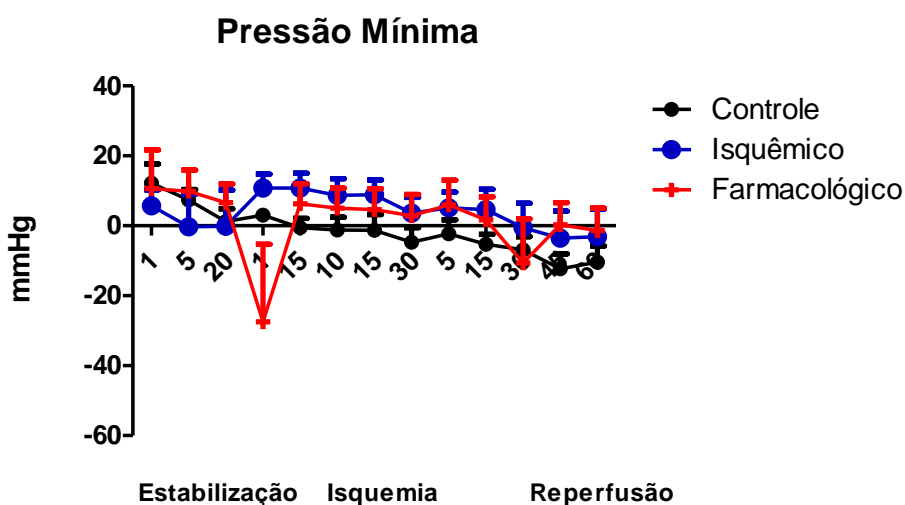
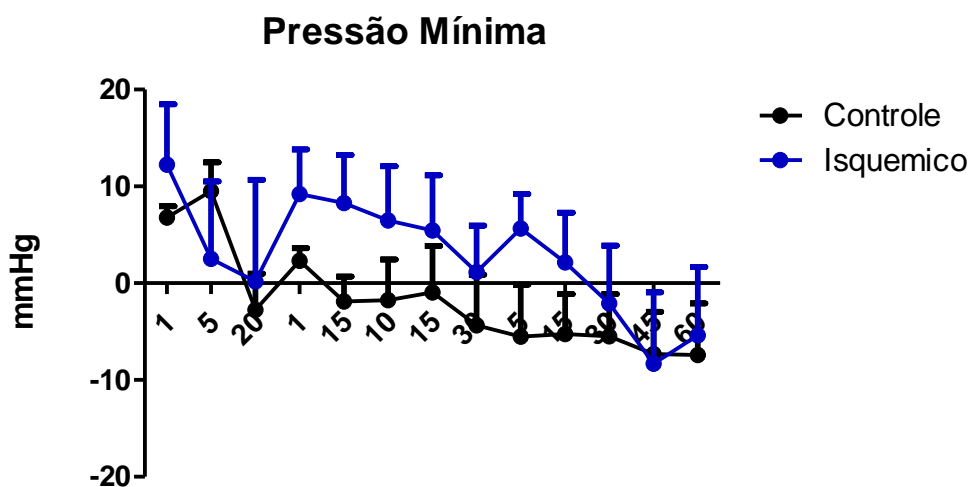


Gráfico 2.1: pressão mínima alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

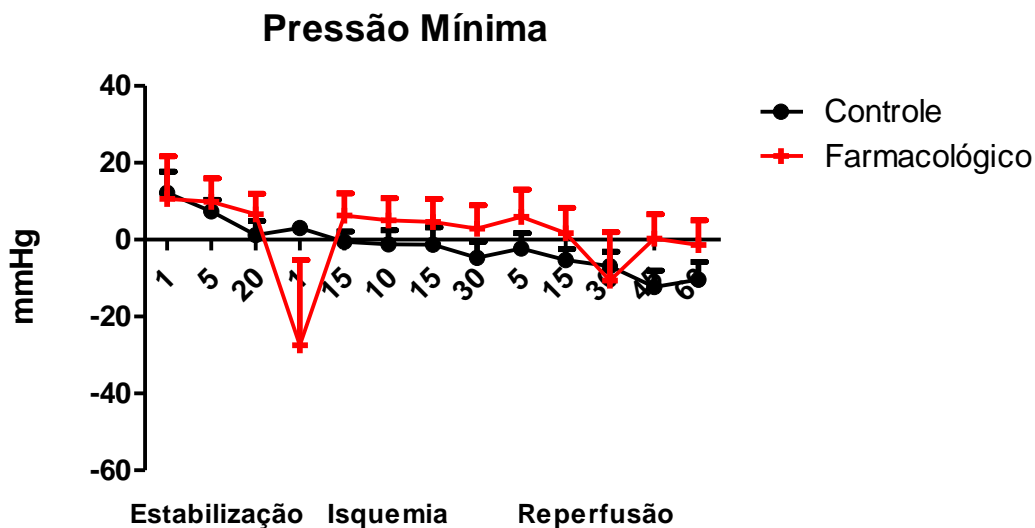
Gráfico 2.2: pressão mínima – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico



**Estabilização Isquemia Reperusão**

Gráfico 2.2: pressão mínima encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 2.3: pressão mínima – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico



**Estabilização Isquemia Reperusão**

Gráfico 2.3: pressão mínima encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 2.4: pressão mínima – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

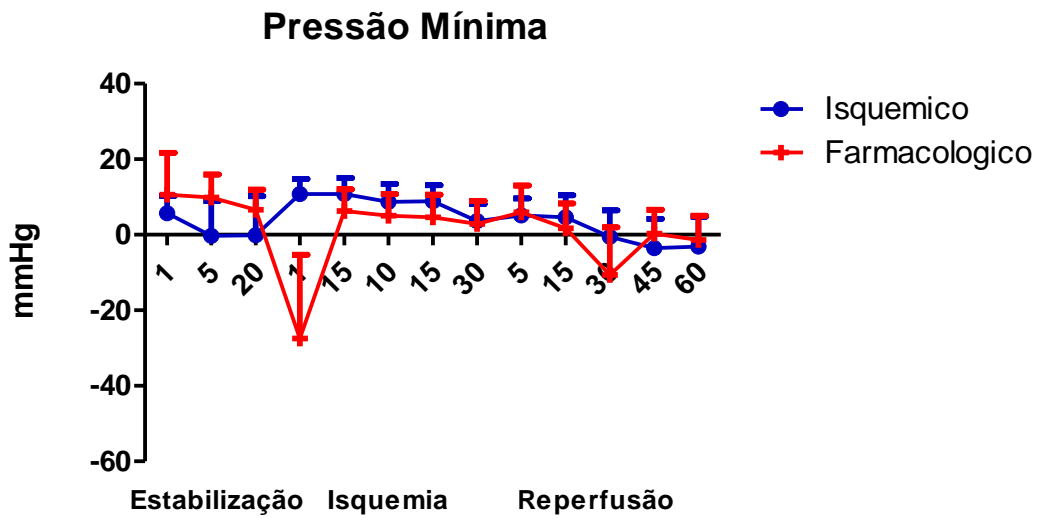


Gráfico 2.4: pressão mínima encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

### 3. Pressão Média

Gráfico 3.1: pressão média – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

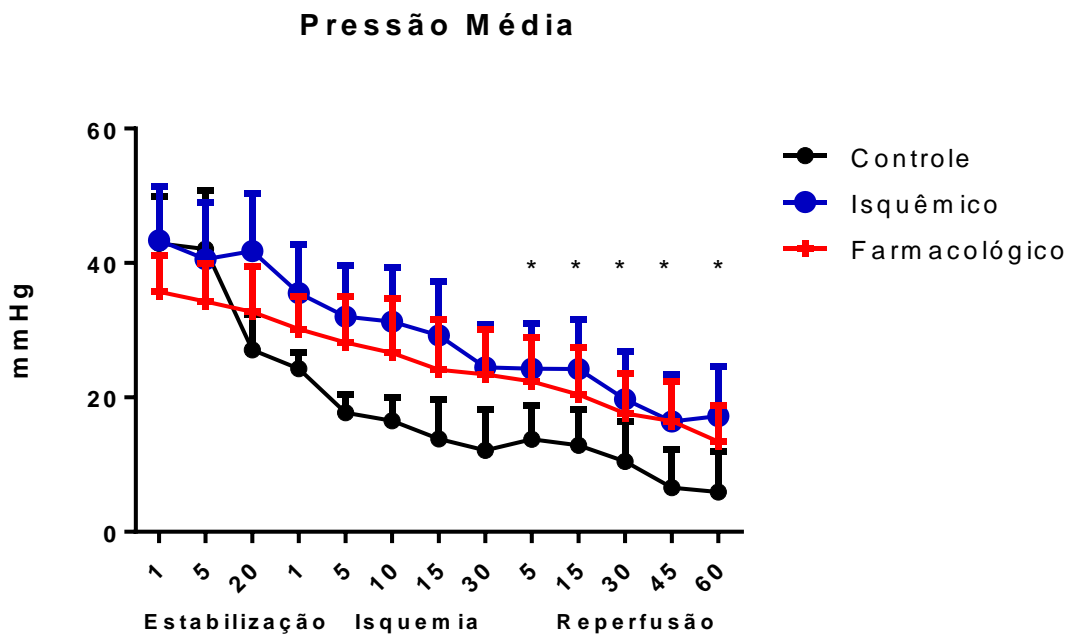


Gráfico 3.1: pressão média alcançada durante os três períodos do experimento nos três grupos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 3.2: pressão média – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

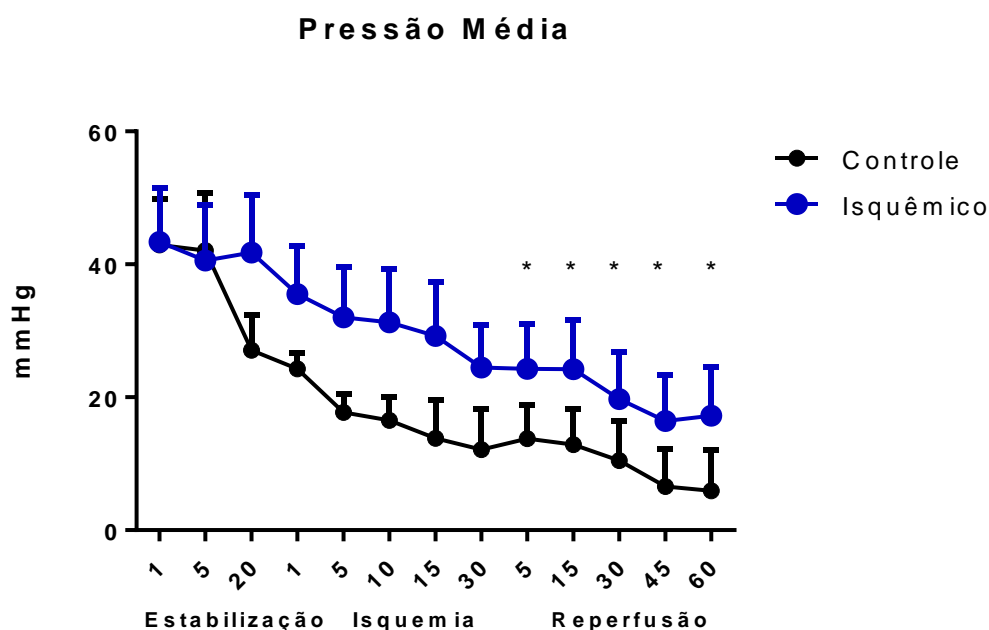


Gráfico 3.2: pressão média encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 3.3: pressão média – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

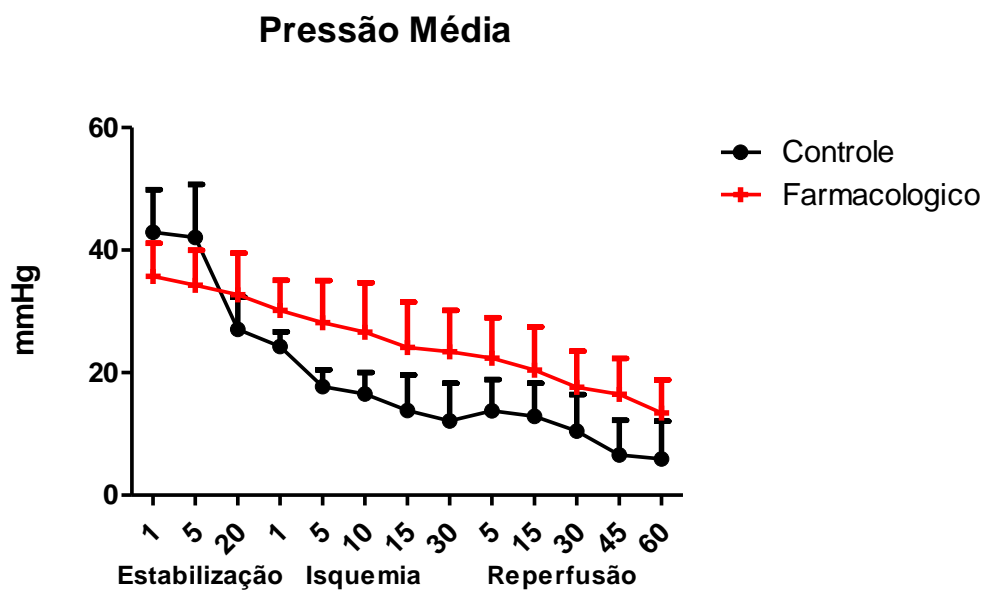


Gráfico 3.3: pressão média encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 3.4: pressão média – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

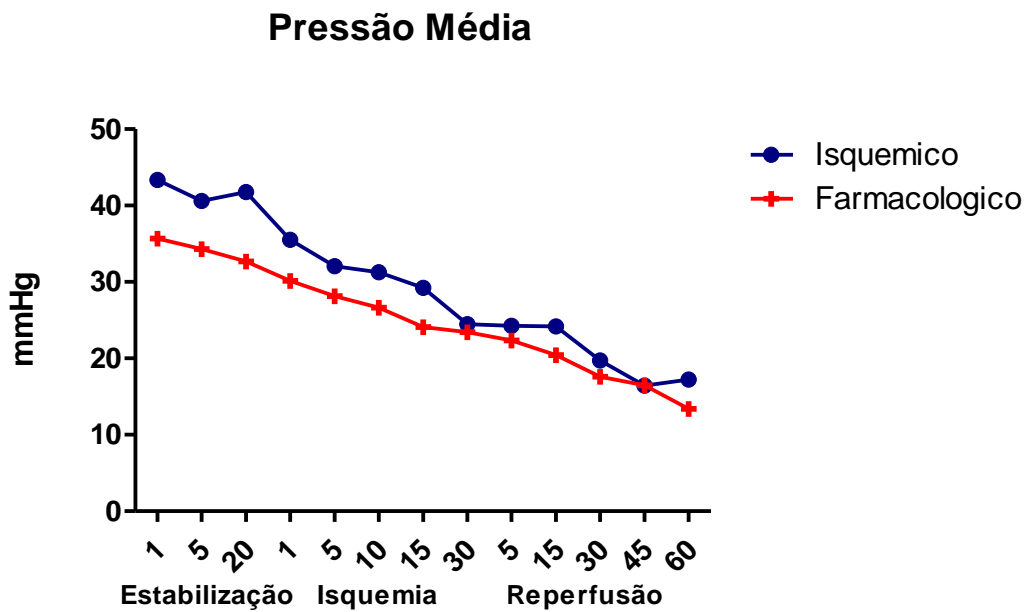


Gráfico 3.4: pressão média encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

#### 4. Pressão Desenvolvida

Gráfico 4.1: pressão desenvolvida – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

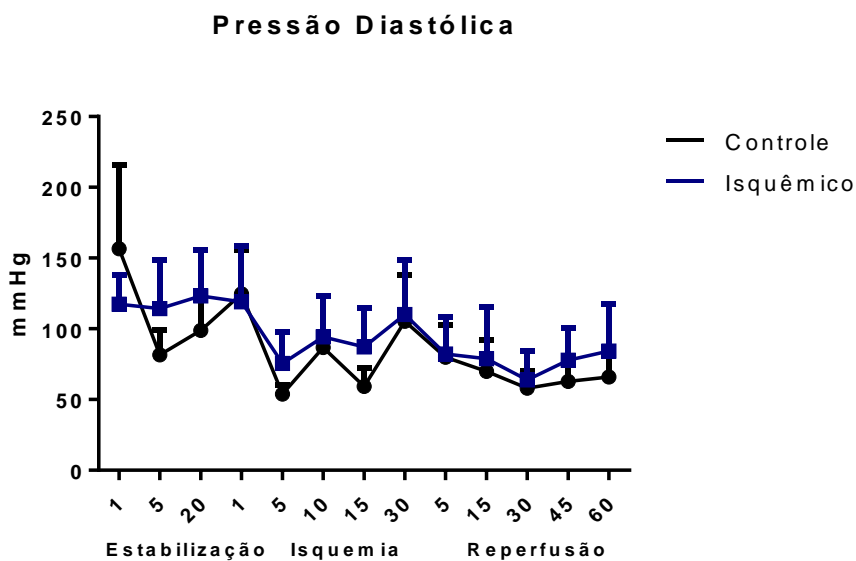


Gráfico 4.1: pressão desenvolvida encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 4.2: pressão desenvolvida - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

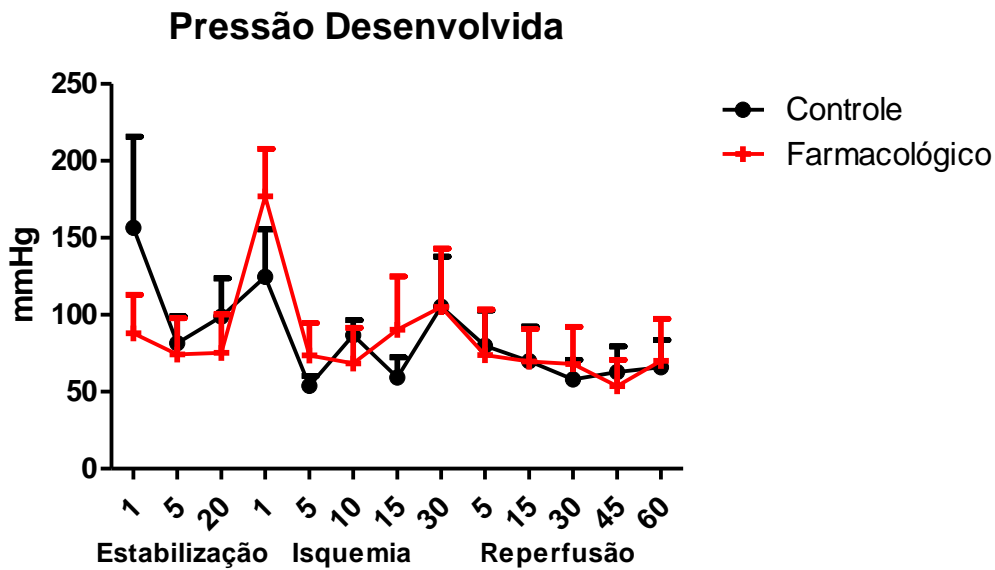


Gráfico 4.2: pressão desenvolvida encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 4.3: pressão desenvolvida - Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

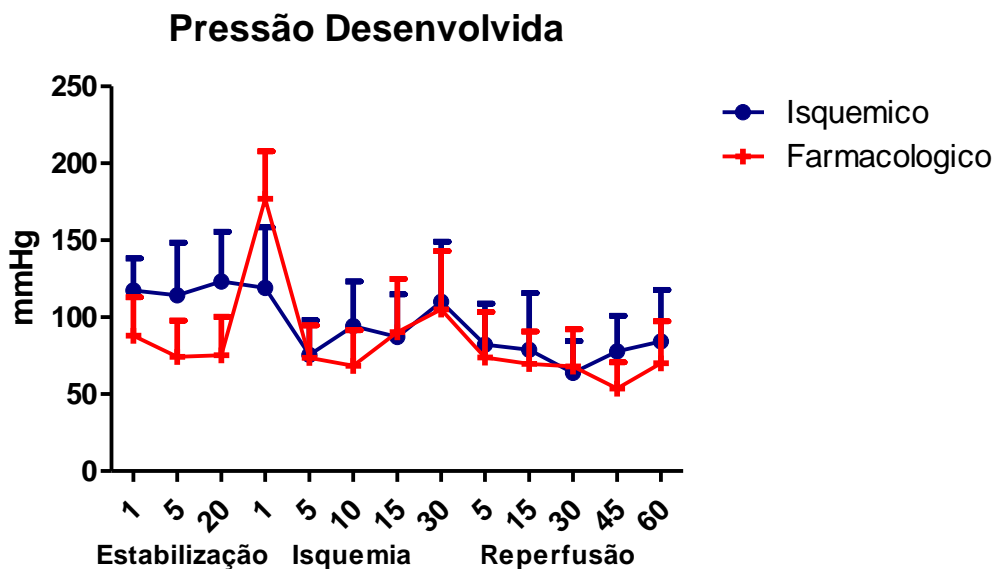


Gráfico 4.3: pressão desenvolvida encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 5. Pressão Sistólica Final

Gráfico 5.1: pressão sistólica final – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

