

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EMANUEL TENÓRIO PAULINO

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO ALPHA-TEPINEOL EM RATOS
INFARTADOS**

**MACEIÓ, AL
2019**

Emanuel Tenório Paulino

Efeito cardioprotetor do alpha-terpineol em ratos infartados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.

Maceió, AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

P328e

Paulino, Emanuel Tenório.

Efeito cardioprotetor do alpha-terpineol em ratos infartados / Emanuel Tenório Paulino. – 2019.

230 f. : il. color.

Orientador: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 180-223.

Anexo: f. 225-230.

1. Alpha-terpineol (Terpenos). 2. Cardiotônicos. 3. Infarto do miocárdio. 4. Monoterpenos (Terpenos). 5. Farmacologia. I. Título.

CDU: 615.221



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

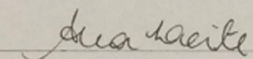
Folha de Aprovação

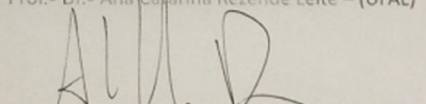
Emanuel Tenório Paulino

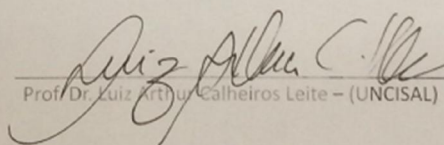
Efeito cardioprotetor induzido por alpha-terpineol em ratos infartados

Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Alagoas e aprovada em 8
de Abril de 2019.

Banca Examinadora


Prof.ª Dr.ª Ana Catarina Rezende Leite - (UFAL)


Prof. Dr. Alfredo Dias de Oliveira Filho - (UFAL)


Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite - (UNCISAL)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e à minha família em especial a minha mãe (Martha Daniella) ao meu irmão (Davi Tenório) e a minha avó materna (Maria de Nazareth) pelos incentivos diários.

Dedico também esta tese aos pacientes cardíacos, razão pela minha dedicação e esforço em tentar contribuir para futura melhoria na vida de indivíduos com risco de sofrer infarto.

AGRADECIMENTOS

À Profa. **Êurica Adélia Nogueira Ribeiro**, minha eterna mestra e fonte de inspiração, pela oportunidade em fazer parte do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFC) desde a minha iniciação científica até o doutorado, sempre a postos para me ouvir e tirar dúvidas a qualquer hora que precisasse, contribuindo para a minha formação em todos os níveis de treinamento acadêmico, assim como pela confiança a mim concedida para transformar um sonho de implantar a linha de cardioproteção em uma realidade no LFC, serei eternamente grato!

Aos professores **Aldeídia Pereira Oliveira e Lucindo Quintans Júnior** dos respectivos Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (Universidade Federal do Piauí) e do Departamento de Farmacologia de Sergipe (Universidade Federal de Sergipe) por cederem o alpha-terpineol para o estudo de cardioproteção.

Ao Prof. **Josué Cariranha Caldas** e seu aluno **Woodland de Souza Oliveira** do Laboratório de Química Analítica por disponibilizar seu laboratório, pelo auxílio e orientação na execução dos ensaios antioxidantes *in vitro*.

À professora **Janáina Herbele Bortoluzzi** e seu aluno **Cristian Gyertas**, pela disponibilidade na execução da confirmação molecular do alpha-terpineol pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas.

Ao doutorando **Edeildo Ferreira da Silva Júnior** do Laboratório de Química Medicinal pelo auxílio na execução do *docking* molecular e nos estudos de RMN H^+ e RMN C.

Ao Professor **Luciano Grillo** e seu aluno **Josiel Santos do Nascimento** do Laboratório Bioquímica e Fisiologia de Insetos pela atenção e pela disponibilidade laboratorial para execução dos ensaios bioquímicos.

A professora **Priscila Guimarães** e seu aluno **Breno Tenório**, do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pela disponibilidade em abrir seu laboratório para a execução do eletrocardiograma.

Às professoras **Salete Smaniotto e Magna Suzana** pela disponibilidade do uso dos equipamentos necessários para desenvolver o trabalho histopatológico e de citotoxicidade.

Ao professor **Isac Medeiros** e suas alunas **Natália Tabosa e Anaís Bezerra**, por me receber no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB, bem como, transmitir

seus conhecimentos das técnicas de medida de pressão interventricular, eletrocardiograma e átrios isolados e perfundidos. Meus sinceros agradecimentos!

À **Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues** pelo auxílio nos trabalhos de cardioproteção desde seu início ainda na iniciação científica bem como na execução deste trabalho, por sua amizade e apoio. Eternamente grato!

Ao mestrando do LFC **Alessandro César Bernardino**, pela incansável participação em todos os ciclos experimentais deste trabalho, abdicando de finais de semana e feriados para que este trabalho fosse desenvolvido. Serei sempre grato!

À doutoranda do LFC **Jessyka Carolina Galvão da Silva**, pelo auxílio na execução do experimento de reatividade vascular, assim como pela sua paciência em me transmitir seus conhecimentos sobre a técnica de artéria mesentérica superior isolada de ratos, me ensinando a montagem e execução do experimento ao longo dos anos em que fiz parte do LFC. Meu muito obrigado!

Às alunas de iniciação científica que fizeram parte na execução deste trabalho, **Kelly Rayane Vital Oliveira e Maria Luiza Dal Pont**, por me ajudarem a tornar possível a execução de vários protocolos experimentais simultâneos, além dos momentos de crises de risos e comilanças. Meus agradecimentos.

Aos professores **Flávio Teles, Luciano Grillo, Olagide de Castro, Alfredo Dias e Camila Dornelas** pelo aceite de participação do exame de qualificação do meu doutorado.

Aos professores **Luiz Arthur Calheiros, Ana Catarina Rezende, Alfredo Dias, Marcelo Duzzioni e Célio Rodrigues** pelo aceite de participação do exame de defesa do meu doutorado.

Aos professores dos Programas de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ciências da Saúde e Química e Biotecnologia pela disponibilidade em compartilhar seus saberes nas disciplinas cursadas.

À FAPEAL, CAPES e UFAL pelo suporte financeiro essencial para o desenvolvimento desta tese.

MUITO OBRIGADO!

*“É preciso ter um caos dentro de
si para dar a luz a uma estrela”*

(Friederich Nietzsche)

RESUMO

Introdução: O infarto agudo do miocárdio ocupa o primeiro lugar na mortalidade e morbidades como desfecho clínico das doenças cardiovasculares preexistente, contribuindo para o aumento dos óbitos precoces no mundo. A complexidade da farmacoterapia do infarto associada à inexistência de fármacos cardioprotetores tem incentivado o desenvolvimento de estratégias de cardioproteção. Assim, os compostos de origem natural representam moléculas candidatas a novos fármacos. Neste contexto, α -terpineol (TPN) é um monoterpeneo cíclico de origem natural que exibe ações cardiovasculares como: ação vasorelaxante endotélio-dependente e efeito anti-hipertensivo agudo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). TPN é um composto majoritário do óleo de *Protium heptaphyllum*, também possui ação vasorelaxante. No entanto, ações cardioprotetoras do TPN são desconhecidas. **Objetivo:** Avaliar o efeito cardioprotetor do TPN frente a um modelo de isquemia miocárdica. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética nº09/2015. **Métodos:** Ratos wistar e SHR foram alocados em 7 grupos e foram tratados por 15 dias através de gavagem em seguida induzidos ao infarto com isoproterenol (ISO), (G1= salina 0,9%); (G2= Infartado salina 0,9%); (G3=TPN 25 mg/kg); (G4=TPN 50 mg/kg); (G5=TNP 75 mg/kg); (G6=TPN 50 mg/kg sem ISO) e (G7=Nifedipina (NIF) 3 mg/kg V.O. 15 dias). No 16º os animais foram anestesiados (Cetamina 80 mg/kg + Xilazina 4 mg/kg i.p.) e foram realizados ensaios bioquímicos, morfométricos, hemodinâmicos, reatividade baroreflexa e eletrocardiográficos. Os ventrículos e aortas foram usados para determinar os níveis de cálcio e para avaliar a reatividade vascular. Adicionalmente, uma curva dose-resposta intravenosa do TPN em animais hipertensos não anestesiados foi realizada. Docking molecular também foi realizado. **Resultados:** TPN aumentou a sobrevivência dos animais ao infarto induzido, reduziu a área de necrose no miocárdio, preveniu as alterações eletrocardiográficas e inibiu a liberação de marcadores cardíacos, além disso, TPN inibiu a elevação da frequência cardíaca induzida por isoproterenol. TPN preveniu o desbalço sobre os níveis de cálcio em ventrículos e aortas. Adicionalmente, TPN produziu dilatação coronariana e neovascularização endotelial em aortas de ratos. TPN também aumentou a potência e o efeito máximo da reatividade vascular de ratos hipertensos e infartados. TPN induziu bradicardia intravenosa dose-dependente, que foi significativamente atenuada na presença de um bloqueador de receptores muscarínicos. Estudos de docking molecular mostraram que TPN possui afinidade eletrônica para receptores muscarínicos M_2 e em canais para cálcio voltagem dependentes produzindo bloqueio similar a nifedipina. **Conclusão:** Alpha-terpineol produz cardioproteção em ratos e seus mecanismos parecem envolver receptores M_2 cardíacos e o bloqueio sobre os VOCC's. TPN pode servir como molécula candidata a fármaco cardioprotetor no IAM. Entretanto, novos estudos são necessários para elucidar o completo mecanismos desta ação.

Palavras-chave: Alpha-terpineol; Cardioproteção; Infarto do miocárdio; Monoterpenos.

ABSTRACT

Introduction: Myocardial infarction is the most common clinical outcome associated with mortality and morbidity of cardiovascular diseases previously. The complexity of infarction pharmacotherapy associated with the lack of cardioprotective drugs has encouraged the development of new cardioprotection strategies. Thus, compounds of natural have been represented candidate molecules for new drugs. In this context, α -terpineol (TPN) is a cyclic monoterpene of natural origin that exhibits cardiovascular actions such as vasorelaxant endothelium-dependent and acute antihypertensive in SHR type rats. TPN is a major compound of essential oil of *Protium heptaphyllum* that produce cardiovascular effects as vasorelaxant activity. However, cardioprotective action of TPN remains unknown. **Objective:** Evaluate the cardioprotective effect of TPN on acute myocardial infarction in rats. This study was approved by ethics committee n°09/2015. **Methods:** Wistar and SHR rats, were allocated on 7 experimental groups, were pre-treated for 15 days orally and induced to infarction by isoproterenol (ISO): (G1= saline 0.9%); (G2= Infarcted saline 0,9%); (G3= TPN 25 mg/kg); (G4=TPN 50 mg/kg); (G5=TPN 75 mg/kg); (G6=TPN 50 mg/kg without ISO) and (G7=Nifedipine (NIF) 3 mg/kg). On 16^o day, rats were anesthetized (Ketamine 80 mg/kg + Xylazine 4 mg/kg i.p.) and biochemical, morphometric, hemodynamic, baroreflex and electrocardiographic tests were performed. Cardiovascular fragments were used to determine calcium levels and to assess vascular reactivity. Additionally a curve dose-response in hypertensive animals non-anesthetized with TPN was realized. Molecular docking was also accomplished. **Results:** TPN increased the survival of animals to induced infarction, reduced necrosis area of the myocardium, prevented changes on electrocardiographic tests and inhibited the release of cardiac markers. Furthermore, TPN inhibited isoproterenol-induced elevation of heart rate. TPN prevented the imbalance on calcium levels in the ventricles and aorta. In addition, TPN produced coronary dilatation and endothelial neovascularization in vessels of rats. TPN also changes of the potency and maximal effect of vascular reactivity of hypertensive and infarcted rats. TPN induced dose-dependent intravenous bradycardia, which was significantly attenuated in the presence of a muscarinic receptor blocker. Molecular docking studies show that TPN has an electronic affinity for muscarinic M₂ receptors but also on calcium-dependent voltage channels L type producing nifedipine-like blocking. **Conclusion:** Alpha-terpineol produces cardioprotection in rats, and its mechanisms appear to involve cardiac M₂ receptors and the blockage on the VOCC's. TPN may be a cardioprotective drug candidate molecule. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms of this action.

Key-words: Alpha-terpineol; Cardioprotection; Myocardial infarction; Monoterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática simplificada da sinalização celular cardioprotetora em miócitos cardíacos produzidos pela ativação de receptores celulares colinérgicos.....	40
Figura 2	Estrutura molecular do isoproterenol.....	44
Figura 3	Rotas biossintéticas envolvidas na formação de compostos terpenicos em vegetais	48
Figura 4	Monoterpenos com ação cardiovascular.....	51
Figura 5	Representação esquemática dos experimentos hemodinâmicos <i>in vivo</i>	68
Figura 6	Representação do miógrafo para experimentos vasculares <i>ex vivo</i>	70
Figura 7	Representação esquemática do protocolo de reatividade vascular <i>ex vivo</i>	71
Figura 8	Representação esquemática dos experimentos de medida direta da pressão arterial em ratos não-anestesiados	72
Figura 9	Representação esquemática do delineamento experimental da curva dose-resposta cardiovascular <i>in vivo</i> em ratos não-anestesiados.....	73
Figura 10	Microfatias de corações isolados de ratos wistar (WT) corados com cloreto de trifeniltetrazólio 1% (TTC 1%) após o tratamento suagudo.....	85
Figura 11	Microfatias de corações isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) corados com cloreto de trifeniltetrazólio 1% (TTC 1%) após o tratamento suagudo.....	85
Figura 12	Microfotografias de miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	87
Figura 13	Microfotografias de miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	88
Figura 14	Microfatias de miocárdios de ratos WT, após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	108
Figura 15	Microfatias de miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o	

	monoterpeno (TPN).....	109
Figura 16	Aspectos morfológicos de corações isolados de ratos wistar (WT) após o tratamento subagudo com TPN.....	122
Figura 17	Aspectos morfológicos de corações isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após o tratamento subagudo com TPN.....	122
Figura 18	Microfatias de aortas de ratos wistar (WT) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	124
Figura 19	Microfatias de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	125
Figura 20	Microfatias de aortas de ratos wistar (WT) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	126
Figura 21	Microfatias de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN).....	127
Figura 22	Docking molecular na análise do composto monoterpeno (TPN).....	149
Figura 23	Docking molecular do TPN frente ao sítio de ação dihidropiridínico em canais para cálcio tipo L.....	150
Figura 24	Docking molecular do TPN frente ao sítio de ação em receptores muscarínicos M ₂	151
Figura 25	Representação esquemática do efeito cardioprotetor induzido por TPN e seus mecanismos de ação.....	178

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Percentagem da viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774 no teste MTT.....	77
Gráfico 2	Percentagem de sobrevivência após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos (A) wistar (B) SHR.....	79
Gráfico 3	Níveis séricos de creatino-kinase total (CK-NAC) após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	80
Gráfico 4	Níveis séricos de creatino-kinase MB (CK-MB) após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	82
Gráfico 5	Percentagem da área de necrose miocárdica após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	84
Gráfico 6	Níveis de proteína C reativa nos ventrículos esquerdos após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	94
Gráfico 7	Avaliação hipertrófica pós-infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos WT.....	105
Gráfico 8	Avaliação hipertrófica pós-infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos SHR.....	106
Gráfico 9	Níveis séricos de colesterol total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	111
Gráfico 10	Níveis séricos de triglicérides após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	112
Gráfico 11	Atividade antioxidante do TPN no teste de atividade sequestradora radicalar in vitro frente às espécies reativas de oxido nítrico (ERN) em função do tempo.....	116
Gráfico 12	Alterações hemodinâmicas após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos WT.....	118

Gráfico 13	Alterações hemodinâmicas após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos SHR.....	119
Gráfico 14	Demanda miocárdica de oxigênio após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	121
Gráfico 15	Reatividade vascular frente à contração obtida pela curva concentração-resposta de fenilefrina após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c) em ratos SHR.....	129
Gráfico 16	Reatividade vascular frente ao relaxamento obtido pela curva concentração-resposta do nitroprussiato de sódio após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c) em ratos SHR.....	130
Gráfico 17	Sensibilidade baroreflexa frente à fenilefrina 8 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	133
Gráfico 18	Tempo de ação da fenilefrina 8 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	134
Gráfico 19	Sensibilidade baroreflexa frente ao nitroprussiato de sódio 50 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	135
Gráfico 20	Tempo de ação do nitroprussiato de sódio 50 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A) wistar (B) SHR.....	136
Gráfico 21	Reatividade cardiovascular frente à acetilcolina 8 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos WT.....	138
Gráfico 22	Reatividade cardiovascular frente à acetilcolina 8 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos SHR.....	139
Gráfico 23	Tempo de ação da acetilcolina 8 µg/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos (A)	

	wistar (B) SHR.....	140
Gráfico 24	Níveis de cálcio total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.) em ratos WT (A) soro (B) ventrículo (C) aorta e em ratos SHR (D) soro (E) ventrículo (F) aorta.....	143
Gráfico 25	Efeitos cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados e não infartados nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v.....	145
Gráfico 26	Efeitos cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos anestesiados e não infartados nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v.....	146
Gráfico 27	Efeitos cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados e não infartados após hexametônio (20 mg/kg i.v.) ou atropina (2 mg/kg i.v.) nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v.....	147
Gráfico 28	Parâmetros hemodinâmicos basais nas linhagens de ratos wistar (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR) – ANEXO I.....	226
Gráfico 29	Percentagem de área de necrose miocárdica após o infarto agudo do miocárdio induzidos por isoproterenol nas linhagens de ratos wistar (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR) – ANEXO II.....	227
Gráfico 30	Reatividade vascular obtida pela curva concentração-resposta para: (A) fenilefrina (FEN) (10^{-10} - 10^{-5} M) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) (10^{-10} - 10^{-7} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada sem endotélio funcional em ratos WT e SHR-ANEXO III	228

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contagem de Leucócitos Totais (CLT) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	89
Tabela 2	Contagem de Leucócitos Totais (CLT) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	89
Tabela 3	Contagem Total de núcleos em picnose (CTNp) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	90
Tabela 4	Contagem Total de núcleos em picnose (CTNp) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	90
Tabela 5	Contagem Total de núcleos em cariólise (CTNc) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	91
Tabela 6	Contagem Total de núcleos em cariólise (CTNc) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	91
Tabela 7	Contagem Total de núcleos em cariorrexe (CTNcx) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	92
Tabela 8	Contagem Total de núcleos em cariorrexe (CTNcx) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno TPN e subsequente exposição ao agente indutor simpaticomimético isoproterenol	

	(85 mg/kg 2x s.c.).....	92
Tabela 9	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização I após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	97
Tabela 10	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização II após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	98
Tabela 11	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização III após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	99
Tabela 12	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	100
Tabela 13	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVL após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	101
Tabela 14	Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVF após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c.).....	102
Tabela 15	Perfil antioxidante do monoterpeno (TPN) em teste antioxidante de atividade sequestradora radicalar <i>in vitro</i> frente aos radicais DPPH, ABTS e Ferro no estado de oxidação Fe ³⁺	114
Tabela 16	Perfil antioxidante do monoterpeno (TPN) em teste antioxidante de atividade complexadora <i>in vitro</i> ao ferro no estado de oxidação Fe ³⁺	114
Tabela 17	Comparação dos valores de E _{máx} e pD ₂ dos anéis de artéria mesentérica isolada de ratos SHR sem endotélio funcional frente às contrações com	

	fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5} M).....	130
Tabela 18	Comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 dos anéis de artéria mesentérica isolada de ratos SHR sem endotélio funcional frente ao relaxamento com nitroprussiato de sódio (10^{-10} - 10^{-7} M).....	131

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>A</i>	Coeficiente angular
<i>Ac</i>	Corresponde ao coeficiente angular da curva analítica
ABTS	Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Ach	Acetilcolina
AC	Adenilil-ciclase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ASN	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
ANGIO II	Angiotensina II
AKT	Proteína Kinase B = PKB
aVR	Derivatização monopolar direita
aVL	Derivatização monopolar esquerda
aVF	Derivatização monopolar inferior
<i>B</i>	Coeficiente linear
β_1	Receptores β -adrenérgicos tipo 1
β_2	Receptores β -adrenérgicos tipo 2
Bcl ₂	Proteína antiapoptótica 2
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CAO	Concentração do composto antioxidante
CA-acetoxi	Ácido ent-15 α -acetoxicaur-16-en-19-óico
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
C ₂ HCl ₃ O ₂	Ácido tricloroaético
C ₂₀ H ₁₂ N ₄ NaO ₆ S ₂	Ferrozina
CI ₅₀	Concentração inibitória que produz 50 % do efeito máximo
CLT	Contagem total de leucócitos
CTNp	Contagem total de núcleos em picnose
CTNc	Contagem total de núcleos em cariólise
CTNcx	Contagem total de núcleos em cariorrexe
„Log P	Concentração logarítmica de P
CK-MB	Fração MB da creatino-kinase

CK-BB	Fração BB da creatino-kinase
CK-MM	Fração MM da creatino-kinase
CK-NAC	Creatino-kinase total
DI	Derivatização I
DII	Derivatização II
DIII	Derivatização III
DMAP	Pirofosfato de dimetilalila
DMO	Demanda miocárdica de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
dL	Decilitro
€	Euro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endothelial
Emáx	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da media
ESENFAR	Escola de Enfermagem e Farmácia
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Cinase regulada por sinalização extracelular
EUA	Estados Unidos da América
Fe ²⁺	Íons ferrosos no estado de oxidação II
Fe ³⁺	Íons ferrosos no estado de oxidação III
FeCl ₃	Cloreto férrico
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FRAP	Ensaio analítico de poder antioxidante por redução do ferro
g	Grama
GLP-1	Peptídeo semelhante à insulina 1
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
Gs	Proteína G estimulatória
GSK-38	Cinase glicogênio sintase 38

GPx	Glutationa peroxidase
H&E	Hematoxilina e eosina
HO ⁻	Radical hidroxila
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H9C6	Linhagem de cardiomiócitos
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IF	Percentual de inibição
I _{máx}	Inibição máxima
i.p.	Intraperitoneal
ISO	Isoproterenol
IPP	Pirofosfato de isopentila
Kg	Kilograma
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianeto de potássio
K ⁺	Potássio
Kcal	Kilocalorias
JAK-2	Janus Kinase tipo 2
L	Litros
<i>L</i>	Lúmen vascular
LEU	Leucina
L-NAME	Hidrocloreto de nitro-L-arginina metil ester
Labdano 302	(8)17, 12E, 14-labdatrieno-18-(óico)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFC	Laboratório de Farmacologia Cardiovascular
Mm	Milímetro
M	Molar
M ₂	Receptor muscarínico tipo 2
M ₃	Receptor muscarínico tipo 3
μM	Micromolar
μL	Microlitros
Mg	Miligrama
MAPK	MAPquinase
MEP	Metileritritol
mmHg	Milímetros de mercúrio

mmol	milimols
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5difenil-2H-tetrazolio
MVA	Ácido mevalônico
<i>N</i>	Tamanho amostral
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sódio mono-hidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NIF	Nifedipina
NF-K β	Fator de necrose tumoral Kappa beta
nM	Nanometros
NOO [·]	Radical óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
NADP	Dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato
NADPH	Enzima dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato oxidase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
§	Sifrão
RNA	Ácido ribonucleico
RSCB	<i>Protein Data Bank</i>
pD ₂	-log CE ₅₀
PE	Polietileno
pKa	Constante de acidez
PKA	Proteína quinase A
p	Nível de significância
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Fenilalanina
PBS	Tampão fosfato-salino

<i>R</i>	Coeficiente de correlação linear
R\$	Real brasileiro
RPM	Rotações por minuto
<i>RISK</i>	Kinase de sobrevivência à lesão de injúria-reperusão
RSD	Desvio padrão relativo
RMN P	Ressonância magnética nuclear de fosfatos
TA	Túnica adventícia
TG	Tricrômio de gomori
TI	Túnica íntima
TM	Túnica média
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TPN	Alpha-terpineol
TPTZ	Complexo férrico 2,4,6-tripiridil- <i>s</i> -triazina
TRR	Triptofano
TYP	Tirosina
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
<i>Sb</i>	Desvio padrão do branco analítico
SER	Serina
<i>Sp</i>	Desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear
s.c.	Subcutâneo
SOD	Enzimas superóxido dismutase
STAT-1	Transdução de sinal ativado por fator transcricional tipo 1
STAT-3	Transdução de sinal ativado por fator transcricional tipo 3
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio
TRPM 8	Canais iônicos acoplados a receptores de transiente de membrana 8
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
U/L	Unidade por litros
UV	Ultravioleta
US\$	Dólar americano
VEGF- β	Fator de crescimento vascular tipo β
V.O.	Via oral
VOOCS	Canais para cálcio operados por voltagem

VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
\bar{X}_p	Valor médio encontrado para este padrão
WHO	World Health Organization
%	Percentual
<	Menor
°C	Graus Celsius
6-PG	6-fosfogluconato
Mm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
μm^3	Micrômetro cúbico
1D	Uma dimensão
1J95	Canal de Potássio $\text{K}_{\text{CA}2+}$
1GP1	Enzima Glutationa Peroxidase
1QQW	Enzima Catalase
1XOS	Enzima fosfodiasterase 4
2RH1	Receptor β Adrenérgico tipo 2
2SOD	Enzima Superóxido Dismutase
2LQP	Canal de Ca^{+2} tipo L, C-terminal
2LQC	Canal de Ca^{+2} tipo L, N-terminal
3σ	Limites de detecção
3D	Três dimensões
3NOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
3NAF	Canal de BkCa
4BKE	Albumina
4DEY	Canal de Ca^{+2} tipo L, sensível à voltagem
4GPO	Receptor β_1
40x	Aumento de 40 vezes
4MQS	Receptor M_2
4DAJ	Receptor M_3
10σ	Limites de quantificação
Π	ligações <i>pi</i>
Σ	ligações <i>sigma</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1	Considerações sobre o infarto agudo do miocárdio.....	30
2.2	Infarto experimental induzido por isoproterenol: uma breve revisão.....	43
2.3	Compostos terpenicos e seus efeitos cardiovasculares.....	48
3	OBJETIVOS	56
3.1	Geral.....	56
3.2	Específicos.....	56
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1.	Sais.....	57
4.1.2	Anestésicos.....	57
4.1.3	Reagentes analíticos.....	57
4.1.4	Kits bioquímicos.....	57
4.2	Extração e obtenção do monoterpene (TPN).....	57
4.3	Avaliação da toxicidade em macrófagos.....	58
4.4	Animais.....	58
4.5	Abordagens farmacológicas.....	59
4.5.1	Avaliação da sobrevivência aos infartos induzidos por isoproterenol.....	60
4.5.2	Determinação da área de necrose miocárdica.....	60
4.5.3	Avaliação eletrocardiográfica em repouso.....	61
4.5.4	Avaliação bioquímica.....	61
4.5.4.1	Dosagem dos marcadores séricos de infarto agudo do miocárdio.....	62
4.5.4.2	Dosagem dos níveis lipídicos.....	62
4.5.4.2.1	Dosagem de colesterol.....	63
4.5.4.2.2	Dosagem de triglicérides.....	63
4.5.4.3	Dosagem dos níveis de cálcio.....	63
4.5.4.4	Dosagem da Proteína C Reativa.....	64
4.5.5	Avaliação histopatológica.....	65
4.5.6	Avaliação morfológica e morfométrica.....	65
4.5.7	Avaliação da atividade sequestradora radicalar.....	65
4.5.7.1	Atividade sequestradora do radical DPPH.....	65

4.5.7.2	Atividade sequestradora do radical ABTS.....	66
4.5.7.3	Atividade redutora de íons Fe ³⁺	66
4.5.7.4	Ensaio de complexação com Fe ³⁺	66
4.5.7.5	Atividade sequestradora de espécies reativas do nitrogênio.....	67
4.5.8	Avaliação hemodinâmica.....	67
4.5.9	Determinação da demanda miocárdica de oxigênio.....	68
4.5.10	Avaliação da sensibilidade baroreflexa.....	68
4.5.11	Avaliação da resposta colinérgica.....	69
4.5.12	Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas.....	69
4.5.13	Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos SHR....	71
4.5.13.1	Avaliação das atividades cardiovasculares induzidas pelo monoterpeno.....	72
4.5.13.2	Avaliação da participação do sistema nervoso central nas respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno.....	73
4.5.13.3	Avaliação da participação ganglionar nas respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno.....	73
4.5.13.4	Avaliação da participação muscarínica nas respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno.....	73
4.5.14	Ensaio <i>in silico</i> de docking molecular.....	74
4.5.14.1	Preparo dos ligantes.....	74
4.5.14.2	Seleção das macromoléculas.....	74
4.5.14.3	Preparo das macromoléculas.....	74
4.5.14.4	Parâmetros do “gridbox”.....	75
4.5.14.5	Parâmetros pelo docking vina.....	75
4.5.14.6	Pesquisa pelo docking vina.....	75
4.5.14.7	Validação do docking.....	75
4.5.14.8	Determinação do cLogP.....	75
4.6	Análise estatística.....	76
5	Resultados	77
5.1	Avaliação da citotoxicidade do TPN.....	77
5.2	Efeito cardioprotetor do TPN no infarto agudo do miocárdio experimental.....	78
5.2.1	Avaliação da sobrevivência ao infarto induzido pelo isoproterenol.....	78

5.2.2	Avaliação dos biomarcadores séricos do infarto agudo miocárdio.....	78
5.2.2.1	Níveis séricos de creatino-kinase total.....	78
5.2.2.2	Níveis séricos de creatino-kinase MB.....	81
5.2.3	Avaliação das áreas de lesões necróticas miocárdicas induzidos por isoproterenol.....	83
5.2.4	Avaliação histopatológica das lesões de isquemia-reperusão em corações após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.....	86
5.2.5	Avaliação dos níveis ventriculares de Proteína C reativa.....	93
5.2.6	Avaliação do eletrocardiograma em repouso.....	95
5.2.7	Avaliação morfométrica da hipertrofia cardíaca pós-infarto induzida por isoproterenol.....	103
5.2.8	Avaliação histopatológica do remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio.....	107
5.3	Avaliação dos níveis lipídicos.....	110
5.3.1	Níveis séricos de colesterol total.....	110
5.3.2	Níveis séricos de triglicérides.....	110
5.4	Avaliação dos mecanismos relacionados aos efeitos cardioprotetores do TPN.....	113
5.4.1	Avaliação dos efeitos antioxidantes <i>in vitro</i> induzidos por TPN.....	113
5.4.1.1	Avaliação da atividade sequestradora radicalar.....	113
5.4.1.2	Avaliação do poder redutor de Fe ³⁺	113
5.4.1.3	Avaliação da atividade complexadora com Fe ³⁺	113
5.4.1.4	Avaliação da atividade sequestradora radicalar derivada de espécies reativas do óxido nítrico.....	115
5.4.2	Avaliação dos efeitos cardiovasculares induzidos por TPN.....	117
5.4.2.1	Avaliação das alterações hemodinâmicas induzidas por TPN pós-infarto agudo do miocárdio.....	117
5.4.2.2	Avaliação da demanda miocárdica de oxigênio após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.....	120
5.4.2.3	Avaliação morfológica das coronárias após o infarto agudo do miocárdio	

	induzido por isoproterenol.....	120
5.4.2.4	Avaliação histopatológica das aortas torácicas após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol	123
5.4.2.5	Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas pós-infarto agudo do miocárdio.....	128
5.4.2.6	Avaliação da sensibilidade baroreflexa pós-infarto agudo do miocárdio.....	131
5.4.2.7	Avaliação da resposta colinérgica pós-infarto agudo do miocárdio	137
5.4.2.8	Avaliação dos níveis de cálcio cardiovascular.....	141
5.4.2.9	Efeitos cardiovasculares intravenosos do TPN.....	144
5.4.2.10	Docking molecular do TPN em alvos cardíacos.....	148
6	DISCUSSÃO	152
7	CONCLUSÕES	179
8	PERSPECTIVAS	180
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
	ANEXOS	225

1 Introdução

As doenças de origem cardiovascular ocupam os primeiros lugares nos índices relevantes em saúde pública ao redor do mundo, contribuindo para o aumento no número de comorbidades e mortes globais (WHO, 2017; WHO, 2018). Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio representa o agravo cardiovascular que mais tem contribuído para o aumento de mortes globais. Assim, o infarto agudo do miocárdio e as síndromes coronarianas contribuem para o aumento das taxas de mortalidades anuais no mundo (LÜSCHER, 2018; BENJAMIN et al, 2018).