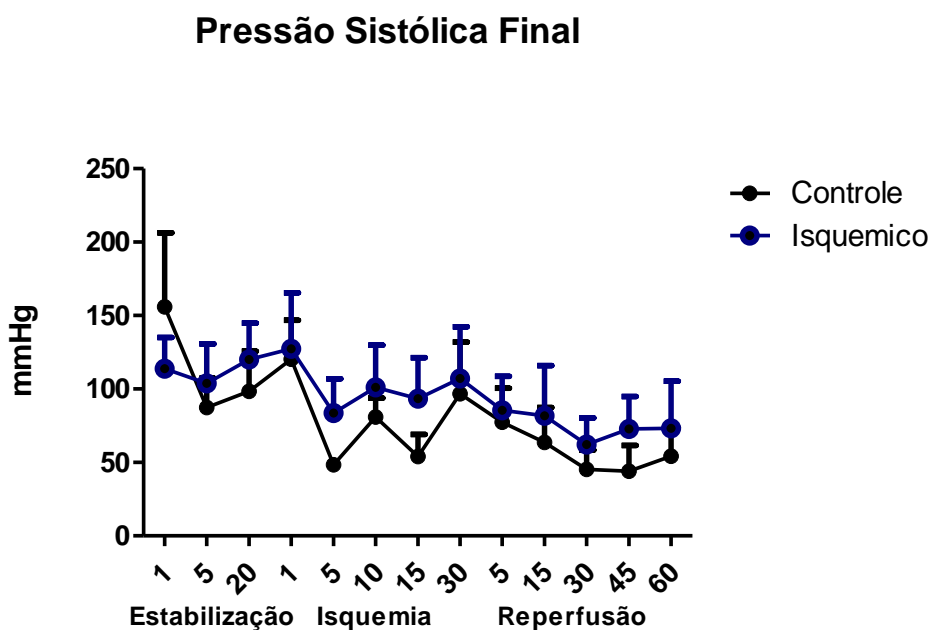


Gráfico 5.1: pressão sistólica final encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 5.2: pressão sistólica final – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

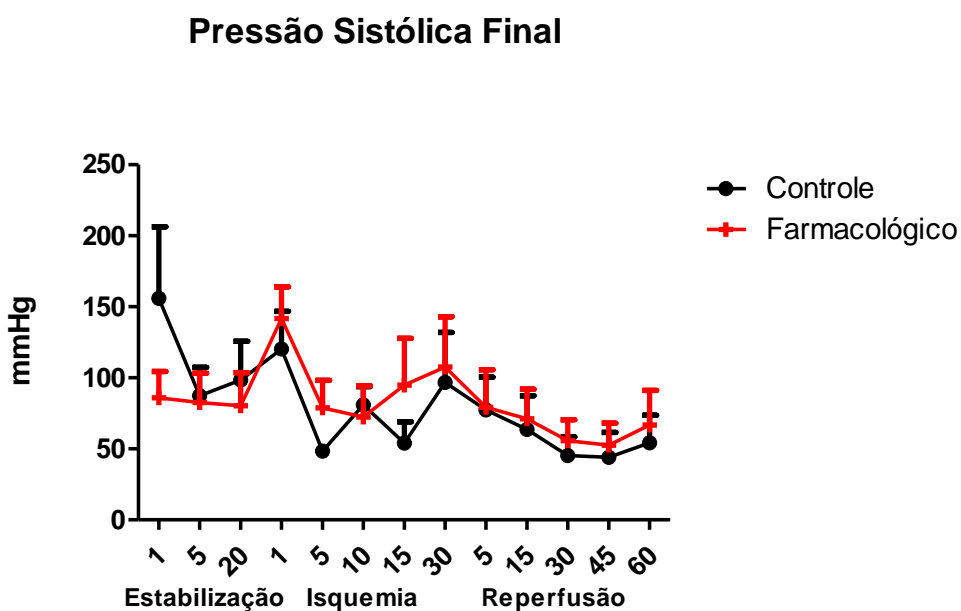


Gráfico 5.2: pressão sistólica final encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 5.3: pressão sistólica final – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

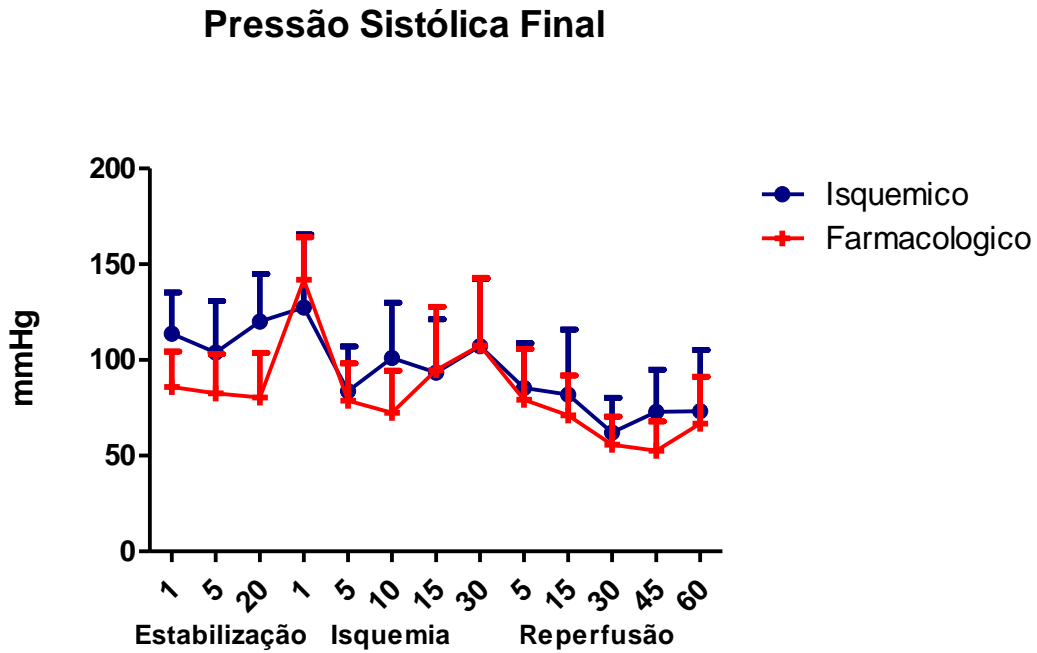


Gráfico 5.3: pressão sistólica final encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 6. Pressão Diastólica Final

Gráfico 6.1: pressão diastólica final – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

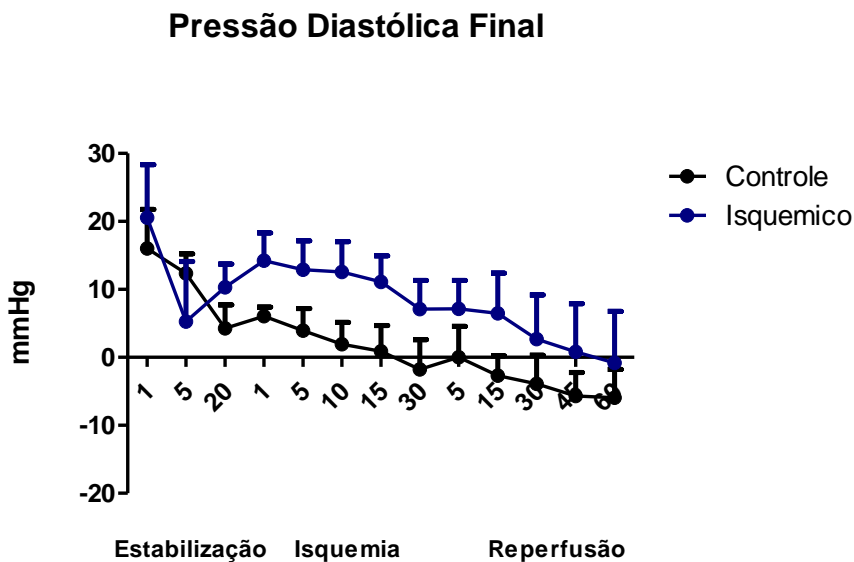


Gráfico 6.1: pressão sistólica final encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.



Gráfico 6.2: pressão diastólica final – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

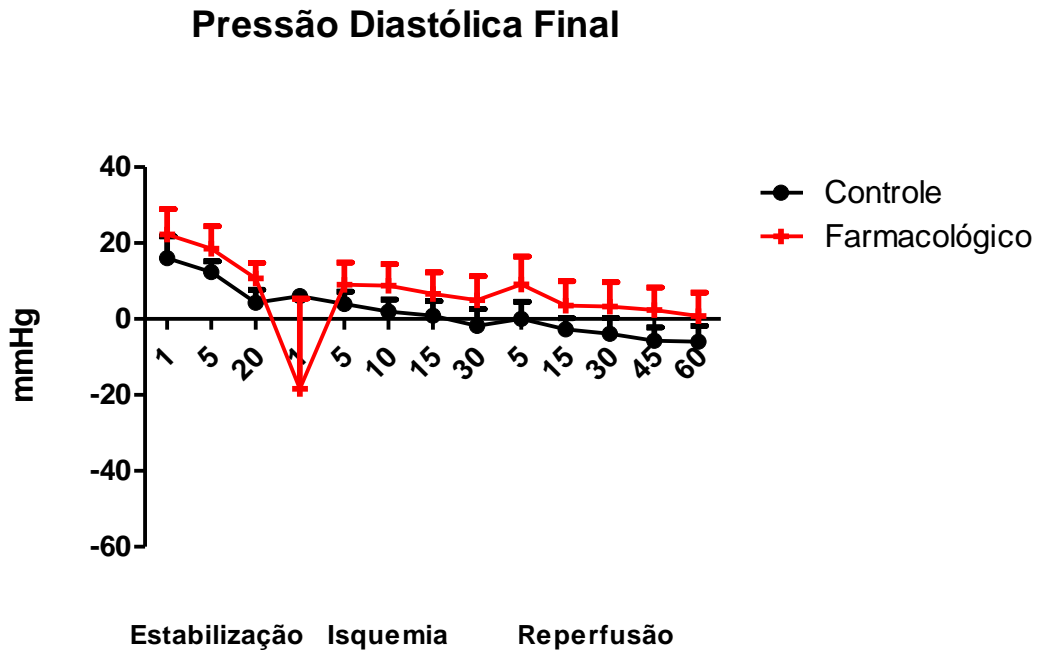


Gráfico 6.2: pressão sistólica final encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 6.3: pressão diastólica final – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

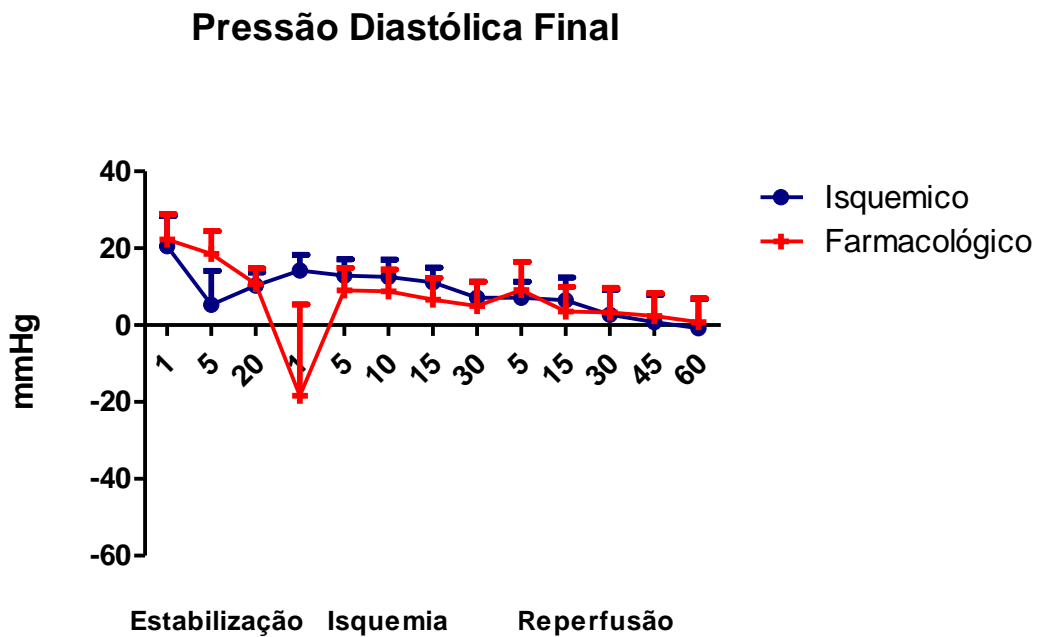


Gráfico 6.3: pressão sistólica final encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 7. Máxima dP/dT

Gráfico 7.1: máxima dP/dT – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

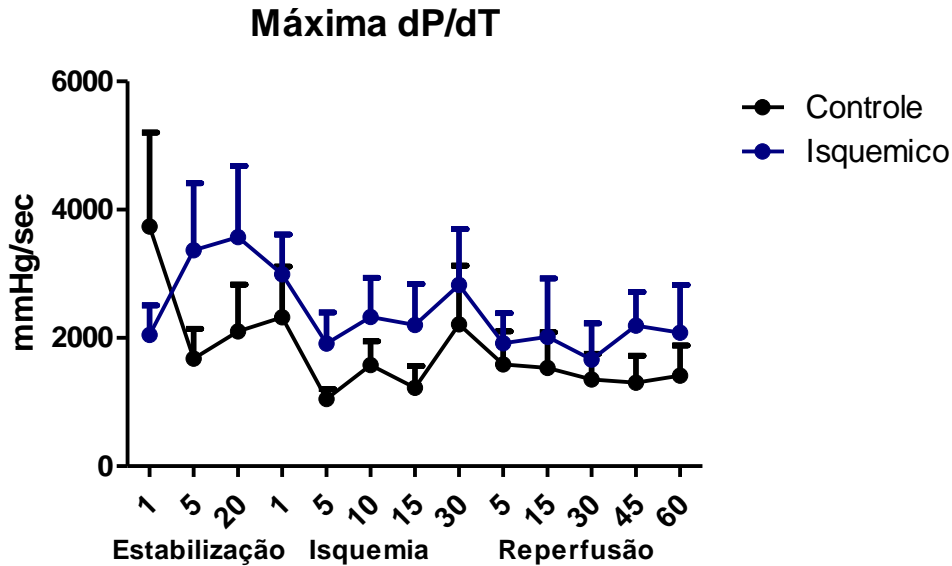


Gráfico 7.1: máxima dP/dT encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 7.2: máxima dP/dT – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

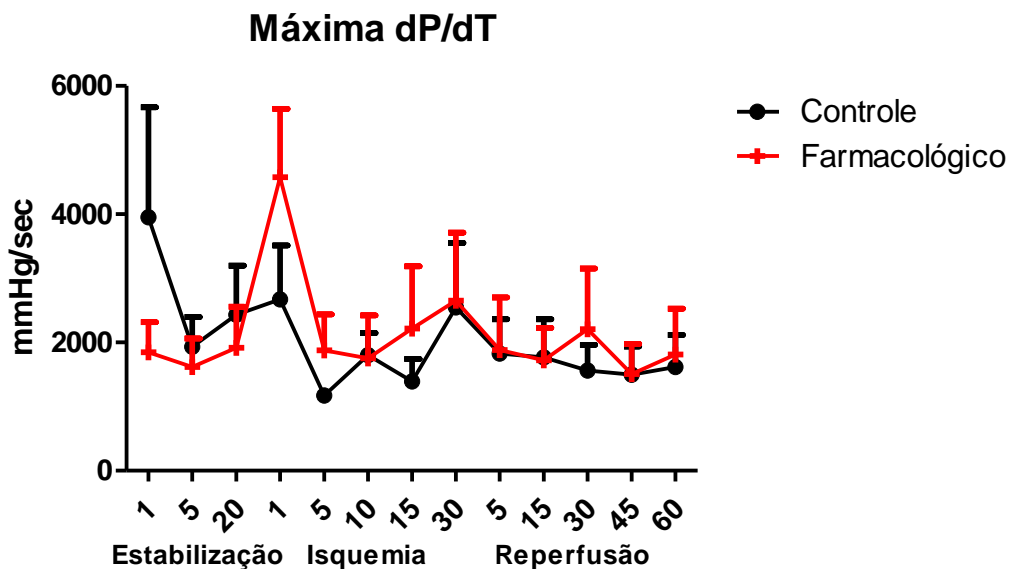


Gráfico 7.2: máxima dP/dT encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 7.3: máxima dP/dT – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

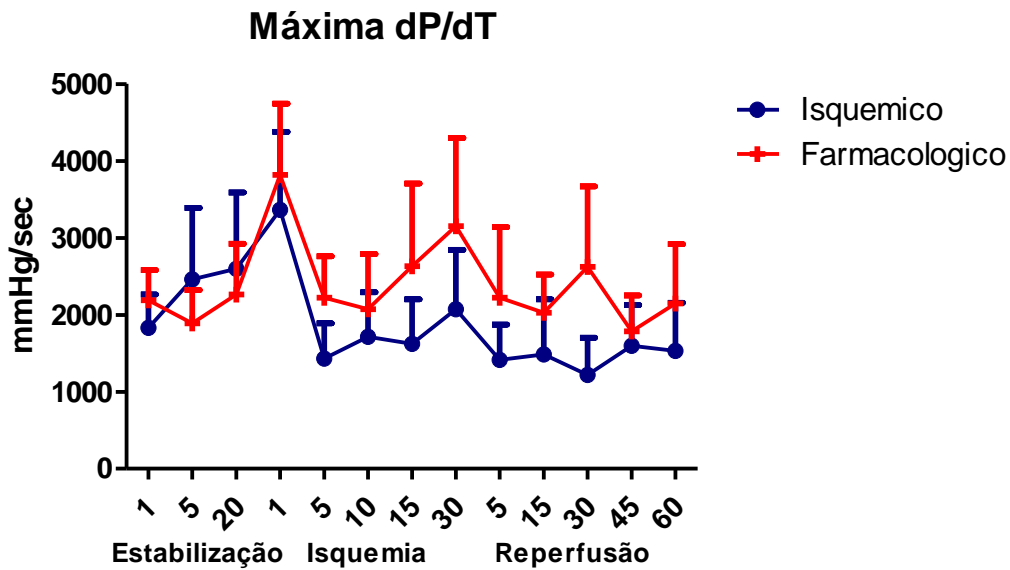


Gráfico 7.3: máxima dP/dT encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 8. Mínima dP/dT

Gráfico 8.1: mínima dP/dT – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

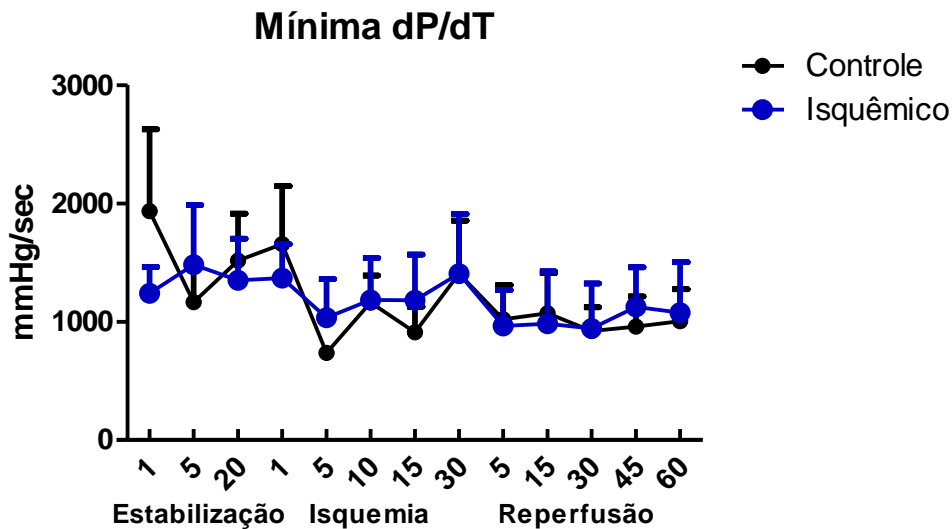


Gráfico 8.1: mínima dP/dT encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 8.2: mínima dP/dT – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

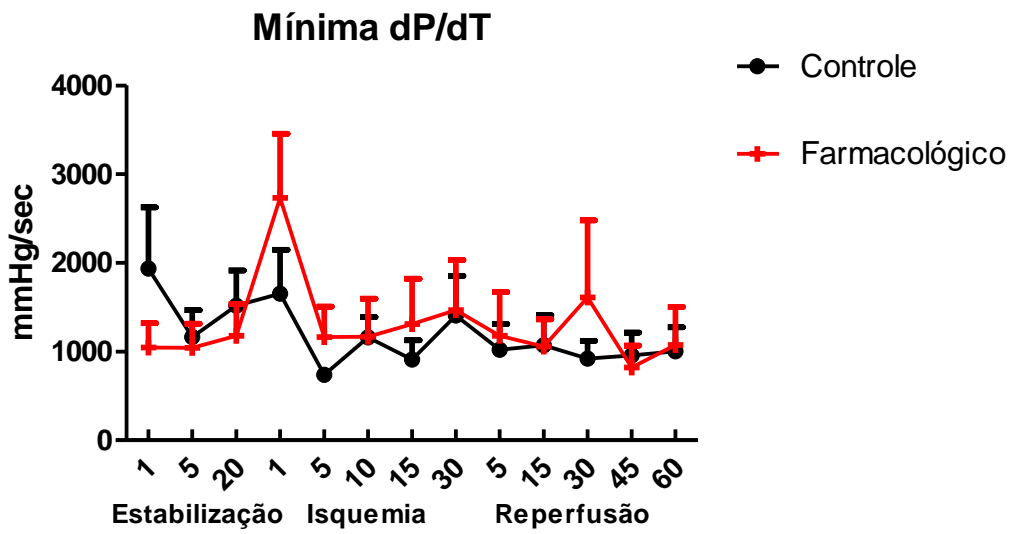


Gráfico 8.2: mínima dP/dT encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 8.3: mínima dP/dT – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

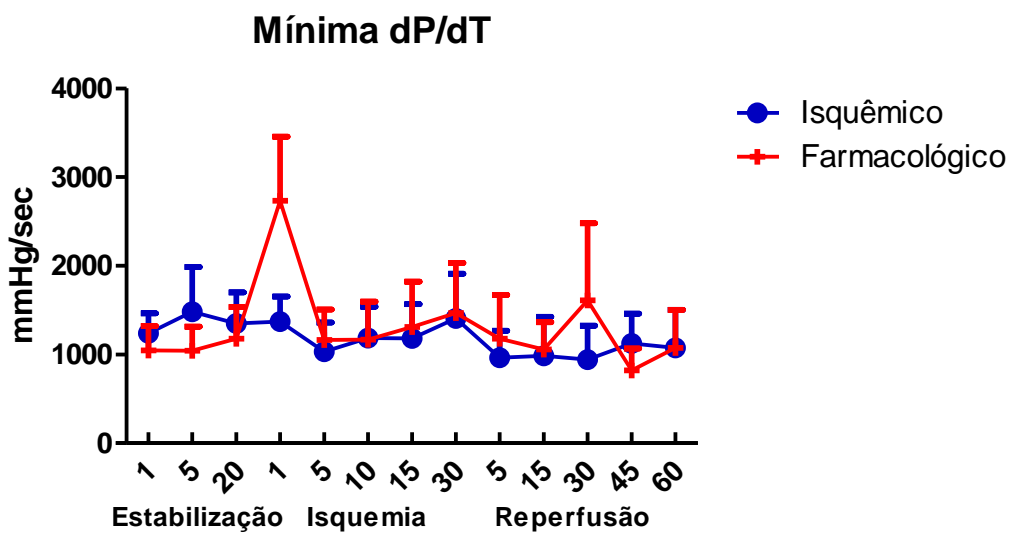


Gráfico 8.3: mínima dP/dT encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 9. Frequencia Cardíaca

Gráfico 9.1: freqüência cardíaca – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

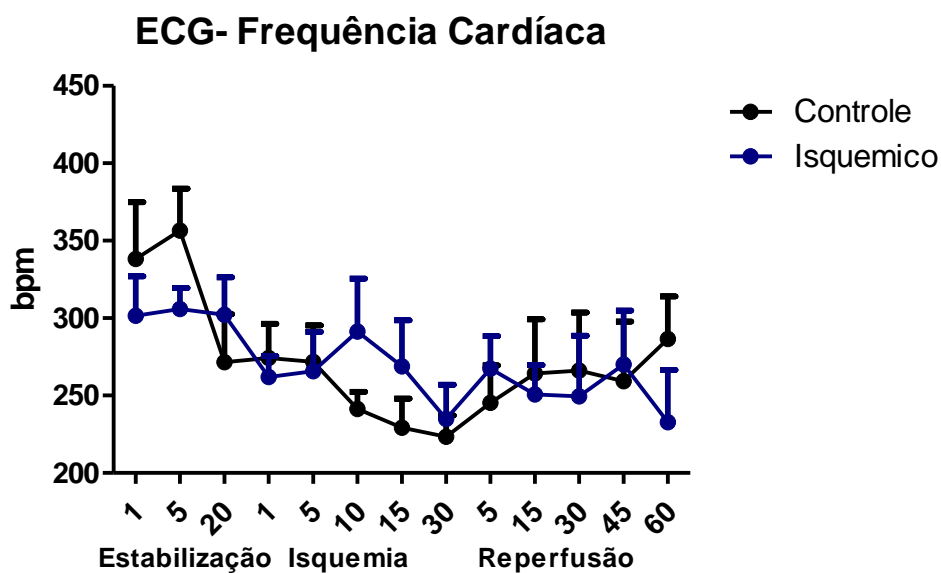


Gráfico 9.1: freqüência cardíaca encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 9.2: freqüência cardíaca – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

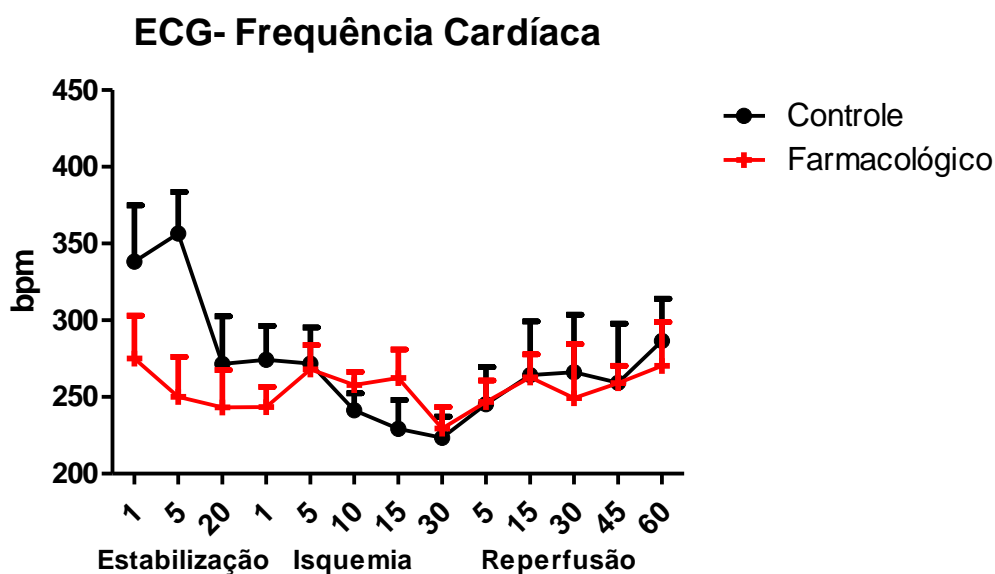


Gráfico 9.2: freqüência cardíaca encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 9.3: freqüência cardíaca – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

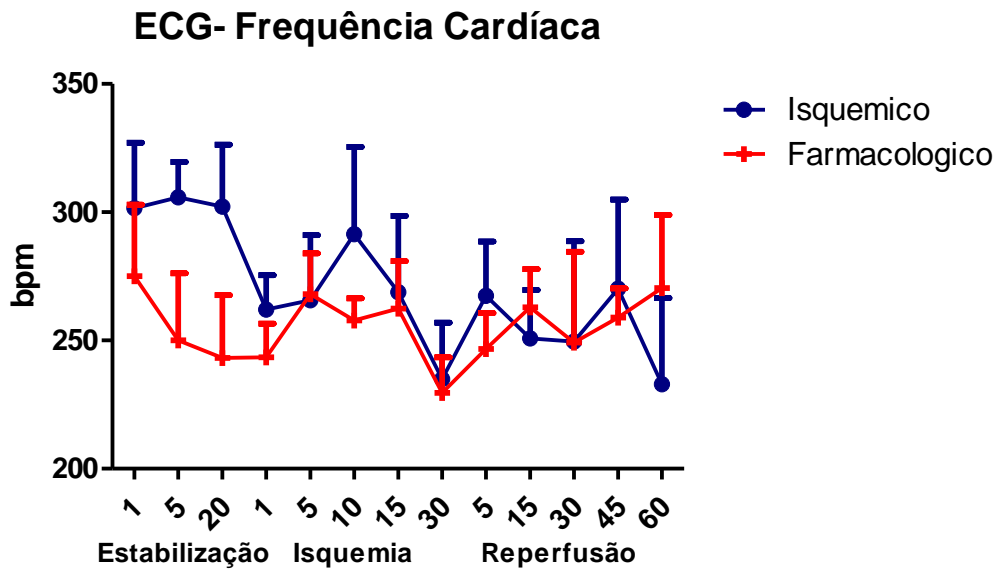


Gráfico 9.3: freqüência cardíaca encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 10. Complexo QRS (largura)

Gráfico 10.1: complexo QRS (largura) – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

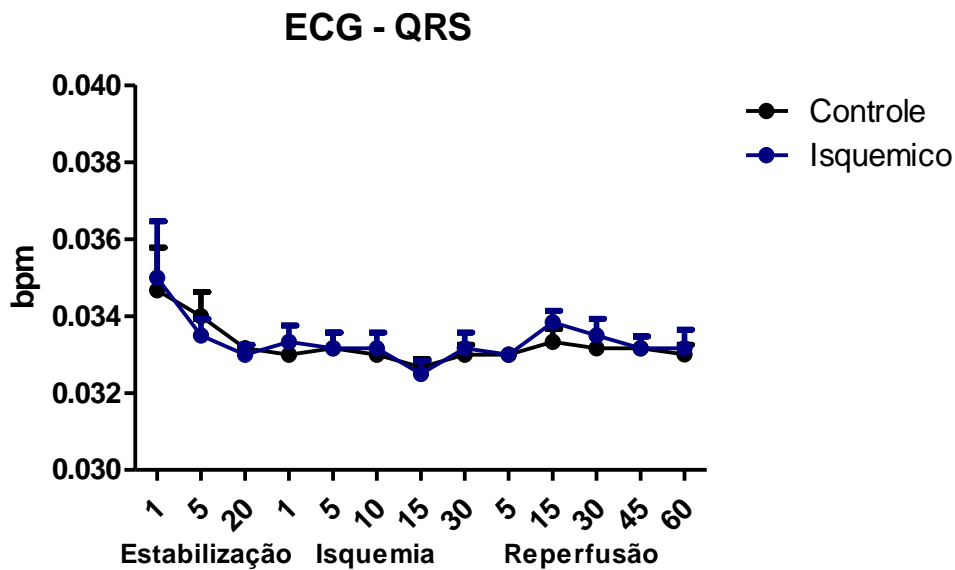


Gráfico 10.1: complexo QRS (largura) encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 10.2: complexo QRS (largura) – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

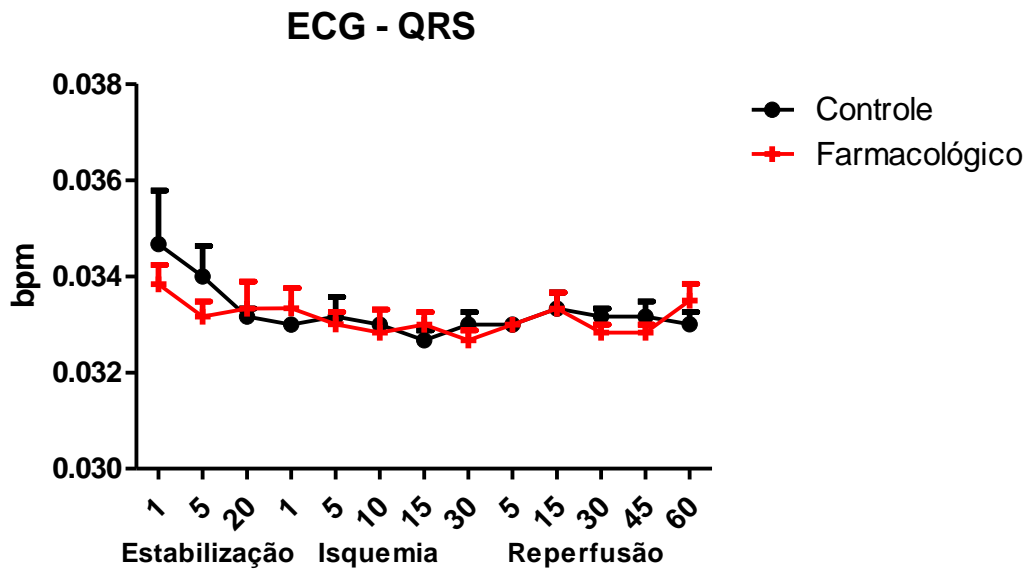


Gráfico 10.2: complexo QRS (largura) encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 10.3: complexo QRS (largura) – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

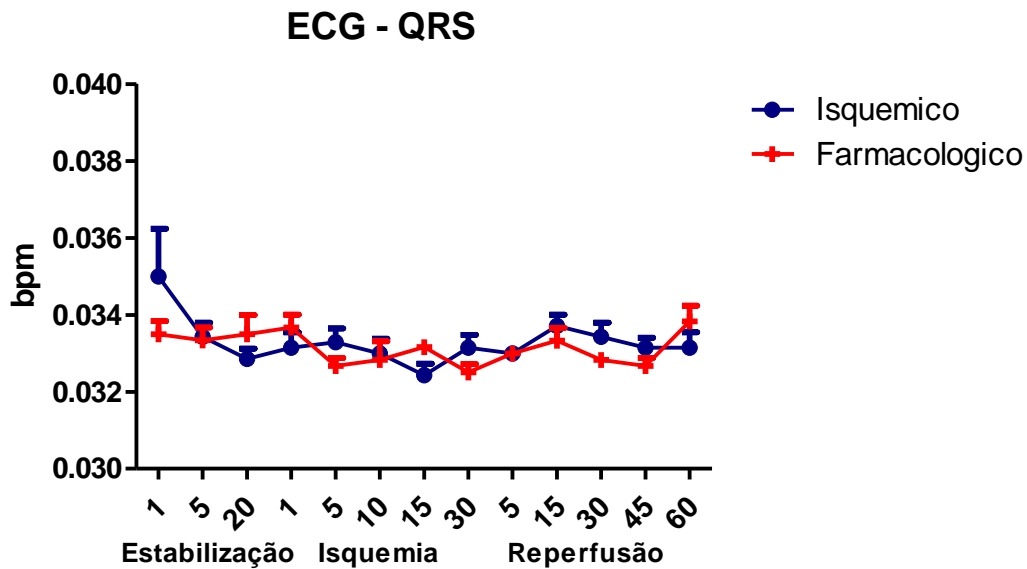


Gráfico 10.3: complexo QRS (largura) encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

11. Intervalo RR

Gráfico 11.1: intervalo RR – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

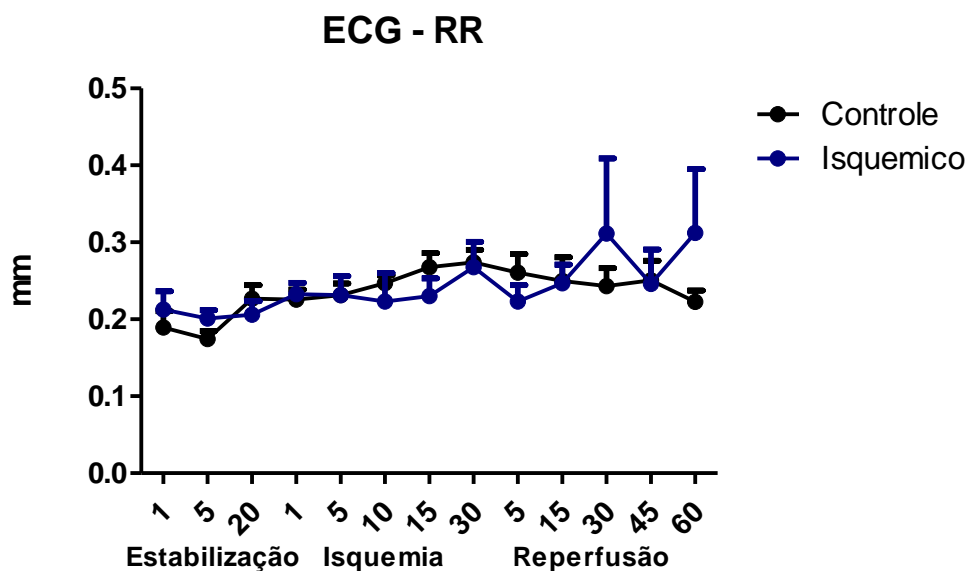


Gráfico 11.1: intervalo RR encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 11.2: intervalo RR – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

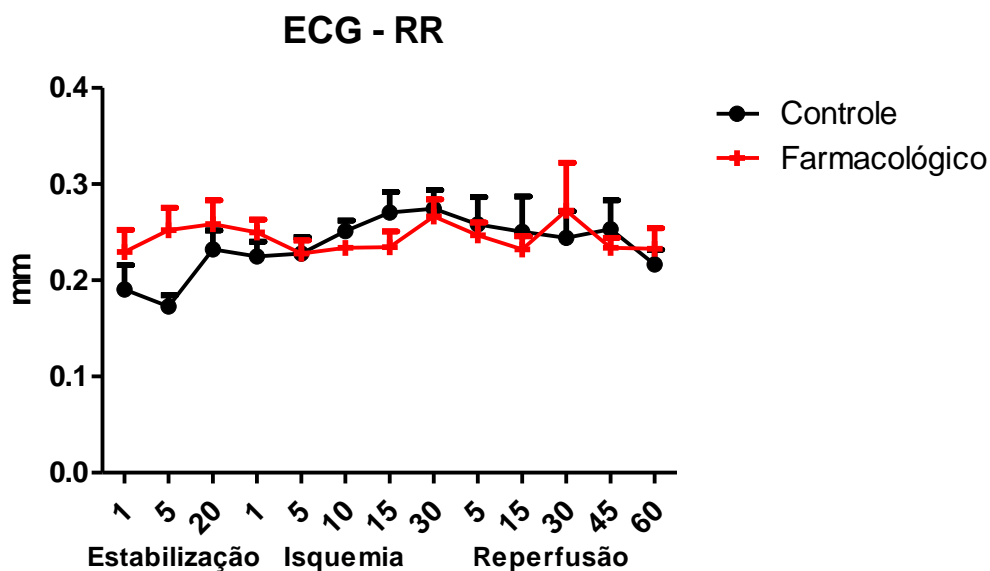


Gráfico 11.2: intervalo RR encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 11.3: intervalo RR – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico



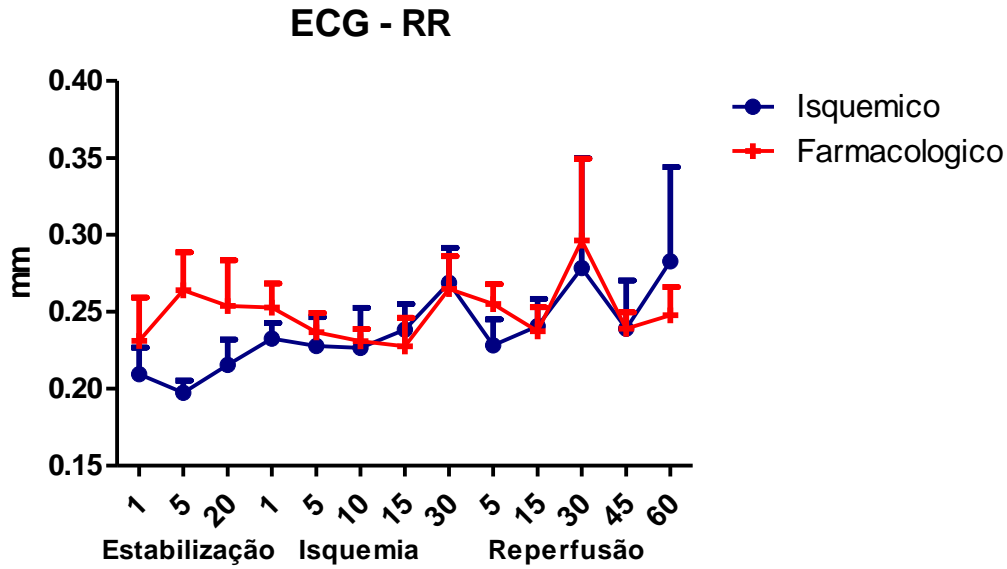


Gráfico 11.3: intervalo RR encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 12. Infradesnivelamento ST

Gráfico 12.1: infradesnivelamento ST – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

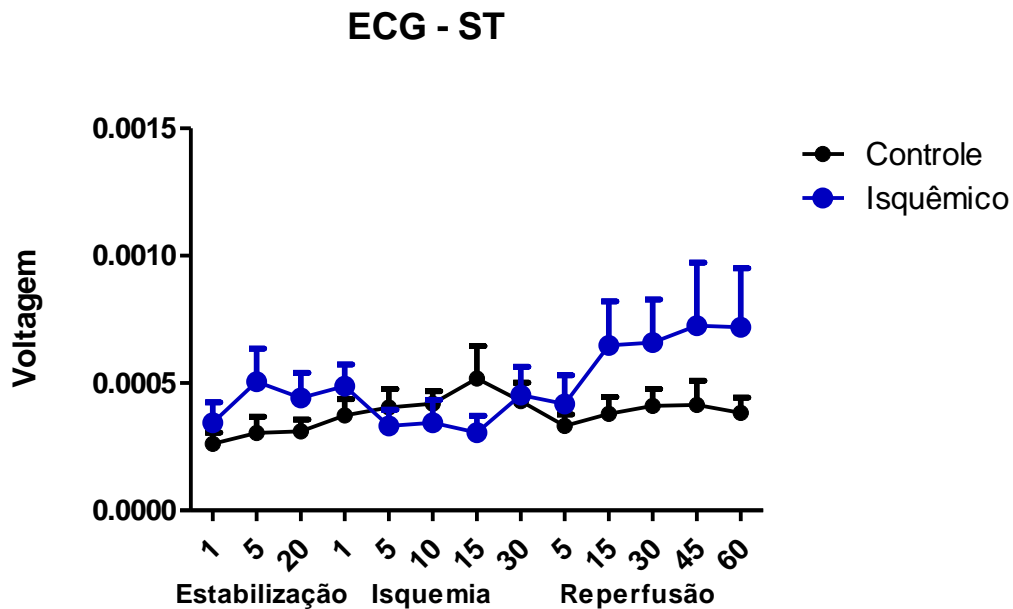


Gráfico 12.1: infradesnivelamento ST encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 12.2: infradesnivelamento ST – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