Os fatores de risco não modificáveis como a hereditariedade e etnias podem colaborar para o surgimento de patologias cardiovasculares. Entretanto, os fatores de risco modificáveis, correlacionado com estilo de vida são considerados mais graves para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares precoces como do infarto agudo do miocárdio e suas complicações (LANAS et al, 2007; LÜSCHER, 2018; WHO, 2018).

Neste contexto, apesar das melhorias do manejo terapêutico das doenças cardiovasculares e em especial a complexidade da farmacoterapia que envolve o infarto agudo do miocárdio, o infarto continua a ser a primeira doença no ranking de doenças que mais mata indivíduos ao redor do mundo (SBC, 2015; WHO, 2018). É válido ressaltar ainda a inexistência de classe farmacológica cardioprotetora.

A este respeito, a comunidade científica tem reunido esforços na busca por estratégias de cardioprevenção, entre elas a terapia celular e a farmacoterapia (SPATH et al, 2016, SLUIJTER et al, 2014; HAUSENLOY et al, 2017). A amplitude de compostos disponíveis por produtos de origem natural e suas ações biológicas tem crescido na literatura, em complementaridade o número de depósitos de patentes de substâncias de origem natural também tem crescido ao longo dos anos e por estas razões são consideradas como moléculas candidatas a fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2016). Não obstante, o emprego dos compostos terpênicos como fonte de novas moléculas terapêuticas tem movimentado o mercado econômico das indústrias farmacêuticas na última década (WANG et al, 2005). Em especial, os monoterpenos tem se revelado como moléculas capazes de produzir ações cardiovasculares e podem representar promissor emprego terapêutico (SANTOS et al, 2011; ALVES-SILVA et al, 2016).

Alpha-terpineol (TPN) um monoterpeneo alcoólico é que possui diversas atividades farmacológicas descritas na literatura como: ação antitumoral envolvendo a supressão do NF-KB (HASSAN et al 2010); anticonvulsivante e sedativa por modulação central (DE SOUSA et al, 2011) gastroprotetora reduzindo os níveis de TNF- α (SOUZA et al, 2011); antinociceptiva e antiinflamatória envolvendo bloqueio da COX-2 e da iNOS (QUINTANS-JÚNIOR et al, 2011; DE OLIVEIRA et al, 2012) e em modelos de hiperalgesia induzem modulação de receptores opioides e serotoninérgicos (OLIVEIRA et al, 2016; GUIMARÃES et al, 2017). TPN também demonstra atividades inseticida e repelente sobre *Aedes egypt* (PANDEY et al, 2013), *Sitophilus zeamais* (YULDRIN et al, 2013) *Liposcelis bostrychophila* (LIU et al, 2012; LIU et al, 2014) e *Coptotermes formosanus* (CHENG et al, 2014).

TPN é um dos compostos majoritários da resina obtida de *Protium hepthaphylum*. *Protium hepthaphylum* é uma árvore nativa do Brasil, pertencente à família *Burseraceae*, que se distribui no norte e nordeste do país. Conhecida popularmente como “almecega” ou “breu-branco” possui emprego tradicional por comunidades indígenas em rituais curandeiros e religiosos. Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial de obtido das resinas de *P. hepthaphylum* produziu ações vasorelaxante (MOBIN et al, 2017). Adicionalmente, TPN demonstrou atividades vasorelaxantes em artérias de ratos espontaneamente hipertensos e L-NAME, de modo que se acredita que TPN seja responsável pelas atividades vasorelaxantes do óleo essencial obtido de *P. hepthaphylum*. TPN também possui ações anti-hipertensivas agudas e hipotensoras em diferentes modelos de hipertensão (RIBEIRO et al, 2010; SABINO et al, 2013). Entretanto os efeitos cardioprotetores de alpha-terpineol permanecem desconhecidos.

Assim, este trabalho objetivou-se em avaliar a atividade cardioprotetora de alpha-terpineol isolado da resina de *Protium hepthaphylum* contra o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos.

2 Revisão da literatura

2.1 Considerações gerais sobre infarto agudo do miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das patologias do aparelho cardiovascular que é conceituado como uma doença relacionada à diminuição do aporte de oxigênio ofertado e demandado às células cardíacas prejudicando as funções metabólicas do coração (THYGESEN, 2012). A isquemia miocárdica é comumente associada ao mal prognóstico cardíaco provocando mortes súbitas e comorbidades como a insuficiência cardíaca progressiva (CAHIL & KHARBANDA, 2017).

Assim a isquemia miocárdica contribui para o agravamento das doenças cardiovasculares. Considera-se assim, que os índices relevantes em saúde como: número de pacientes acometidos pelo infarto, número de indivíduos com risco isquêmico, taxa de morbidade e taxa de mortalidade, devam ser monitorados ao redor do mundo, visto que a doença isquêmica miocárdica é responsável por 37 % da mortalidade no mundo (RAHIMI et al, 2015).

Na Europa, as doenças cardiovasculares produzem 11,3 milhões de novos casos anualmente, causam 3,9 milhões de mortes anuais e o infarto é a primeira causa das mortalidades das doenças cardiovasculares. Sendo assim produz alto índice de internações hospitalares, 20% de mortes prematuras em homens e mulheres e cerca de 13% de incapacidades nos pacientes acometidos, gerando altas taxas de morbidades (EHNHEART, 2017).

De modo similar no Brasil, estima-se que a prevalência do IAM seja de cerca de 300-400 mil casos/ano e 1 óbito a cada 6 casos (SBC, 2004; ROGER et al, 2007). Entretanto acredita-se que este número possa ser subestimado em função de casos subnotificados.

Em adição, os custos com internações hospitalares e cuidados à saúde dos pacientes acometidos pelo IAM sobrecarregam os cofres públicos. A união europeia dispõe anualmente de 53% do fundo monetário destinado a saúde somente para as doenças cardiovasculares o equivalente a 11 bilhões de euros, sendo €18.875,775 destinados aos tratamentos do infarto (EHNHEART, 2017).

Nos Estados Unidos, o custo com internações hospitalares de pacientes infartados reflete 20% da sua arrecadação fiscal, representando cerca de US\$15.889,00 por paciente hospitalizado (AFANA et al, 2015). Estes dados estão em consonância

com nosso país, no Brasil, estima-se que o tratamento padrão incluindo as intervenções cirúrgicas de implante de *stents* coronários seja em torno de R\$ 8.211.654,50 anuais para o sistema único de saúde, o que reflete um gasto de aproximadamente R\$ 23.461,87 por paciente com intervenção cirúrgica ou R\$ 12.873,69 se a intervenção cirúrgica não for necessária (MARQUES et al, 2012).

Para melhor prognóstico nos desfechos clínicos do infarto, o diagnóstico precoce do infarto se faz necessário. Em sua maioria, as metodologias utilizadas no diagnóstico do infarto são eficazes e possuem alta sensibilidade em sua acurácia guiando os profissionais clínicos ao correto diagnóstico do IAM (PIEGAS et al, 2005). O diagnóstico do IAM baseia-se na utilização de marcadores séricos enzimáticos e não-enzimáticos, alterações na atividade elétrica cardíaca medidas através do eletrocardiograma, mudanças nos parâmetros hemodinâmico, além de disfunções na função cardíaca verificadas através do ecocardiograma (PANDEY & GUPTA, 2011).

Dentre os marcadores séricos do infarto a troponina I e a isoforma MB da creatino fosfoquinase são considerados os marcadores mais sensíveis e seletivos para as lesões cardíacas isquêmicas (WU et al, 1996, PANDEY & GUPTA, 2011). Entretanto, as dosagens séricas de mioglobina, lactato desidrogenase tipo II e as transaminase como a transaminase glutâmica oxalacética e a transaminase oxalacética pirúvica são rotineiramente utilizada como auxiliar no diagnóstico do IAM (JAFFE et al, 1996; PRABODH et al, 2012).

A troponina I é uma proteína intracelular dos miócitos, integrante de um complexo de três proteínas (troponina T, troponina C e troponina I) participantes do processo de excitação-contração de dois dos tecidos musculares: cardíaco e esquelético. Porém não participam do processo de contração do músculo liso e sua liberação sanguínea é intimamente relacionada com lesões musculares e sensivelmente alterada nas lesões cardíacas, sendo utilizada no diagnóstico precoce de pacientes infartados, pois eleva-se na corrente sanguínea entre as 6 primeiras horas do início da lesão cardíaca (WU et al, 1996; GODOY et al, 1998; LIM et al, 2006, MOTTA, 2011).

A creatino-fosfoquinase é uma enzima intracelular de tecidos musculares que possui a função de fornecer moléculas energéticas durante a contração muscular no ciclo de Krebs, compostas por três isoformas (CK-MM, CK-BB e CK-MB), divergem em sua localização e abundância. A creatino fosfoquinase MB é uma isoforma que suas

concentrações séricas elevam-se entre 12 e 24 horas após o início da lesão isquêmica e permanecem em altas concentrações durante 30 horas mantendo-se estável no soro de pacientes infartados. A concentração total das três isoformas mantém-se estável por até 72 horas e por esta razão são consideradas seguras para o correto diagnóstico das lesões cardíacas por isquemia-reperfusão (PULEO et al, 1990; PIEGAS et al, 2005; MOTTA, 2011; DANESE & MONTAGNA, 2016).

Mioglobina é um pequeno peptídeo responsável pelo transporte de oxigênio para os músculos esquelético e cardíaco. Assim a redução na disponibilidade de oxigênio ofertada ao coração pode ser mensurada e torna-se útil no diagnóstico precoce do infarto, devido aos níveis séricos aumentarem em 1 hora após a lesão isquêmica, mantendo máxima liberação entre 4 à 12 horas à injúria, porém retornam aos níveis basais rapidamente após as 12 horas do infarto. Por este motivo seu uso é desvantajoso no diagnóstico tardio não sintomático do infarto e seu aumento também está envolvido no processo de degradação do óxido nítrico muscular (OHMAN et al, 1990; MYTHLI & MALATHI, 2015).

Embora estes sejam os marcadores de lesões cardíacas mais úteis no diagnóstico do infarto do miocárdio, novos métodos de detecção têm crescido visando a prevenção do desenvolvimento do infarto em pacientes de risco. Neste contexto, a utilização de pequenas moléculas como o micro RNA's mostra-se eficaz na correlação do aumento deste segundo mensageiro na resposta de hipóxia em pacientes infartados, e novos kits de diagnóstico estão sendo desenvolvidos visando a inserção de uma terapêutica cardiovascular menos invasiva, além da redução dos custos hospitalares relacionados ao internamento destes pacientes nas unidades de terapia intensiva em cardiologia (KRÄNKEL et al, 2016; WANG et al, 2017).

Ainda que o uso de marcadores bioquímicos seja clinicamente relevante no diagnóstico do infarto, o eletrocardiograma ainda é o recurso mais aplicado no diagnóstico do infarto (PANDEY & GUPTA, 2011). As mínimas mudanças bioelétricas no coração são perceptíveis nos traçados eletrocardiográficos, e por esta razão é possível localizar os pontos focais de micro lesões por injúria, verificar se as lesões desenvolvidas são recentes ou passadas, além de ser possível quantificar a área de ocorrência do infarto, podendo assim avaliar o grau de comprometimento cardíaco do

infarto desenvolvido nos pacientes (HERRING & PATERNSON, 2006; HWANG 2014).

Durante o IAM, as principais alterações eletrocardiográficas manifestadas são: mudanças da onda T, indicando que a isquemia miocárdica desenvolvida durou tempo inferior a 20 minutos, depressões ou elevações do segmento ST do eletrocardiograma, com durabilidade superior a 20 minutos de anóxia e aprofundamento da onda Q, apontando para uma necrose resultante de uma anóxia persistente (PIEGAS et al, 2005; GOLDBERGER et al, 2018). Quanto à localização do infarto desenvolvido, as alterações nas derivatizações precordiais são mais sensíveis às mudanças bioelétricas nas paredes miocárdias, sendo mais úteis na precisão das artérias ocluídas e suas respectivas paredes lesionadas, entretanto, as derivatizações periféricas também podem ser correlacionadas com a origem das coronárias oclusas e suas terminações miocárdicas afetadas (TIMERMAN et al, 2007; ZIPES, 2017).

O eletrocardiograma também pode ser útil na identificação de eventos pós-infarto ou ainda na detecção de patologias cardíacas decorrentes do infarto como: arritmias atriais e ventriculares, fibrilação atrial, falhas na condução do potencial de ação por bloqueios de ramos e feixes, mecanismos de reentrada e desvios de condução elétrica e ainda bloqueios átrio-ventriculares (PASOTTI et al, 2006; LEMMER & VLAHAKES, 2010; COPPOLA et al, 2013; YAHALOM et al, 2013). Outras metodologias cardiológicas vêm sendo aplicadas na identificação do infarto agudo em pacientes infartados como o ecocardiograma, alterações sobre a homeostasia nos parâmetros hemodinâmicos assim como na demanda miocárdica de oxigênio calculado através do produto da pressão arterial em função da frequência cardíaca (EGINEER et al, 2012; ESMAEILZADEH et al, 2013; HOFFMAN & BUCKBERG, 2014).

Diante a alta complexidade da evolução clínica do infarto e alta taxa de mortalidade nas primeiras horas do infarto, houve a necessidade de desenvolver uma estratégia no atendimento dos pacientes infartados. Essa estratégia estratifica a farmacoterapia empregada no paciente infartado em: atendimento de urgência (em geral realizado por serviços móveis de saúde), atendimento pré-hospitalar (fase de manutenção dos medicamentos do paciente até a chegada ao hospital), atendimento hospitalar intensivo, atendimento hospitalar de manutenção, alta hospitalar e por fim

farmacoterapia de reabilitação, visando à reinserção do paciente a sua rotina habitual (SBC, 2009).

As primeiras horas do desenvolvimento do infarto são consideradas pontos de controle na terapêutica cardiovascular, devido ao período crítico de evolução clínica para mortalidade. Neste contexto, estima-se que a mortalidade na primeira hora do infarto seja entre 40-65% atingindo 80% de mortalidade nas 24 horas do surgimento da lesão isquêmica. As diretrizes que norteiam as condutas terapêuticas do tratamento do IAM recomendam o uso imediato do eletrocardiograma nas 12 derivatizações, nas unidades móveis para avaliar imediatamente o grau e a extensão do infarto acompanhando a evolução clínica, assim como sua remissão (SBC, 2009; SBC, 2014; SBC, 2015). O tratamento de urgência do serviço móvel baseia-se no tratamento de suporte a vida. Nesse sentido, são adotados os procedimentos descritos nas literaturas de suporte avançado de suporte ao coração, caracterizado pelo atendimento rápido com tomadas de decisão bem estabelecidas por protocolos internacionais e nacionais de suporte a vida (MOYER et al, 2007; POZNER, 2018).

De modo geral a conduta farmacoterapêutica do serviço de urgência inicia-se com a administração intranasal de oxigênio em casos onde o indivíduo possui um percentual de oxigênio saturado menor que 94% ou em casos de congestão pulmonar ou ainda em casos onde o paciente descreva dificuldade no ritmo respiratório, a oxigenoterapia é indicada na maior parte dos pacientes infartados contraindicado somente se o indivíduo permaneceu tempo maior que 90 minutos sem atendimento, devido ao aumento da resistência vascular sistêmica e redução do débito cardíaco, tornando a reperfusão cardíaca prejudicial ao indivíduo (BURLS et al, 2011; CABELLO et al, 2016). São também administrados analgésicos opióides endovenoso visando à redução do desconforto torácico e da ansiedade, nitratos orgânicos sublinguais para alívio da dor anginosa e aumento da reperfusão miocárdica (SBC, 2014; SBC, 2015).

O controle da homeostase sanguínea também deve ser controlado, visto que estudos de metanálise indicaram que a estase sanguínea com a formação de trombólise pré-hospitalar e hospitalar são favoráveis ao desfecho clínico negativo, do mesmo modo que o uso de trombolíticos nas primeiras horas de atendimento foi capaz de reduzir 17%

da mortalidade dos pacientes infartados (WEVER et al,1997; MORRISSON et al, 2000; BJÖRKLUND et al, 2006).

Desta maneira, o uso de antiplaquetários e trombolíticos são rotineiramente aplicados no tratamento pré-hospitalar no atendimento de suporte a vida, facilitando a degradação de trombos formados nas coronárias e reduzindo a adesão plaquetária para a prevenção da formação de novos trombos e assim diminuindo o risco de novas oclusões coronárias (SBC, 2009; SBC, 2014; SBC, 2015).

O atendimento hospitalar fundamenta-se através do nível de remissão do infarto devido às intervenções no atendimento pré-hospitalar, e controle cardiovascular previamente estabelecido, porém, a utilização de novas condutas são cruciais para investigar a necessidade de intervenções invasivas ou não invasivas na desobstrução coronária, além da manutenção do controle homeostático cardiovascular para evitar a reincidência de infartos (MENDES et al, 2014; STOCKBURGER et al, 2016).

Assim a utilização da terapia farmacológica dependerá dos resultados apresentados em exames eletrocardiográficos, ecocardiográficos, marcadores bioquímicos e exames imageamento. Na fase de atendimento de urgência deseja-se conservar o controle hemostático e este deve ser realizado por anticoagulantes intravenosos e agentes trombolíticos, quando necessários, enquanto o controle cardiovascular deve-se ao uso de agentes beta-bloqueadores com a monitorização da frequência cardíaca em 60 bpm. Em casos onde há o aparecimento de arritmias ventriculares ou fibrilações atriais o uso de antiarrítmicos deve ser usado para evitar o choque cardiogênico, no entanto, não são rotineiramente aplicados (RISENFORS et al, 1991; CHEN et al, 2005; McHUGH et al, 2010).

Após a avaliação de risco do paciente infartado em submissão a desobstrução coronariana pelo método invasivo, o indivíduo pode então ser designado para o atendimento de cardiológico clínico, onde haverá a controle da reperfusão miocárdica e monitorização da melhora nas funções cardíacas, quando não há necessidade de procedimentos cirúrgicos, enquanto que aqueles indivíduos que necessitam do processo cirúrgico são designados para o implante de dispositivos coronários e em seguida devem iniciar o tratamento farmacoterapêutico no atendimento cardiológico clínico (NORDMANN et al, 2004; TONINO et al, 2009; DE LUCA et al,2012).

Na fase hospitalar, o controle cardiovascular dar-se pelo uso de uma terapêutica farmacológica múltipla composta por: gases medicinais, analgésicos, trombolíticos, anticoagulantes e agentes cardiovasculares (SBC, 2004; SBC, 2009; SBC, 2014; SBC, 2015). Dentre os agentes cardiovasculares, os estudos de metanálise tem demonstrado que o uso de beta-bloqueadores é favorável à redução no risco relativo de mortalidade de pacientes hospitalizados, estas ações foram atribuídas a redução sinérgica cardiovascular, reduzindo a frequência cardíaca, o inotropismo e a redução na pressão arterial, resultando melhora do consumo do oxigênio miocárdico, bem como, na melhora da perfusão miocárdica (FREEMANTLE et al, 1999; CHEN et al, 2005).

Em casos de contraindicações ou resistências aos beta-bloqueadores, o uso dos antagonistas dos canais para cálcio são clinicamente úteis, entretanto, estudos de metanálise revelam que os antagonistas de canais para cálcio não mostraram benefícios cardiovasculares sugestivas na redução da mortalidade ou na reincidência de infarto, quando utilizados na fase aguda ou de recuperação da isquemia (TANI et al, 2004; SBC, 2015). Contudo, controlaram os sintomas anginosos comparáveis aos beta-bloqueadores mesmo que sem prevenir a angina refratária (YUSUF et al, 1991; BODEN et al, 2000).

O uso dos vasodilatadores coronários restringem-se a fase aguda inicial, somente em casos de reversão de espasmos ou para alívio da dor anginosa não tratada por beta-bloqueadores ou antagonista dos canais para cálcio (MENYAR, 2006; CASTRILLO et al 2016; KANNAM, 2017). O tratamento de reabilitação e manutenção pós hospitalar objetiva-se em evitar a reincidência dos infartos ou manifestações anginosas, assim, o tratamento ambulatorial dos pacientes pós-infarto também são caracterizados pelo grande espectro de medicamentos e as classes mais rotineiramente usadas são: anti-hipertensivos, hipolipemiantes orais, antiplaquetários, anticoagulantes orais e trombolíticos.

O uso dos anti-hipertensivos compõe a maior parte das prescrições do tratamento do IAM, onde a terapia farmacológica pode apresentar um ou mais representantes das mais variadas subclasses anti-hipertensivas. O uso mais comum de anti-hipertensivo na farmacoterapia cardiovascular pós-infarto são os antagonistas de receptores de angiotensina I, as evidências clínicas mostram que pacientes pós-infartados melhoraram a função cardíaca e reduziram o reinfarto. Esses efeitos foram atribuídos à diminuição do remodelamento cardíaco em indivíduos com disfunção ventricular esquerda, graças a

modulação no sistema renina-angiotensina-aldosterona (MINUZZO et al, 2014; LEE et al, 2016). Adicionalmente, os antagonistas dos receptores para aldosterona, como o eplerone aperfeiçoou o tratamento farmacológico múltiplo aplicado com inibidores da enzima conversora de angiotensina, aspirina, beta-bloqueador e estatinas, reduzindo 17% a mortalidade de indivíduos pós-infarto em comparação com o grupo placebo com mesmo protocolo farmacoterapêutico (PITT et al, 2003).

Estudos recentes demonstram que o uso de beta-bloqueadores é capaz de reduzir a mortalidade e a reincidência de infarto em terapias secundárias de indivíduos após o infarto do miocárdio (KEZERASHVILI et al, 2012; DINICOLANTONIO et al, 2015; SOEIRO et al, 2016). Os antagonistas de canais para cálcio, não possuem estudos recentes sobre seu uso em indivíduos após o infarto, as evidências mais antigas apontam para um possível benefício prognóstico, quando analisado especificamente verapamil e diltiazem, os estudos associam a vasodilatação coronária e sistêmica, melhorando a reperfusão miocárdica a sugestivas melhorias nas taxas de mortalidade, entretanto a consistência destes resultados é questionável por agências de cuidados à saúde em todo o mundo, portanto o uso dos antagonistas de canais para cálcio é considerado como alternativa ao uso dos beta-bloqueadores (WARNOC et al, 1989; DAVIT II, 1990).

Hipolipemiantes orais são vastamente prescritos para reduzir as dislipidemias e prevenir o reinfarto por obstrução de novos ramos de artérias coronárias (SWARTZ et al, 2001; CANNON et al, 2004; BAIGENT et al, 2005). Uma metanálise recente, demonstrou que o uso de hipolipemiantes orais de diferentes potencia, foi capaz de reduzir os desfechos clínicos associados à mortalidade e a reincidência de infarto em função da potência do hipolipemiante reduzir o colesterol LDL (STONE et al, 2013).

Os antiplaquetários associados com anticoagulantes orais mostram-se eficazes em reduzir a formação de trombos e placas ateroscleróticas em pequenos ramos vasculares como as artérias coronárias, reduzindo a capacidade de oclusão coronária por ateromas (FLOYD et al, 2017). A associação destes fármacos são aconselhados por até um ano após o evento isquêmico, os estudos apresentados de SABATINE, 2005 e GARLTON, 2006 recomendam o uso da terapia fibrinolítica por até 4 semanas após o infarto agudo do miocárdio (SABATINE et al, 2005; GARLTON et al, 2006). O uso dos anticoagulantes orais, especialmente os derivados cumarínicos, mostraram-se capazes de reduzir a mortalidade e a reincidência de infarto do miocárdio (VAN et al,

2002; HURLEN et al, 2002). Entretanto, não há consenso no uso dos anticoagulantes orais para o tratamento pós-infarto. O uso destes agentes é sugerido na rotina de indivíduos com tromboembolismo sistêmico, trombo intracardíaco laudável ao ecocardiograma, fibrilação atrial e histórico de tromboembolia em infartos de grande extensão, especialmente quando atingida a parede anterior e ainda quando o indivíduo apresenta disfunção cardíaca grave associada a insuficiência cardíaca (SBC, 2009; SBC, 2014; SBC, 2015).

Como visto, o tratamento farmacológico do IAM é complexo e envolve diversas fases na conduta terapêutica. A principal estratégia utilizada é o uso da polifarmácia composta por: oxigenoterapia, antianginosos, analgésicos, antiarrítmicos, anti-hipertensivos, hipolipidêmicos e antiagregantes plaquetários, sejam por via intravenosa, na fase aguda da doença ou oral na terapia de reabilitação e manutenção (SBC, 2009; SBC, 2014; SBC,2015).