### ECG - ST

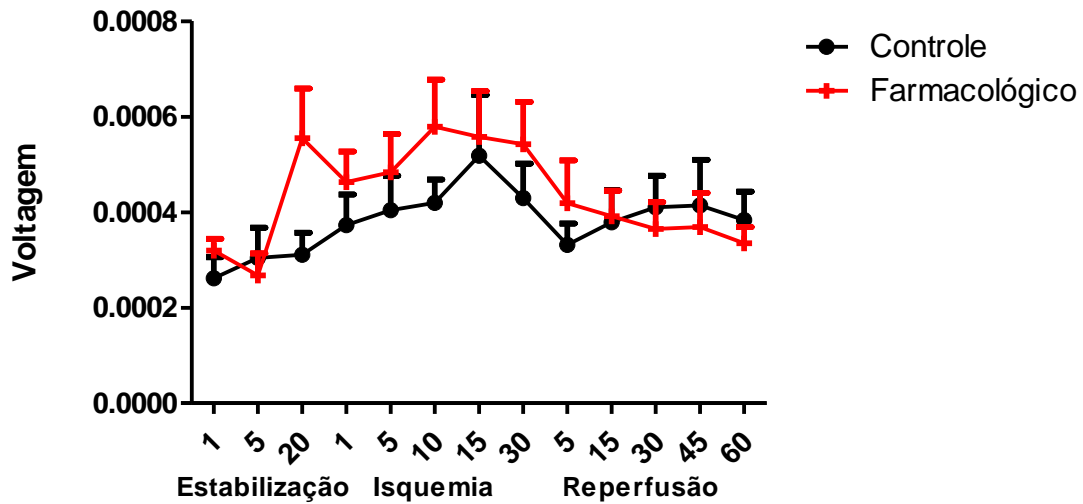


Gráfico 12.2: infradesnívelamento ST encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 12.3: infradesnívelamento ST – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

### ECG - ST

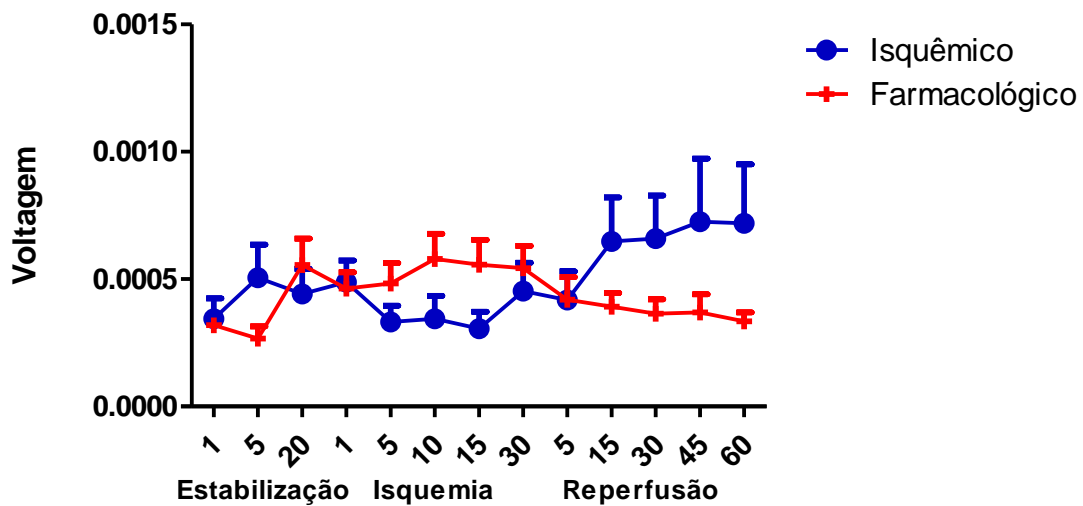


Gráfico 12.3: infradesnívelamento ST encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 13.1: intervalo QTc – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

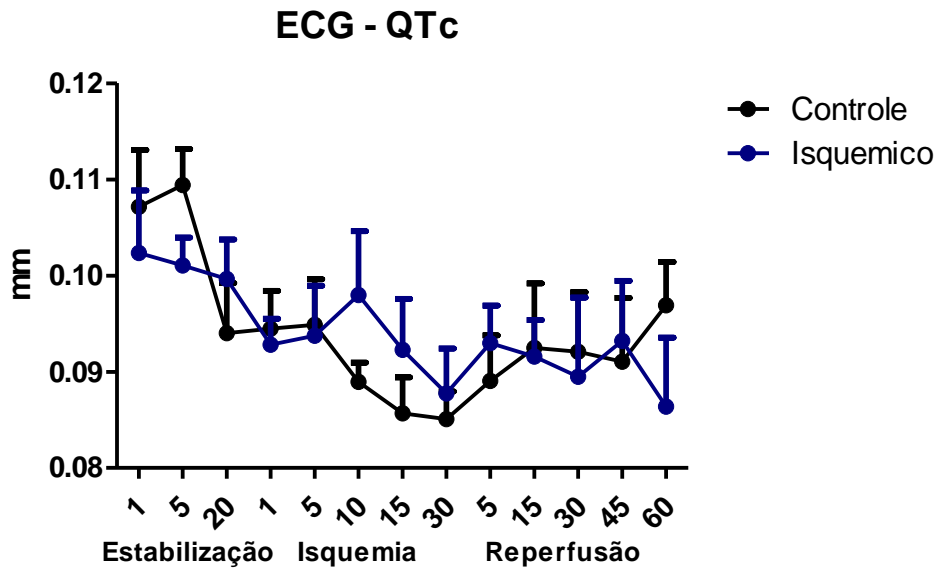


Gráfico 13.1: intervalo QTc encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 13.2: intervalo QTc – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

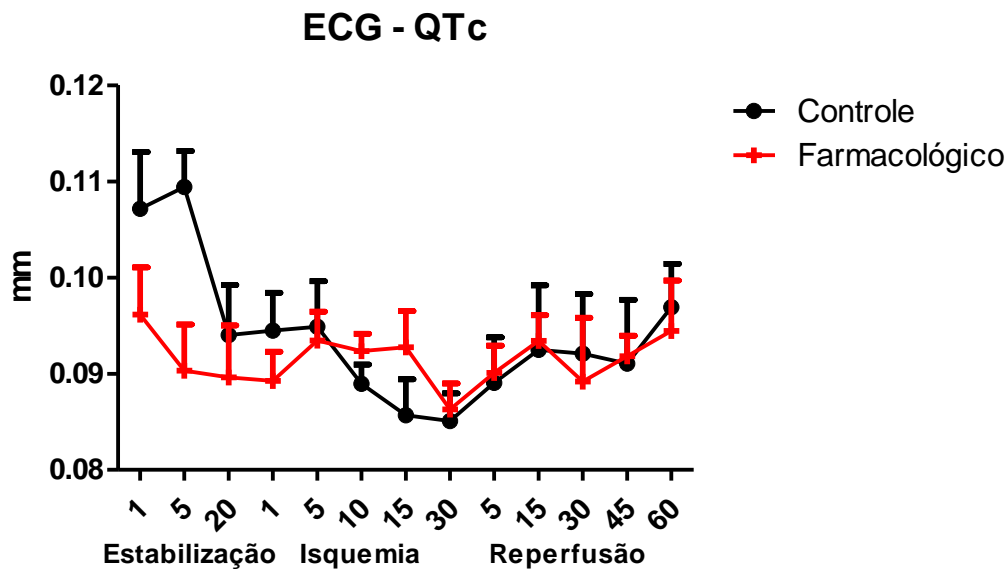


Gráfico 13.2: intervalo QTc encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 13.3: intervalo QTc – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

### ECG - QTc

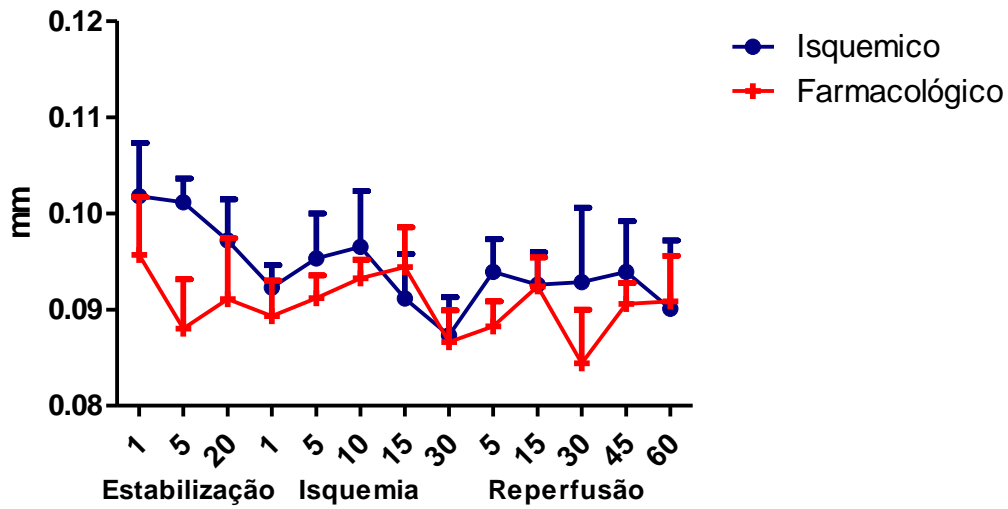


Gráfico 13.3: intervalo QTc encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

## 14. Arritmia

Gráfico 14.1.1: Arritmia – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

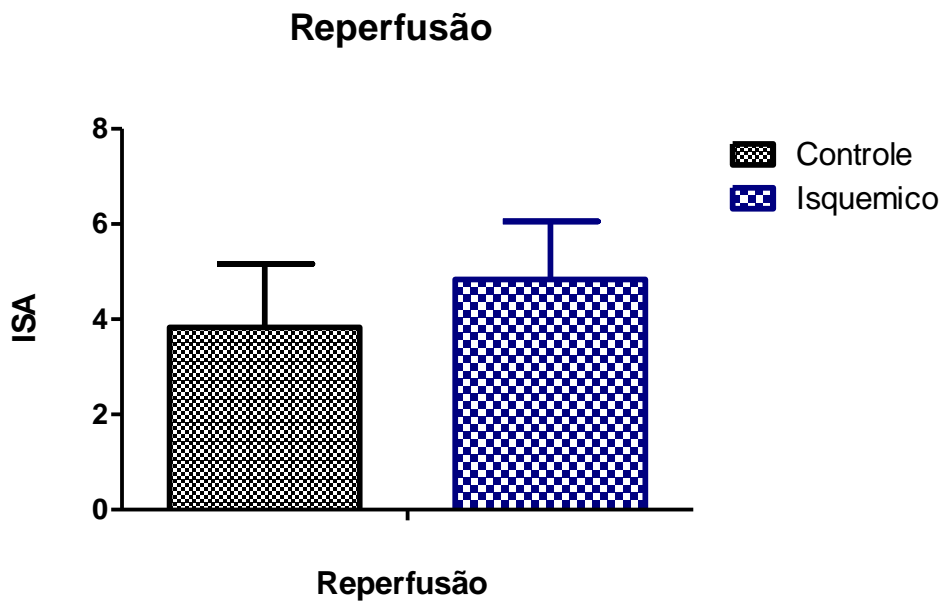


Gráfico 14.1.1: arritmia encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Mann-Whitney.

Gráfico 14.1.2: Arritmia – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

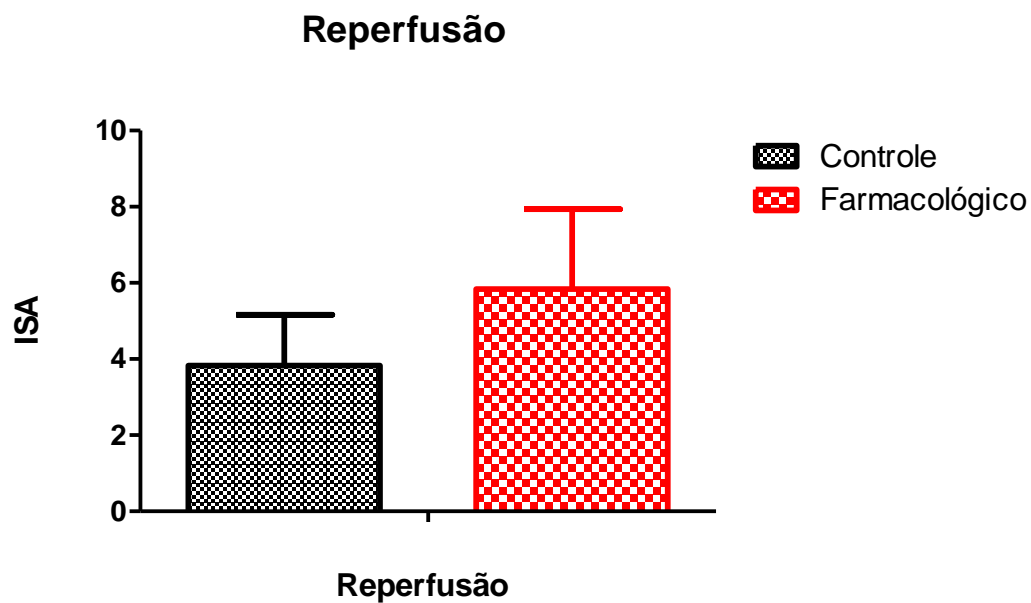


Gráfico 14.1.2: arritmia encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Mann-Whitney.

Gráfico 14.1.3: Arritmia – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

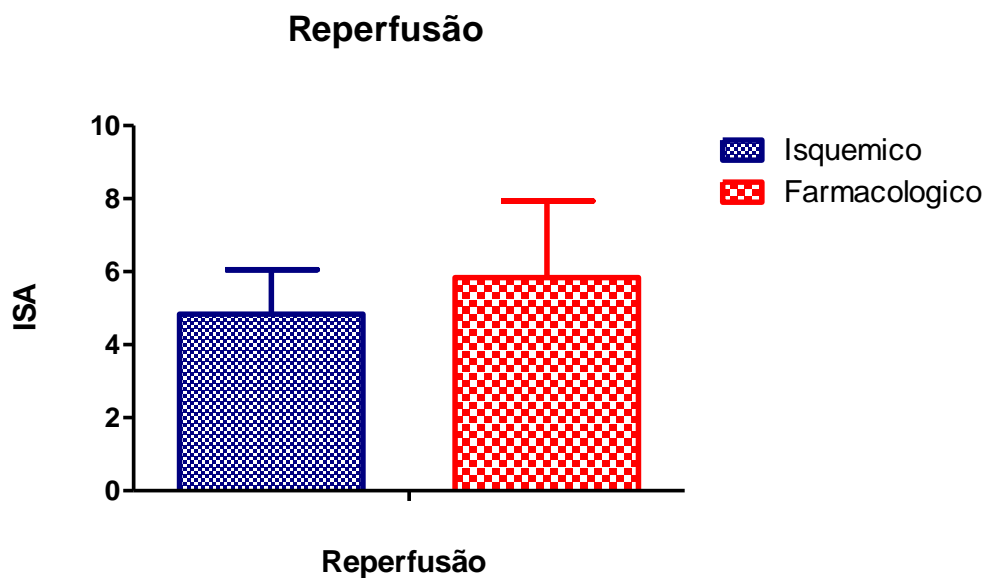


Gráfico 14.1.3: arritmia encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Mann-Whitney.

Gráfico 14.2.1 Arritmia 5' – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

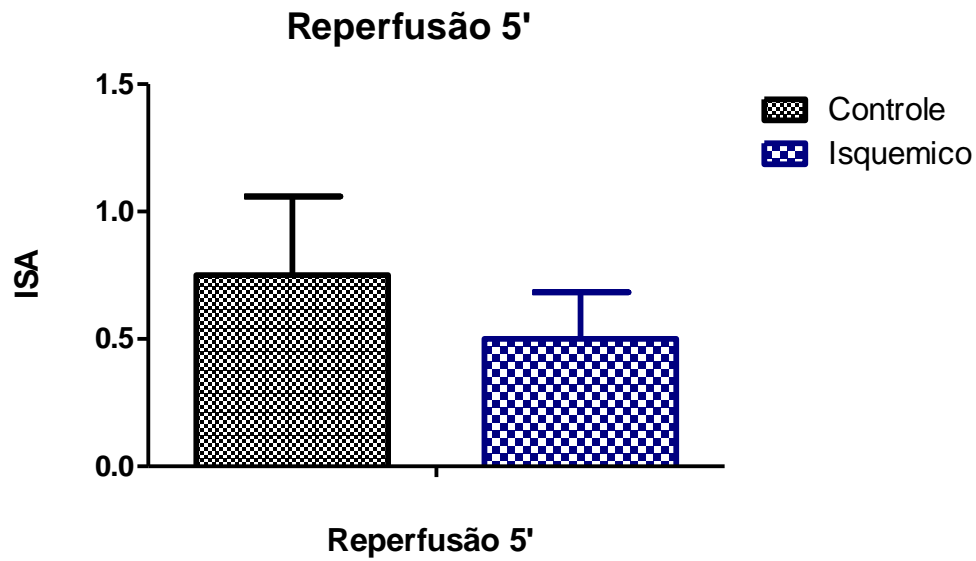


Gráfico 14.2.1: arritmia 5' encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média ± epm. Teste Mann-Whitney.

Gráfico 14.2.2: Arritmia 5' – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

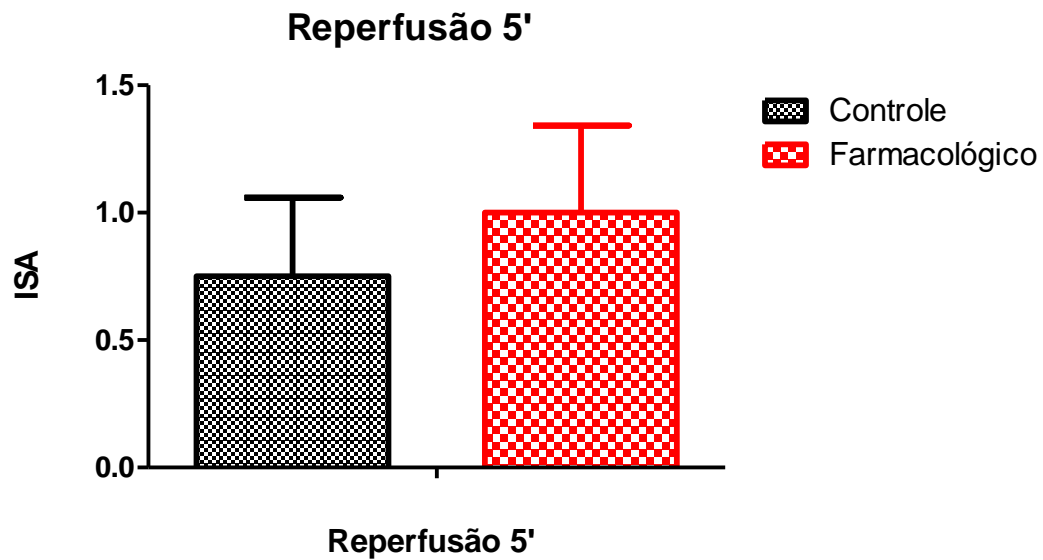


Gráfico 14.2.2: arritmia 5' encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Mann-Whitney.

Gráfico 14.2.3: Arritmia 5' – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

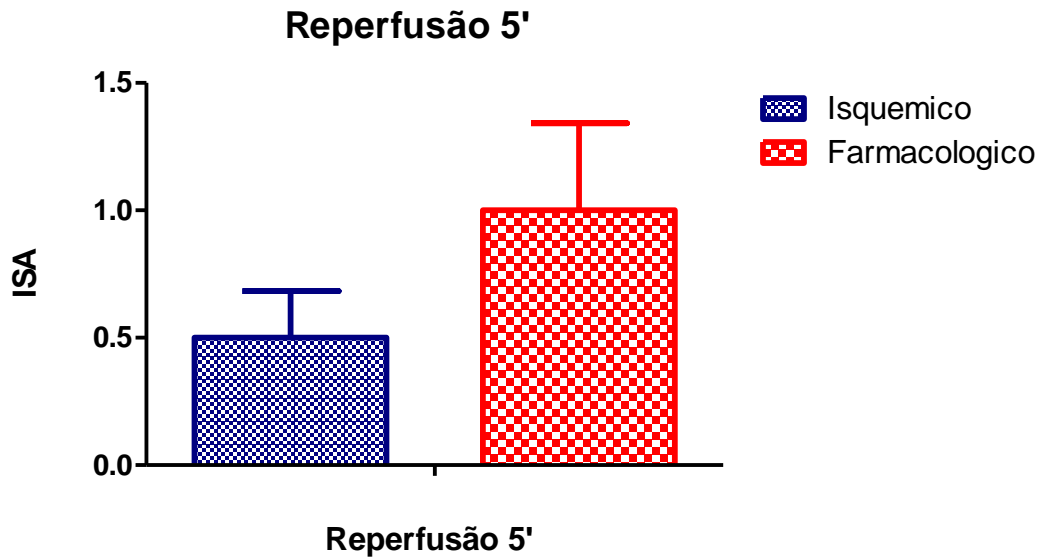


Gráfico 14.2.3: arritmia 5' encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Mann-Whitney.