Em adição, as recomendações mais recentes também sugerem a utilização de abordagens não farmacológicas, para a melhoria na qualidade de vida de indivíduos após o infarto, estas recomendações incluem: interromper o tabagismo de indivíduos fumantes, prescrição de uma dieta adequada e equilibrada, readaptação ao exercício físico de baixo impacto e adesão aos programas de reabilitação (SBC 2014; SBC, 2015).

Em contraste, apesar das melhorias no manejo clínico e farmacológico, o IAM continua a ser a principal causa de morte em todo o mundo e é notável a inexistência de uma classe de fármacos cardioprotetora na literatura (ZHOU, 2012). Neste contexto, recentes estudos tem demonstrado a necessidade da implementação de novas estratégias terapêuticas para a cardioprevenção (SPATH et al, 2016, SLUIJTER et al, 2014; HAUSENLOY et al, 2017). No qual a cardioproteção pode ser compreendida como todos os mecanismos e meios que contribuem para a preservação cardíaca por meio da redução ou mesmo prevenção do dano miocárdico (KLUBER & HAAS,1996).

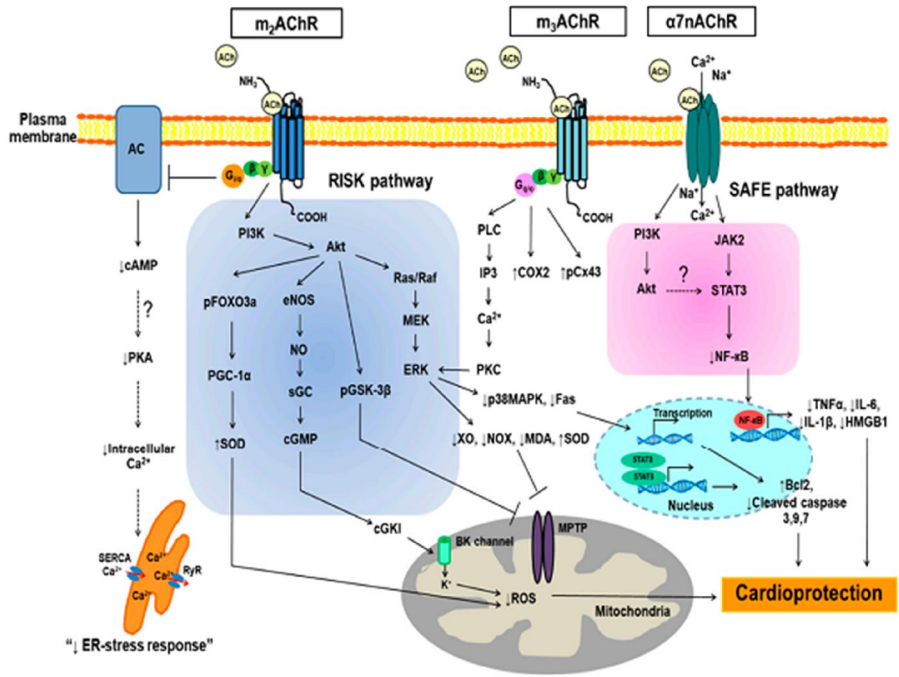
Estas estratégias podem envolver como alvos estratégicos, técnicas de transplante cardioplégico, uso de terapias celulares visando o estímulo para a maturação e diferenciação de células pluripotentes, em novos de cardiomiócitos, gerados a partir de bancos de células tronco ou ainda a modulação de alvos moleculares como: receptores cardíacos, receptores e canais mitocondriais e ainda inibição das vias apoptóticas (JACOBSON et al, 2000; SLUIJTER et al, 2014; HAUSENLOY et al, 2017).

HAUSENLOY e cols 2010 têm apontado as recomendações úteis para a transposição dos estudos farmacológicos de cardioproteção em modelos experimentais e sua correlação com o infarto desenvolvido em humanos para inserção de uma futura classe farmacológica cardioprotetora, essas recomendações incluem: a seleção do animal utilizado, influência de comorbidades, modelo de infarto experimental desenvolvido (*ex-vivo e in vivo*) e sua duração entre outros. Além das variáveis analisadas como: mortalidade, área de infarto, dosagem de marcadores bioquímicos (CK-MB e troponinas), medida da função cardíaca e análises mais robustas como mapeamento do metabolismo cardíaco por RMN P em tempo real e ecocardiograma (HAUSENLOY et al, 2010).

Recentes estudos evidenciam o papel das vias parassimpáticas como mecanismos de cardioproteção (SUN et al, 2011; INSERTE & GARCÍA-DORADO et al, 2015; KINGMA et al, 2017; ITANCHAI et al, 2018) indicando que a acetilcolina pode exercer papel fundamental na prevenção do IAM, assim como, pode ativar vias de sobrevivência celular pós-infarto através de complexos mecanismos que envolvem os receptores muscarínicos e nicotínicos (Figura 1, pág 40) (SUN et al, 2011; ITANCHAI et al, 2018). Também tem sido evidenciado o envolvimento do NOSe-GMPc-PKG como agentes mediadores na cardioproteção endógena da acetilcolina liberada pelo nervo vago e consequente aumento na estimulação do óxido nítrico disponível no miocárdio (INSERTE & GARCÍA-DORADO, 2015; KINGMA et al, 2017).

Estes estudos recentes oferecem suporte às evidências de ZAUGG & SCHAUB, 2004 em que o sistema parassimpático exerce função cardioprotetora através de mecanismos celulares na simpatomodulação na intercomunicação do coração e pequenos vasos sanguíneos especialmente em situações de trauma ou estresse como uma resposta fisiológica (ZAUGG & SCHAUB, 2004).

FIGURA 1 - Representação esquemática simplificada da sinalização celular cardioprotetora em miócitos cardíacos produzida pela ativação dos receptores celulares colinérgicos.



Fonte: INTACHAI et al, 2018.

Devido às evidências de alvos moleculares com transduções de sinais com efeito cardioprotetor, alguns compostos tem atraído à atenção, devido sua ação cardioprotetora exercida e figuram entre os possíveis candidatos a fármacos cardioprotetores. Adenosina tem demonstrado ação cardioprotetora tanto em estudos experimentais quanto em estudos clínicos reduzindo a área de infarto (OLAFSSON et al 1987; ROSS et al, 2005; LASLEY, 2018). Também foi evidenciado o envolvimento de receptores muscarínicos nos benefícios cardíacos produzidos pela adenosina no infarto por injúria e reperfusão em ratos (SUN et al, 2011)

O peptídeo natriurético atrial (ANP) tem mostrado modesto efeito cardioprotetor em estudos experimentais reduzindo a área de infarto em coelhos (YANG et al, 2006) e também exibiu efeito cardioprotetor reduzindo os níveis de creatino fosfoquinase em estudos clínicos em terapia combinada ao nicorandil (KITAKAZE et al, 2007).

De modo similar o exenatide, um composto sintético análogo ao GLP-1 e o exenatide 4, exibiu ações cardioprotetoras em diversos estudos experimentais com

animais de pequeno e grande porte (SONNE et al, 2008; TIMMERS et al, 2009; HAUSENLOY et al, 2012) e também apresentou redução da área de necrose em pacientes infartados (LONGBORD et al, 2012; WOO & KIM, 2013).

A administração do antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos, metoprolol, preveniu o infarto por reperfusão, reduzindo a área de infarto em animais de grande porte (IBANEZ et al, 2007) e reduziu a área de necrose, o remodelamento cardíaco e a disfunção do ventrículo esquerdo em estudos clínicos (IBANEZ et al, 2013; PIZZARRO et al, 2014; ROOLVINIK et al, 2016). A terapia combinada de beta-bloqueador e inibidor de enzima conversora de angiotensina produziu efeito cardioprotetor em um estudo experimental, envolvendo a ativação da via JAK-2/STAT-3 como mediador da cardioprevenção (HAYBAR et al, 2018).

A Janus kinase 2 (JAK-2) pertence a uma família de receptores do tipo tirosino-kinases, que ao serem ativadas induzem a fosforilação dos fatores de transcrição ativados por sinalizações transdutoras como a STAT-3, esta sinalização intracelular regula transcrição gênica de fatores anti-apoptóticos como os fatores Bcl2 que uma vez fosforilados por STAT-3 mediada inibe o dano nuclear e mitocondrial pela supressão da via da caspase que induz necrose celular em lesões de injúria-reperfusão (SUN et al, 2018)

Ciclosporina A, um fármaco imunodepressor tem demonstrado ação cardioprotetora em estudos experimentais *ex-vivo* e *in vivo* envolvendo a participação da inibição do poro de permeabilidade mitocondrial (PIOT et al, 2008; MEWTON et al, 2010), também preveniu o infarto em estudos clínicos com pacientes trombolisados (GAFFARI et al, 2013) e melhorou os desfechos clínicos de pacientes hospitalizados pós infarto (CUNG et al, 2015; OTTANI et al, 2016). Embora haja um número considerável de estudos circundando a ciclosporina A, não é claramente elucidado o seu papel exercido no mecanismo trombolítico (HAUSENLOY et al, 2017).

Alguns compostos de origem natural também tem apresentado efeito significativo sobre o infarto do miocárdio, produzindo relevante efeito cardioprotetor. Dentre eles, miricetina, um flavonóide encontrado em uvas da espécie *vitis vinifera*, exibiu efeito cardioprotetor *in vivo* no modelo de infarto por isoproterenol e envolve a participação do segundo mensageiro STAT-1 (TIWARI et al, 2009; SCARABELLI et al, 2009).

Embora não existam estudos clínicos com miricetina, esta molécula tem sido apontada por sua promissora ação cardiopreventiva (GOUTAM et al, 2017).

Omega 3, um ácido graxo polinsaturado quando suplementado em indivíduos saudáveis, preveniu o surgimento de doenças cardiovasculares (LEE et al, 2008), em estudos experimentais este efeito parece envolver a redução da inflamação engatilhada pelo ácido araquidônico, reduzindo a inflamação cardíaca, porém também parecem envolver a participação de canais iônicos e segundos mensageiros, além de promover melhoras da função autonômica, melhora das funções endoteliais e ações antiplaquetárias (ADKINS & KELLEY, 2010; ENDO & ARITA, 2016; ROY & GUENNEC, 2017). Embora estes efeitos tenham apresentado correlação benéfica com o sistema circulatório, algumas diferenças entre os efeitos em estudos experimentais e em humanos são relatados (DESNOYERS et al, 2018).

Resveratrol, um polifenol obtido de uvas também é indicado com futuro candidato de fármaco cardioprotetor. Seus efeitos cardiovasculares tem sido estudado ao longo das duas últimas década, por diversas abordagens experimentais: *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo* e clínicas, as evidências apontam para o efeito cardioprotetor dependente da ação antioxidante como mecanismo de ação, embora possam envolver ações antiproliferativas, anti-inflamatórias e mediadora na expressão gênica (WU et al, 2001; DERNEK et al, 2004; GURUSAMY et al, 2009; WU et al, 2011; DAS & MAULIK, 2011;MAGYAR et al; 2012; MOKNI et al, 2013).

Além dos compostos endógenos, sintéticos, nutracêuticos ou naturais isolados, extratos de plantas que possuem atividade anti-hipertensiva e cardioprotetora em estudos pré-clínicos, são apontados como uma sugestão de tratamento coadjuvante na prevenção do desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio (MALI et al, 2012; NADE et al,2013; PAUDEL et al,2014).

2.2- Infarto experimental induzido por isoproterenol: uma breve revisão

O infarto induzido por isoproterenol surgiu como um método alternativo e eficaz de estudo experimental das lesões de isquemia-reperfusão aos já existentes na literatura como: procedimentos cirúrgicos de oclusão coronariana, implantes de bombas osmóticas contendo agonistas β -adrenérgicos ou métodos *ex-vivo* em banhos de órgãos isolados e perfundidos. O baixo custo efetivo do modelo experimental associado à alta reprodutibilidade apresenta-se como vantagens aos modelos até então usados para estudos fisiopatológicos do IAM ou como método de avaliação de compostos com potencial cardioprotetor (WONG et al, 2017).

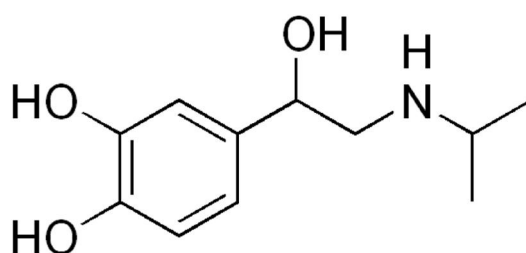
Neste contexto o uso do isoproterenol subcutâneo mostra-se útil em mimetizar o IAM desenvolvido em humanos, contemplando as diversas alterações metabólicas e fases evolutivas em similaridade ao infarto agudo ocorrido em seres humanos (BROKS et al, 2009; LOBO-FILHO et al, 2011). Assim o 4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino) ethyl] benzene-1, 2-diol ou comumente conhecido pela denominação comum internacional isoproterenol é uma catecolamina sintética que atua como agonista de receptores β -adrenérgicos não-seletivos. A alta densidade de receptores β -adrenérgicos nos tecidos cardíacos favorece ao desenvolvimento da cardiomiopatia induzida pelo isoproterenol (GOODMAN & GILMAN, 2018).

O uso do isoproterenol para produzir injúria miocárdica, pode produzir graus patológicos diferentes em sua indução devido à dose utilizada. Em baixas doses (0.3–6 mg/kg), isoproterenol induz injúria miocárdica de 1-3 semanas de administrações repetidas, sem afetar a pressão arterial, porém produz hipertrofia cardíaca acompanhada de fibrose e necrose cardíaca. O uso de isoproterenol em média dosagem (10–85 mg/kg 1x) produz injúria miocárdica associada a temporária redução da pressão arterial sistólica e diastólica, além de mudanças na ultraestrutura mitocondrial, produzindo inchamento da mitocôndria. A administração de isoproterenol em altas doses (85–300 mg/kg, administração repetida) produz necrose miocárdica difusa, hipertrofia ventricular, alterações hemodinâmicas, alterações metabólicas e eletroionicas (SIDDIQUI et al, 2016).

Isoproterenol assemelha-se as catecolaminas endógenas devido à presença de um núcleo aromático catecol unido a uma porção alifática. A porção alifática confere às catecolaminas maior afinidade entre os receptores metabotópicos como adrenérgicos

e/ou dopaminérgicos (BANGASH et al, 2012; LIAUDET et al, 2014). Em relação à sua estrutura molecular (Figura 2, pág 44), o grupamento alifático isopropila ligado ao grupo amina confere ao isoproterenol maior afinidade β -adrenérgica e pouca afinidade por receptores α -adrenérgicos, enquanto que a presença de hidroxilas ligadas ao anel aromático nas posições 3 e 4 potencializam a ação β -adrenérgica, enquanto que a hidroxila ligada ao carbono na posição β aumenta a hidrofília molecular e reduz a ação central (HOFFMAN et al, 2001).

FIGURA 2- Estrutura molecular do isoproterenol



Fonte: SIDDIQUI et al, 2016

A transdução de sinal produzido por isoproterenol é igual aos dos agonistas adrenérgicos cardíacos. A ativação de receptores cardíacos $\beta_{1,2}$ adrenérgicos induz a ativação da proteína G tipo s que induz a dissociação de seu trímero, a subunidade α estimula a ativação da adenilato ciclase e induz a ciclização do monofosfato de adenosina (AMPc) e conseqüente ativação de canais para cálcio do retículo sarcoplasmático e dos canais para cálcio ancorados na membrana, resultando em aumento da condutância de cálcio intracelular mediados pela fosforilação da proteína kinase A (PKA). A dissociação do trímero da proteína Gs, também aumenta a estimulação de proteínas contráteis, assim, o aumento intracelular do cálcio ventricular e a estimulação de proteínas contráteis produzem inotropismo, cronotropismo lusitropismo e badmotropismo positivo, resultando em aumento da força de contração, frequência cardíaca, da velocidade de condução e do débito cardíaco (MOURA & VIDAL, 2011).

Entretanto, doses maciças e repetidas de isoproterenol produzem sobrecarga da sinalização cardíaca do cálcio e aumento da demanda miocárdica de oxigênio alterando

o estado energético mitocondrial cardíaco e produção de espécies reativas de oxigênio aumentando o estresse oxidativo (FLECKENSTEIN et al, 1974; FLECKENSTEIN et al, 1975; KHAN et al, 2012). O estresse oxidativo tem sido exaustivamente correlacionado com o IAM, devido ao aumento da peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres (ânions superóxido e hidroxil) durante a hipóxia/anóxia. Não obstante, isoproterenol é capaz de produzir lesões cardíacas por hipóxia e consequente hiperprodução de espécies radicalares engatilhando a peroxidação lipídica (COSTA et al, 2011). Isoproterenol também é capaz de alterar a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GP_X) (LOBO-FILHO et al, 2011; SHUKLA et al, 2015).

Em associação, estudos recentes mostram que o isoproterenol, também pode causar aumento do estresse oxidativo durante a biotransformação e excreção do isoproterenol, assim, isoproterenol é convertido a metabólitos ativos como isoprenocromos, que possuem a capacidade de agir de modo similar às espécies reativas derivadas do oxigênio aumentando a lesão isquêmica cardíaca (REMIÃO et al, 2001; REMIÃO et al, 2002).

O estresse oxidativo produzido na lipoperoxidação tem sido apontado como responsável pela fase inflamatória do infarto. Sabe-se que o aumento do estresse oxidativo seja responsável pela quimiotaxia e recrutamento de células inflamatórias que envolve um complexo mecanismo orquestrado pelo aumento da circulação dos leucotrienos, interleucinas e de segundos mensageiros inflamatórios como o TNF- α , promovendo neutrofilia miocárdica (NIJIMA et al, 1999; OLIVETTI et al, 2000). Os mecanismos que envolvem todos os processos envolvidos na inflamação das lesões de isquemia-reperfusão não é claramente descrito, entretanto, sabe-se que o isoproterenol é capaz de mimetizar a inflamação das lesões de isquemia-reperfusão semelhante ao humano (LOBO-FILHO et al, 2011).

Da mesma maneira, sabe-se que o isoproterenol é capaz de aumentar os níveis circulantes de integrinas e selectinas, estimulando o mecanismo de rolamento e adesão de células inflamatórias nas coronárias e sua invasão no miocárdio subjacente (DERIAN et al, 1995; SHUKLA et al, 2015). A estase sanguínea envolvida na diapedese neutrofilica pode funcionar como o gatilho para a formação da agregação plaquetária e dos trombos oclusivos coronários, produzindo infarto, no entanto, não está

claro na literatura se o IAM produzido pelo isoproterenol envolve mecanismos trombolíticos e vasoespasmos na geração da hipóxia/anóxia miocárdica (RAHMATULLA & DEVI, 2013).

O aumento das espécies radicalares no miocárdio e o trabalho cardíaco extenuante produzem estímulos de morte celular ativado pela via intrínseca e extrínseca. A sobrecarga da sinalização do cálcio miocárdico e a alteração do estado energético mitocondrial resulta em hiperexpressão de endonucleases que fragmentam o DNA e consequente morte celular. O aumento da apoptose cardíaca ocorre devido a supressão de moléculas antiapoptóticas como o Bcl₂ e aumento de moléculas pró-apoptóticas BAX (SHUKLA et al, 2015). Este mecanismo de morte celular produzida pelo isoproterenol é similar ao encontrado nas lesões de isquemia-reperfusão em humanos (BAROLDI, 1974, WONG et al, 2017).

Isoproterenol também é capaz de modular negativamente o metabolismo cardíaco, alterando o metabolismo da taurina, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, assim como do ácido cítrico (LIU et al, 2013). É sabido que a taurina é capaz de reduzir os níveis circulantes de apolipoproteína B100, componentes da formação de VLDL e LDL, que representam risco cardiovascular, ao reduzir o metabolismo da taurina, isoproterenol aumenta o risco de infarto pela circulação de LDL e VLDL (YANANGITA et al, 2008). Há evidências, que o baixo nível de taurina, possa produzir cardiomiopatia isquêmica devido ao envolvimento da taurina na função contrátil cardíaca, porém seus mecanismos não são totalmente conhecidos (RIPPS & SHEN, 2012).

O isoproterenol também é capaz de produzir alterações sobre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do ácido cítrico. Isoproterenol inibe a beta-oxidação de lipídeos, aumentando os níveis de lipídicos na corrente circulatória, representando risco cardiovascular. De modo similar, isoproterenol é capaz de alterar a via glicolítica, assim, isoproterenol aumenta a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico. O aumento na glicólise miocárdica induzida por isoproterenol, indica o uso excessivo de glicose para desempenhar o trabalho cardíaco sistólico. Os níveis de treonina, glicina e alanina no musculo cardíaco de ratos foi diminuída após indução do infarto com isoproterenol, indicando deficiência no metabolismo energético no miocárdio de ratos infartados (LIU et al, 2013).

Em adição, isoproterenol é capaz de estimular a lipólise mediada por receptores β_3 em adipócitos, aumentando a circulação lipídica e a formação de aterosclerose no infarto induzido por catecolaminas (MOHAN & BLOOM, 1999).

As alterações eletrolíticas estão relacionadas com aumento dos níveis de cálcio e de sua captação pelo miocárdio em torno de 6 horas após a administração do isoproterenol, redução nos níveis de Na^+ e Ca^{2+} e aumento dos níveis de K^+ na corrente sanguínea, após 24 horas manutenção ou ligeiro aumento nos níveis de Na^+ no miocárdio e normalização dos eletrólitos com leve redução nos níveis de cálcio plasmáticos (REMIÃO et al, 2001).

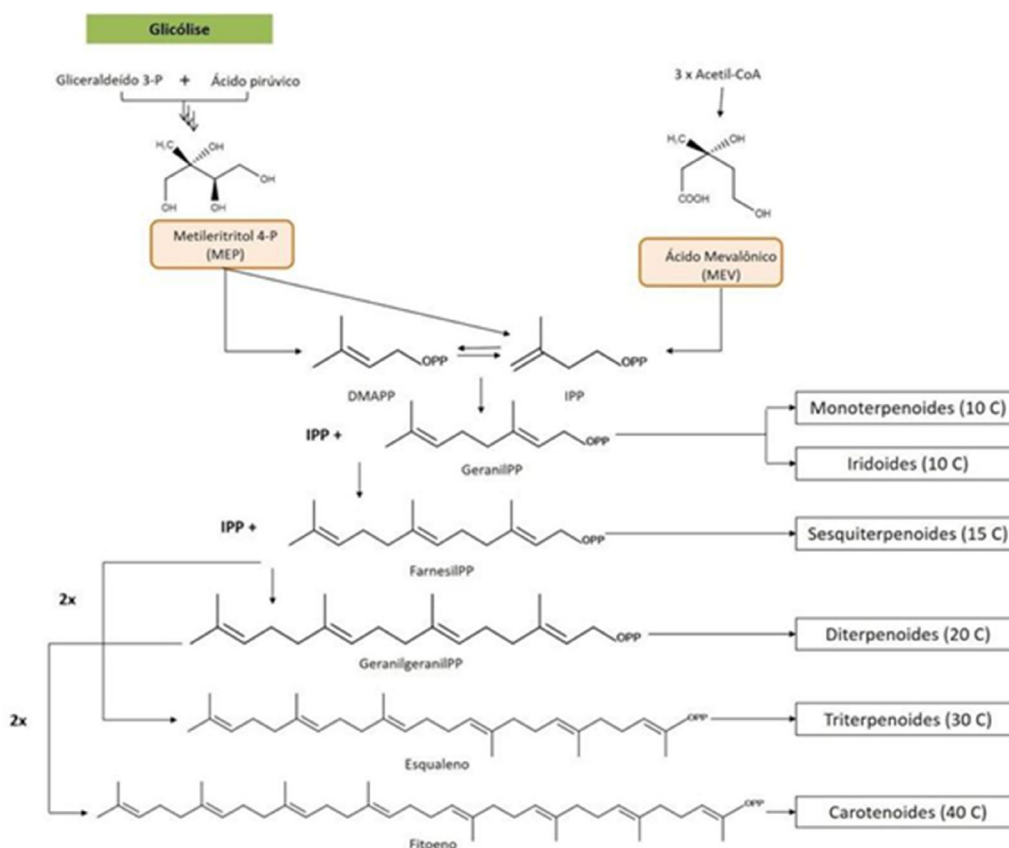
As alterações membranares, ocorrem sobre os fosfolípidos, após 24 horas da administração do isoproterenol, diminuindo a capacidade de metilação do sarcolema, aumento do conteúdo do retículo sarcoplasmático e redução da capacidade de metilação, não foram descritas alterações significativas no conteúdo e na metilação de mitocôndrias (SÁNCHEZ et al, 1997). Quanto ao sarcoplasma, após 24 horas a administração do isoproterenol, há diminuição sobre a atividade de canais para cálcio, redução dos sistemas antiporte $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, aumento nos reservatórios superficiais de cálcio, sem alteração na densidade de canais para cálcio e dos cotransportadores Na^+-K^+ (DAHLLA et al, 2001).

O isoproterenol é capaz de induzir insuficiência cardíaca em longo prazo, associada à hipertrofia ventricular, redução da complacência cardíaca e diminuição da fração de ejeção ventricular esquerda (CANNAVO et al, 2013). A hipertrofia ventricular desenvolvida pelo isoproterenol não envolve neogênese celular, entretanto há participação do aumento da angiotensina II (ANGIO II) sistêmica, assim como da redução sobre os níveis circulantes de esfingosina I (OCARANZA, 2002; CANNAVO et al, 2013).

2.3 Compostos terpênicos e seus efeitos cardiovasculares

Os compostos terpênicos são substâncias naturais, reconhecidas por serem metabólitos secundários de origem vegetal. São formados através da união de unidades de isopreno e possuem como fórmula estrutural básica $(C_5H_8)_n$. A biossíntese para a formação dos compostos terpênicos nos vegetais derivam do metabolismo do ácido mevalônico (MVA) através da união de unidades da acetil coenzima A ou através do metabolismo do metileritritol fosfato (MEP) (Figura 3, pág 48). Entretanto, em ambas as rotas biosintéticas, serão originados os precursores dos terpenos: pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAP), que por sua vez irão originar o isopreno (DEWIK, 2002; SIMÕES et al, 2017).

FIGURA 3- Rotas biosintéticas envolvidas na formação de compostos terpênicos em vegetais.



Fonte: NETO et al, 2017.

Em geral, os compostos terpênicos podem ser classificados quimicamente de acordo com os grupos orgânicos presentes neles, assim como de acordo com a presença ou não de anel aromático estrutural e ainda podem se subclassificar quimicamente de

acordo com o número de moléculas de isoprenos associadas. Assim, em relação ao grupamento orgânico, podem possuir ligações com álcool, cetona e aldeídos e podem ser alifáticos (acíclicos) ou aromáticos, entre as formas com anéis cíclicos podem existir nas formas: monocíclica, bicíclica, tricíclica, tetracíclica e pentacíclica. Enquanto a classificação relacionada ao número de unidades de isopreno pode ser: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos ou ainda politerpenos (DEWIK, 2002; SIMÕES et al, 2017).

Os compostos terpênicos têm atraído interesse da comunidade científicas, devido as suas atividades biológicas promissoras. Sendo assim, os compostos terpênicos têm sido considerados úteis para o tratamento de diversas doenças humanas. Relatos da literatura mostram que em 2002 as indústrias farmacêuticas movimentaram aproximadamente 12 bilhões de dólares em moléculas terpênicas e suas aplicações farmacoterapêuticas (WANG et al, 2005). Não obstante, o interesse dos compostos terpênicos e suas aplicações sobre o sistema cardiovascular têm crescido na última década (SANTOS et al, 2011; ALVES-SILVA et al, 2016).

Compostos diterpenicos também são capazes de produzir efeitos cardiovasculares. Estudos de Oliveira, 2006 mostram que o diterpeno labdano-302 ((8)17, 12E, 14-labdatrieno-18-(óico)) isolado de *Xylopija langsdorfiana* é capaz de produzir hipotensão e taquicardia de maneira dose dependente em ratos normotensos e não anestesiados, labdano-302 também é capaz de produzir efeito vasorelaxante em artérias mesentéricas de ratos normotensos e hipertensos L-NAME, os efeitos parecem envolver em parte a via do óxido nítrico, da prostaglandina I₂ e do bloqueio de canais para cálcio voltagem dependentes tipo L, assim os efeitos cardiovasculares induzidos por labdano-302 são provenientes da vasodilatação periférica (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al, 2006; OLIVEIRA, 2008).