## 15. Fluxo

Gráfico 15.1: Fluxo – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

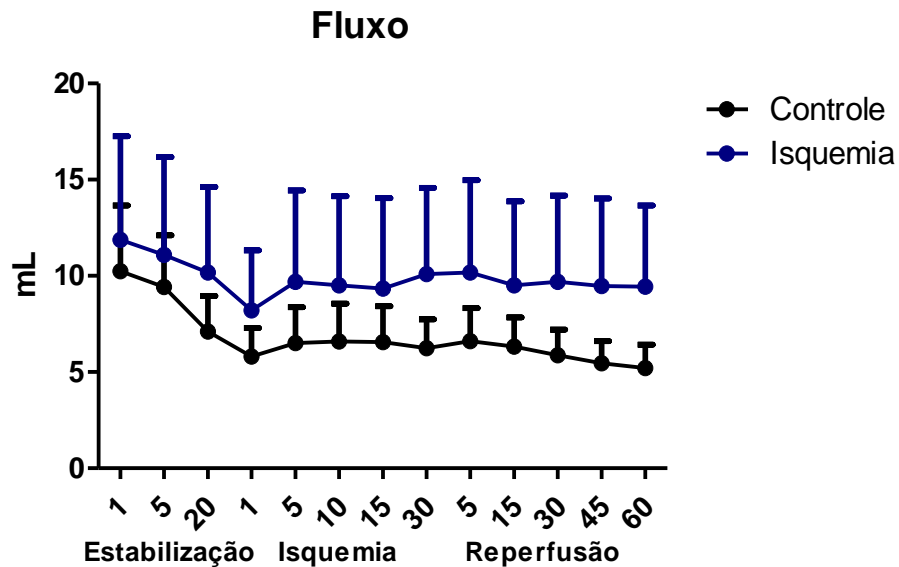


Gráfico 15.1: fluxo encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 15.2: Fluxo – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

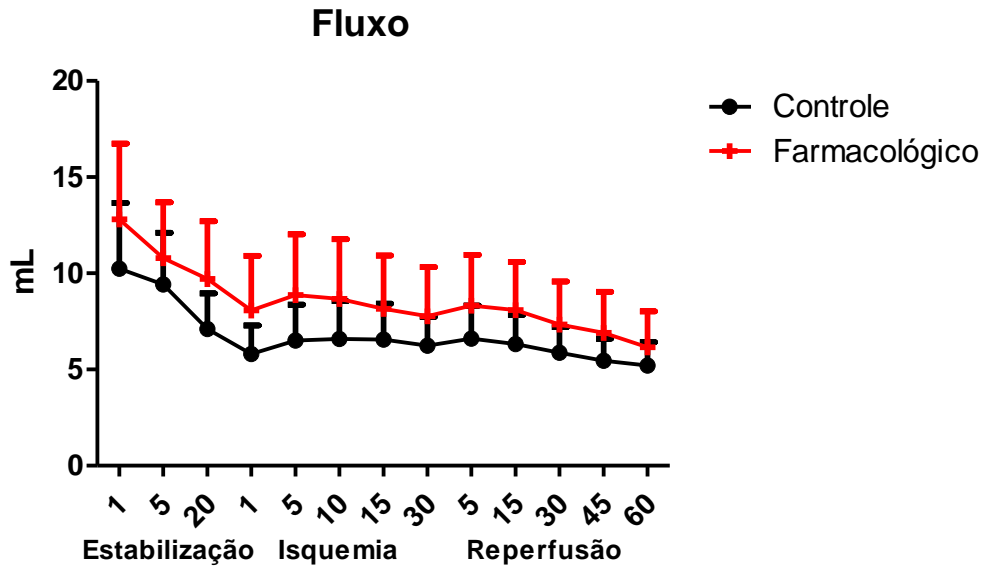


Gráfico 15.2: fluxo encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 15.3: Fluxo – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

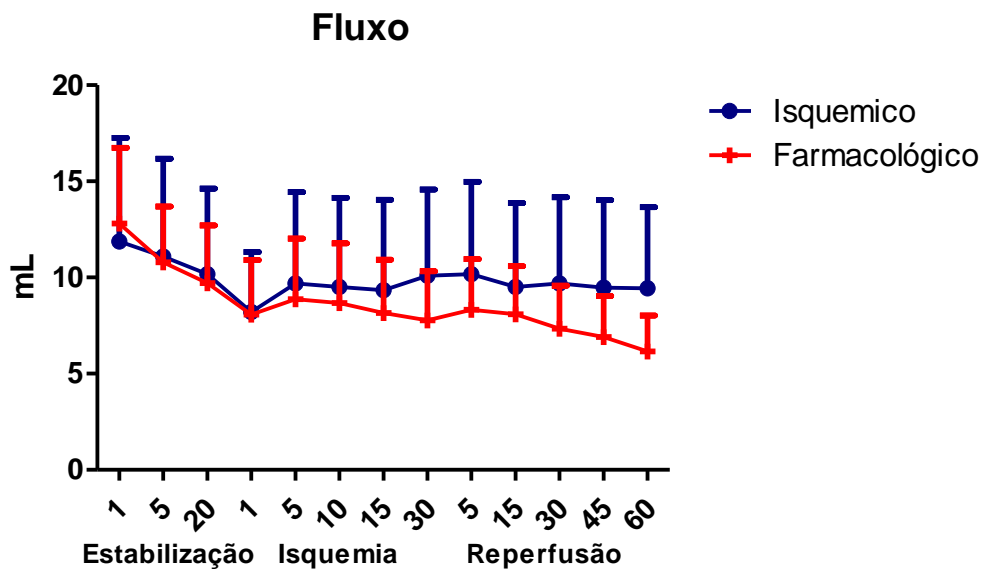


Gráfico 15.3: fluxo encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

16. CK-MB

Gráfico 16.1: CK-MB – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico



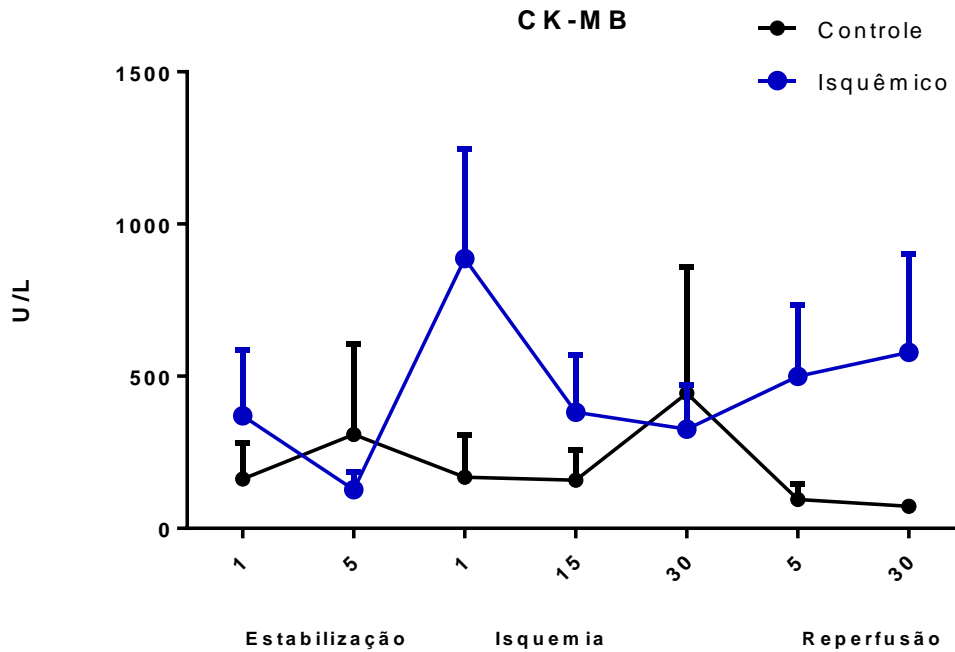


Gráfico 16.1: CK-MB encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 16.2: CK-MB – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

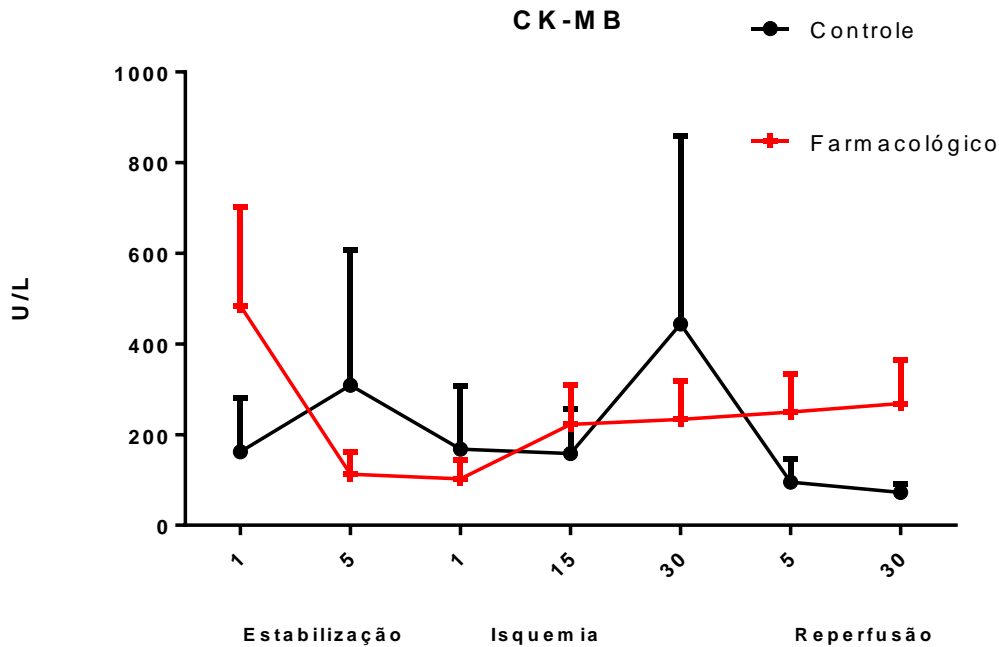


Gráfico 16.2: CK-MB encontrada nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 16.3: CK-MB – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

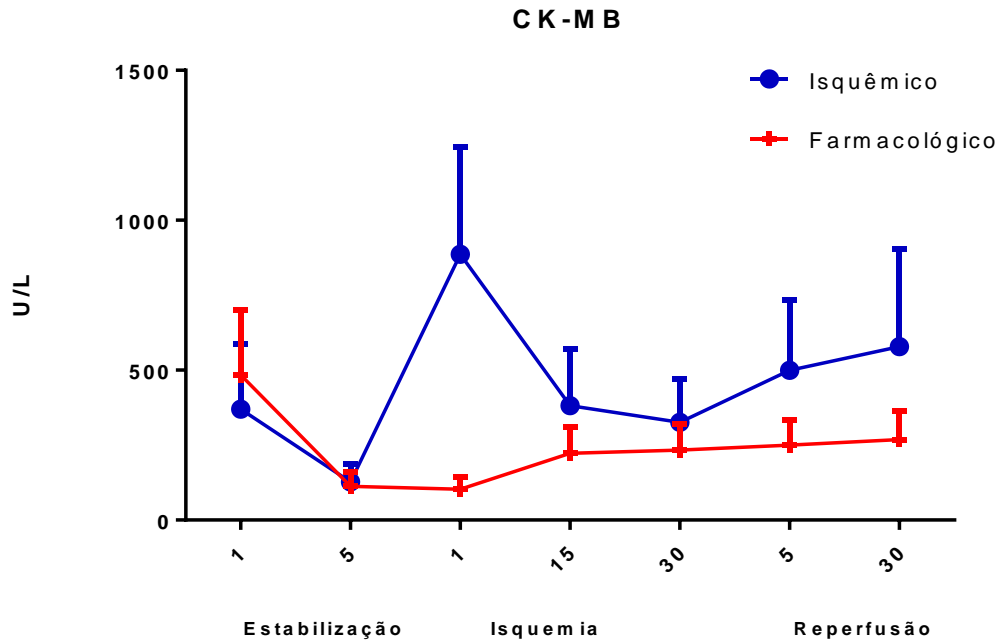


Gráfico 16.3: CK-MB encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

## 17. LDH

Gráfico 17.1: LDH - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

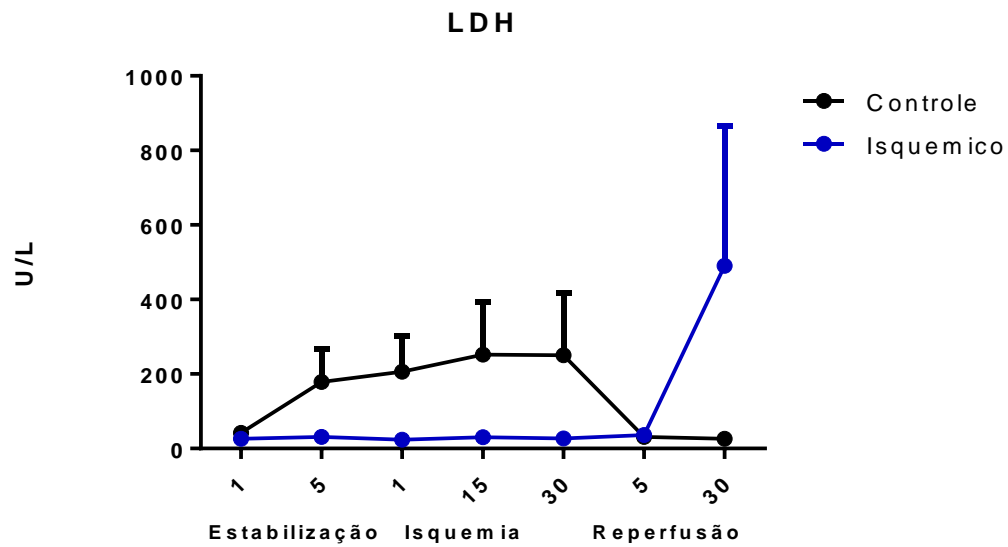


Gráfico 17.1: LDH encontrado nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 17.2: LDH - Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

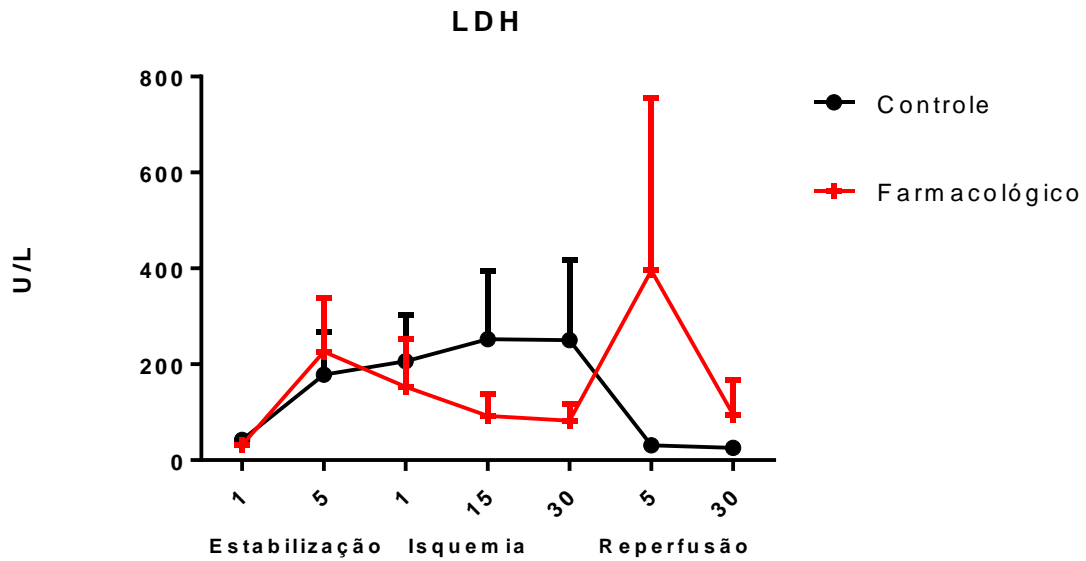


Gráfico 17.2: LDH encontrado nos grupos controle x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 17.3: LDH – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

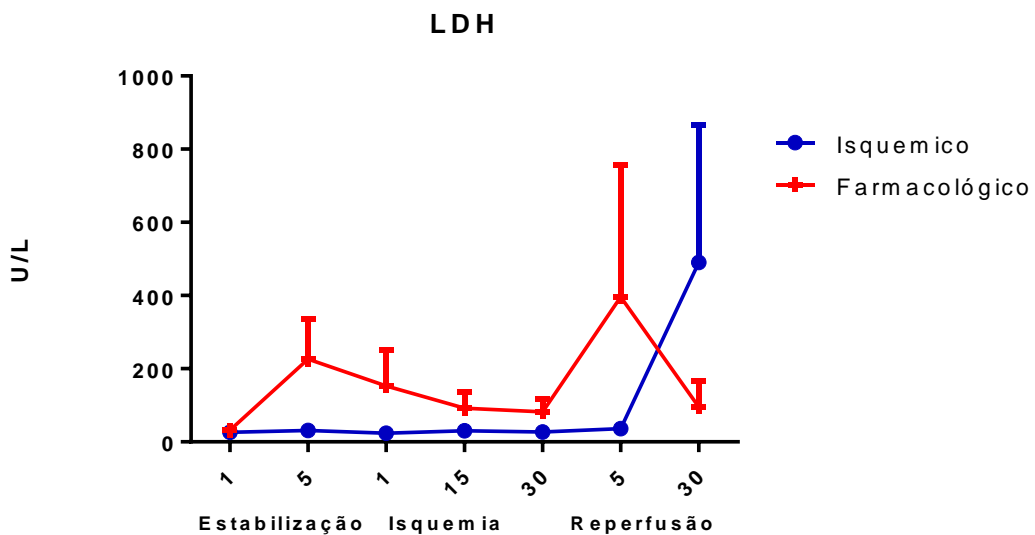


Gráfico 17.3: LDH encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 18.1: Troponina I – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

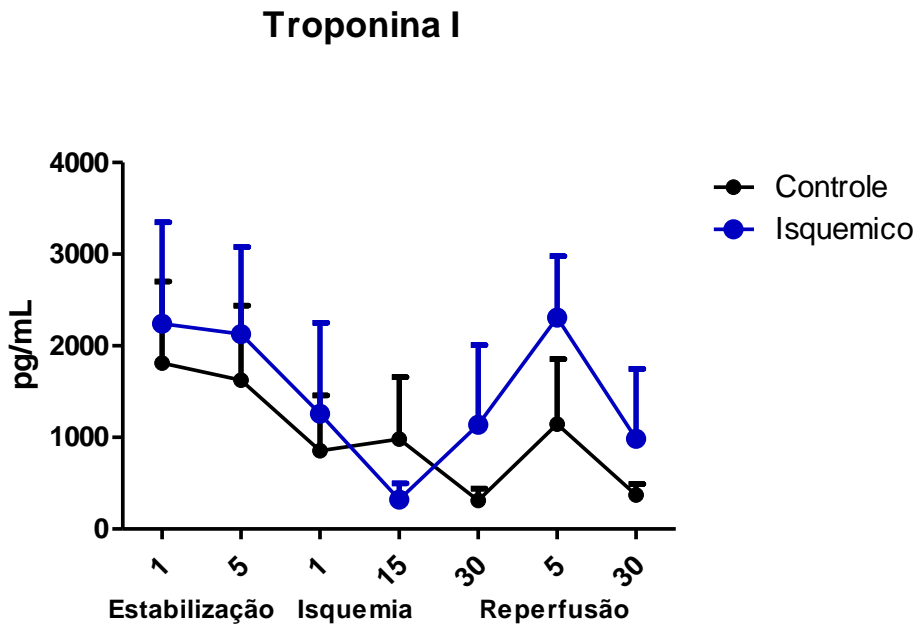


Gráfico 18.1: troponina I encontrado nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 18.2: Troponina I – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

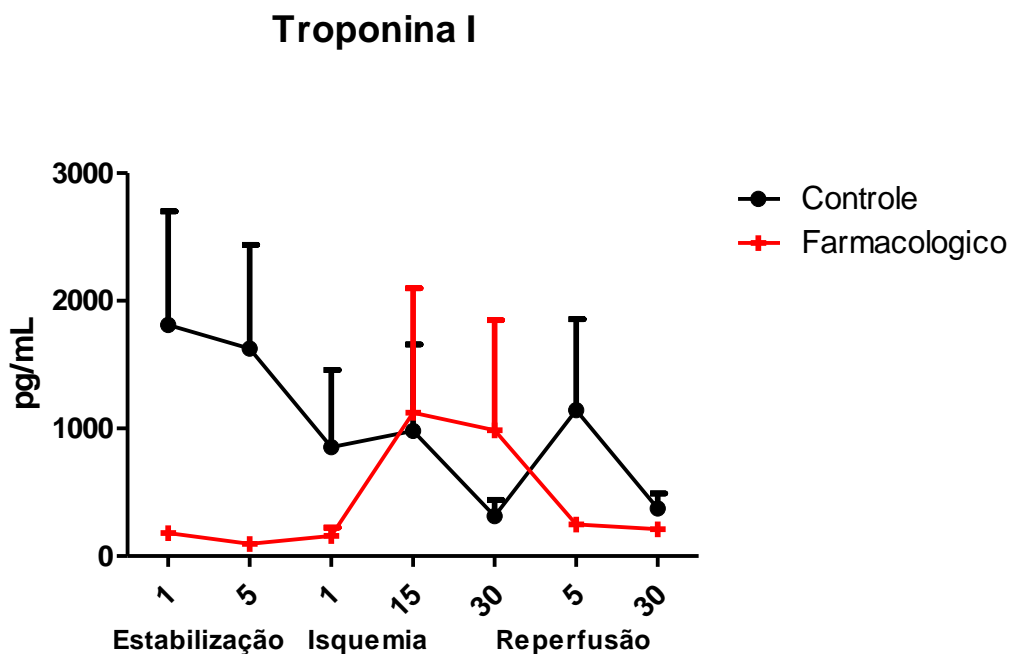


Gráfico 18.2: troponina I encontrado nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Bonferroni.

Gráfico 18.3: Troponina I – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

## Troponina I

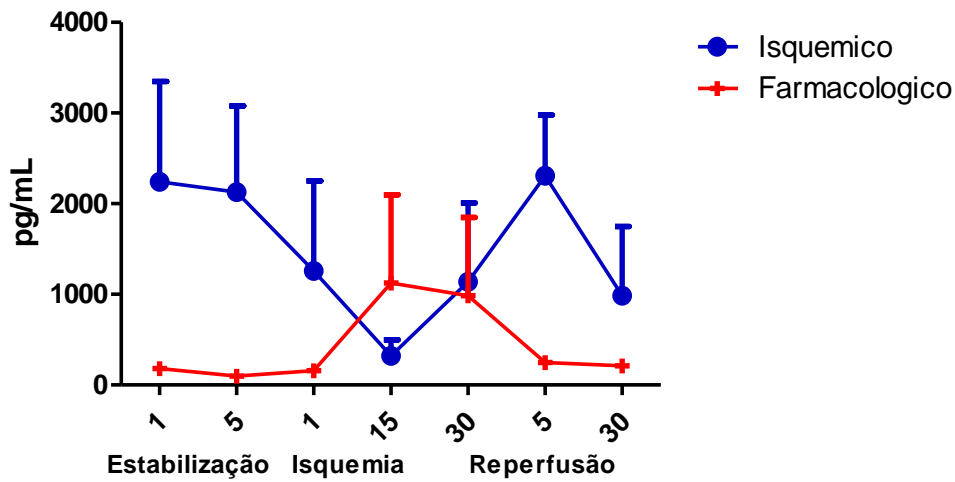


Gráfico 18.3: troponina I encontrado nos grupos pós-condicionamento isquêmico x pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Bonferroni.