Estudos de Ribeiro 2005 mostraram que o diterpeno ácido ent-15 α -acetoxicaur-16-en-19-óico (CA-acetoxi) isolado de *Guatteria juruensis* produziu efeito vasorelaxante em artérias mesentéricas isoladas de ratos e nas preparações de átrio isolados e perfundidos induziram resposta cronotrópicas e inotrópicas negativas. Em ratos normotensos não anestesiados induziu hipotensão e bradicardia que eram abolidas na presença de atropina. Assim o diterpeno caurano induziu redução na resistência periférica total produzindo hipotensão e reduziu o cronotropismo e o inotropismo

cardíaco resultando em bradicardia. Os mecanismos envolvidos nestas ações foram dependentes da ativação de receptores muscarínicos e consequente liberação de óxido nítrico, além do bloqueio sobre canais para cálcio (RIBEIRO, 2005).

Os estudos de Simplício e cols, mostram que o labdano ácido Ent-3-Acetóxi-Labda-8(17),13-Dieno-15-Óico foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos hipertensos em ratos com hipertensão cardiorrenal. Labda-15-óico produz relaxamento vascular em artérias com e sem endotélio de ratos hipertensos 2R-1C e 2R. O diterpeno foi capaz de reduzir a pressão arterial devido ao relaxamento do músculo liso vascular, entretanto a administração intravenosa do diterpenol labda-15-óico produziu aumento da pressão arterial em ratos 2R-1C e 2R não-anestesiados (SIMPLÍCIO et al, 2016).

Cuadrado e cols evidenciaram que um diterpeno labdano produz efeito cardioprotetor contra as lesões de isquemia-reperfusão miocárdicas através de abordagens *ex-vivo*, usando culturas de cardiomiócitos ventriculares H9C2, bem como, nas abordagens *in vivo* diminuindo o tamanho do infarto. Os mecanismos relacionados ao efeito cardioprotetor envolve a participação da ativação da via AKT nos cardiomiócitos (CUADRADO-BERROCAL et al, 2011; CUADRADO-BERROCAL et al, 2015).

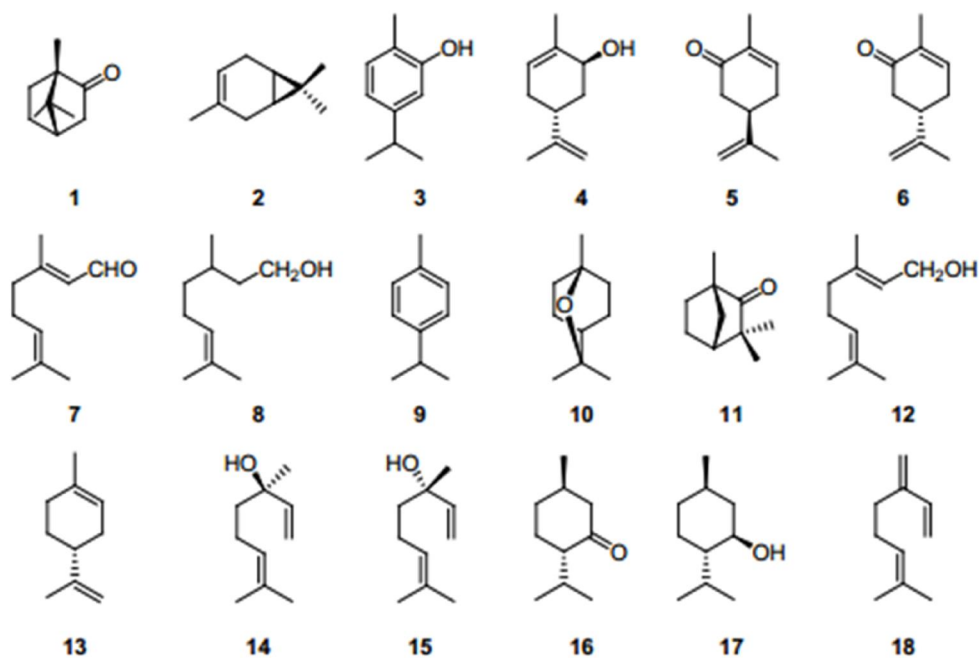
Em particular, os monoterpenos são capazes de modular ações sobre o sistema cardiovascular, demonstrando promissores efeitos para o tratamento farmacológico de doenças do aparelho cardiovascular (SANTOS et al, 2011). Os monoterpenos são constituintes comumente encontrados em óleos essenciais de várias estruturas vegetais, como flores, folhas, frutos e resinas (YANG et al, 2013; ZUZARTE & SALGUEIRO, 2015). Monoterpenos, também são atrativos nas indústrias cosméticas devido à vasta amplitude de aromas e suas combinações servindo tanto para aromatização quanto para a fixação de fragrância dos perfumes (KANG & LEE, 2016; SARKIC & STAPPEN, 2018)

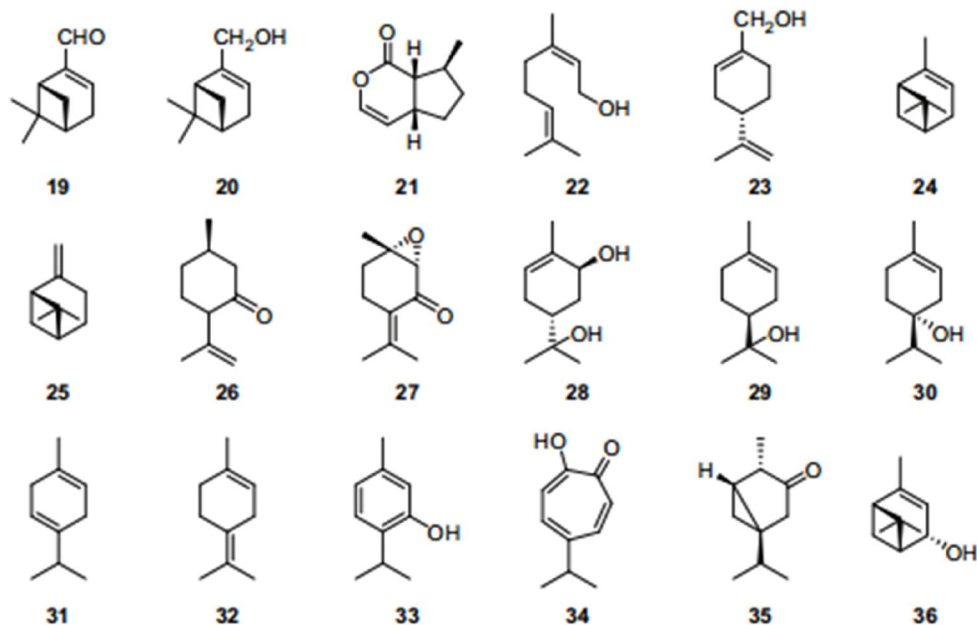
Estudos de Santos e cols, 2011 mostram que aproximadamente 33 monoterpenos e seus isômeros, são capazes de induzir respostas cardiovasculares devido às ações pressóricas, vasorelaxantes e cardíacas (Figura 4, pág 51). Estas evidências foram testadas em diversos modelos experimentais, usando abordagens *ex-vivo* com fragmentos de tecidos de animais e de humanos, como também através do uso de abordagens *in vivo* em modelos animais e em humanos (SANTOS et al, 2011).

1,8-cineol e 4-terpineol são monoterpenos apontados como compostos majoritários de óleos essenciais obtidos de *Alpinia zerumbet*. *Alpinia zerumbet* é uma planta conhecida por seus efeitos cardiovasculares. Assim, 4-terpineol induziu hipotensão em ratos normotensos e hipertensos (LAHLOU et al, 2002; LAHLOU et al, 2003). Em experimentos *ex-vivo*, anéis aórticos relaxaram na presença de 4-terpineol devido à inibição eletromecânica do influxo de cálcio através de canais para cálcio voltagem dependentes (MAIA-JOCA et al, 2014).

1,8-cineol foi capaz de induzir efeitos vasorelaxantes em aortas isoladas de ratos envolvendo ações endotélio-dependentes devido a liberação de óxido nítrico (LAHLOU et al, 2002; PINTO et al, 2009).

FIGURA 4- Monoterpenos com ações cardiovasculares.





Fonte: SANTOS et al, 2011.

1-8 cineol também reduziu a pressão arterial de ratos normotensos anestesiados e não-anestesiados (LAHLOU et al, 2002). Em músculos papilares isolados e perfundidos de ratos 1,8-cineol induziu inotropismo negativo devido à inibição do influxo de cálcio transmembranar (SOARES et al, 2005).

Citronelol, produziu efeito hipotensor e taquicardico em ratos normotensos não-anestesiados, e em preparações de artéria mesentérica isolada de ratos produziu efeito vasorelaxante, os mecanismos propostos para os efeitos cardiovasculares estudados devem-se ao bloqueio do influxo de cálcio através da membrana por canais para cálcio voltagem dependetes, produzindo redução da resistência periférica vascular e taquicardia reflexa (BASTOS et al, 2010; MENEZES et al, 2010).

Limoneno, um monoterpene comumente encontrado em frutas cítricas produziu efeito anti-hipertensivo em roedores com hipertensão pulmonar *in vivo* induzido por monocrotalina além de prevernia os agravos da hipertensão pulmonar nos animais (TOURVAY et al, 1995). Sobrerol, também foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos com hipertensão pulmonar, sendo capaz de regularizar os níveis pressóricos (TOURVAY et al, 1995).

Mentol, um composto encontrado em espécies de hortelã, produziu efeito vasorelaxante em preparações isoladas de ratos e de humanos, este efeito vasorelaxante foi dependente da ativação de receptores muscarínicos vasculares e consequente produção de óxido nítrico endotelial em ratos, porém também parece envolver o bloqueio dos canais para cálcio e sódio do tipo TRPM 8 em artérias humanas (JOHNSON et al, 2009), estudos com *patch clamp* revelaram que o mentol é capaz de inibir as correntes de cálcio através dos canais para cálcio tipo L em cardiomiócitos ventriculares (BAYLIE et al, 2010).

Mirtenal e mirtenol induziram efeito hipotensor de maneira dose-dependente em ratos (SAITO et al, 1996). α -pineno e α -cimeno, monoterpenos encontrados em uma planta popularmente conhecida como “cominho-preto” foi capaz de produzir hipotensão e bradicardia de modo dependente de dose em ratos não anestesiados e anestesiados com uretano, estes efeitos foram atribuídos à modulação no controle central vasomotor e redução na liberação de neurotransmissores simpáticos, reduzindo a resistência periférica total e a frequência cardíaca (EL TAHIR ET AL., 1993; EL TAHIR & AGEEL, 1994; EL TAHIR et al, 2003). Entretanto, também foi demonstrado que α -pineno e β -pineno produzir hipotensão e taquicardia em ratos normotensos não anestesiados (MENEZES et al, 2010).

Carvacrol foi capaz de induzir efeitos vasorelaxantes em anéis arteriais de aortas, mesentéricas e artérias cerebrais e cerebelares de ratos (AYDIN et al, 2007; EARLEY et al, 2010), também foi capaz de produzir efeitos antiarrítmicos em cardiomiócitos isolados de cães e de humanos estes efeitos parecem envolver a modulação de canais para cálcio de diversos subtipos (MAGYAR et al, 2004; AYDIN et al, 2007; PEIXOTO-NEVES et al, 2010) e em abordagem *in vivo* produziu redução na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos normotensos anestesiados, estes efeitos foram atribuídas as ações endotélio-dependentes envolvendo a ativação da via do óxido nítrico, pois a indução da hipertensão L-NAME foi inibida pela pré-administração de carvacrol (AYDIN et al, 2007).

Carvacrol, também foi capaz de produzir cardioproteção contra as lesões de isquemia-reperfusão do infarto agudo do miocárdio em ratos e seus mecanismos envolvem ações antiapoptóticas e modulações cardíacas envolvendo as vias MAPK/ERK e AKT/eNOS (YU et al, 2013; EL-SAYED et al,2016; CHEN et al, 2017;

SADEGHZADEH et al, 2018). Timol, também produziu efeitos cardioprotetores *in vivo* contra as injúrias miocárdicas induzidas previamente com doxorubicina (EL-SAYED et al, 2016).

Em adição, timol produziu efeitos arritmogênicos em cardiomiócitos ventriculares isolados de cães e de humanos, estes efeitos sugerem o envolvimento da inibição de correntes de cálcio e potássio (MAGYAR et al, 2004), estudos com *patch clamp* mostraram que timol é capaz de inibir canais para cálcio voltagem dependente tipo L em corações isolados, induzindo efeitos inotrópicos negativos (SZENTANDRÁSSY ET AL, 2004) assim como também foi capaz de inibir o influxo de cálcio do retículo sarcoplasmático induzindo efeito cardiodepressor (SZENTANDRÁSSY ET AL, 2004). Thymol, também foi capaz de induzir ações farmacológicas sobre a vasculatura, produzindo efeito vasorelaxante em preparações de aortas isoladas de ratos de modo independente de endotélio, as evidências demonstraram que timol foi capaz de inibir o influxo de cálcio intracelular em anéis aórticos (PEIXOTO-NEVES et al, 2010).

A mistura racêmica de linalol foi capaz de produzir efeitos hipotensores e taquicardicos em ratos normotensos e não anestesiados, estes efeitos foram atribuídos a redução da resistência periférica vascular com consequente taquicardia reflexa devido a ativação dos barorreceptores cardíacos nas abordagens *in vivo* (MENEZES et al, 2010). Entretanto, os resultados dos efeitos de linalol sobre a frequência cardíaca foram variáveis de acordo com o uso separado dos isômeros de linalol. A utilização da inalação da molécula levogira (-) linalol em humanos provocou efeito cardiodepressor, entretanto a exposição de humanos a molécula dextrogira (+) linalol com mesma via de administração induziu cardioestimulação (HOËFERL et al, 2006).

O tratamento crônico de ratos ao linalol foi capaz de produzir efeitos cardioprotetores *in vivo* contra o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol, linalol também preveniu as lesões de isquemia-reperusão em células H9C2 e os mecanimos intrínsecos ao efeito cardioprotetor se correlacionam com múltiplas ações, induzindo angiogênese endotelial devido à ativação da via do VEGF- β , assim como, também envolvem a ativação da via AKT e possivelmente exerce inibição do GSK-3 β em células cardíacas (ZHENG et al, 2017).

Alpha-terpineol é um monoterpeneo cíclico, com massa molar (154.25 g/mol) e fórmula molecular (C₁₀H₁₈O) de origem natural que pode ser isolado de uma variedade de espécies vegetais aromáticas, apresenta-se como um óleo incolor, volátil e odorífero. Seus principais empregos são em aromaterapias, perfumaria e no uso tradicional de plantas medicinais aromáticas, sendo componente de óleos essenciais extraídos de plantas (BHATIA, 2008).

Alpha-terpineol tem sido considerado um dos compostos majoritários da resina obtida nos caules de *Protium heptaphyllum* (MARQUES et al, 2010; MOBIN et al, 2016; MOBIN et al, 2017). *Protium heptaphyllum* é uma planta nativa do Brasil pertencente à família *Burseraceae* é popularmente conhecida como “almécega” ou “breu-branco” que se distribui na região amazônica e no nordeste brasileiro. Sua resina é utilizada por tribos indígenas brasileiras em rituais curandeiros para tratamento popular de diversas doenças, através da inalação da queima da resina obtida desta espécie vegetal (BREITBACH et al,2013; MOBIN et al, 2017). O uso da resina de *Protium heptaphyllum* foi capaz de prevenir a obesidade em camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras, demonstrando que a resina de *Protium heptaphyllum* é capaz de alterar o metabolismo energético dos camundongos previamente induzidos a obesidade (CARVALHO et al, 2015). O óleo essencial obtido das resinas de *Protium heptaphyllum* foi capaz de induzir efeito vasorelaxante em artérias mesentéricas de ratos de maneira independente de endotélio vascular e parece envolver a participação de canais para cálcio em sua resposta (MOBIN et al, 2017).

Diversas atividades farmacológicas são descritas para alpha-terpineol (KHALEL et al, 2018). Porém, as principais atividades farmacológicas descritas para o α -terpineol, no sistema cardiovascular são: vasorelaxante em artérias de resistência de ratos espontaneamente hipertensos, estimulando a produção de óxido nítrico via óxido nítrico sintase ativados pelo guanilil monofosfato cíclico (RIBEIRO et al, 2010) e anti-hipertensivo envolvendo a participação de canais para cálcio sensíveis à voltagens tipo L em ratos induzidos a hipertensão com L-NAME, um inibidor das oxido nítrico sintetases (SABINO et al, 2013).

Diante destas premissas, nós hipotetizamos que o tratamento prévio e subagudo com alpha-terpineol isolado das resinas de *Protium heptaphyllum* possa induzir cardioproteção contra o IAM induzido por isoproterenol em ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Avaliar o efeito cardioprotetor de monoterpeno (TPN) isolado das resinas do caule de *Protium hepthaphylum* em ratos infartados.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar os efeitos cardioprotetores do TPN em ensaios farmacológicos *in vivo* sobre ratos infartados e seus controles;
- ✓ Avaliar o efeito do TPN sobre a prevenção do remodelamento hipertrófico pós-infarto induzido em ratos por lesão de isquemia-reperusão;
- ✓ Avaliar os efeitos do TPN sobre o peso corporal e parâmetros lipídicos de ratos previamente tratados e induzidos ao infarto;
- ✓ Avaliar as alterações hemodinâmicas induzidas pelo TPN após o tratamento crônico nos ensaios *in vivo* de cardioproteção;
- ✓ Avaliar os efeitos do TPN em prevenir alterações na sensibilidade baroreflexa em ensaios farmacológicos *in vivo* em ratos previamente tratados e induzidos ao infarto;
- ✓ Avaliar os efeitos do TPN em prevenir alterações sobre as respostas colinérgicas cardiovasculares em ensaios farmacológicos *in vivo* em ratos previamente tratados e induzidos ao infarto;
- ✓ Avaliar os efeitos do monoterpeno TPN na reatividade vascular em ensaios *ex vivo* de preparações de artéria mesentérica superior ratos infartados e seus controles;
- ✓ Avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres do TPN em ensaios antioxidantes *in vitro*;
- ✓ Avaliar os efeitos agudos do TPN no sistema cardiovascular nos ensaios *in vivo* em ratos espontaneamente hipertensos;
- ✓ Avaliar o efeito do TPN em ensaios *in silico* em alvos moleculares relacionados à cardioproteção através de *docking* molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias

4.1.1 Sais

Cloreto de sódio (Isofar, BR), cloreto de potássio (Isofar, BR), cloreto de cálcio di-hidratado (Isofar, BR), cloreto de magnésio hexa-hidratado (Isofar, BR), glicose (Isofar, BR), bicarbonato de sódio (Isofar, BR), fosfato de sódio mono-hidratado (Isofar, BR).

4.1.2 Anestésicos

Tiopental sódico (Cristália, BR), Cetamina (Syntec, BR), Xilazina (Syntec, BR).

4.1.3 Reagentes analíticos

EDTA, nifedipina, nitroprussiato de sódio, fenilefrina, acetilcolina, atropina, hexametônio, isoproterenol, cremophor, PBS, MTT, RPMI, gentamicina, ácido gálico, ácido cafeico, quecertina, Trolox, ácido 2,2'-aziobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), cloreto de ferro(III), cloridrato de naftiletlenodiamino, ferrozina (Sigma Aldrich, EUA), heparina sódica (Cristália, BR), cloreto de trifeniltetrazólio, etanol P.A, Entelan, hexacianoferrato (III) de potássio, nitropussiato de potássio, carbonato de sódio, monohidrogenofosfato de sódio, ácido fosfórico, ácido clorídrico, ácido ascórbico, hidróxido de sódio, persulfato de potássio, metanol (Merk, BR) formaldeído, ácido acético glacial, ácido pícrico, xileno, parafina granulada 56-58°, parafina granulada 58-62° (Synth, BR), hematoxilina de harris, eosina (Biopac, BR), ácido tricloroacético, sulfato ferroso (Vetec, BR).

4.1.4 Kits bioquímicos

Creatino fosfoquinase total liquiform, creatino fosfoquinase isoforma MB liquiform, colesterol total liquiform, triglicérides liquiform, Cálcio liquiform (Labtest, BR), Proteína C Reativa (Wama diagnóstica, BR)

4.2 Extração e obtenção do monoterpeno

O monoterpeno foi extraído de resinas obtidas no caule de *Protium heptaphyllum*. O método de extração e purificação encontra-se em patente depositada no Instituto

Nacional de Propriedade Intelectual (INPI-BR) sob número de protocolo INPI 00012. Para a confirmação estrutural do TPN foi realizada uma corrida cromatográfica gasosa que era acoplada à espectrometria de massas e sua elucidação estrutural era analisada através da montagem molecular com base nos íons fragmentados no espectro de massa/carga além da confirmação da compatibilidade de compostos descritos na biblioteca espectral NIRST, superior à 85% de similaridade. Uma análise confirmatória era realizada através de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN H^+), identificando a formação de hidrogênios singletos, dupletos e tripletos presentes na molécula.

4.3 Avaliação da toxicidade em macrófagos

Para avaliação da citotoxicidade, utilizamos o ensaio colorimétrico de viabilidade celular por Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT) conforme descrito por Mosman, 1983. Brevemente os macrófagos da linhagem J774 foram inseridas em microplacas com 96 poços em uma concentração ($5,0 \times 10^5$ células/poços), suplementadas com solução nutritiva RPMI (solução criada pelo Instituto Memorial Roswell Park) 10 % de soro bovino fetal e gentamicina 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, em seguida foram incubadas por 4 horas (37°C), as células aderentes foram suspendidas ao menos duas vezes antes do início do experimento de citotoxicidade.

Após o período de manutenção da viabilidade das linhagens celulares, o monoterpeno foi diluído em DMSO e logo após, inserido nos micropoços contendo as culturas celulares. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações [1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] respectivamente. Triton X-100 1% foi utilizado como controle para morte celular, enquanto o meio nutritivo RPMI foi utilizado como controle da viabilidade das células. DMSO também foi testado como veículo nas linhagens celulares. Cada micropoço foi tratado com 200 μL de uma solução de MTT, em seguida as culturas celulares foram incubadas em estufas à 37° C por 48 horas. Por fim, após as 48 horas a densidade óptica foi lida em espectrofotômetro à 540 nm.

4.4 Animais

Foram utilizados em todos os protocolos farmacológicos descritos neste trabalho, 140 ratos adultos jovens (*Rattus norvegicus*, variedade albinus), machos da linhagem wistar (WT) e 140 ratos adultos jovens (*Rattus norvegicus*, variedade albinus)

machos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR), ambos sadios, pesando entre 150 e 250 gramas que foram procedentes do Biotério Central da UFAL, Maceió, AL.

Os animais foram previamente acondicionados em gaiolas plásticas coletivas, contendo cinco animais por gaiola, mantidos em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos, temperatura ambiente de aproximadamente 25°C e umidade mantida por ar condicionado, conforme preconizado pelo Conselho Canadense de Experimentação Animal (Olfert, 1993). Os ratos eram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab, BR) e água filtrada “*ad libitum*”. A troca da maravalha foi realizada três vezes por semana. Antes do início do experimento, os animais foram submetidos por um período de adaptação no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Escola de Enfermagem e Farmácia (LFC-ESENFAR) por sete dias. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFAL, sob número de protocolo 09/2015 (ANEXO IV, pág. 229).

4.5 Abordagens farmacológicas

Para avaliar o potencial cardioprotetor do monoterpene (TPN), nós utilizamos o método de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol, conforme técnica descrita por Rajadurai & Prince, 2006. Os animais de ambas as linhagens eram aleatoriamente alocados em 7 grupos experimentais, contendo 5 ratos por grupo:

G1-Grupo salina (grupo que recebia solução salina 0,9% V.O por 15 dias)

G2-Grupo infartado por isoproterenol (grupo que recebia solução salina 0,9% V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c. 14° e 15° dias)

G3-TPN 25 mg/kg + ISO (grupo que recebia TPN na dose de 25 mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c.14° e 15° dia)

G4-TPN 50 mg/kg + ISO (grupo que recebia TPN na dose de 50 mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c.14° e 15° dia)

G5-TPN 75 mg/kg + ISO (grupo que recebia TPN na dose de 75 mg/kg V.O. por 15 dias + isoproterenol 85 mg/kg s.c.14° e 15° dia)

G6-TPN 50 mg/kg sem ISO (grupo que recebia TPN na dose de 50 mg/kg V.O. por 15 dias)

G7- NIF 3 mg/kg + ISO (grupo que recebia nifedipina na dose de 3 mg/kg V.O. por 15 dias+ isoproterenol 85 mg/kg s.c.14° e 15° dia).



Injeção subcutânea dorsal de isoproterenol 85mg/kg em ratos (Lobo-Filho, 2011)

4.5.1 Avaliação da sobrevivência aos infartos induzidos por isoproterenol

O índice de sobrevivência dos animais aos infartos letais induzidos por isoproterenol foi estimada através da expressão matemática:

$$\% \text{ Sobrevivência} = (\text{n}^\circ \text{ de infartos não letais} - \text{n}^\circ \text{ de obtidos por infartos letais}) \times 100$$

Os obtidos devido ao tratamento crônico antes da exposição ao isoproterenol e/ou devido a traumas da administração oral por gavagem eram excluídos do cálculo.

4.5.2 Determinação da área de necrose miocárdica

Após a eutanásia por ensanguinação sob anestesia (Tiopental sódico 45 mg/kg i.p.), os animais foram submetidos à uma toracotomia e os corações foram excisados do espaço torácico. Os corações foram limpos de tecidos aderentes, as câmaras cardíacas foram cuidadosamente lavadas com solução salina 0,9%, e imediatamente congelados (-

18°C) por 15 minutos, depois os miocárdios foram dissecados na posição transversal ao eixo septal. As microfatias cardíacas continham uma espessura de 3-4 mm.

Cada microfatia foi incubada em uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio à 1%, contendo tampão fosfato 1M com pH= 7.4. As cubas de vidro hermeticamente fechadas foram imersas em um banho-maria com temperatura a 37°C por 20 minutos. As microfatias foram inseridas em lâminas de vidro e fotografadas em estereoscópio sob luz (Leica, KL 300-LED). As imagens eram inseridas no programa Image J pro plus 7.0 (Media cybernetics Inc, silver spring, MD, EUA), onde era determinado o percentual de áreas de necrose e de áreas viáveis.

4.5.3 Avaliação do eletrocardiograma em repouso

Após o tratamento crônico (16º dia), os animais foram anestesiados com uma mistura de agentes anestésicos (Cetamina 80 mg/kg + Xilazina 4 mg/kg i.p.). Em seguida, foram realizadas incisões subcutâneas para inserção de eletrodos e os registros eletrocardiográfico foram gravados. Os eletrodos eram conectados a um amplificador (Bioamp, powerlab, ADInstruments, Dunedin, New Zealand) que enviava os registros para um microcomputador que permitia o acompanhamento do registro eletrocardiográfico em tempo real através do software Labchart 8.0. A atividade elétrica cardíaca foi avaliada nas 6 derivatizações periféricas no plano frontal (DI, DII, DIII, aVR, aVL e aVF).

Os sinais eletrocardiográficos foram estabilizados por um período mínimo de 15 minutos e em seguida o registro eletrocardiográfico em cada derivatização era gravado por 10 minutos. Para avaliar a presença de lesões do infarto agudo do miocárdio e/ou alterações cardíacas secundárias ao infarto foram considerados ao menos 3 derivatizações referentes às ondas, segmentos e intervalos eletrocardiográficos em conjunto.

4.5.4 Avaliação bioquímica

Após a eutanásia por ensanguinação sob anestesia (Cetamina 80 mg/kg + Xilazina 4 mg/kg i.p). Os animais foram submetidos a uma toracotomia e uma punção cardíaca foi realizada. O sangue colhido foi centrifugado 5.000 rpm por 15 minutos e o soro foi

obtido como amostra para dosagens bioquímicas (creatino fosfoquinase total, creatino fosfoquinase isoforma MB, colesterol total, triglicérides e cálcio).

Os corações também foi excisados do tórax, limpos de tecidos aderentes e as câmaras cardíacas lavadas com solução salina 0,9%. Os corações foram dissecados, e os ventrículos direitos e aortas foram homogeneizados com uma solução de PBS 200 mM. O homogeneizado ventricular e aortico foram centrifugados sob refrigeração 15.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as dosagens de cálcio. O sobrenadante do homogeneizado ventricular foi utilizado para dosar a proteína C reativa.

4.5.4.1 Dosagem dos marcadores séricos de infarto agudo do miocárdio

Para determinação dos marcadores séricos do infarto agudo do miocárdio, utilizamos as dosagens de creatino fosfoquinase total e isoforma MB, conforme técnica descrita por Szasz e cols, 1976. Brevemente, uma mistura de reagentes (reagente de trabalho) foi preparada pela adição de 80 µL Reagente 1 (Tampão imidazol 125nmol/L, N-acetilcysteina 25 nmol/L, ADP 2,5 mmol/L, AMP 6,25 mmol/L, diadenosina pentafosfato 12,5 µmol/L, acetato de magnésio 12,5 mmol/L, NADP 2,5 mmol/L, hexoquinase 5.000 U/L e azida sódica 0,095 %) + 20 µL Reagente 2 (Glicose 100 mmol/L, creatina fosfato 150 mmol/L, azida sódica 0,095%, anti-CK-M para inibir CK-MM no kit CK-MB. No kit CK-NAC não haviam anticorpos para inibição de isoformas. 50 µL do soro foi incubada e imediatamente inserida em espectrofotômetro para a leitura de duas absorbâncias em modo cinético (0 e 5 minutos para CK-MB e 0 e 2 minutos para CK-NAC), as absorbâncias foram lidas à 340 nm no espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu). Em seguida, as atividades de creatino fosfoquinase foram estimadas pela expressão matemática:

$$\text{Atividade da CK (U/L)} = \frac{\text{Absorb 2} - \text{Absorb 1}(\text{padrões})}{\text{Absorb 2} - \text{Absorb 1}(\text{amostras})} \times [\text{Calibrador}]$$

4.5.4.2 Dosagem dos níveis lipídicos

Os níveis lipídicos foram estimados pelas dosagens de colesterol total e dosagens de triglicérides dos soros sanguíneos.

4.5.4.2.1 Dosagem de colesterol

1000 μL do reagente 1 (Tampão fosfato 50 mmol, fenol 24 mmol/L, colato de sódio 500 $\mu\text{mol/L}$, azida sódica 15 mmol/L, 4-aminoantipirina 500 $\mu\text{mol/L}$, colesterol esterase 250 U/L, colesterol oxidase 250 U/L e peroxidase 1000 U/L) foi misturada à 10 μL da amostra, inserida em espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu), as absorbâncias foram lidas à 505 nm em modo colorimétrico. Em seguida, o colesterol total foi calculado:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = (\text{Absorbância da amostra/Absorbância do padrão}) \times 200$$

4.5.4.2.1 Dosagem de triglicérides

Para determinação dos níveis séricos de triglicérides, foi utilizado o método descrito por Trinder e cols, 1969. Assim, 1000 μL do reagente 1 (Tampão fosfato 50 mmol/L, magnésio ionizado 4 mmol/L, 4-clorofenol 2,7 mmol/L, 4-aminoantipirina $\mu\text{mol/L}$, ATP 1,8 mmol/L, lipoproteína lipase 1.400 U/L, glicerol quinase 1.000 U/L, glicerol fosfato oxidase 1.500 U/L, peroxidase 900 U/L e azida sódica 0,095%) foi misturada à 10 μL da amostra que foi inserida em um espectrofotômetro (UV-VIS mini-1240 Shimadzu) em modo colorimétrico, as absorbâncias foram lidas à 505 nm. Em seguida, os níveis de triglicérides foram calculados:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = (\text{Absorbância da amostra /Absorbância do padrão}) \times 200$$

4.5.4.3 Dosagem dos níveis de cálcio

Para a determinação dos níveis de cálcio foi utilizado o método colorimétrico baseado na reação titulométrica. Deste modo, 1000 μL do reagente de trabalho formado por 900 μL do reagente 1 (tampão fosfato [920 mmol/L]) + 100 μL do reagente 2 (O-cresolftaleína 320 $\mu\text{mol/L}$, 8-hidroxiquinoleína 13 mmol/L e ácido clorídrico 130 mmol/L) foram adicionados à 10 μL de amostra (soro sanguíneo, sobrenadante do homogeneizado aórtico ou ventricular), em seguida foram inseridas em espectrofotômetro, onde as absorbâncias eram lidas à 570 nm. Os níveis de cálcio eram estimados pela fórmula expressa:

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = (\text{Absorbância do padrão /Absorbância das amostras}) \times 10$$

4.5.4.4 Dosagens de proteína C reativa

A proteína C reativa foi estimada pelo método de imunolátex semi-quantitativo. O sobrenadante do homogeneizado ventricular foi eleito como amostra para dosagem da proteína C reativa. Assim, foram inseridas em microplacas contendo 96 poços. 2,5µL de uma suspensão de látex revestida com anticorpo monoclonal anti-PCR foi incubada cada micropoço e adicionalmente 2,5 µL da amostra pura, em seguida 195 µL de água destilada foi inserida nas microplacas e então as absorbâncias foram lidas na faixa de 540 nm. A fim de evitar o efeito pró-zona, as amostras foram diluídas em até 64 vezes sua concentração inicial. As absorbâncias foram lidas de modo cinético por 2 minutos. As amostras que possuíam concentração abaixo de 5 mg/L foram consideradas negativas, por ausência total de aglutinação, enquanto que as que possuíam concentrações acima de 5 mg/L foram consideradas positivas. O cálculo da concentração das amostras foi expresso pela fórmula abaixo:

$$\text{PCR (mg/dL)} = 5 \text{ mg/L} \times \text{valor da diluição da amostra}$$

4.5.5 Avaliação histopatológica

Para avaliação histopatológica, os ramos aórticos e os corações foram removidos do tórax. As aortas foram limpas e dissecadas de tecidos conectivos aderentes, enquanto os corações foram lavados em solução salina e dissecados na posição longitudinal paralelamente ao eixo septal. Os corações foram submersos em uma solução de formalina 10% onde permaneciam em *overnight* por 12 horas, em seguida uma nova solução de formalina foi substituída e as peças histológicas permaneciam por 12 horas.

Após 24 horas em fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 30 minutos e imediatamente desidratadas em graus crescentes de etanol, sequencialmente diafanizadas por ação do xilol e imersas em banhos de parafinas aquecidas para sua completa inclusão. Os blocos de parafina foram cortados em microfatias (4-5 µm) de maneira semi-seriada, e então cada microfatia foram aderida em lâminas de vidro contendo albumina, cada lâmina formada foi então corada por hematoxilina-eosina e/ou tricrômio de gomori. Nos ramos aórticos foram observadas alterações sobre as túnicas enquanto o diâmetro do lúmen aórtico era medido. Os danos cardíacos foram avaliados

de acordo com o grau e a extensão das lesões conforme descrito por Rona, 1963. Foram avaliados os parâmetros: edema, separação e desorganização das miofibrilas, invasão de leucócitos, inflamação (miocardite), hemorragia, formação de zonas necróticas, vacuolização citoplasmática, alterações sobre o núcleo (picnose, cariólise e cariorexe) e remodelamento cardíaco hipertrófico.

4.5.6 Avaliação morfológica e morfométrica

Após a retirada do coração, estes foram limpos de tecidos aderentes e as câmaras cardíacas foram lavadas com solução salina 0,9%. Os corações foram pesados de acordo com o método de Scherle. Após a pesagem, os corações foram fotografados *in natura* e então cuidadosamente dissecados, os átrios foram extirpados e os ventrículos foram separados, medidos em sua espessura e pesados. O peso do coração e dos ventrículos foram equilibrados com o peso corporal, bem como, com o peso do fêmur dos ratos. Foram avaliados: localização anatômica da ocorrência dos infartos induzidos, assim como, alterações sobre os parâmetros morfométricos: peso corpóreo, peso cardíaco, peso cardíaco/peso corpóreo, peso cardíaco/peso do fêmur, aumento relativo do peso cardíaco, peso ventricular esquerdo/peso cardíaco, peso ventricular direito/peso cardíaco, espessura ventricular esquerda, espessura ventricular direita e Δ das espessuras ventriculares.

4.5.7 Avaliação da atividade sequestradora radicalar

A atividade antioxidante do monoterpeno foi realizada através da abordagem *in vitro* pela capacidade sequestradora de radicais livres.

4.5.7.1 Atividade sequestradora do radical DPPH°

A ação antioxidante do monoterpeno frente ao radical DPPH° foi avaliada conforme descrito por Abe et al., 1998. Uma solução do radical DPPH° foi preparada pela adição de 200 μ l de DPPH° [600 μ mol/L] em uma solução de metanol contendo 500 μ l de tampão acetato de sódio na concentração 0,1 M (pH= 5,5). Em seguida, uma curva concentração-resposta foi obtida na presença do monoterpeno ou dos padrões (ácido gálico, ácido cafeico e quecertina). A mistura foi incubada por 30 min e inseridas em espectrofotômetro, as absorbâncias foram medidas em 517 nm. Trolox, um antioxidante

sintético, foi usado como padrão positivo, enquanto a água miliQ ou metanol foram usados como controle-branco para o cálculo da CI_{50}

4.5.7.2 Atividade sequestradora do radical ABTS*

Brevemente, o potencial de sequestro do radical ABTS* foi realizado conforme descrito por Hsu *et al.*, 2011. Uma solução para geração do radical ABTS* foi preparada pela adição de 200 μ L de ABTS* [2,5 mg/mL] em solução aquosa em 800 μ L de tampão fosfato à 0,1 M (pH= 7.4). Após o preparo da solução contendo o radical livre, uma curva concentração-resposta foi obtida na presença do monoterpeno ou de antioxidantes naturais conhecidos (ácido gálico, ácido cafeico e quecertina). A mistura foi então incubada por 30 min e inseridas em espectrofotômetro, as absorbâncias eram medidas à 734 nm. Trolox foi utilizado como controle positivo enquanto que a água miliQ foi usada como controle-branco para calcular a CI_{50}

4.5.7.3 Atividade redutora de íons Fe^{3+}

O ensaio do poder de redução de íon ferro foi realizada em acordo com Huang *et al.*, 2005. Inicialmente, $[Fe(TPZT)_2]^{2+}$ foi formado pela mistura de 625 μ L de $K_3Fe(CN)_6$ à 1% e 375 μ L do monoterpeno e dos padrões foram incubados à 50°C contendo tampão fosfato (pH= 3.6). Em seguida, 625 μ L de $C_2HCl_3O_2$ à 10 % e 250 μ L $FeCl_3$ à 1% foram adicionadas a mistura. Após 20 minutos, a capacidade do monoterpeno ou dos padrões antioxidantes naturais (ácido gálico, ácido cafeico e quecertina) em inibir a formação do $[Fe(TPZT)_2]^{3+}$ foi avaliada, através da leitura das absorbâncias à 700 nm em espectrofotômetro. Trolox foi usado como controle antioxidante positivo.

4.5.7.4 Ensaio de complexação com Fe^{3+}

A capacidade de complexação com Fe^{3+} foi avaliada conforme descrito por Diniz *et al.*, 1994. Inicialmente, 200 μ L de ferrozina ($C_{20}H_{12}N_4NaO_6S_2$) na concentração de 5 mM e 200 μ L $FeSO_4$ [0,6 mM] foi adicionada em uma solução. Sequencialmente, 800 μ L do monoterpeno ou dos antioxidantes naturais (ácido gálico, ácido cafeico e quecertina) foram incubadas com a mistura e a mistura foi inserida em espectrofotômetro. A formação do complexo foi monitorada na faixa de absorbância de 562 nm. EDTA foi usado como agente complexante positivo.

4.5.7.5 Atividade sequestradora de espécies reativas de nitrogênio

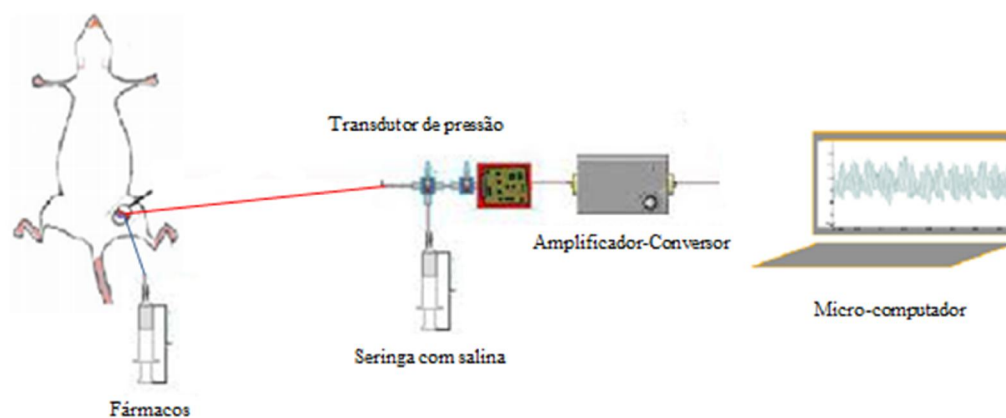
A atividade sequestradora radicalar de nitrogênio ($\text{NO}^\bullet/\text{ONOO}^-$) foi avaliada de acordo com o método apresentado por Ebrahimzadeh et al., 2008 *et al.* Previamente, o reagente de griess, que era capaz de gerar as espécies reativas de nitrogênio foi preparado, pela adição da sulfonilamida 1% previamente diluída em ácido fosfórico à 5% ao dicloridrato de N-(1-naftiletilenodiamina) à 1% e nitroprussiato de sódio na concentração de 14 mg/mL. Então uma única concentração do monoterpeno [500 µg/mL] ou antioxidantes padrões naturais foram incubada com 1mL do reagente de griess e 4mL de Na_2NO_3 à 1M. 2,5 mL da mistura era aliqotada e inserida no espectrofotômetro para a leitura da absorbância à 700 nm nos tempos: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 minutos. Trolox foi utilizado como controle antioxidante, enquanto que o nitroprussiato de sódio foi utilizado controle negativo, gerador de espécies reativas de nitrogênio.

4.5.8 Avaliação hemodinâmica

Para avaliar as alterações hemodinâmicas induzidas pelo monoterpeno após o tratamento crônico na presença ou ausência do infarto por isoproterenol (animais mencionados na seção 4.5), utilizamos a técnica descrita por Parasuraman & Raveendran, 2012. No 16º dia, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina 80 mg/kg + Xilazina 4 mg/kg i.p. e em seguida foram submetidos a uma cirurgia para a inserção de cateteres de polietileno intravasculares. Os cateteres de polietileno (PE), possuíam um segmento de PE-10 com diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente que foram soldado a um segmento de PE-50 com diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (1:20 v/v), e então foram implantados na aorta abdominal e veia cava inferior através da artéria e veia femural esquerda. Após a inserção e fixação, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA), acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA). Para aquisição dos registros foi utilizado o programa AQCAD (São Paulo, Brasil).

A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. O cateter venoso foi utilizado para a administração de fármacos *in bolus*. Os parâmetros hemodinâmicos avaliados foram: pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). Os registros hemodinâmicos foram gravados por 30 minutos após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares.

FIGURA 5 – Representação esquemática dos experimentos hemodinâmicos *in vivo*



Fonte: Autor, 2019.

4.5.9 Determinação da demanda miocárdica de oxigênio

A estimativa da demanda miocárdica de oxigênio, como um índice para lesões de isquemia-reperfusão, foi determinado pelos valores expressos nas taxas pressóricas de perfusão miocárdica nos ratos em repouso (animais mencionados na secção 4.5.8) em função da frequência como reflexo do trabalho cardíaco exercido. A demanda miocárdica de oxigênio foi então obtida pela expressão matemática:

$$\text{DMO (mmHg/min)} = (\text{PAM}) \times \text{FC}/1000$$

4.5.10 Avaliação da sensibilidade baroreflexa

Para avaliar a sensibilidade baroreflexa, o cateter venoso dos animais mencionados na secção 4.5.8, foi utilizado para a administração *in bolus* de fármacos

vasoativos. A estimulação baroreflexa deu-se através da administração de fenilefrina (8 µg/kg. i.v.), um agonista α-adrenérgico, que produz resposta bradicárdica reflexa, enquanto que a resposta taquicárdica reflexa foi avaliada pela administração do nitroprussiato de sódio (50 µg/kg i.v.), um doador espontâneo de óxido nítrico. Assim, a sensibilidade baroreflexa foi verificada através das mudanças reflexas sobre a frequência cardíaca no ganho taquicárdico ou no ganho bradicárdico em resposta as rápidas alterações no controle da pressão arterial induzida por fármacos. A sensibilidade baroreflexa foi calculada através da fórmula:

$$SB \text{ (bpm/mmHg)} = \Delta FC / \Delta PAM$$

4.5.11 Avaliação da resposta colinérgica

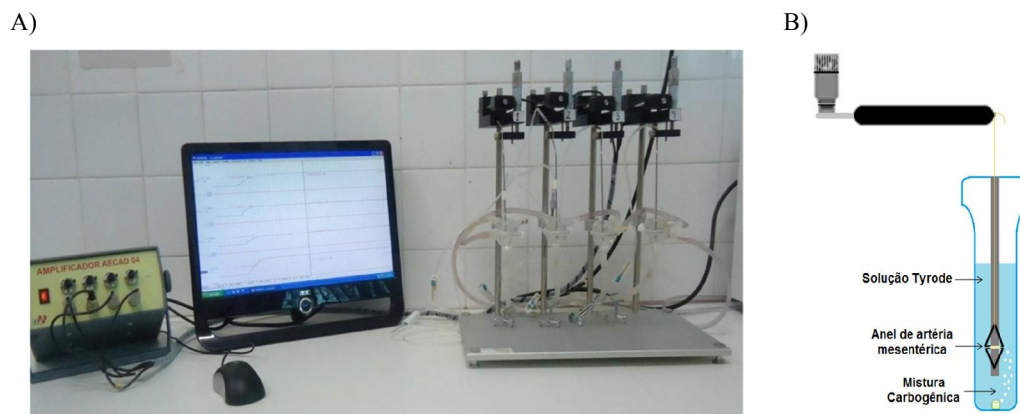
Após o procedimento cirúrgico de implantação de cateteres de polietileno (animais mencionados na secção 4.5.8), o cateter venoso foi utilizado para administração *in bolus* de acetilcolina (8 µg/kg i.v.), um neurotransmissor do sistema nervoso autônomo. Assim, para avaliar as respostas cardiovasculares foram considerados os parâmetros entre os grupos: Δ PAM, Δ FC e o tempo de ação.

4.5.12 Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas

Para avaliar os efeitos do monoterpene sobre a reatividade vascular em artérias de resistência, os ratos tratados com o monoterpene e induzidos ao infarto (animais mencionados na secção 4.5), foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia (Cetamina 80 mg/kg + Xilazina 4 mg/kg i.p) no 16º dia. Em seguida, através de uma incisão no abdome do animal, foi retirada a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 – 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 5 mL de solução de Tyrode a 37° C e gaseificada com carbogênio. Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (Fort 10, WPI, Sarasota, EUA), o qual estava conectado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (Altura; Altura, 1970). Os anéis

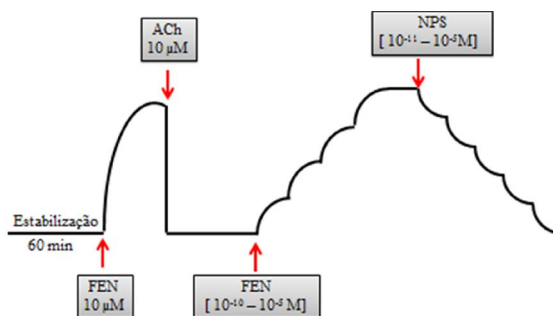
sem endotélio forão obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso. A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10 μM de acetilcolina. Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contração com fenilefrina 10 μM . Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

FIGURA 6 –Representação do miógrafo para experimentos vasculares *ex-vivo*



Representação esquemática do sistema utilizado para análise *ex-vivo*. A) Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato (Autor, 2019). B) Representação esquemática da cuba para órgãos isolados (MACHADO, 2013).

Após um período de estabilização de 60 minutos, uma curva concentração-resposta cumulativa de fenilefrina [10^{-10} - 10^{-5}M] foi obtida. Em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa ao nitroprussiato de sódio [10^{-11} - 10^{-5}M], foi desenvolvida. Os parâmetros farmacológicos para avaliar as alterações na reatividade vascular foram: PD_2 e $E_{\text{máx}}$.

FIGURA 7 –Representação esquemática do protocolo de reatividade vascular *ex-vivo*

Fonte: Autor, 2019.

4.5.13 Medida direta de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos SHR

Os parâmetros pressóricos intra-aórticos foram mensurados em ratos hipertensos não anestesiados, conforme técnica descrita por Kramer & Remie, 2005. Brevemente, ratos espontaneamente hipertensos (200-250g), que não foram submetidos ao tratamento crônico, foram anestesiados (Tiopental sódico 45 mg/kg i.p.) e foram submetidos a um procedimento cirúrgico para implante de cateteres de polietileno intravasculares. O implante de cateteres foi realizado conforme descrito no item 4.5.8. Após a inserção e fixação, o cateter foi tunelizado subcutaneamente e exteriorizado, através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*). 24 horas após o ato cirúrgico, os animais não anestesiados, foram conectados a um equipamento para o registro pressórico. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA), acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA). Para aquisição dos registros foi utilizado o programa AQCAD (São Paulo, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Enquanto o cateter venoso foi utilizado para a administração de fármacos *in bolus*.

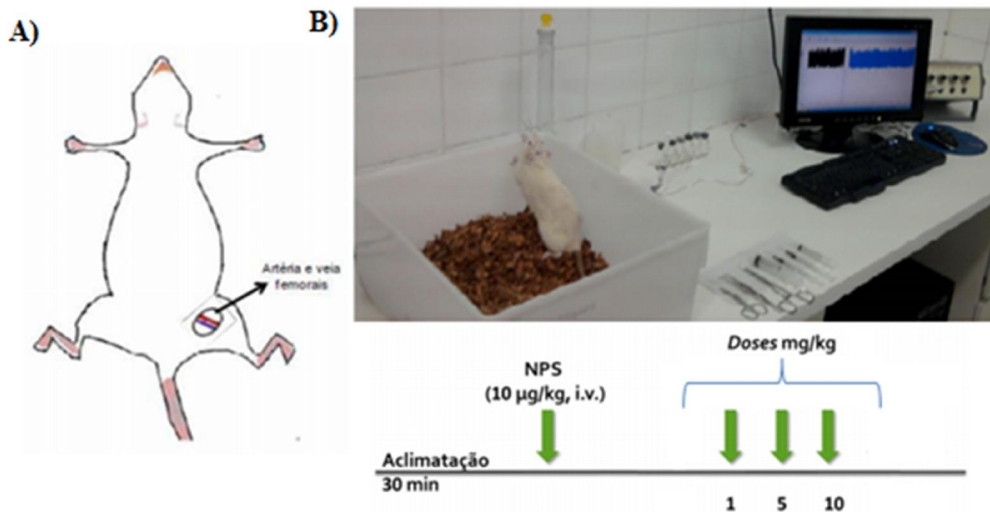
4.5.13.1 Avaliação das atividades cardiovasculares induzidas pelo monoterpeno

Os animais eram mantidos em aclimatação por no mínimo 30 minutos para estabilização dos parâmetros hemodinâmicos. Em seguida era administrado NPS (10 µg/kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter. Após 15 minutos, doses crescentes do TPN (1, 5 e 10 mg/kg, i.v.) eram administradas randomicamente com intervalos de tempo suficiente para que a PAM e FC retornassem aos seus valores de linha de base. Os valores de PAM e FC eram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração do TPN suas variações foram expressas em percentagem da pressão arterial média e da frequência cardíaca. Para cada dose, calculadas através da seguinte equação (1) e (2), respectivamente:

$$(1) \text{ Valores de PAM (\%)} = \frac{(PAM \text{ após} - PAM \text{ antes}) \times 100}{PAM \text{ antes}}$$

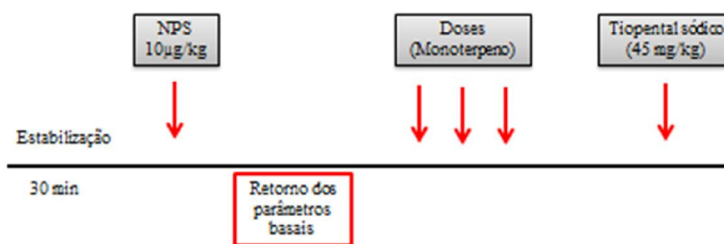
$$(2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{(FC \text{ após} - FC \text{ antes}) \times 100}{FC \text{ antes}}$$

FIGURA 8 – Representação esquemática dos experimentos de medida direta de pressão arterial em ratos não-anestesiados



A) Representação do procedimento cirúrgico do implante de cateteres intravasculares (Adaptado de MACHADO, 2013) B) Representação esquemática do sistema de medidas diretas de pressão arterial em ratos conscientes (FONTE: Autor, 2019).

FIGURA 9 – Representação esquemática do delineamento experimental da curva dose-resposta cardiovascular *in vivo* em ratos não-anestesiados



Fonte: Autor, 2019.

4.5.13.2 Avaliação da participação do sistema nervoso central das respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno

A fim de avaliar a participação do sistema nervoso central nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo monoterpeno, uma nova curva dose-resposta para o monoterpeno foi obtida em ratos espontaneamente hipertensos sob efeito do tiopental sódico 45 mg/kg, um barbitúrico de ação central (MURRAY et al, 2006).

4.5.13.3 Avaliação da participação ganglionar nas respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno

Após um registro controle obtido comodescrito no item 4.5.13.1, os animais foram tratados com hexametônio (20 mg/kg, i.v.), um bloqueador ganglionar não despolarizante (OWYANG, 1997). Após 30 minutos, uma nova curva dose-resposta para TPN foi obtida. Mudanças na PAM e na FC induzidas por TPN foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com hexametônio.

4.5.13.4 Avaliação da participação muscarínica nas respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pelo monoterpeno.

Após um registro controle obtido comodescrito no item 4.5.13.1, os animais foram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após 15 minutos, uma nova curva dose-resposta para TPN foi obtida. Mudanças na PAM e na FC induzidas por TPN foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com atropina.

4.5.13 Ensaio *in silico* de docking molecular

4.5.13.1 Preparo dos Ligantes

A estrutura 1D do monoterpeno foi desenhada através do software gratuito ACD/ACD/ChemSketch[®], disponível em: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>. Em seguida, convertida para 3D, e determinada a minimização da energia através do software gratuito ArgusLab[®] versão 4.0.1 desenvolvido por Thompson (1994-2004) disponível em: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>.

Usando o software gratuito AUTODOCK TOOLS 1.5.6[®] desenvolvido por Sanner, 1999, disponível em: <http://autodock.scripps.edu/>. As cargas parciais atômicas foram assumidas de acordo com o modelo matemático de Gasteiger. Além disso, as ligações σ foram admitidas como flexíveis e as ligações π como rígidas.

4.5.13.2 Seleção das Macromoléculas

Foram selecionadas macromoléculas frequentemente estudados como alvo terapêutico para planejamento de novos candidatos a fármacos com ação no sistema cardiovascular e enzimas provenientes de estudos dos sistemas antioxidantes. Dessa forma, foram selecionados os PDB-ID – alvos 4MQS (Receptor M₂ ligado ao seu agonista), 3UON (Receptor M₂ ligado ao seu antagonista), 4DAJ (Receptor M₃), 1J95 (Canal de Potássio K_{CA2+}), 3NAF (Canal de BkCa), 4GPO (Receptor β_1), 3NOS (Enzima Óxido Nítrico Sintase ligado a L-arginina), 4BKE (Albumina), 2LQC (Canal de Ca⁺² tipo L, N-terminal), 2LQP (Canal de Ca⁺² tipo L, C-terminal), 4DEY (Canal de Ca⁺² tipo L, sensível à voltagem), 2BE6 (Sítio de ancoragem dihidropiridínico em canais para Ca⁺² tipo L, sensível à voltagem), 2RH1 (Receptor β Adrenérgico tipo 2), 1QQW (Enzima Catalase), 2SOD (Enzima Superóxido Dismutase), 1GP1 (Enzima Glutaciona Peroxidase) e 1XOS (Enzima fosfodiasterase 4) obtidas no *RSCB Protein Data Bank (PDB)*.

4.5.13.3 Preparo das Macromoléculas

Nessa etapa foi utilizado novamente o software AUTODOCK TOOLS 1.5.6[®], onde todas as moléculas de água foram eliminadas e todos os hidrogênios foram adicionados às macromoléculas. As cargas parciais atômicas foram adicionadas

utilizando o modelo matemático de Kollman e todos os átomos foram admitidos como tipo AD4. Por fim, as macromoléculas foram convertidas à extensão.