## 19. Alamandina

Gráfico 19.1: Alamandina – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

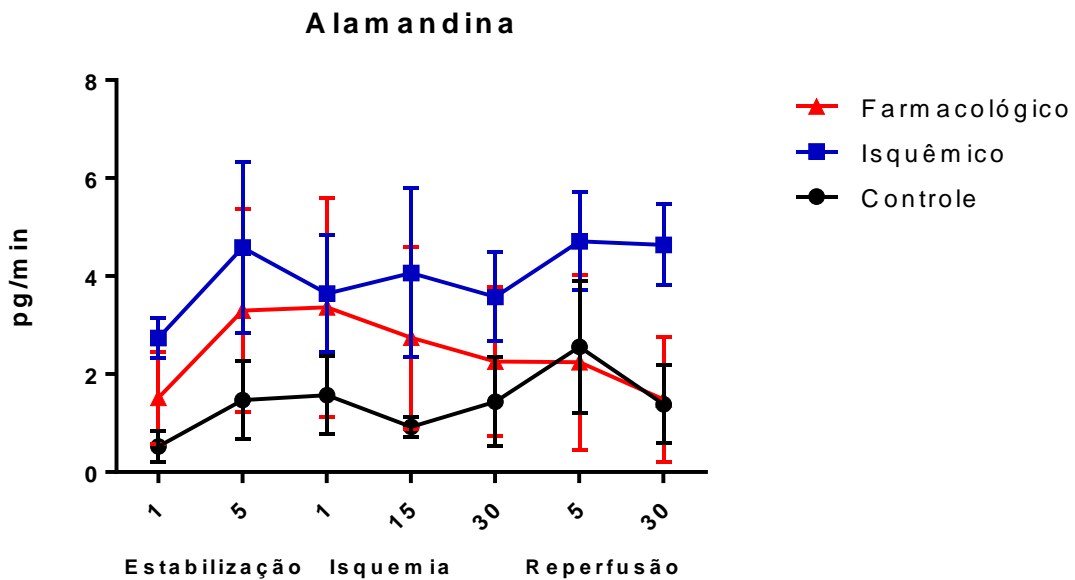


Gráfico 19.1: Alamandina encontrada nos grupos controle, pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Sidak's.

Gráfico 19.2: Alamandina – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

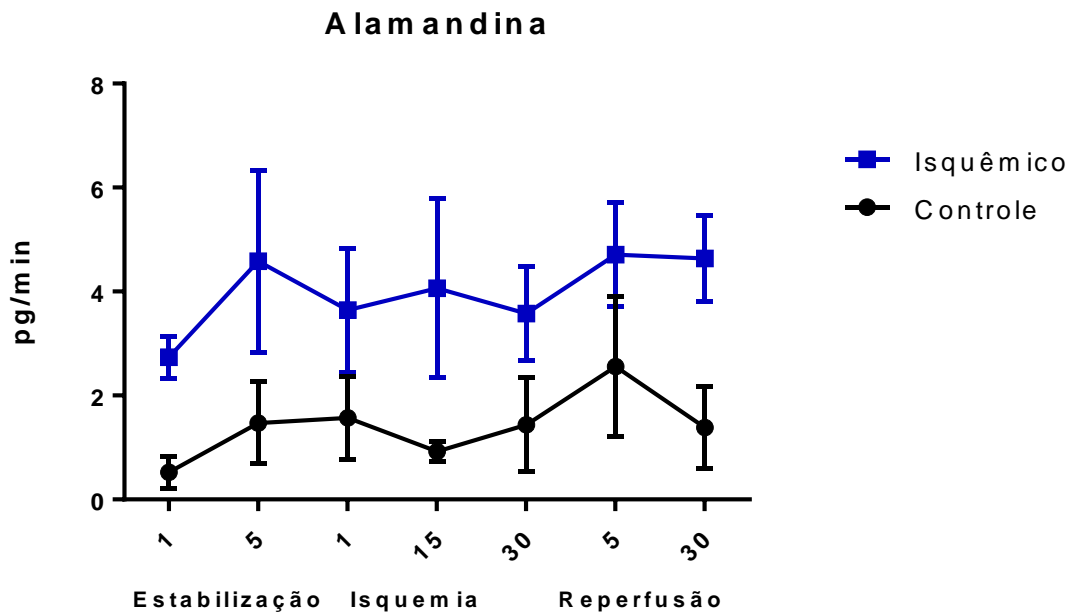


Gráfico 19.2: Alamandina encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 19.3: Alamandina – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

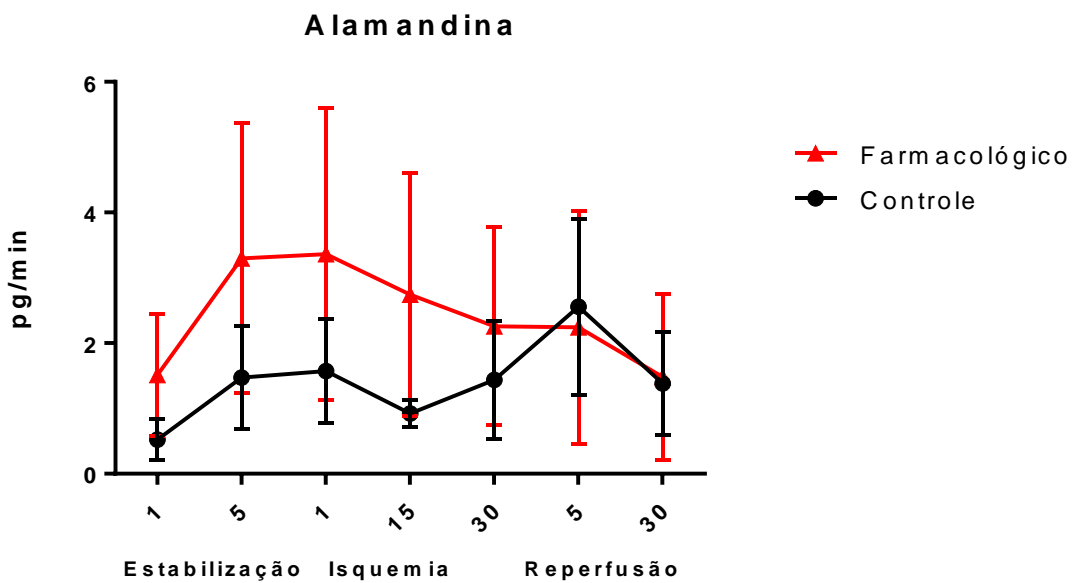


Gráfico 19.3: Alamandina encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 19.4: Alamandina – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

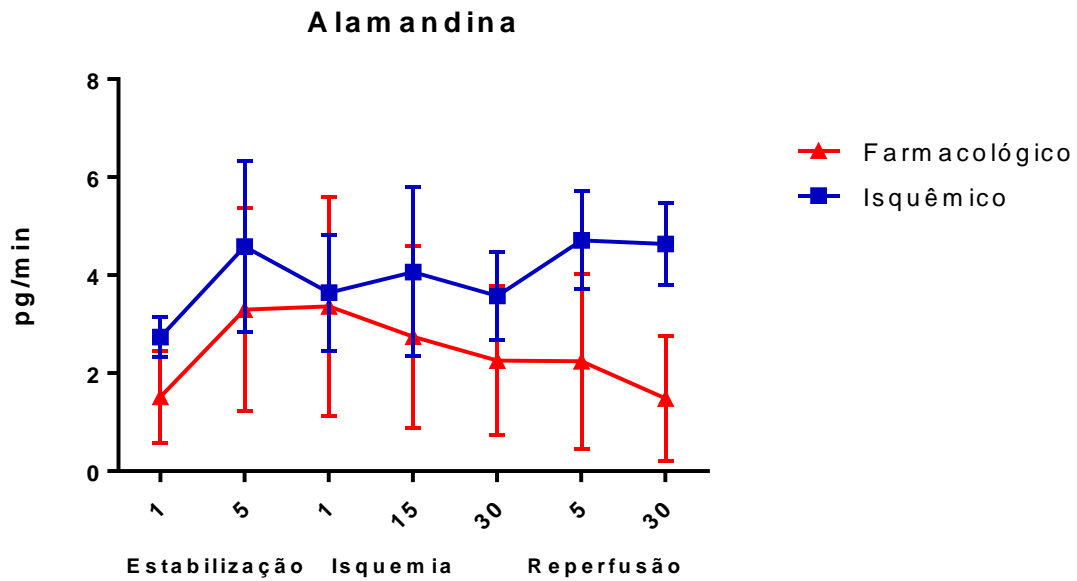


Gráfico 19.4: Alamandina encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 19.5: Alamandina – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e isquemia

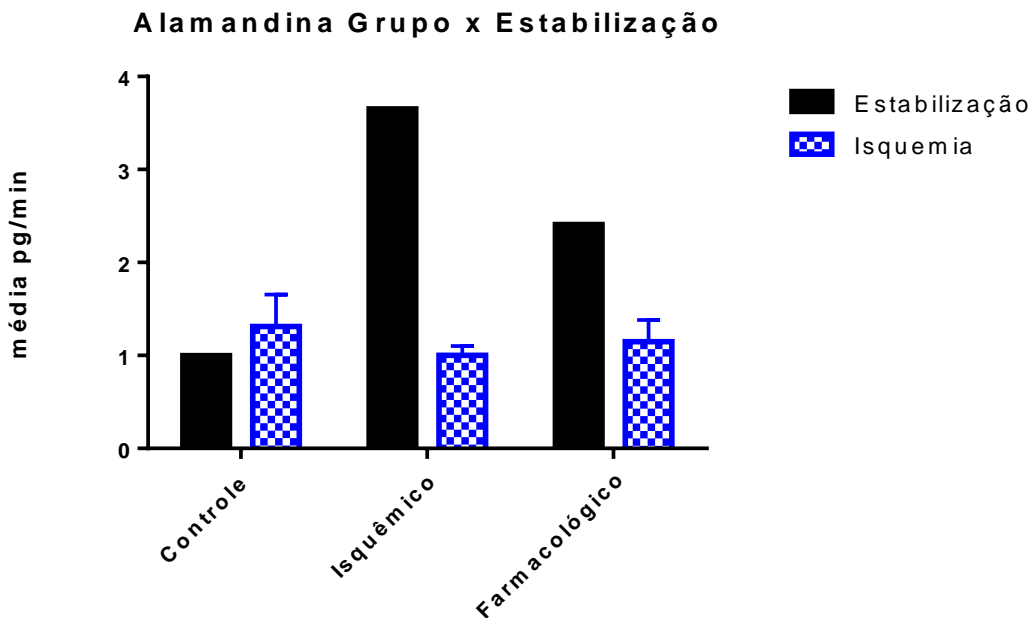


Gráfico 19.5: Alamandina – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 19.6: Alamandina – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e reperfusão

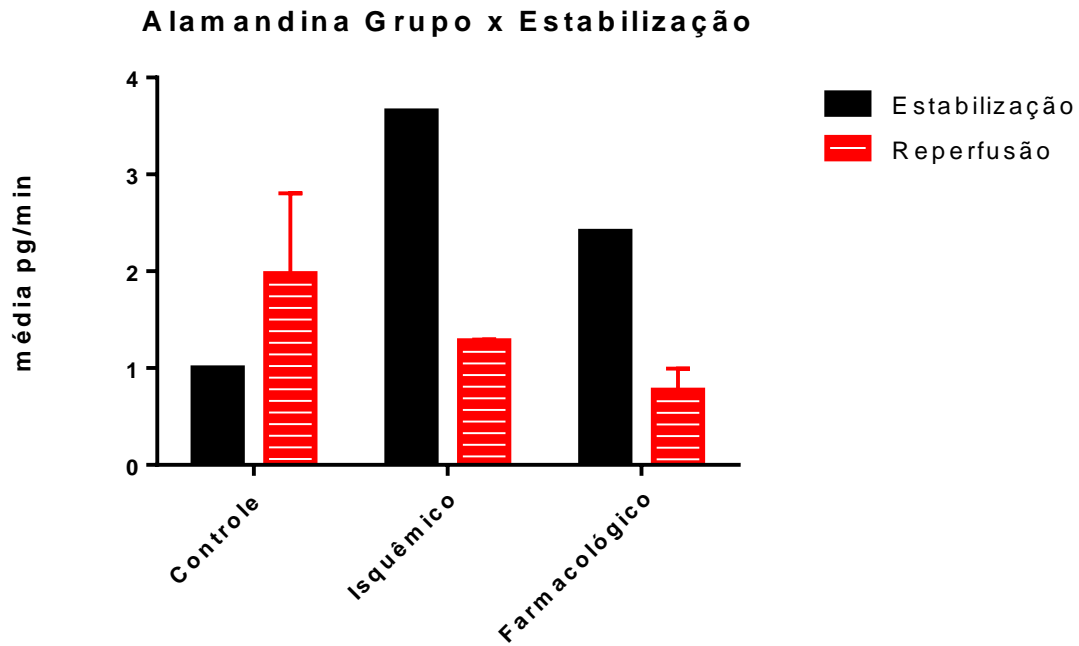


Gráfico 19.6: Alamandina – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 19.7: Alamandina – valor médio dos grupos nos períodos de isquemia e reperfusão

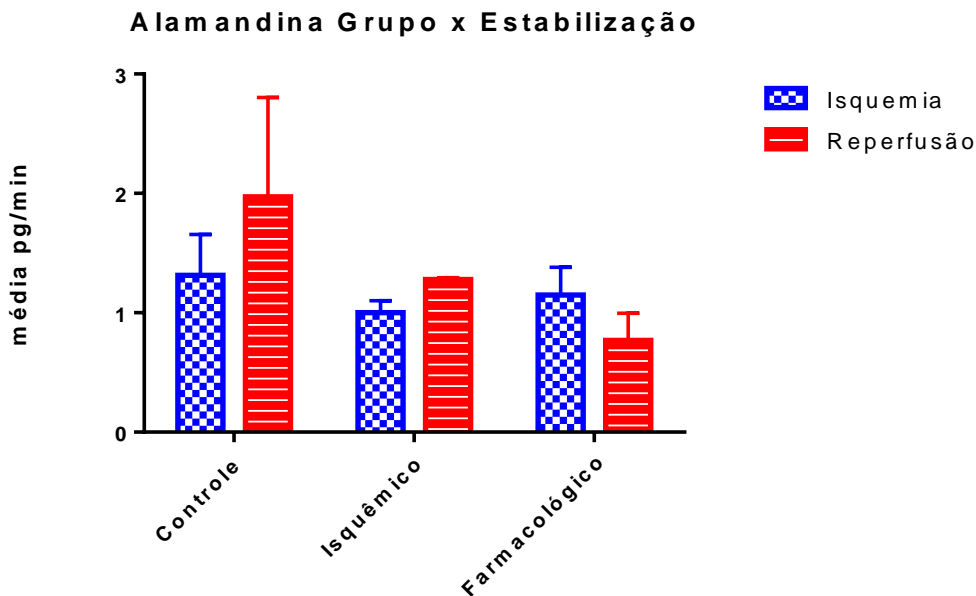


Gráfico 19.7: Alamandina – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.



Gráfico 19.8: Alamandina – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia

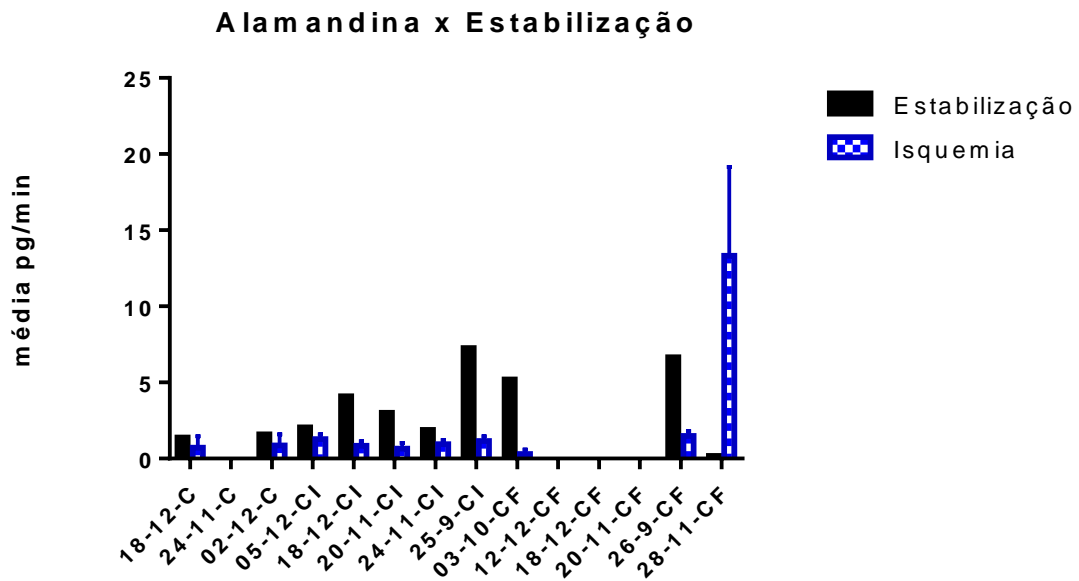


Gráfico 19.8 Alamandina, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média ± epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 19.9: Alamandina – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão

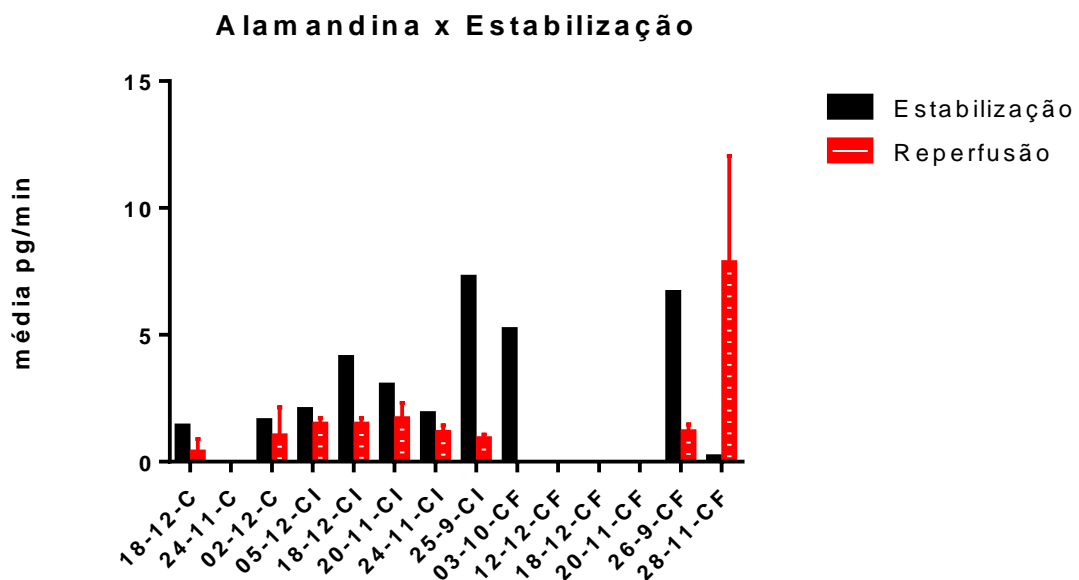


Gráfico 19.9 Alamandina, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão. Valores expressos como média ± epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 19.10: Alamandina – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão

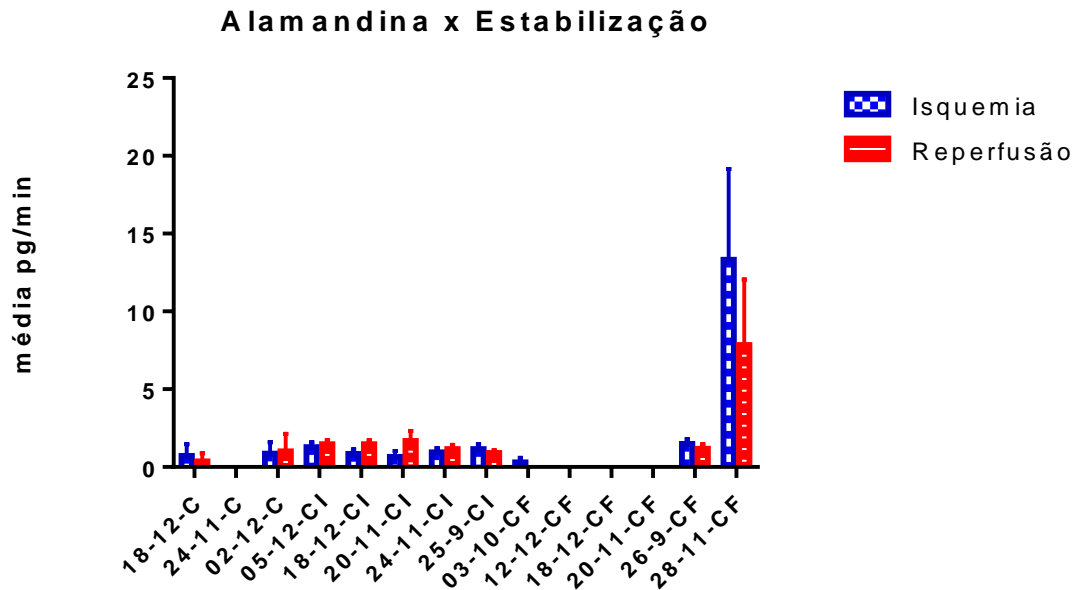


Gráfico 19.10 Alamandina, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

## 20. Angiotensina-(1-7)

Gráfico: 20.1 Angiotensina-(1-7) – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

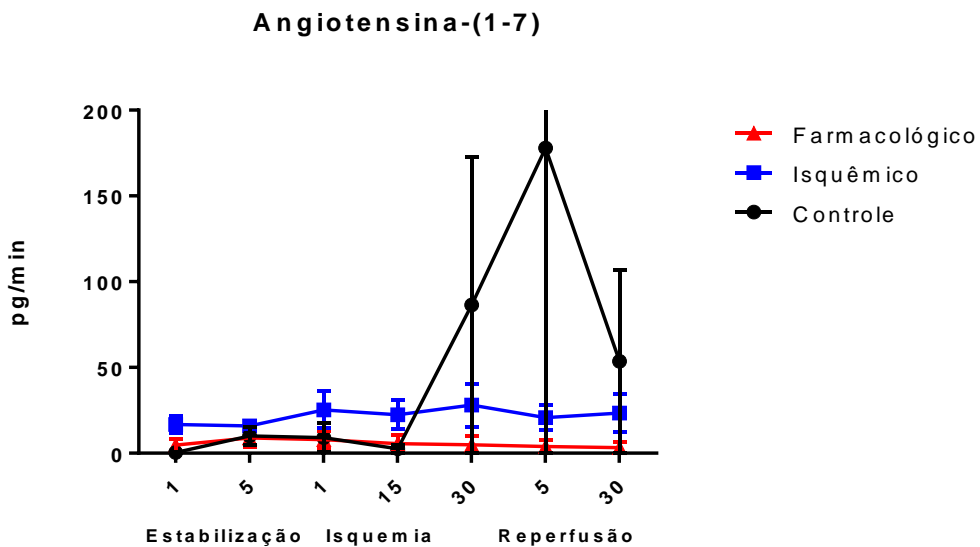


Gráfico 20.1: Angiotensina-(1-7) encontrada nos grupos controle, pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 20.2: Angiotensina-(1-7) – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

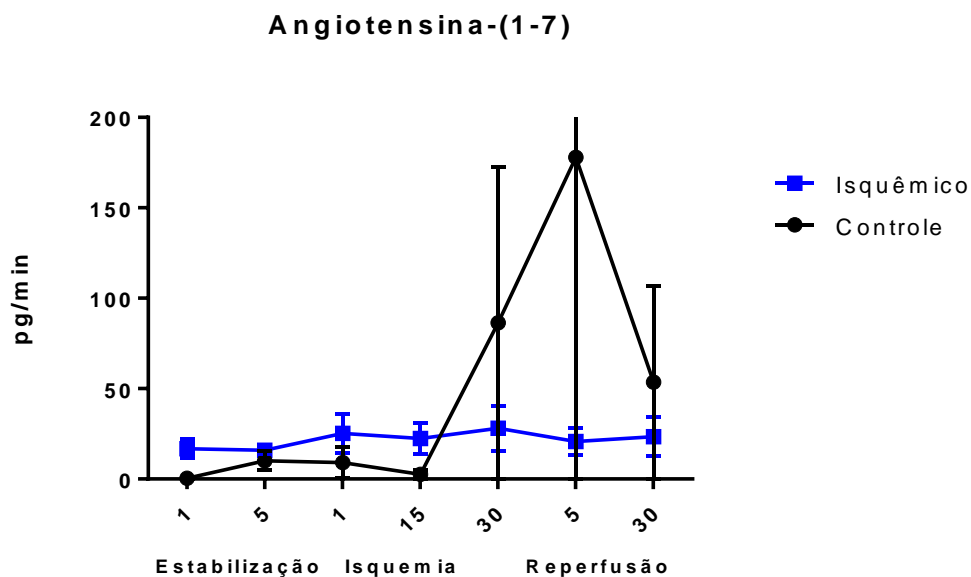


Gráfico 20.2: Angiotensina-(1-7) encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 20.3: Angiotensina-(1-7) – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

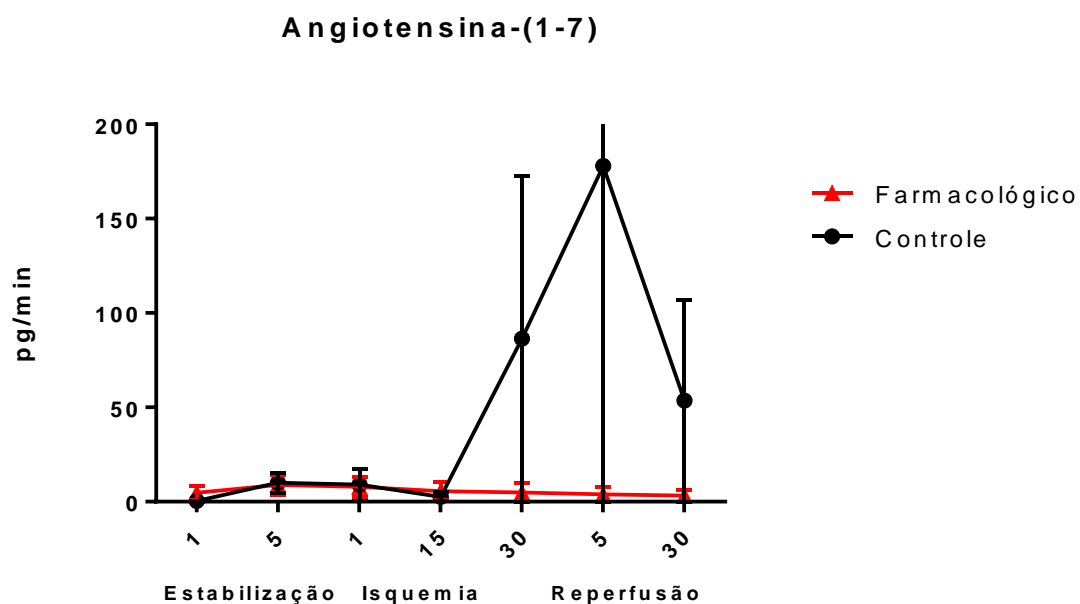


Gráfico 20.3: Angiotensina-(1-7) encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 20.4: Angiotensina-(1-7) – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

Pós-Condicionamento

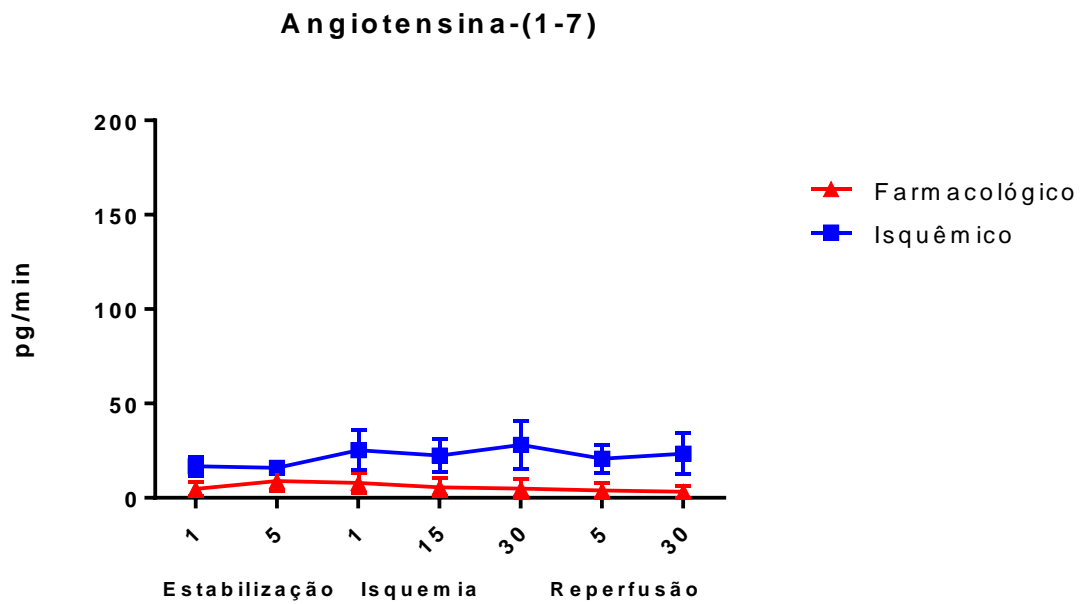


Gráfico 20.4: Angiotensina-(1-7) encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 20.5: Angiotensina-(1-7) – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e isquemia

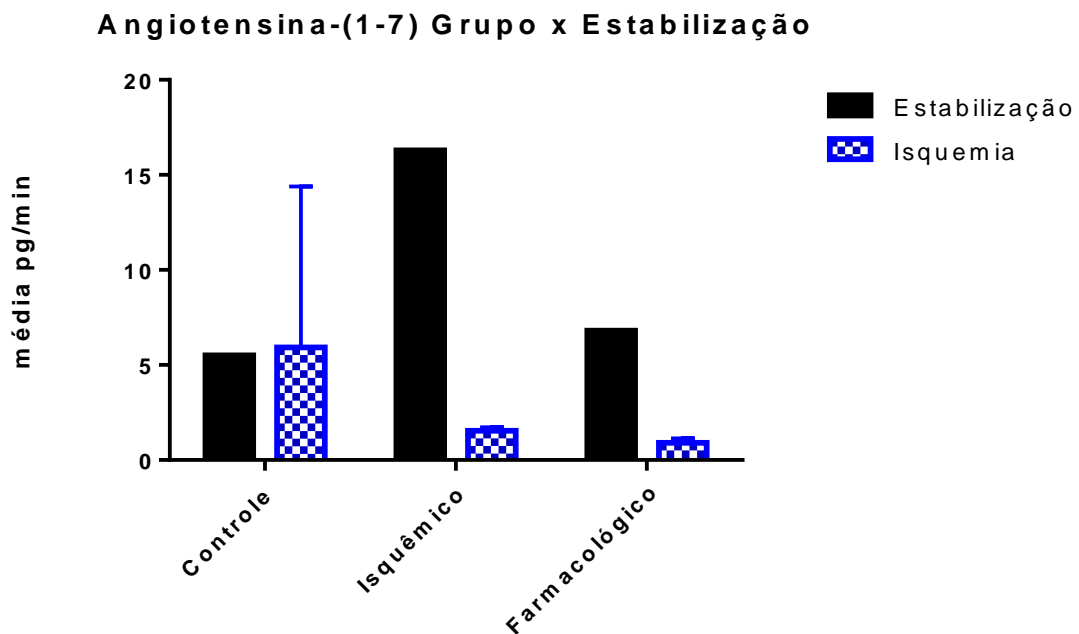


Gráfico 20.5: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 20.6: Angiotensina-(1-7) – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e reperusão

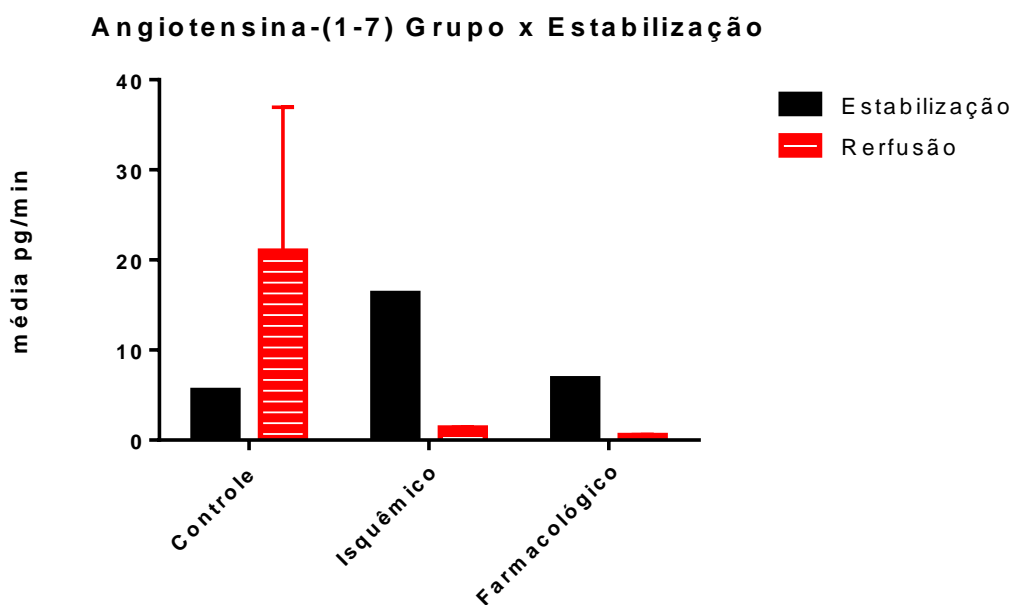


Gráfico 20.6: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e reperusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 20.7: Angiotensina-(1-7) – valor médio dos grupos nos períodos de isquemia e reperusão

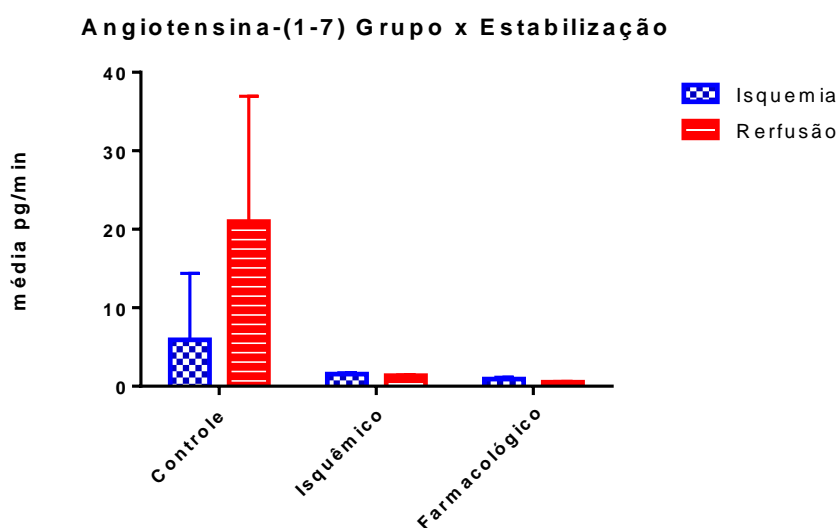


Gráfico 20.7: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de isquemia e reperusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 20.8: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia

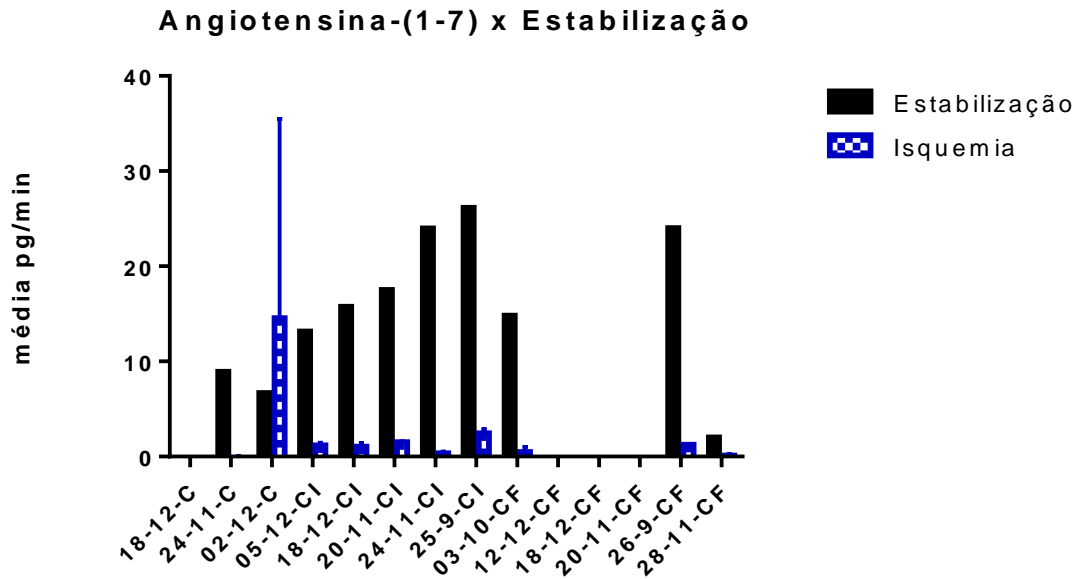


Gráfico 20.8 Angiotensina-(1-7), valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 20.9: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão

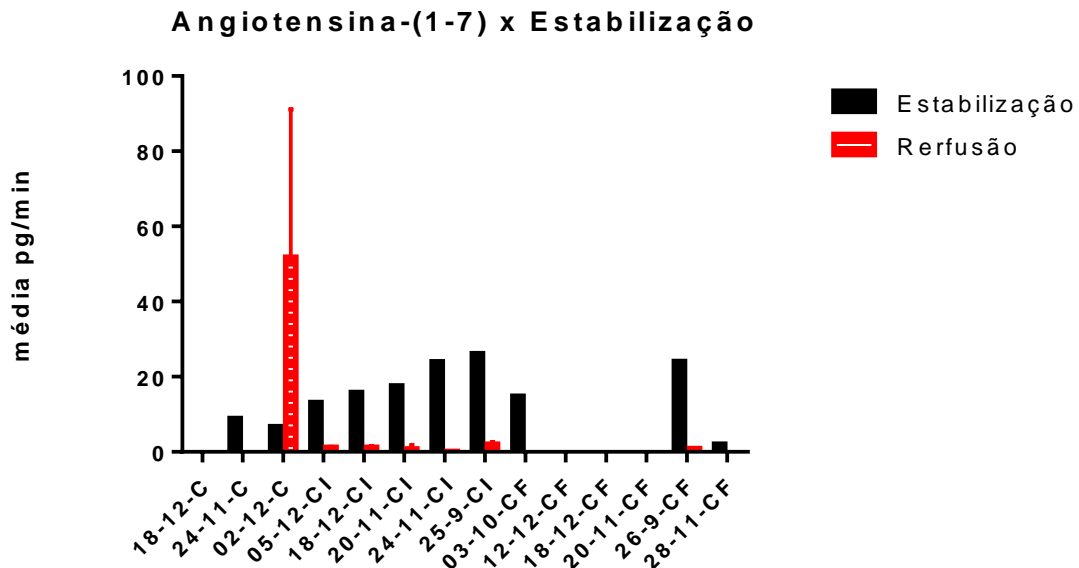


Gráfico 20.9 Angiotensina-(1-7), valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 20.10: Angiotensina-(1-7) – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão

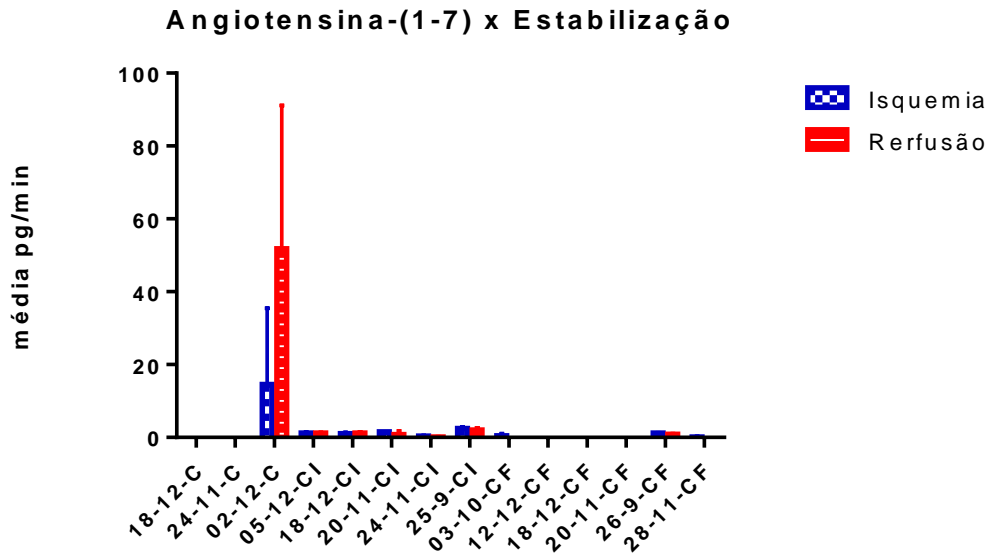


Gráfico 20.10 Angiotensina-(1-7), valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

## 21. Angiotensina II

Gráfico Gráfico: 21.1 Angiotensina II – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

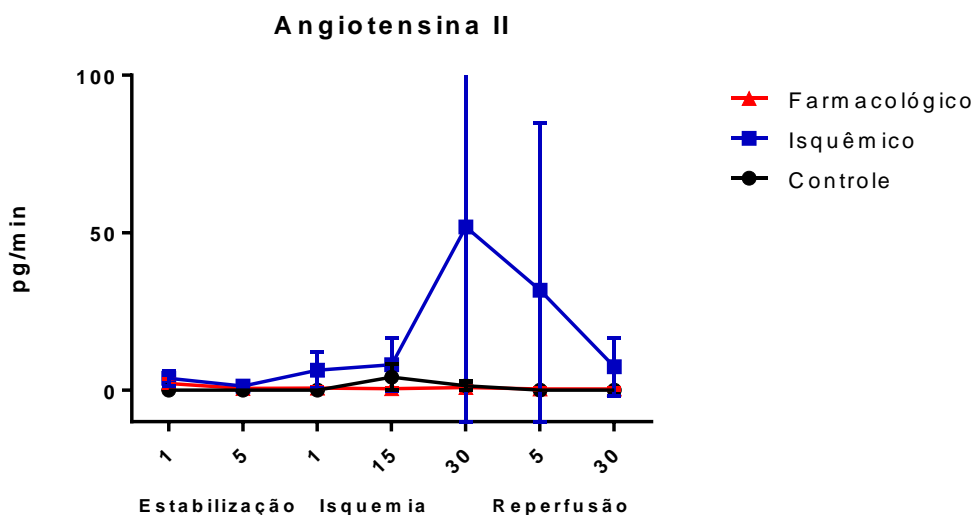


Gráfico 21.1: Angiotensina II encontrada nos grupos controle, pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico Gráfico: 21.2 Angiotensina II – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Isquêmico

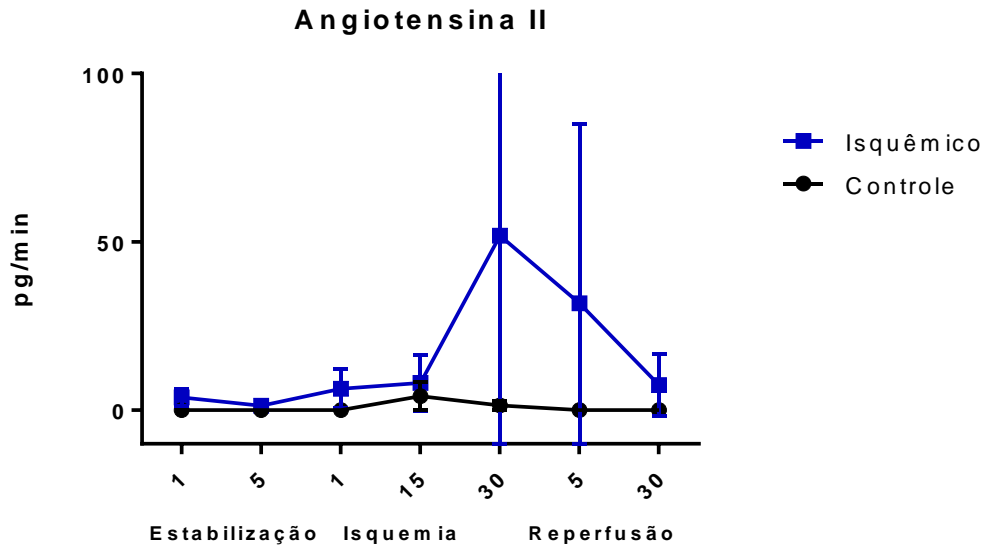


Gráfico 21.2: Angiotensina II encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento isquêmico. Valores expressos como média ± epm. Teste Sidak's.