4.5.13.4 Parâmetros do “Gridbox”

O mapa de busca foi estabelecido com dimensões 126 \AA^2 e espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$, cujo foi calculado usando o AUTOGRID4 [20]. A afinidade e os potenciais eletrostáticos dos mapas foram calculados para cada tipo de átomo dos ligantes, de acordo com suas naturezas. As coordenadas foram estabelecidas através da centralização do “gridbox” no interior de cada macromolécula.

4.5.13.5 Parâmetros do docking

O algoritmo Genético Lamarckiano foi escolhido para os procedimentos de docking. O número de execuções desses algoritmos foi estabelecido em 100, quanto à avaliação populacional, admitiu-se um valor de 150. Todos os outros parâmetros foram mantidos como “padrão” pelo AUTODOCK4.

4.5.15.6 Pesquisa pelo Docking Vina[®]

Foi utilizado o software gratuito AUTODOCK VINA[®] (desenvolvido por Trott & Olson, 2010), disponível em: <http://vina.scripps.edu/> onde todas as coordenadas utilizadas foram as mesmas citadas no tópico 3.5.15.4. A exaustividade do método foi mantida em 8 e número de modelos gerados foi estabelecido em 100.

4.5.15.7 Validação do Docking

A validação do método foi interpretada em termos do desvio padrão quadrático médio (RMSD) entre as conformações adotadas pelo monoterpeno, sendo o *cut-off* para este $\leq 2 \text{ \AA}$.

4.5.15.8 Determinação do cLogP

O software gratuito OSIRIS PROPERTY[®] foi usado para calcular o cLogP, disponível em: <http://organic-chemistry.org/prog/peo/>, desenvolvido por Sander em Actelion Pharmaceuticals Ltda.

4.6 Análise estatística

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). O teste “t” de Student não pareado foi usado para a comparação entre duas variáveis. Enquanto, a análise de variância one-way ANOVA foi usada para comparações de mais de duas variáveis, seguida do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Adotou-se o valor de $p \leq 0,05$ nos resultados das variáveis. Isso representa uma chance em vinte do evento ter ocorrido ao acaso como resultado de um erro amostral. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0.

Para a otimização dos parâmetros antioxidantes analíticos foi empregado como critério à sensibilidade analítica a partir do valor de coeficiente angular da respectiva curva analítica em uma determinada condição de estudo. A curva analítica avaliada foi construída com no mínimo cinco pontos de acordo com a relação: $\%IF = aCAO + b$, sendo % IF o percentual de inibição, CAO a concentração do composto antioxidante, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear. Procedimento semelhante foi realizado para o método proposto e os métodos de comparação visando à quantificação da capacidade antioxidante em diferentes amostras por interpolação dos dados.

Os cálculos relativos aos limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram realizados de acordo com as seguintes equações, $LOD = 3sb/ac$ e $LOQ = 10sb/ac$, onde, sb equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto ac corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação: $RSD = (sp/xp) \times 100$, onde sp equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$). A avaliação dos resultados dos diferentes métodos empregados foi realizada a partir do teste t pareado de Student, ANOVA (Análise de Variância) e por procedimentos de correlação linear entre os resultados obtidos. Para todos os procedimentos foi considerada uma distribuição normal dos dados (erro aleatório) e um intervalo de confiança igual a 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade do TPN

A exposição de Triton X-100 em macrófagos da linhagem J774 foi capaz de reduzir o percentual de viabilidade celular em comparação com macrófagos cultivados em meio de cultura RPMI, produzindo efeito citotóxico (Gráfico 1, pág 77). O pré-tratamento de macrófagos com TPN, produziu uma inibitória máxima ($I_{m\acute{a}x} = 30,83\%$) nas concentrações testadas, com valores abaixo de concentração inibitória em 50% das culturas celulares ($CI_{50\%}$). TPN aumentou de modo concentração dependente a viabilidade celular em comparação com Triton X-100. DMSO 0,1% também foi capaz de produzir resposta citotóxica em macrófagos reduzindo a viabilidade celular em comparação com meio RPMI. (Gráfico 1, pag 77).

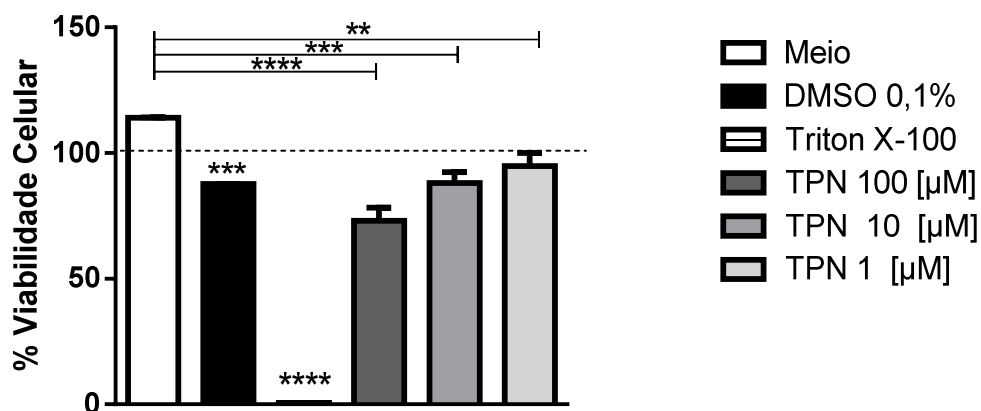


GRÁFICO 1- Percentagem da viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774 no teste MTT. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. $n = 3$.

5.2 Efeito cardioprotetor do TPN no infarto agudo do miocárdio experimental

5.2.1 Avaliação da sobrevivência ao infarto induzido por isoproterenol

A administração subcutânea de ISO (85 mg/kg) foi capaz de reduzir a percentagem de sobrevivência dos ratos, entretanto não foi diferente significativamente entre as linhagens experimentais. O tratamento prévio com TPN foi capaz de aumentar de modo significativa a taxa de sobrevivência aos infartos letais induzidos por ISO em todas as doses testadas na linhagem normotensa e infartada quando comparados aos seus respectivos controle (Gráfico 2A, pag 79), entretanto em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa e infartada somente produziu aumento significativo na sobrevivência ao infarto induzido na maior dose testada (Gráfico 2B, pag. 79). Nifedipina, somente produzir aumento na sobrevivência dos infartos induzidos na linhagem normotensa e infartada, em comparação ao seu respectivo controle (Gráfico 2A pag. 79).

5.2.1. Avaliação dos biomarcadores séricos de infarto agudo do miocárdio

5.2.1.1- Níveis séricos de creatino-kinase total (CK-NAC)

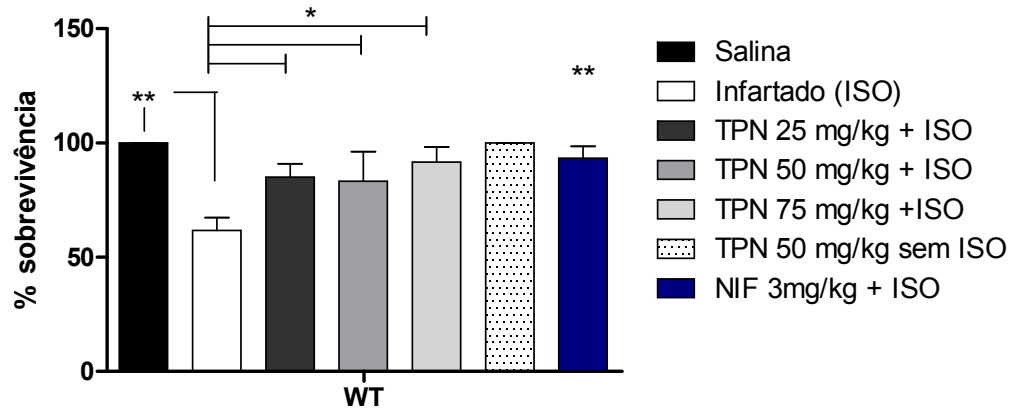
Isoproterenol foi capaz de produzir um aumento significativo sobre os níveis séricos de creatino-quinase total em ratos (Gráfico 3A e 3B, pag. 80).

O pré-tratamento com TPN inibiu a liberação sérica de creatino-quinase total de modo independente de dose nos ratos em comparação aos seus respectivos controles (Gráfico 3A e 3B, pag. 80). O tratamento subagudo de TPN 50 mg/kg sem ISO produziu uma redução significativa sobre os níveis séricos de creatino-quinase total em comparação com o grupo salina em ratos infartados wistar (Gráfico 3A, pag. 80). Mas, não sobre ratos da linhagem hipertensa e infartada (Gráfico 3B, pag. 80).

Nifedipina produziu uma redução significativa nos níveis séricos de creatino-quinase total, nas duas linhagens de ratos em comparação aos seus respectivos controles infartados (Gráfico 3A e 3B, pag. 80).

Quando foram comparados estatisticamente, nifedipina foi capaz de reduzir de modo significativo os níveis séricos de creatino-quinase total em relação ao grupo salina apenas na linhagem de ratos wistar (Gráfico 3A, pag. 80).

A)



B)

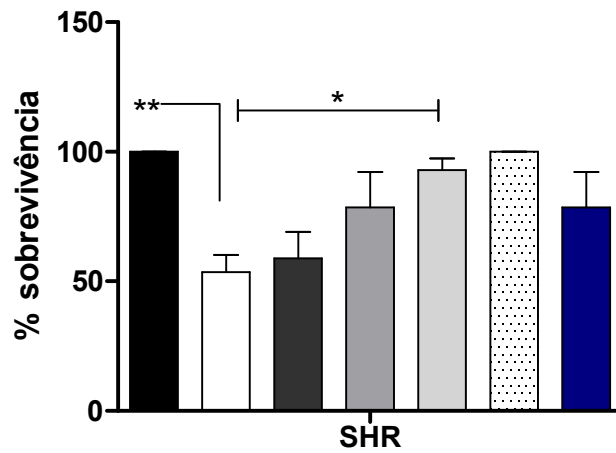


GRÁFICO 2- Percentagem de sobrevivência após infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado/ NIF versus infartado). $n=5$.

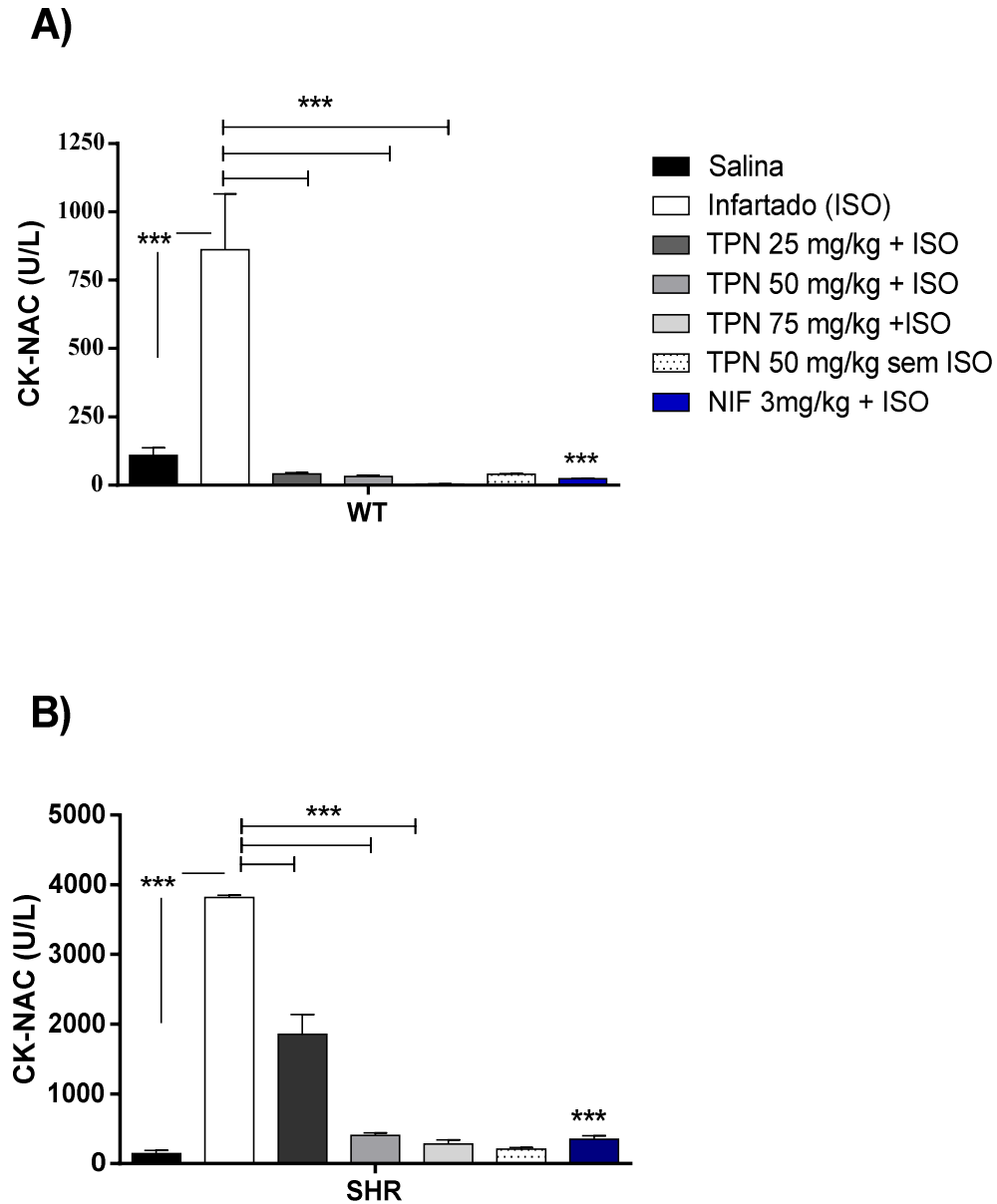


GRÁFICO 3- Níveis séricos de creatino-kinase total (CK-NAC) após infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado/ NIF versus infartado). $n=5$.

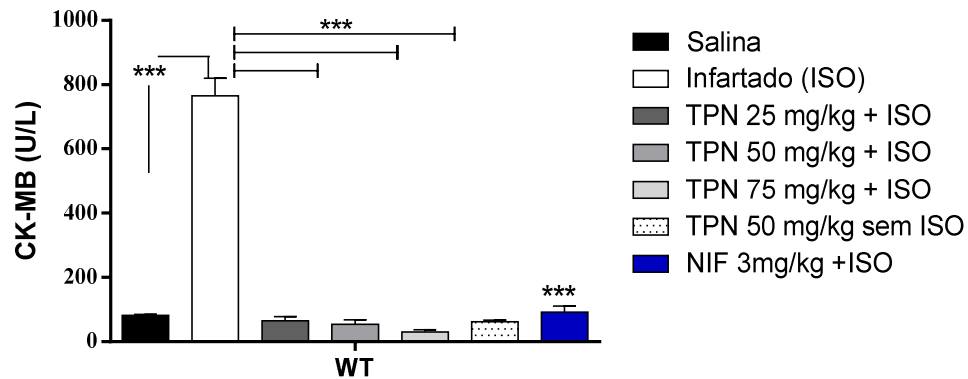
5.2.1.2- Níveis séricos de creatino-quinase MB (CK-MB)

Isoproterenol foi capaz de produzir um incremento nos níveis séricos de creatino-quinase MB nas duas linhagens de ratos quando comparados aos grupos controles salina (Gráfico 4A e 4B, pag. 82).

O pré-tratamento com TPN reduziu a liberação sérica de creatino-quinase MB de maneira dose independente nas duas linhagens de ratos (Gráfico 4A, pag. 82) em comparação aos respectivos controles infartados (Gráfico 4B, pag. 82). O tratamento subagudo de TPN 50 mg/kg sem ISO produziu uma diminuição significativa sobre os níveis séricos de creatino-quinase MB em comparação com o grupo salina em ratos wistar. Porém, o mesmo não ocorreu sobre ratos da linhagem hipertensa (Gráfico 4B, pag. 82).

Nifedipina produziu uma redução significativa nos níveis séricos de creatino-quinase MB, nas duas linhagens de ratos em comparação aos respectivos grupos infartados (Gráfico 4A e 4B, pag. 82).

A)



B)

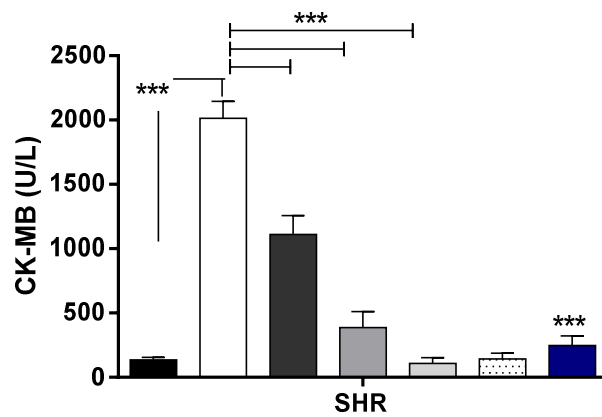


GRÁFICO 4- Níveis séricos de creatino-kinase MB (CK-MB) após infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado/ NIF versus infartado). $n=5$.

5.2.3. Avaliação das áreas de lesões necróticas miocárdicas após o infarto induzido por isoproterenol

Isoproterenol foi capaz de induzir um aumento no percentual de áreas de necrose no miocárdio, quando comparados aos ratos infartados (Gráfico 5A e 5B, pag. 84). Quando comparados estatisticamente, não houve diferença significativa no infarto produzido pelo isoproterenol nas duas linhagens experimentais (Gráfico 29, Anexo II pág. 227).

O mesmo pode ser confirmado através da análise colorimétrica com trifeniltetrazólio, nas secções miocárdicas (Figura 10 e Figura 11, pág. 85). Pode-se observar, que nas secções miocárdicas de ratos infartados com isoproterenol, das duas linhagens experimentais, houve a formação de regiões coradas em amarelo-pálido, representando as áreas necróticas e áreas coradas em vermelho, representando o miocárdio viável remanescente. Entretanto, quando observado as microsecções miocárdicas de ratos salina, nota-se apenas microsecções coradas em vermelho, indicando a viabilidade das células miocárdicas. O tratamento prévio com TPN inibiu de modo significativo o percentual de áreas de necrose de maneira dose dependente apenas na linhagem de ratos wistar (Gráfico 5A e 5B, pag. 84).

Os resultados numéricos podem ser confirmados pela análise colorimétrica (Figura 10 e Figura 11, pág 85), nas microsecções miocárdicas de ratos tratados previamente com TPN e induzidos ao infarto com isoproterenol, observa-se uma redução nas regiões coradas em amarelo-pálido em comparação com os respectivos grupos controles infartados, nas duas linhagens experimentais. Bem como, nota-se uma redução gradativa das regiões amarelo-pálidas entre as doses testadas com TPN, assim, TPN inibiu a formação de regiões de necrose quando induzidos ao infarto com isoproterenol.

O tratamento subagudo de TPN 50 mg/kg sem ISO não produziu alterações significantes sobre o percentual de áreas de necrose em comparação com o grupo salina em ratos em ambas as linhagens de ratos. Os resultados colorimétricos (Figura 10 e Figura 11, pág 85) demonstram que não houve formação de regiões amarelo-palidas em ratos tratados com TPN 50 mg/kg sem ISO, assim, as microsecções apresentaram-se coradas em vermelho de modo similar aos ratos controle salina.

Nifedipina produziu uma inibição significativa no percentual de área de necrose, em abas as linhagens de ratos quando comparados aos respectivos controles infartados (Gráfico 5B, pag. 84).

Quando observado o teste colorimétrico, as microsecções miocárdicas de ratos previamente tratados com nifedipina e induzidos ao infarto com isoproterenol possui uma redução significativa de áreas de necrose coradas em amarelo-pálido, contendo maior área corada em vermelho, representando as áreas de miocárdio viável remanescente (Figura 10 e Figura 11, pág 85).

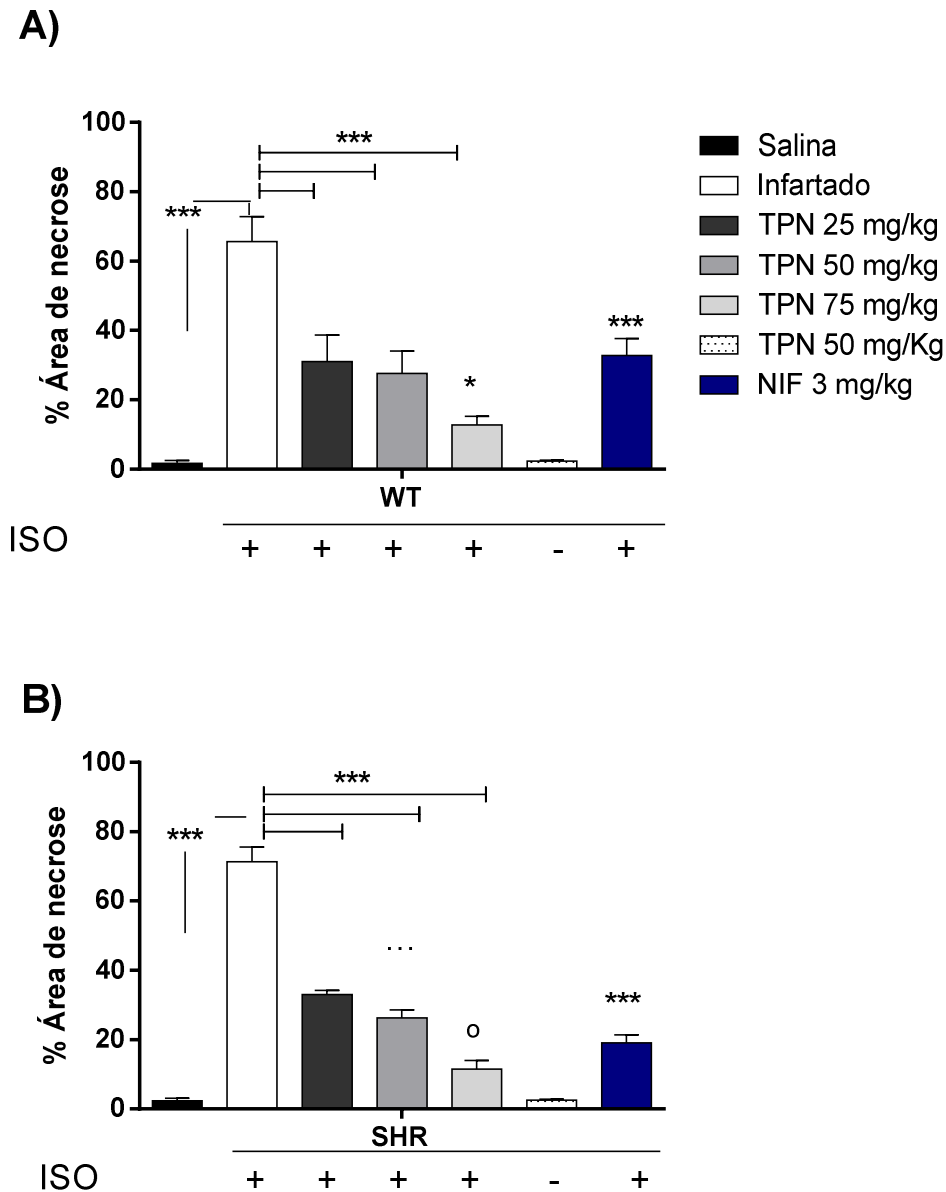


GRÁFICO 5- Percentagem de área de necrose após infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando *** $p < 0.0001$ (salina vs Infartado/TPN VS Infartado/ Nifedipina vs Infartado) $\overset{\circ}{p} < 0.05$ (TPN 50 vs 75) e $\overset{\circ}{p} < 0.05$ (TPN 25 VS 75) $\overset{\circ}{p} < 0.05$ (TPN 25 VS 75).n=5.

FIGURA 10- Microfatias de corações isolados de ratos wistar (WT) corados com cloreto de trifeniltetrazólio 1% após o tratamento subagudo. n=5






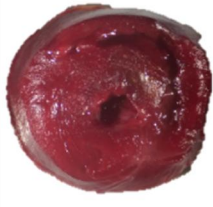


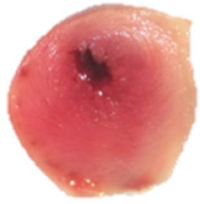
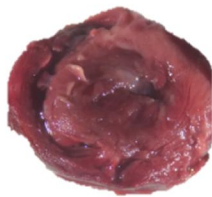



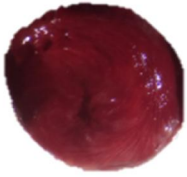
	Controle salina 0,9%	Infartado	TPN 25 mg/kg	TPN 50 mg/kg	TPN 75 mg/kg	TPN 50 mg/kg	NIF 3 mg/kg
							
ISO	-	+	+	+	+	-	+

FIGURA 11- Microfatias de corações isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) corados com cloreto de trifeniltetrazólio 1% após o tratamento subagudo. n=5

	Controle salina 0,9%	Infartado	TPN 25 mg/kg	TPN 50 mg/kg	TPN 75 mg/kg	TPN 50 mg/kg	NIF 3 mg/kg
							
ISO	-	+	+	+	+	-	+

5.2.4. Avaliação histopatológica de lesões de isquemia-reperfusão em corações após o infarto experimental induzido por isoproterenol

Em lâminas histopatológicas de corações corados por hematoxilina-eosina (H&E) após o infarto induzido, isoproterenol foi capaz de induzir alterações na histoarquitetura cardíaca mimetizando o infarto agudo do miocárdio nas duas linhagens de ratos, em suas diversas fases patológicas das lesões de isquemia-reperfusão. Isoproterenol foi capaz de induzir no grupo infartado (ISO): edema, degeneração e separação das miofibrilas, vacuolização do citoplasma, degeneração nuclear progressiva (picnose, cariorrexe e cariólise) e invasão tecidual de células polimorfonucleares (leucócitos) induzindo miocardite e remodelamento cardíaco (Figura 12 e Figura 13, págs 87 e 88).

Quando analisados estatisticamente, o grupo infartado (ISO) teve um aumento significativo na contagem total de leucócitos nas duas linhagens de ratos em comparação com seus respectivos controles salina (Tabela 1 e Tabela 2, pág. 89).

O pré-tratamento com TPN inibiu a invasão de leucócitos nos corações de maneira dose dependente nas duas linhagens de ratos, comparados os respectivos controles infartados (Tabela 1, pág. 89). O tratamento subagudo de TPN 50 mg/kg sem ISO não produziu mudanças significativas sobre a contagem total de leucócitos nas lâminas cardíacas em comparação com os respectivos grupos salina (Tabela 2, pág. 89).

O tratamento com nifedipina também, foi capaz de inibir a invasão de leucócitos nas lâminas cardíacas em comparação com o grupo infartado nas duas linhagens de ratos comparados aos respectivos controles infartados (Tabela 1 e Tabela 2, pag 89).

Quando foram analisados os aspectos relacionados à degeneração nuclear, observou-se que isoproterenol foi capaz de aumentar o número de núcleos em picnose, cariorrexe e cariólise em ambas as linhagens, em comparação aos respectivos controles salina (Tabelas 3-8, págs 90-92)

Enquanto o tratamento prévio com TPN foi capaz de reduzir de modo significativo de maneira dose-dependente nas degenerações nucleares em ambas as linhagens, quando comparados aos respectivos controles infartados (Tabelas 3-8, págs 90-92). O tratamento prévio com TPN na ausência do isoproterenol não produziu alterações significantes em comparação aos respectivos controles salina. O pré-tratamento com nifedipina produziu uma redução significativa sobre as degenerações nucleares dos em comparação aos animais infartados em ambas as linhagens (Tabelas 3-8, págs 90-92).

FIGURA 12- Microfotografias de miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpreno (TPN). Miocárdios corados em H&E, aumento de 100 X. E=Edema/ IL= Infiltrado de leucócitos/ R= Remodelamento/ DM= Degeneração miocárdica/ ··=> vacuolização do citoplasma/ ➤=> alterações nucleares (picnose, cariólise e cariorrexe).

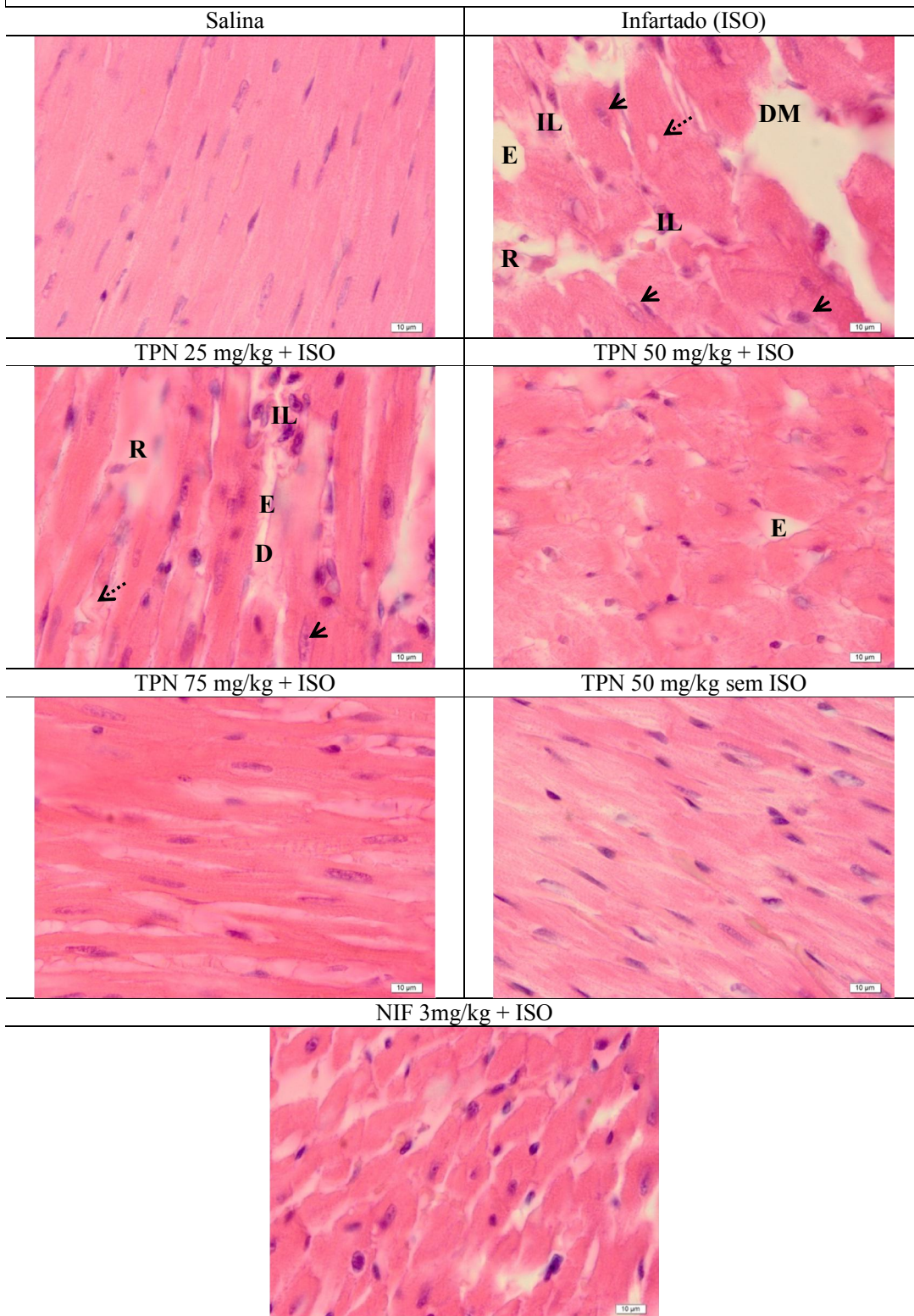


FIGURA 13- Microfotografias de miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Miocárdios corados em H&E, aumento de 100 X. E=Edema/ IL= Infiltrado de leucócitos/ R= Remodelamento/ DM= Degeneração miocárdica/ ·> = vacuolização do citoplasma/ > = alterações nucleares (picnose, cariólise e cariorrexe).

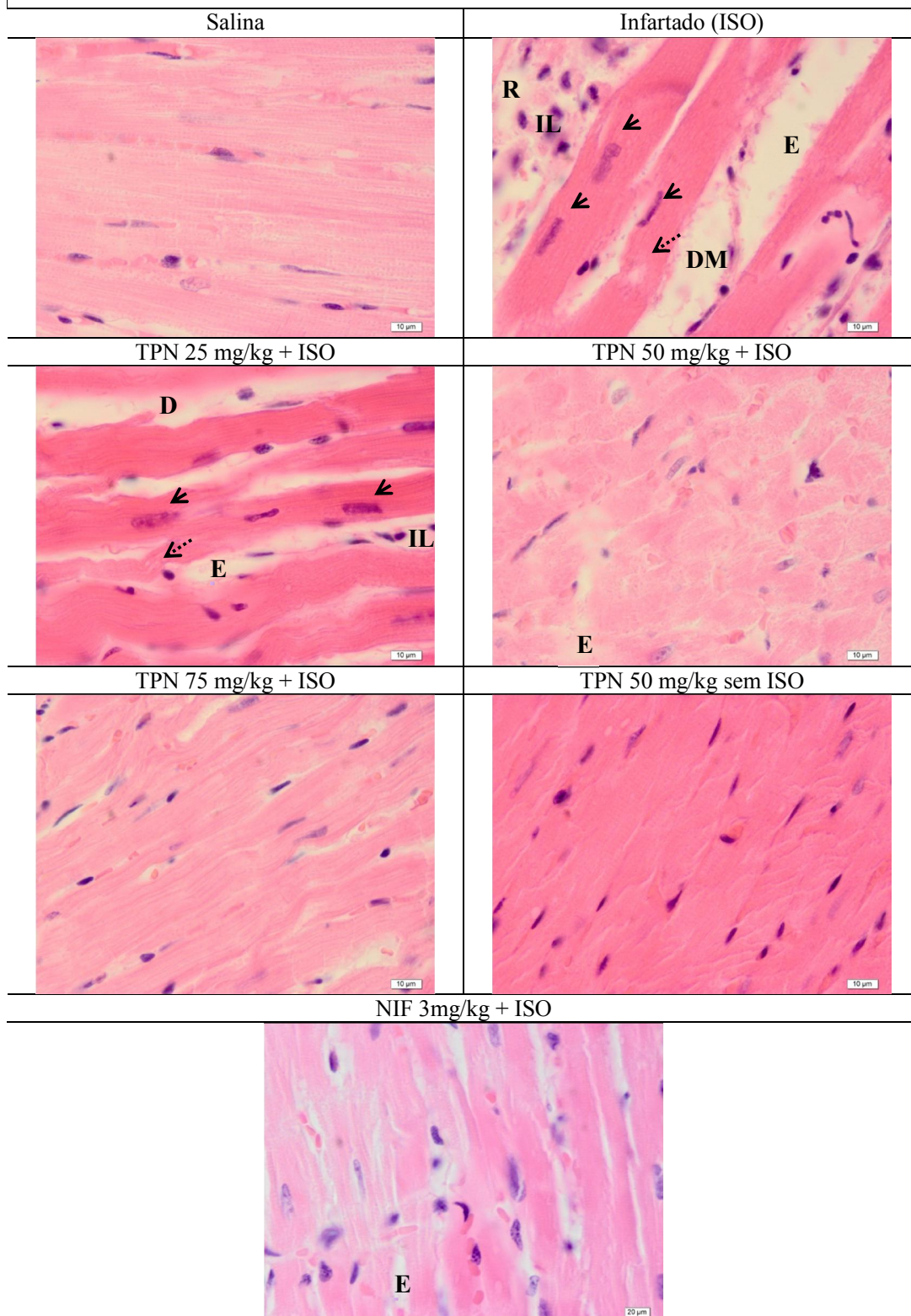


TABELA 1 - Contagem de Leucócitos Totais (CLT) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CLT = \frac{N^{\circ} \text{ de leucócitos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	302± 9,7	2.596 ± 36,70 [†]	2.314 ± 17,51 ^{****}	856 ± 6,31 ^{****}	334 ± 4,4 ^{****}	490 ± 3,7 ^{****}	411 ± 8,14 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ****p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado). N=5

TABELA 2 - Contagem de Leucócitos Totais (CLT) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg + ISO
$CLT = \frac{N^{\circ} \text{ de leucócitos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	608± 5,4	4.124 ± 12,24 [†]	2.462 ± 10,15 ^{****}	857 ± 6,32 ^{****}	510 ± 3,4 ^{****}	490 ± 3,4 ^{****}	350 ± 8,64 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ****p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado). N=5

TABELA 3- Contagem total de núcleos em picnose (CTNp) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CTNp = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	84± 2,20	716 ± 30,85 [†]	656 ± 33,98 [*]	306 ± 15,20 ^{****}	158 ± 2,03 ^{****}	168 ± 2,7 ^{****}	130 ± 2,14 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina), *p<0.05 e ****p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado). N=5

TABELA 4- Contagem total de núcleos em picnose (CTNp) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CTNp = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	178± 5,6	698 ± 11,02 [†]	470 ± 2,68 ^{****}	304 ± 3,42 ^{****}	210 ± 1,78 ^{****}	208 ± 0,8 ^{****}	119 ± 0,7 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ****p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado) . N=5

TABELA 5 - Contagem total de núcleos em cariólise (CTNc) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CTNc = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	62± 3,21	1.040± 12,76 [†]	496 ± 41,5 ^{****}	208 ± 4,10 ^{****}	100 ± 1,30 ^{****}	110 ± 0,8 ^{****}	97 ± 1,72 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ^{****}p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado) . N=5

TABELA 6- Contagem total de núcleos em cariólise (CTNc) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg + ISO	TPN 50 mg/kg + ISO	TPN 75 mg/kg + ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg + ISO
$CTNc = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	164± 1,7	930± 8,79 [†]	446 ± 4,30 ^{****}	208 ± 4,7 ^{****}	124 ± 1,63 ^{****}	130 ± 0,31 ^{****}	74 ± 0,48 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ^{****}p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado) . N=5

TABELA 7 - Contagem total de núcleos em cariorrexe (CTNcx) em miocárdios de ratos WT após o tratamento prévio com o monoterpene (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CTNcx = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	30± 1,4	198± 4,97 [†]	176 ± 1,32 ^{****}	78 ± 0,86 ^{****}	46 ± 0,40 ^{****}	68 ± 0,48 ^{****}	54 ± 1,06 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ^{****}p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado) . N=5

TABELA 8 - Contagem total de núcleos em cariorrexe (CTNcx) em miocárdios de ratos SHR após o tratamento prévio com o monoterpene (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

<i>Parâmetro</i>	Salina	Infartado (ISO)	TPN 25 mg/kg+ISO	TPN 50 mg/kg+ISO	TPN 75 mg/kg+ISO	TPN 50mg/kg sem ISO	NIF 3 mg/kg+ISO
$CTNcx = \frac{N^{\circ} \text{ de núcleos}}{0.038 \text{ mm}^2}$	42± 0,96	236± 4,43 [†]	110 ± 1,09 ^{****}	78 ± 0,76 ^{****}	70 ± 0,89 ^{****}	66 ± 0,74 ^{****}	39 ± 0,96 ^{****}

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando [†]p<0.0001 (Infartado vs salina) e ^{****}p<0.0001 (TPN vs infartado) ou (NIF vs infartado) . N=5

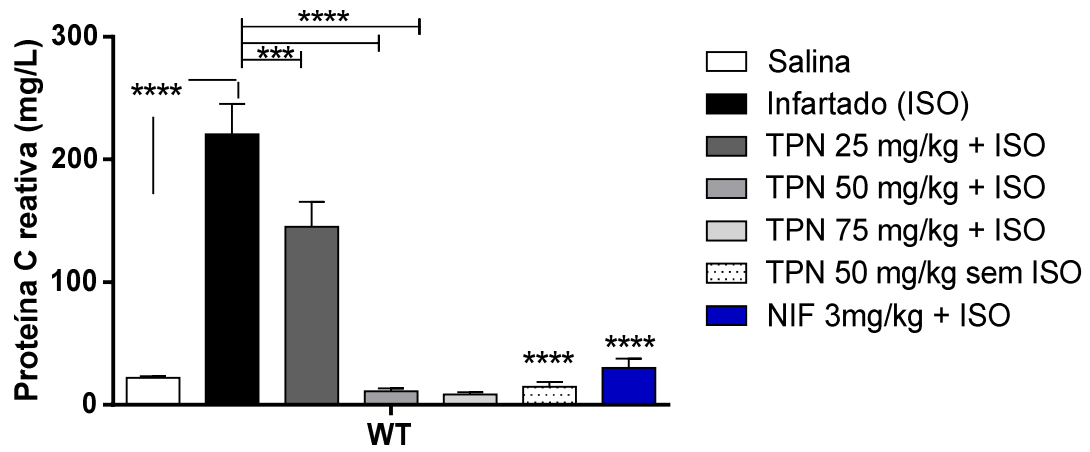
5.2.5- Avaliação dos níveis ventriculares de Proteína C Reativa

A administração de isoproterenol foi capaz de aumentar os títulos ventriculares de proteína c reativa em ratos infartados das duas linhagens experimentais em comparação aos respectivos controles salina (Gráfico 6A e 6B, pág 94).

O tratamento com TPN foi capaz de inibir o aumento os títulos de proteína c reativa após a administração subcutânea de isoproterenol em comparação os grupos infartados em ambas linhagens de ratos quando comparados aos respectivos controles infartado (Gráfico 6A e 6B, pág. 94).O tratamento subagudo de TPN na ausência de isoproterenol, não foi diferente estatisticamente do grupo controle salina nas duas linhagens experimentais

O tratamento prévio com nifedipina, também foi capaz de inibir o aumento significativo de proteína C reativa na presença de isoproterenol em ambas as linhagens experimentais quando comparados aos respectivos controles infartados.

A)



B)

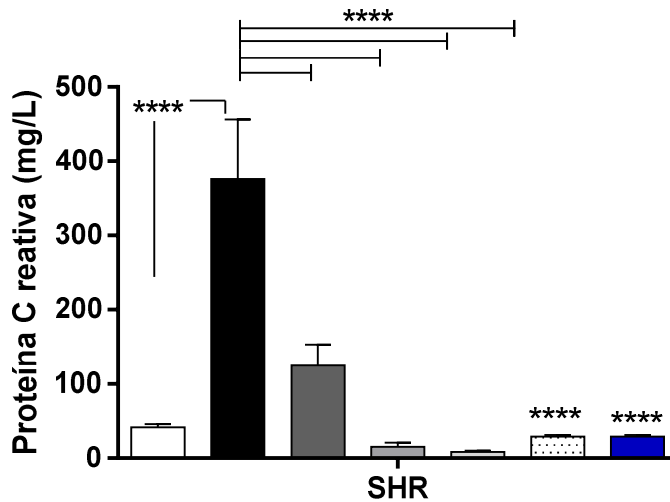


GRÁFICO 6- Níveis de proteína C reativa nos ventrículos esquerdos após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). n=5

5.2.6- Avaliação eletrocardiográfica em repouso

A administração de isoproterenol foi capaz de induzir alterações significantes sobre o miocárdio no eletrocardiograma em repouso nas derivatizações periféricas no plano frontal. Isoproterenol induziu aumento na onda T em ambas às linhagens de ratos que em ratos wistar pode ser visualizado na derivatização DI. Em ratos SHR, as alterações na onda T puderam ser visualizadas de modo persistente nas derivatizações DII, aVR, aVL e AVF.

A administração subcutânea de isoproterenol também foi capaz de induzir alterações significantes sobre o desnivelamento do segmento ST em ambas as linhagens. Em ratos wistar o supradesnivelamento pode ser visualizado na derivatização DII, enquanto que em ratos SHR as alterações foram visualizadas de modo persistente nas derivatizações DII e DIII.

Isoproterenol induziu aprofundamento da onda Q patológica em ambas às linhagens experimentais na derivatização DI. O uso subcutâneo do isoproterenol em ratos também foi capaz de induzir alterações sobre o ritmo sinusal, bem como sobre o sistema de condução do potencial de ação cardíaco. Isoproterenol induziu alterações na onda P, tanto na amplitude, quanto na duração de modo persistente apenas em ratos SHR, nas derivatizações DI, DII e AVF. Isoproterenol também causou alterações sobre o intervalo P-R em ambas as linhagens experimentais na derivatização aVF.

O pré-tratamento com TPN não foi capaz de alterar de modo significante as alterações na onda T induzidas pelo isoproterenol. Entretanto, TPN foi capaz de inibir as alterações do segmento ST na derivatização DII em ambas as linhagens de ratos quando comparados aos respectivos controles infartados

Sobre a onda Q patológica, TPN foi capaz de inibir o aprofundamento em DI em ratos wistar em todas as doses testadas comparados ao controle infartado. Em ratos SHR foi possível observar o efeito a partir da dose de 50 mg/kg. TPN também foi capaz de inibir as alterações sobre o intervalo PR em aVF em ratos ambas as linhagens experimentais comparados aos respectivos controles infartados.

O tratamento com TPN na presença de isoproterenol, não foi capaz de inibir de modo significativo alterações sobre o ritmo sinusal em ratos SHR. Observou-se uma tendência a reversão das alterações na onda P, na amplitude e na duração, porém estatisticamente os resultados não divergiram do grupo infartado.

O tratamento subagudo com TPN 50mg/kg na ausência de isoproterenol, não causou alterações significantes no eletrocardiograma nas derivatizações periféricas em repouso, quando comparados ao grupo controle salina.

O tratamento prévio com nifedipina 3 mg/kg na presença de isoproterenol foi capaz de induzir resposta semelhante ao tratamento com TPN nas alterações eletrocardiográficas. Todos os resultados mencionados neste item podem ser visualizados através das tabelas 9-14, págs, 97-102

TABELA 9 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização I após o tratamento prévio com o monoterpene (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,044 ± 0,011	0,021 ± 0,004	0,041 ± 0,002	0,038 ± 0,002	-0,083 ± 0,011	0,059 ± 0,004	0,091 ± 0,011	-0,309 ± 0,141	0,002 ± 0,001	0,041 ± 0,040
Controle ISO	0,046 ± 0,007	0,022 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,036 ± 0,001	-0,211 ± 0,007***	0,061 ± 0,005	0,118 ± 0,013	-0,035 ± 0,011*	0,091 ± 0,029*	0,279 ± 0,005***
TPN 25 mg/kg + ISO	0,043 ± 0,008	0,021 ± 0,001	0,035 ± 0,003	0,037 ± 0,001	-0,181 ± 0,001**	0,067 ± 0,008	0,164 ± 0,022	-0,102 ± 0,027	0,076 ± 0,018	0,208 ± 0,031
TPN 50 mg/kg + ISO	0,029 ± 0,004	0,019 ± 0,001	0,078 ± 0,041	0,037 ± 0,003	-0,152 ± 0,007***	0,057 ± 0,002	0,110 ± 0,014	-0,137 ± 0,028	0,084 ± 0,027*	0,250 ± 0,024
TPN 75 mg/kg + ISO	0,030 ± 0,004	0,019 ± 0,008	0,034 ± 0,002	0,041 ± 0,004	-0,070 ± 0,006***	0,069 ± 0,003	0,142 ± 0,011	-0,120 ± 0,021	0,044 ± 0,011	0,236 ± 0,041
TPN 50 mg/kg	0,040 ± 0,004	0,021 ± 0,007	0,037 ± 0,003	0,036 ± 0,027	-0,065 ± 0,004***	0,027 ± 0,022	0,042 ± 0,035	-0,125 ± 0,018	0,018 ± 0,011	0,366 ± 0,017
NIF 3mg/kg + ISO	0,065 ± 0,004	0,017 ± 0,006	0,043 ± 0,001	0,041 ± 0,008	-0,083 ± 0,005***	0,074 ± 0,037	0,167 ± 0,003	-0,166 ± 0,013	0,051 ± 0,012	0,186 ± 0,002

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,048 ± 0,008	0,018 ± 0,008	0,047 ± 0,007	0,035 ± 0,001	-0,043 ± 0,009	0,090 ± 0,007	0,017 ± 0,001	-0,148 ± 0,030	0,292 ± 0,02	0,340 ± 0,02
Controle ISO	0,00 ± 0,00**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00***	0,037 ± 0,003	-0,121 ± 0,003***	0,052 ± 0,017	0,118 ± 0,040	-0,102 ± 0,040	0,079 ± 0,014	0,202 ± 0,017**
TPN 25 mg/kg + ISO	0,004 ± 0,012	0,010 ± 0,002	0,027 ± 0,007**	0,032 ± 0,001	-0,115 ± 0,007	0,087 ± 0,006	0,192 ± 0,017	-0,020 ± 0,010	0,181 ± 0,035	0,192 ± 0,006
TPN 50 mg/kg + ISO	0,011 ± 0,001	0,016 ± 0,004	0,024 ± 0,007**	0,042 ± 0,002	-0,074 ± 0,015*	0,060 ± 0,025	0,105 ± 0,043	-0,294 ± 0,006	0,098 ± 0,016	0,315 ± 0,017*
TPN 75 mg/kg + ISO	0,027 ± 0,010	0,024 ± 0,022	0,041 ± 0,002**	0,038 ± 0,002	-0,069 ± 0,015*	0,070 ± 0,007	0,139 ± 0,017	-0,210 ± 0,034	0,195 ± 0,015	0,300 ± 0,021**
TPN 50 mg/kg	0,040 ± 0,008	0,026 ± 0,002	0,044 ± 0,001***	0,038 ± 0,002	-0,022 ± 0,010***	0,065 ± 0,002	0,124 ± 0,006	-0,400 ± 0,016	0,087 ± 0,010	0,282 ± 0,026*
NIF 3mg/kg + ISO	0,032 ± 0,006	0,023 ± 0,001	0,040 ± 0,001***	0,034 ± 0,001	-0,094 ± 0,007	0,037 ± 0,020	0,064 ± 0,033	-0,118 ± 0,002	0,020 ± 0,002	0,353 ± 0,033***

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

TABELA 10 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização II após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	-0,0031 ± 0,009	0,022 ± 0,006	0,038 ± 0,003	0,038 ± 0,005	-0,018 ± 0,007	0,090 ± 0,006	0,140 ± 0,016	-0,111 ± 0,020	0,069 ± 0,014	0,398 ± 0,016
Controle ISO	0,0224 ± 0,002***	0,020 ± 0,005	0,032 ± 0,001	0,033 ± 0,002	-0,034 ± 0,007	0,071 ± 0,008	0,139 ± 0,020	0,047 ± 0,001***	0,109 ± 0,019	0,292 ± 0,006***
TPN 25 mg/kg + ISO	0,0212 ± 0,009	0,016 ± 0,003	0,028 ± 0,006	0,033 ± 0,001	-0,051 ± 0,010	0,079 ± 0,007	0,184 ± 0,023	-0,087 ± 0,027***	0,090 ± 0,007	0,206 ± 0,027**
TPN 50 mg/kg + ISO	-0,0262 ± 0,004***	0,034 ± 0,012	0,045 ± 0,012	0,034 ± 0,002	-0,043 ± 0,013	0,065 ± 0,011	0,128 ± 0,031	-0,089 ± 0,023***	0,085 ± 0,015	0,274 ± 0,027
TPN 75 mg/kg + ISO	-0,0234 ± 0,004***	0,016 ± 0,003	0,029 ± 0,007	0,038 ± 0,003	-0,024 ± 0,005	0,070 ± 0,004	0,154 ± 0,008	-0,082 ± 0,017***	0,040 ± 0,005	0,212 ± 0,018**
TPN 50 mg/kg	-0,0208 ± 0,005***	0,206 ± 0,004	0,038 ± 0,002	0,039 ± 0,003	-0,034 ± 0,003	0,071 ± 0,024	0,091 ± 0,003	-0,084 ± 0,003***	0,044 ± 0,019	0,311 ± 0,006
NIF 3mg/kg + ISO	0,051 ± 0,002**	0,018 ± 0,002	0,045 ± 0,008	0,035 ± 0,005	-0,032 ± 0,002	0,080 ± 0,002	0,173 ± 0,003	-0,181 ± 0,003	-0,023 ± 0,071	0,200 ± 0,004**

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,044 ± 0,008	0,021 ± 0,006	0,043 ± 0,003	0,041 ± 0,003	-0,035 ± 0,003	0,090 ± 0,008	0,166 ± 0,027	-0,122 ± 0,032	0,182 ± 0,045	0,312 ± 0,033
Controle ISO	0,000 ± 0,00	0,000 ± 0,00*	0,000 ± 0,00	0,032 ± 0,001	-0,061 ± 0,014	0,057 ± 0,019	0,124 ± 0,042	0,042 ± 0,006**	0,102 ± 0,016*	0,202 ± 0,015
TPN 25 mg/kg + ISO	0,005 ± 0,004	0,012 ± 0,003	0,024 ± 0,06	0,033 ± 0,002	-0,032 ± 0,015	0,076 ± 0,012	0,162 ± 0,023	-0,144 ± 0,031**	0,078 ± 0,019	0,200 ± 0,006
TPN 50 mg/kg + ISO	0,018 ± 0,008	0,016 ± 0,004	0,033 ± 0,009	0,041 ± 0,004	-0,037 ± 0,007	0,063 ± 0,027	0,113 ± 0,049	0,202 ± 0,026***	0,009 ± 0,062*	0,340 ± 0,007
TPN 75 mg/kg + ISO	0,137 ± 0,099	0,020 ± 0,007*	0,085 ± 0,036	0,041 ± 0,002	-0,058 ± 0,011	0,083 ± 0,004	0,147 ± 0,008	-0,198 ± 0,039**	0,127 ± 0,025	0,295 ± 0,022
TPN 50 mg/kg	0,090 ± 0,003	0,019 ± 0,001*	0,036 ± 0,029	0,040 ± 0,002	-0,045 ± 0,005	0,081 ± 0,003	0,125 ± 0,030	-0,234 ± 0,026**	0,076 ± 0,008	0,264 ± 0,028
NIF 3mg/kg + ISO	0,017 ± 0,006	0,015 ± 0,005	0,026 ± 0,009	0,032 ± 0,001	-0,082 ± 0,011	0,061 ± 0,007	0,103 ± 0,008	-0,017 ± 0,002	0,044 ± 0,002	0,268 ± 0,088

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

TABELA 11 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização III após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,058 ± 0,013	0,016 ± 0,002	0,024 ± 0,003	0,035 ± 0,016	-0,162 ± 0,034	0,071 ± 0,011	0,117 ± 0,018	-0,041 ± 0,018	0,057 ± 0,011	0,397 ± 0,019
Controle ISO	-0,057 ± 0,008***	0,272 ± 0,003***	0,041 ± 0,002	0,036 ± 0,003	-0,298 ± 0,052	0,064 ± 0,008	0,107 ± 0,002	0,042 ± 0,025	0,044 ± 0,013	0,440 ± 0,114
TPN 25 mg/kg + ISO	0,036 ± 0,006***	0,052 ± 0,033***	0,022 ± 0,001	0,032 ± 0,009	-0,400 ± 0,060	0,062 ± 0,007	0,128 ± 0,017	-0,087 ± 0,041	0,039 ± 0,014	0,214 ± 0,002
TPN 50 mg/kg + ISO	0,041 ± 0,009***	0,022 ± 0,002***	0,041 ± 0,052	0,033 ± 0,001	-0,192 ± 0,048	0,080 ± 0,015	0,150 ± 0,034	-0,070 ± 0,026	0,062 ± 0,014	0,282 ± 0,029
TPN 75 mg/kg + ISO	0,043 ± 0,010***	0,018 ± 0,003***	0,029 ± 0,003	0,036 ± 0,001	-0,308 ± 0,063	0,075 ± 0,010	0,154 ± 0,027	-0,200 ± 0,080	0,043 ± 0,016	0,242 ± 0,022
TPN 50 mg/kg	0,047 ± 0,011***	0,018 ± 0,004***	0,029 ± 0,004	0,034 ± 0,001	-0,158 ± 0,059	0,071 ± 0,009	0,108 ± 0,018	-0,024 ± 0,014	0,071 ± 0,023	0,466 ± 0,079
NIF 3mg/kg + ISO	0,031 ± 0,006***	0,017 ± 0,001***	0,023 ± 0,001	0,038 ± 0,006	-0,306 ± 0,044	0,066 ± 0,007	0,140 ± 0,015	-0,204 ± 0,011	0,101 ± 0,019	0,206 ± 0,006