Gráfico 21.3: Angiotensina II – Grupos Controle x Pós-Condicionamento Farmacológico

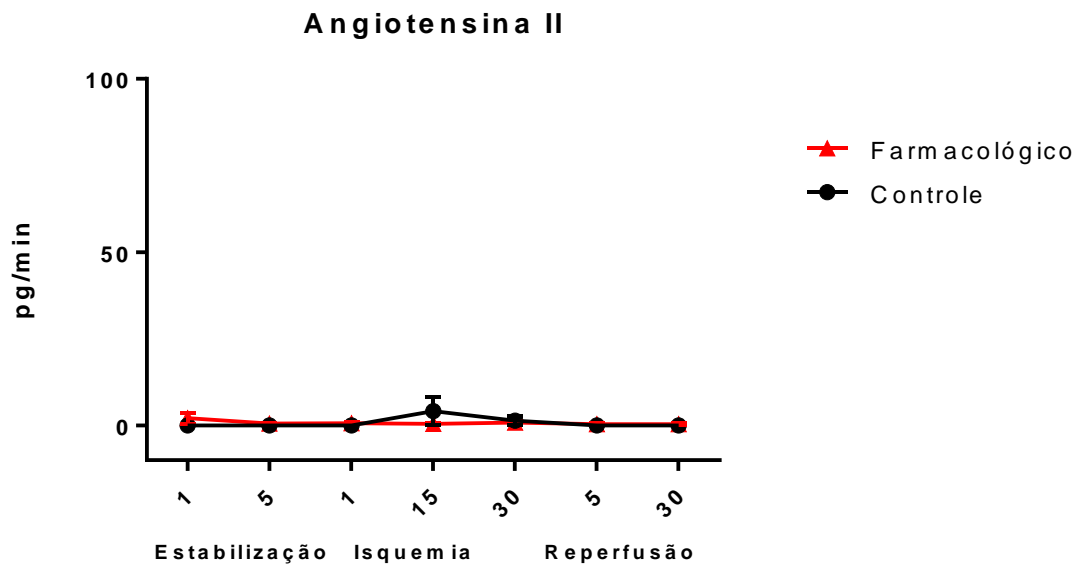


Gráfico 21.3: Angiotensina II encontrada nos grupos controle e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média ± epm. Teste Sidak's.



Gráfico 21.4: Angiotensina II – Grupos Pós-Condicionamento Isquêmico x Pós-Condicionamento Farmacológico

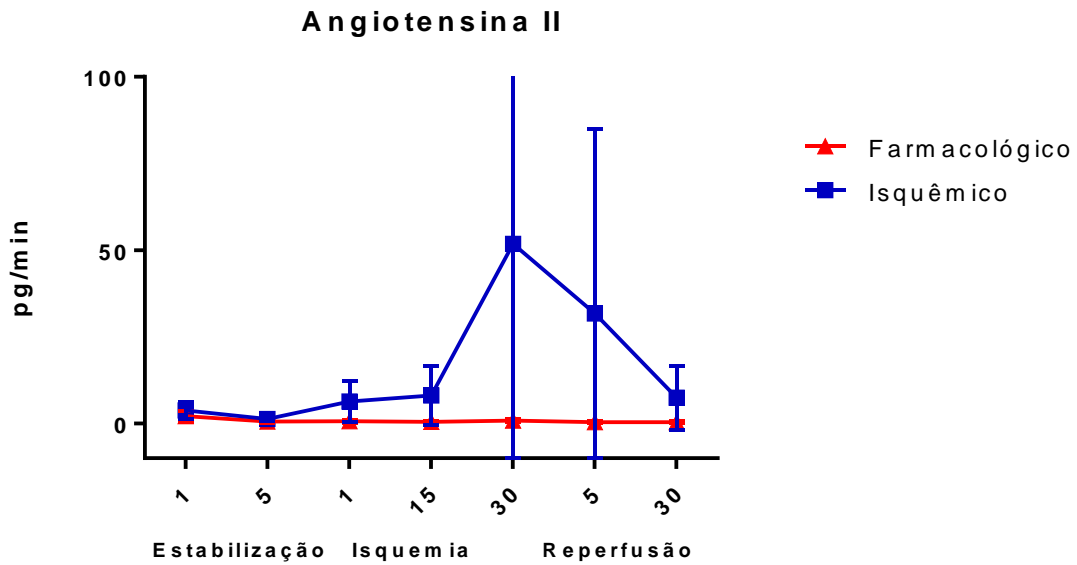


Gráfico 21.4: Angiotensina II encontrada nos grupos pós-condicionamento isquêmico e pós-condicionamento farmacológico. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Sidak's.

Gráfico 21.5: Angiotensina II – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e isquemia

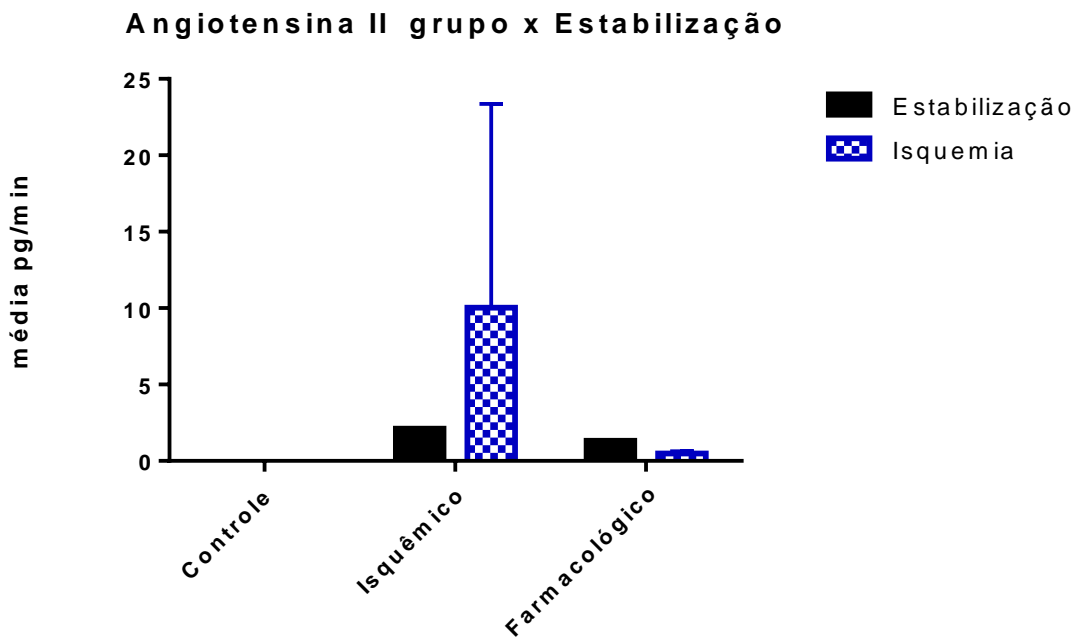


Gráfico 21.5: Angiotensina II - valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 21.6: Angiotensina II – valor médio dos grupos nos períodos de estabilização e reperfusão

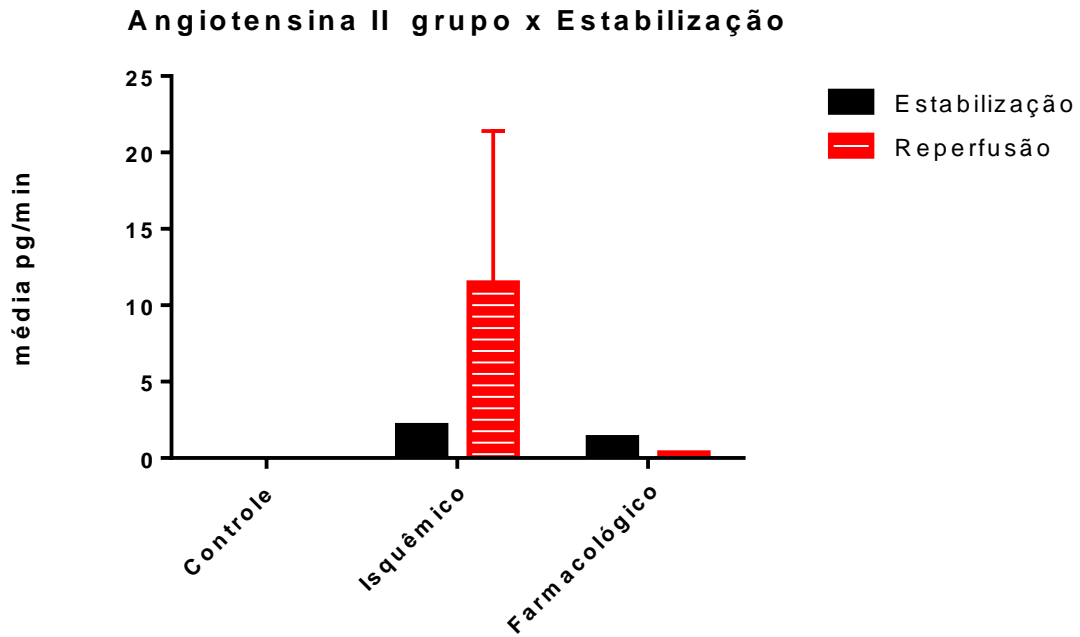


Gráfico 21.6: Angiotensina II - valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de estabilização e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 21.7: Angiotensina II valor médio dos grupos nos períodos de isquemia e reperfusão

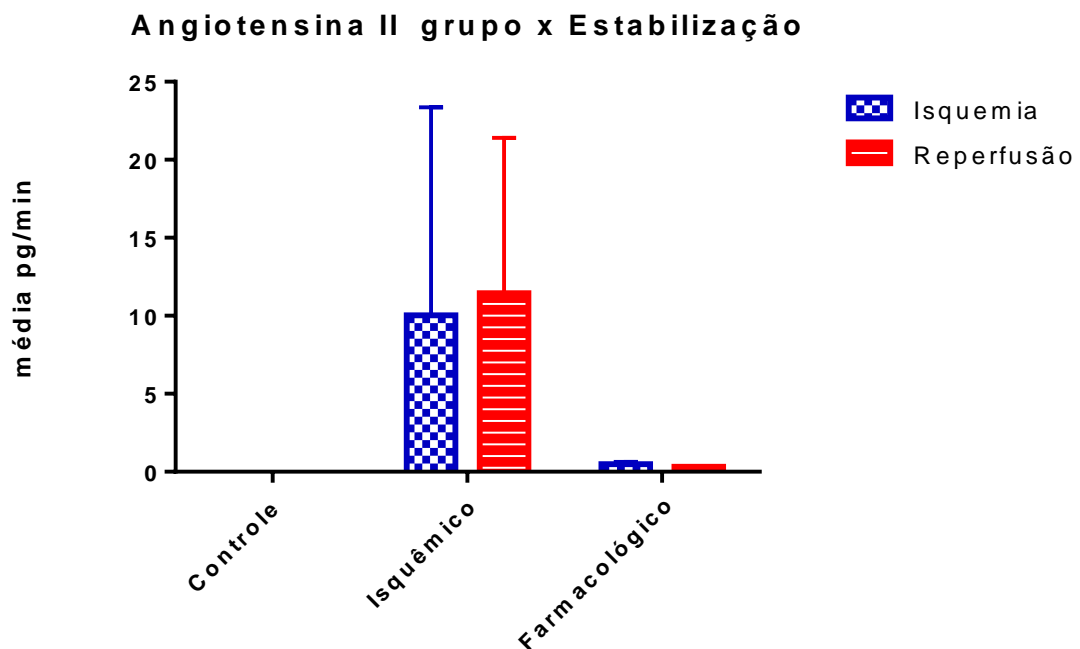


Gráfico 21.7: Angiotensina II - valor médio encontrado em todos os grupos nos períodos de isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 21.8: Angiotensina II – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia

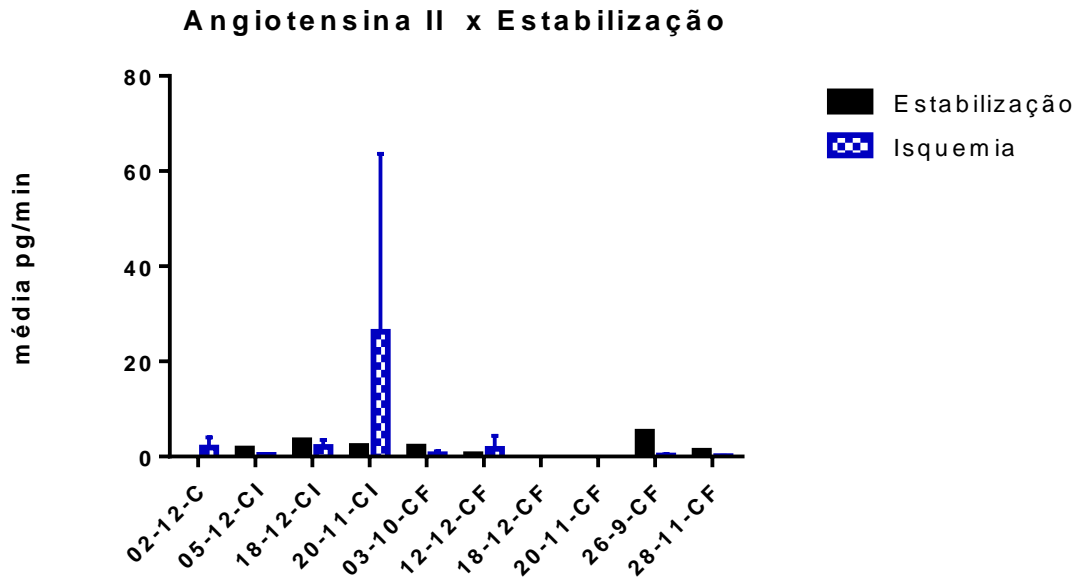


Gráfico 21.8: Angiotensina II, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e isquemia. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 21.9: Angiotensina II – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão

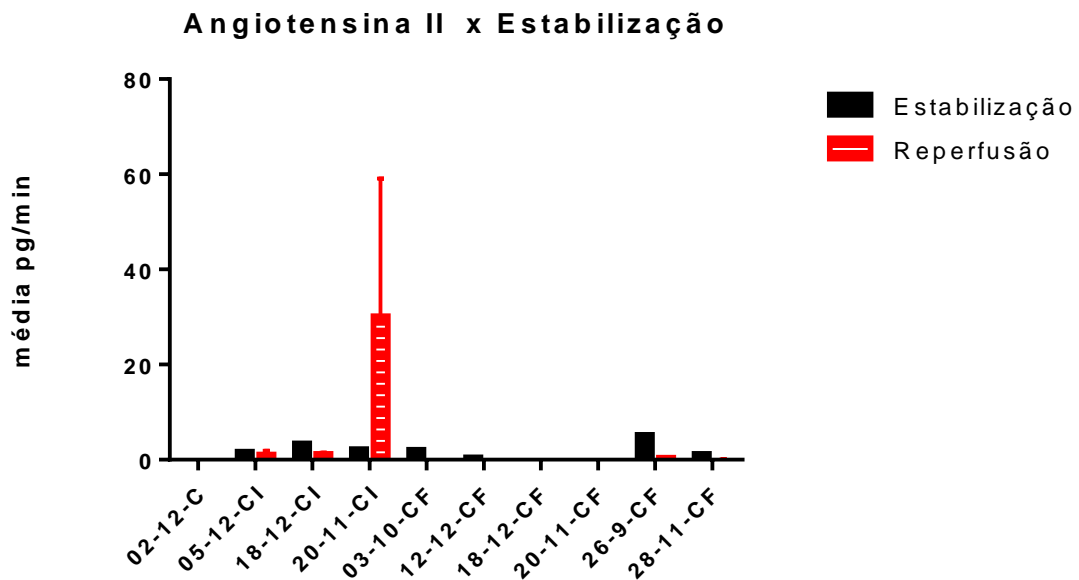


Gráfico 21.9: Angiotensina II, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de estabilização e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

Gráfico 21.10: Angiotensina II – valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão

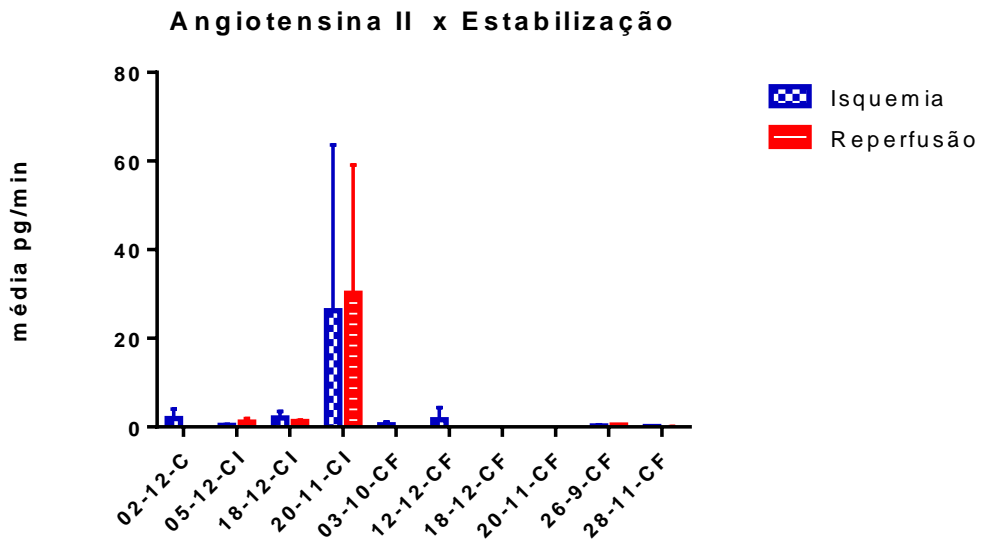
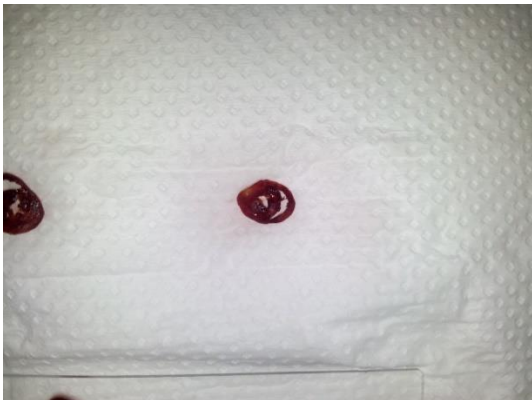


Gráfico 21.10 Angiotensina II, valor médio encontrado em cada animal durante os períodos de isquemia e reperfusão. Valores expressos como média  $\pm$  epm. Teste Dunnett's.

## 22. Arquivo Fotográfico

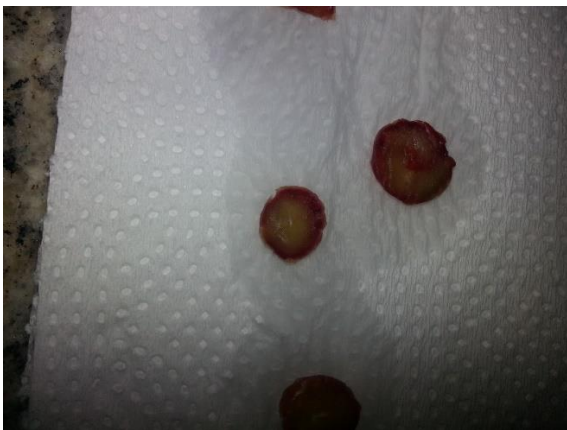
### 22.1. Grupo Controle







## 22.2. Grupo Pós-Condicionamento Isquêmico







### 22.3. Grupo Pós-Condicionamento Farmacológico