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,040 ± 0,005	0,104 ± 0,022	0,014 ± 0,006	0,036 ± 0,002	-0,039 ± 0,003	0,098 ± 0,022	0,151 ± 0,048	-0,100 ± 0,050	0,233 ± 0,053	0,328 ± 0,032
Controle ISO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00*	0,034 ± 0,001	-0,052 ± 0,011	0,072 ± 0,012	0,149 ± 0,030	-0,159 ± 0,055	0,095 ± 0,010**	0,262 ± 0,036
TPN 25 mg/kg + ISO	0,035 ± 0,009	0,017 ± 0,002	0,026 ± 0,003***	0,035 ± 0,001	-0,147 ± 0,043	0,058 ± 0,025	0,115 ± 0,049	-0,235 ± 0,089	0,078 ± 0,009	0,240 ± 0,007
TPN 50 mg/kg + ISO	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,028 ± 0,003***	0,035 ± 0,001	-0,339 ± 0,012	0,042 ± 0,016	0,080 ± 0,003	-0,309 ± 0,010	0,064 ± 0,006	0,252 ± 0,021
TPN 75 mg/kg + ISO	0,024 ± 0,009	0,017 ± 0,001	0,041 ± 0,001***	0,034 ± 0,005	-0,031 ± 0,004	0,062 ± 0,008	0,119 ± 0,020	-0,127 ± 0,018	0,131 ± 0,024	0,295 ± 0,030
TPN 50 mg/kg	0,026 ± 0,009	0,012 ± 0,003	0,072 ± 0,003***	0,038 ± 0,002	-0,128 ± 0,065	0,054 ± 0,019	0,092 ± 0,038	-0,202 ± 0,027	0,089 ± 0,023	0,250 ± 0,018
NIF 3mg/kg + ISO	0,115 ± 0,086	0,020 ± 0,005	0,035 ± 0,006***	0,033 ± 0,005	-0,213 ± 0,051	0,033 ± 0,003	0,066 ± 0,007	0,077 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,353 ± 0,062

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

TABELA 12 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVR após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,061 ± 0,010	0,013 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,038 ± 0,001	-0,420 ± 0,090	0,056 ± 0,005	0,080 ± 0,024	-0,145 ± 0,064	-0,044 ± 0,097	0,368 ± 0,016
Controle ISO	-0,044 ± 0,020***	0,019 ± 0,002	0,025 ± 0,001	0,038 ± 0,001	-0,152 ± 0,012*	0,053 ± 0,005	0,102 ± 0,018	-0,334 ± 0,017	0,100 ± 0,002	0,308 ± 0,010
TPN 25 mg/kg + ISO	-0,024 ± 0,003	0,028 ± 0,014	0,019 ± 0,003	0,036 ± 0,003	-0,586 ± 0,083**	0,055 ± 0,002	0,118 ± 0,007	-0,175 ± 0,066	0,110 ± 0,020	0,216 ± 0,083
TPN 50 mg/kg + ISO	-0,040 ± 0,018	0,022 ± 0,002	0,028 ± 0,007	0,032 ± 0,002	-0,167 ± 0,027	0,052 ± 0,007	0,111 ± 0,001	-0,346 ± 0,010	0,026 ± 0,009	0,296 ± 0,030
TPN 75 mg/kg + ISO	-0,032 ± 0,006	0,020 ± 0,001	0,029 ± 0,008	0,035 ± 0,003	-0,222 ± 0,098	0,071 ± 0,009	0,121 ± 0,018	-0,398 ± 0,135	0,067 ± 0,027	0,227 ± 0,057
TPN 50 mg/kg	0,050 ± 0,011	0,012 ± 0,013	0,094 ± 0,069	0,035 ± 0,008	-0,430 ± 0,056	0,048 ± 0,015	0,075 ± 0,024	-0,097 ± 0,022	0,049 ± 0,009	-0,430 ± 0,056
NIF 3mg/kg + ISO	0,085 ± 0,010***	0,013 ± 0,001	0,017 ± 0,021	0,034 ± 0,023	-0,553 ± 0,027*	0,068 ± 0,004	0,146 ± 0,033	-0,170 ± 0,034	0,099 ± 0,026	0,220 ± 0,010

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,031 ± 0,018	0,017 ± 0,001	0,027 ± 0,005	0,036 ± 0,003	-0,184 ± 0,058	0,051 ± 0,016	0,092 ± 0,003	-0,360 ± 0,087	-0,117 ± 0,019	0,300 ± 0,040
Controle ISO	-0,016 ± 0,011	0,017 ± 0,004	0,025 ± 0,007	0,039 ± 0,004	-0,382 ± 0,084**	0,064 ± 0,006	0,129 ± 0,019	-0,492 ± 0,090	0,072 ± 0,038***	0,246 ± 0,037
TPN 25 mg/kg + ISO	-0,015 ± 0,004	0,017 ± 0,002	0,037 ± 0,004	0,035 ± 0,001	-0,101 ± 0,032***	0,073 ± 0,015	0,154 ± 0,034	-0,284 ± 0,137	0,010 ± 0,002	0,181 ± 0,037
TPN 50 mg/kg + ISO	0,063 ± 0,009	0,010 ± 0,001	0,015 ± 0,007	0,034 ± 0,001	-0,171 ± 0,010**	0,037 ± 0,027	0,068 ± 0,005	0,103 ± 0,052	-0,091 ± 0,047**	0,287 ± 0,020
TPN 75 mg/kg + ISO	0,061 ± 0,011	0,014 ± 0,002	0,021 ± 0,004	0,033 ± 0,001	-0,050 ± 0,009***	0,075 ± 0,003	0,157 ± 0,005	-0,135 ± 0,010	0,00 ± 0,00	0,287 ± 0,020
TPN 50 mg/kg	0,061 ± 0,018	0,010 ± 0,002	0,016 ± 0,001	0,033 ± 0,003	-0,052 ± 0,007***	0,020 ± 0,002	0,040 ± 0,051	-0,099 ± 0,003	0,00 ± 0,00	0,238 ± 0,009
NIF 3mg/kg + ISO	0,066 ± 0,018	0,011 ± 0,005	0,021 ± 0,005	0,032 ± 0,001	-0,040 ± 0,008***	0,028 ± 0,002	0,046 ± 0,004	-0,053 ± 0,004	0,015 ± 0,001	0,340 ± 0,053

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

TABELA 13 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVL após o tratamento prévio com o monoterpreno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,050 ± 0,021	0,017 ± 0,001	0,034 ± 0,005	0,039 ± 0,003	-0,354 ± 0,071	0,062 ± 0,007	0,081 ± 0,023	-0,101 ± 0,033	0,031 ± 0,013	0,337 ± 0,039
Controle ISO	0,064 ± 0,008	0,022 ± 0,002	0,041 ± 0,001	0,034 ± 0,027	-0,146 ± 0,035***	0,100 ± 0,013	0,125 ± 0,017	-0,116 ± 0,016	0,029 ± 0,002	0,346 ± 0,029
TPN 25 mg/kg + ISO	-0,005 ± 0,007	0,049 ± 0,029	0,034 ± 0,001	0,038 ± 0,003	-0,059 ± 0,009***	0,079 ± 0,004	0,168 ± 0,019	-0,095 ± 0,009	0,024 ± 0,004	0,226 ± 0,023*
TPN 50 mg/kg + ISO	0,053 ± 0,012	0,021 ± 0,007	0,041 ± 0,003	0,035 ± 0,001	-0,089 ± 0,010***	0,065 ± 0,014	0,126 ± 0,038	-0,100 ± 0,015	0,043 ± 0,014	0,302 ± 0,030
TPN 75 mg/kg + ISO	0,026 ± 0,009	0,192 ± 0,001	0,040 ± 0,019	0,046 ± 0,005	-0,057 ± 0,013***	0,068 ± 0,003	0,134 ± 0,005	-0,062 ± 0,032	0,030 ± 0,001	0,254 ± 0,020
TPN 50 mg/kg	0,035 ± 0,006	0,021 ± 0,005	0,041 ± 0,002	0,039 ± 0,005	-0,057 ± 0,016***	0,078 ± 0,007	0,146 ± 0,021	-0,079 ± 0,020	-0,010 ± 0,006	0,314 ± 0,020
NIF 3mg/kg + ISO	-0,015 ± 0,004	0,020 ± 0,003	0,043 ± 0,002	0,041 ± 0,007	-0,080 ± 0,007***	0,071 ± 0,008	0,156 ± 0,003	-0,143 ± 0,017	0,002 ± 0,001	0,233 ± 0,013*

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,022 ± 0,001	0,013 ± 0,009	0,017 ± 0,005	0,032 ± 0,001	-0,142 ± 0,009	0,073 ± 0,006	0,127 ± 0,033	-0,214 ± 0,019	0,128 ± 0,042	0,272 ± 0,048
Controle ISO	-0,008 ± 0,003**	0,013 ± 0,031	0,027 ± 0,007	0,034 ± 0,001	-0,033 ± 0,006***	0,060 ± 0,007	0,125 ± 0,021	-0,177 ± 0,048	0,026 ± 0,010**	0,258 ± 0,037
TPN 25 mg/kg + ISO	0,003 ± 0,006	0,020 ± 0,001	0,036 ± 0,002	0,034 ± 0,002	-0,053 ± 0,018	0,082 ± 0,007	0,170 ± 0,022	-0,041 ± 0,009	0,086 ± 0,007	0,237 ± 0,011
TPN 50 mg/kg + ISO	0,010 ± 0,003*	0,015 ± 0,004	0,037 ± 0,001	0,036 ± 0,002	-0,100 ± 0,017*	0,082 ± 0,011	0,147 ± 0,011	-0,159 ± 0,042	0,068 ± 0,006	0,300 ± 0,032
TPN 75 mg/kg + ISO	0,020 ± 0,001**	0,017 ± 0,002	0,037 ± 0,004	0,030 ± 0,001	-0,183 ± 0,027***	0,073 ± 0,011	0,142 ± 0,019	-0,137 ± 0,029	0,030 ± 0,001	0,295 ± 0,029
TPN 50 mg/kg	0,020 ± 0,009**	0,023 ± 0,003	0,034 ± 0,003	0,035 ± 0,001	-0,077 ± 0,018***	0,034 ± 0,002	0,074 ± 0,006	-0,133 ± 0,021	0,053 ± 0,018	0,194 ± 0,040
NIF 3mg/kg + ISO	0,00 ± 0,00	0,017 ± 0,006	0,030 ± 0,001	0,034 ± 0,010	-0,038 ± 0,006	0,022 ± 0,002	0,310 ± 0,003	-0,076 ± 0,012	-0,001 ± 0,001	0,343 ± 0,062

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

TABELA 14 - Registros eletrocardiográficos de ratos WT (A) e SHR (B) na derivatização aVF após o tratamento prévio com o monoterpreno (TPN) e subsequente exposição ao agente indutor de infarto simpaticomimético isoproterenol (85 mg/kg 2x s.c).

(A)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,083 ± 0,023	0,016 ± 0,001	0,028 ± 0,005	0,037 ± 0,001	-0,258 ± 0,031	0,060 ± 0,004	0,112 ± 0,020	0,101 ± 0,076	0,044 ± 0,001	0,396 ± 0,012
Controle ISO	0,035 ± 0,011	0,022 ± 0,003	0,300 ± 0,004***	0,034 ± 0,001	-0,364 ± 0,005	0,604 ± 0,003***	0,107 ± 0,018	0,027 ± 0,004	0,039 ± 0,008	0,444 ± 0,127
TPN 25 mg/kg + ISO	0,042 ± 0,008	0,016 ± 0,001	0,022 ± 0,001***	0,035 ± 0,001	-0,428 ± 0,066	0,059 ± 0,004***	0,117 ± 0,011	-0,114 ± 0,060	0,051 ± 0,008	0,258 ± 0,039
TPN 50 mg/kg + ISO	0,046 ± 0,013	0,058 ± 0,031	0,080 ± 0,005***	0,096 ± 0,008	-0,334 ± 0,0081	0,063 ± 0,001***	0,120 ± 0,029	-0,125 ± 0,007	0,048 ± 0,011	0,288 ± 0,028
TPN 75 mg/kg + ISO	0,034 ± 0,009	0,018 ± 0,001	0,030 ± 0,004***	0,037 ± 0,019	-0,204 ± 0,065	0,069 ± 0,007***	0,129 ± 0,017	-0,260 ± 0,083	0,051 ± 0,022	0,298 ± 0,042
TPN 50 mg/kg	0,041 ± 0,010	0,015 ± 0,001	0,026 ± 0,003***	0,036 ± 0,014	-0,186 ± 0,036	0,074 ± 0,011***	0,138 ± 0,032	0,086 ± 0,003	0,058 ± 0,013	0,308 ± 0,033
NIF 3mg/kg + ISO	0,044 ± 0,012	0,016 ± 0,001	0,022 ± 0,002***	0,037 ± 0,014	-0,410 ± 0,060	0,074 ± 0,009***	0,150 ± 0,025	0,237 ± 0,090	0,085 ± 0,032	0,246 ± 0,015

(B)

	Onda P (mV)	Onda P (s)	P-R (s)	Q-R-S (s)	Onda Q (mV)	Q-T (s)	QTc (s)	S-T (s)	Onda T (mV)	R-R (s)
Controle salina	0,040 ± 0,005	0,104 ± 0,022	0,014 ± 0,006	0,036 ± 0,002	-0,039 ± 0,003	0,098 ± 0,022	0,151 ± 0,048	-0,100 ± 0,050	0,233 ± 0,053	0,328 ± 0,032
Controle ISO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00*	0,034 ± 0,001	-0,052 ± 0,011	0,072 ± 0,012	0,149 ± 0,030	-0,159 ± 0,055	0,095 ± 0,010**	0,262 ± 0,036
TPN 25 mg/kg + ISO	0,035 ± 0,009	0,017 ± 0,002	0,026 ± 0,003***	0,035 ± 0,001	-0,147 ± 0,043	0,058 ± 0,025	0,115 ± 0,049	-0,235 ± 0,089	0,078 ± 0,009	0,240 ± 0,007
TPN 50 mg/kg + ISO	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,028 ± 0,003***	0,035 ± 0,001	-0,339 ± 0,012	0,042 ± 0,016	0,080 ± 0,003	-0,309 ± 0,010	0,064 ± 0,006	0,252 ± 0,021
TPN 75 mg/kg + ISO	0,024 ± 0,009	0,017 ± 0,001	0,041 ± 0,001***	0,034 ± 0,005	-0,031 ± 0,004	0,062 ± 0,008	0,119 ± 0,020	-0,127 ± 0,018	0,131 ± 0,024	0,295 ± 0,030
TPN 50 mg/kg	0,026 ± 0,009	0,012 ± 0,003	0,072 ± 0,003***	0,038 ± 0,002	-0,128 ± 0,065	0,054 ± 0,019	0,092 ± 0,038	-0,202 ± 0,027	0,089 ± 0,023	0,250 ± 0,018
NIF 3mg/kg + ISO	0,115 ± 0,086	0,020 ± 0,005	0,035 ± 0,006***	0,033 ± 0,005	-0,213 ± 0,051	0,033 ± 0,003	0,066 ± 0,007	0,077 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,353 ± 0,062

Análise estatística ANOVA one-way seguido de pós-teste Newman-Keuls. Foram considerados significativos quando ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 (Infartado vs salina/TPN vs infartado/NIF vs infartado). WT (n=5) SHR(n=4).

5.2.7 Avaliação morfométrica da hipertrofia cardíaca pós-infarto induzido por isoproterenol

Isoproterenol induziu um aumento significativo nos parâmetros morfométricos cardíacos em ratos do grupo infartado (ISO) nas duas linhagens experimentais. O peso dos corações úmidos foi significativamente aumentado após a administração subcutânea de isoproterenol em comparação aos respectivos controles salina (Gráfico 7A e 8A, págs 105 e 106). O tratamento prévio com TPN reduziu de modo significativo o peso dos corações úmidos em ambas as linhagens de ratos quando comparados aos respectivos controles infartados.

O tratamento subagudo não alterou de modo significativo o peso corpóreo em nenhum dos grupos antes e após o tratamento, nas duas linhagens de ratos. Quando os corações dos ratos induzidos ao infarto foram equilibrados sobre o peso corpóreo, o aumento da massa cardíaca manteve-se alterada em ambas as linhagens experimentais em comparação aos controles salina. No entanto, o peso cardíaco quando equilibrado sobre o peso do fêmur, foi aumentado no grupo infartado em comparação com o grupo controle salina apenas em ratos wistar (Gráfico 7C e 8C, págs. 105 e 106).

Verificou-se um aumento relativo no peso cardíaco de ratos infartados em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 7D e 8D, págs. 105 e 106). A mesma resposta foi encontrada quando se verificou a diferença das espessuras ventriculares esquerda (Gráfico 7E e 8E, págs. 105 e 106).

O pré tratamento com TPN foi capaz de reduzir o peso dos corações úmidos em ambas as linhagens experimentais comparados aos respectivos controles infartados (Gráfico 7A, pag. 105). Quando analisado o peso cardíaco equilibrado pelo peso corpóreo o tratamento prévio com TPN produziu uma redução sobre este parâmetro a partir da dose de 50 mg/kg+ISO (Gráfico 7B e 8B, págs. 105 e 106). O equilíbrio do peso cardíaco em função do peso do fêmur, manteve o resultado anterior apenas nos grupos de ambas as linhagem experimentais (Gráfico 7C e 8C, págs.105 e 106).

Em comparação ao grupo infartado com isoproterenol, o tratamento subagudo preveniu o aumento relativo do peso cardíaco nas duas linhagens de ratos (Gráfico 7D e 8D, págs 105 e 106). Quando foram analisadas as espessuras ventriculares esquerda, TPN preveniu o aumento da parede ventricular em ambas as linhagens (Gráfico 7E e 8E, págs 105 e 106). Na linhagem de ratos SHR, TPN produziu uma diminuição dose dependente (TPN 25 mg/kg + ISO vs TPN 75 mg/kg + ISO) (Gráfico 7E, pág. 105). O

tratamento de TPN 50 mg/kg sem ISO não produziu alterações hipertróficas, os resultados obtidos foram semelhantes ao grupo controle salina em ambas as linhagens.

Nifedipina, também produziu alterações significantes sobre a hipertrofia pós-infarto induzido por ISO apenas sobre o peso dos corações úmidos (Gráfico 7A e 8A, págs. 105 e 106), peso cardíaco sobre peso corpóreo (Gráfico 7B e 8B, págs. 105 e 106), peso cardíaco versus o peso do fêmur: (Gráfico 7D e 8D , págs. 105 e 106), aumento relativo do peso cardíaco: (Gráfico 7B e 8B, págs 105 e 106)e espessura ventricular esquerda (Gráfico. 7E e 8E, págs 105 e 106).

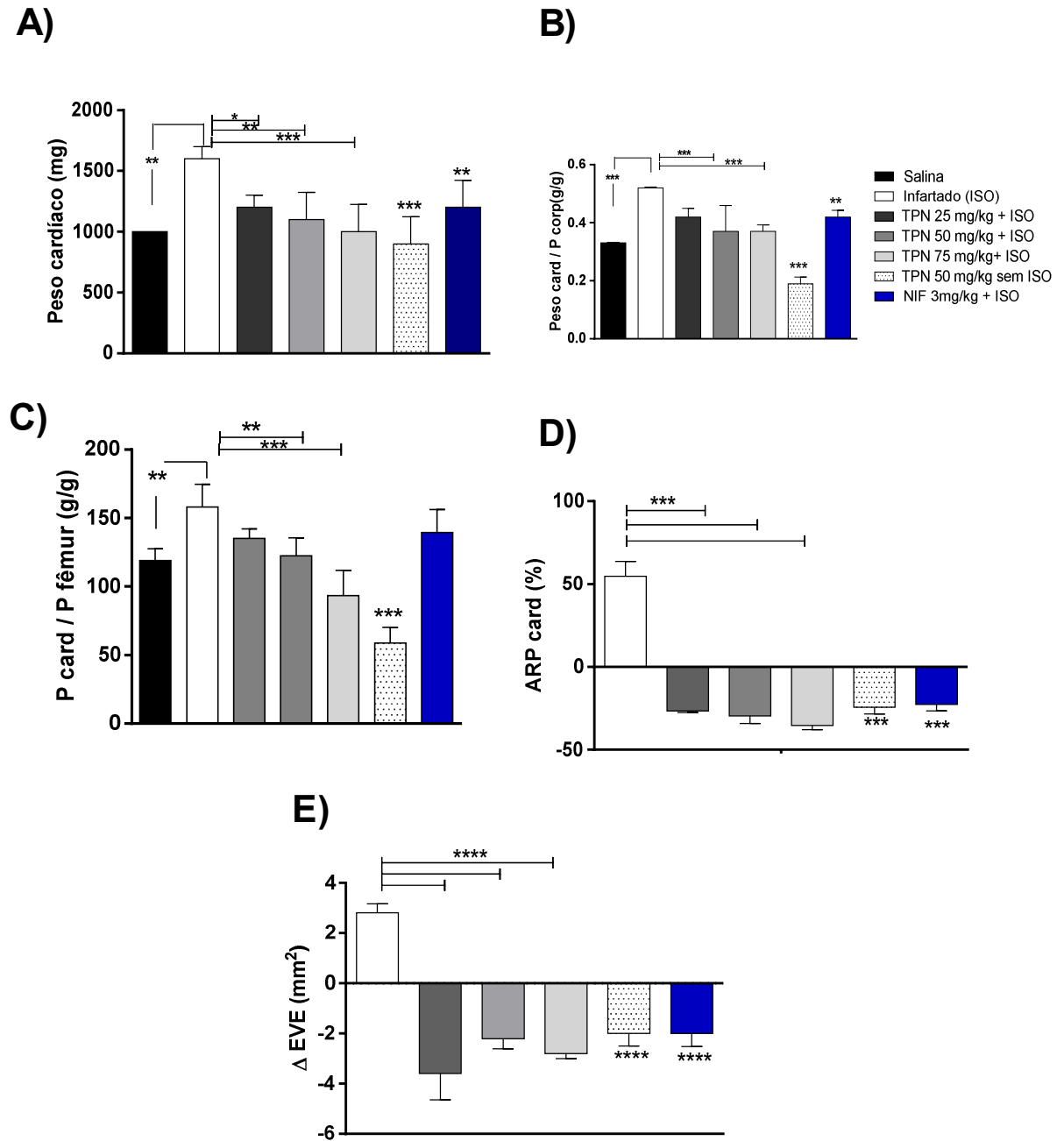


GRÁFICO 7- Avaliação hipertrófica pós-infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos WT. (A) peso dos corações úmidos (B) Razão do peso cardíaco sobre o peso corpóreo (C) Razão do peso cardíaco sobre o peso do fêmur (D) (E) Diferença da espessura ventricular esquerda. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (salina vs Infartado/TPN VS Infartado/ Nifedipina vs Infartado). $n = 5$.

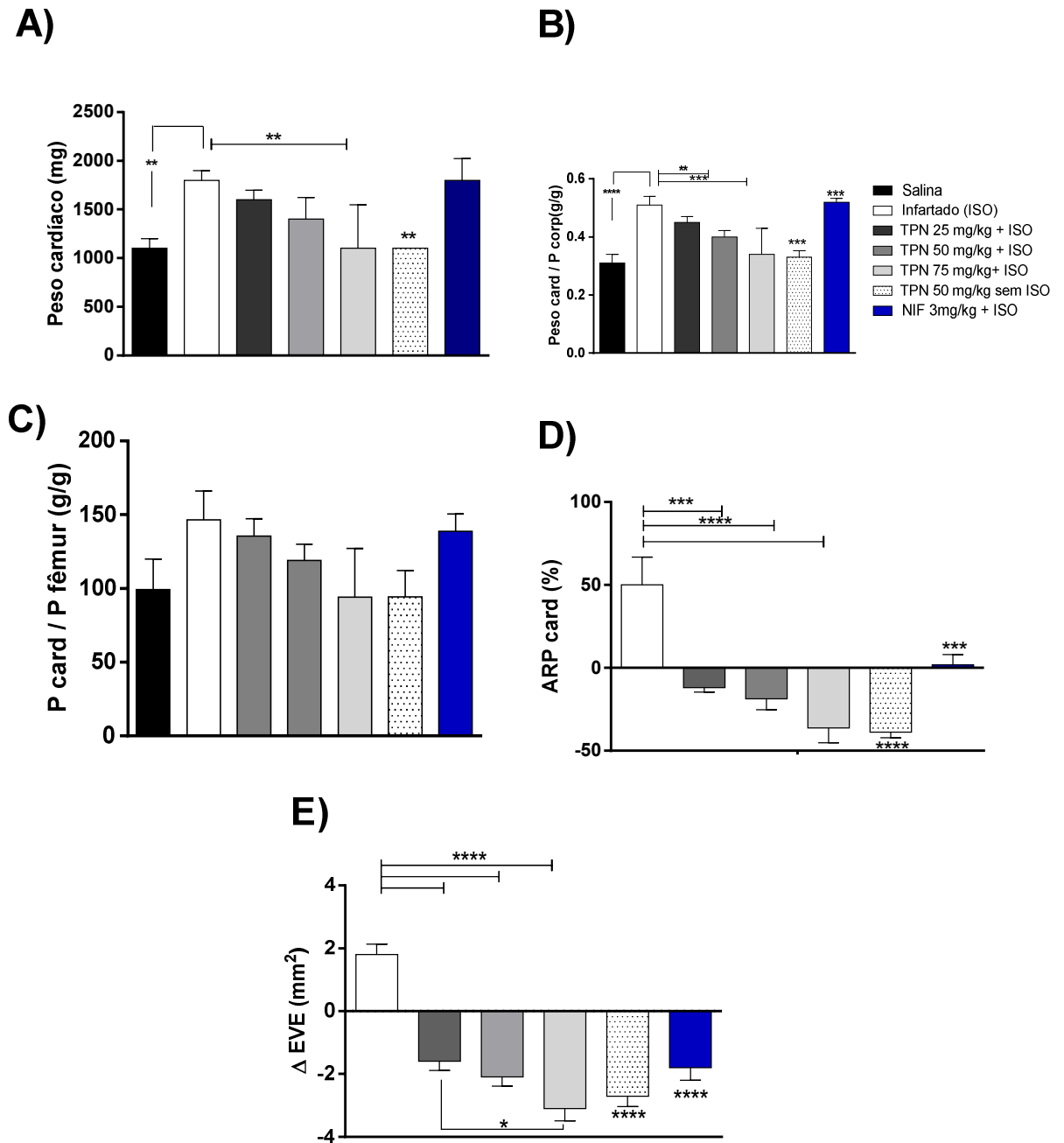


GRÁFICO 8-Avaliação hipertrófica pós-infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos SHR. (A) peso dos corações úmidos (B) Razão do peso cardíaco sobre o peso corpóreo (C) Razão do peso cardíaco sobre o peso do fêmur (D) (E) Diferença da espessura ventricular esquerda. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (salina vs Infartado/TPN VS Infartado/ Nifedipina vs Infartado). n=5.

5.2.8- Avaliação histopatológica do remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio.

A administração em doses maciças e repetidas de isoproterenol (85 mg/kg s.c 2x) em ambas as linhagens de ratos, foi capaz de induzir resposta adaptativa pós lesão de isquemia-reperfusão do tipo hipertrófica concêntrica, com redução da complacência ventricular esquerda e aumento da massa ventricular sem o neogênese miofibrilar.

O aumento da massa ventricular esquerda deu-se por aumento da matriz extracelular, devido à deposição de colágeno intersticial fibrilar. Estes resultados podem ser visualizados através da figura 14 e 15 págs. 108 e 109. Em cortes histopatológicos de corações de ratos wistar (WT) e espontaneamente hipertensos (SHR) corados com tricrômio de gomori (TG), observa-se um aumento na expressão de colágenos interfibrilar corados em azul, enquanto que as miofibrilar coram-se em rosa ou roxo.

O pré-tratamento com TPN na presença de isoproterenol, foi capaz de inibir o remodelamento hipertrófico pós lesão isquêmica nos corações de ratos em ambas as linhagens de ratos. A resposta alcançada com o tratamento foi progressiva quando comparadas as doses testadas, e em sua máxima dose testada obteve-se uma resposta semelhante aos grupos controle salina (Figura 14 e 15, págs. 108 e 109).

Quando observada a resposta do tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, percebe-se que não houve alterações significantes sobre a histoarquitura cardíaca, os resultados apresentados nas figuras 14 e 15, mostram maior grau de semelhança com ratos controles salina, indicando preservação do estado saudável cardíaco, sem resposta remodeladora pós-lesões cardíacas.

O tratamento com nifedipina 3mg/kg na presença de isoproterenol foi capaz de atenuar a resposta remodeladora nos corações dos ratos, mostrando efeito similar aos grupos tratados com TPN.

FIGURA 14- Microfotografias de miocárdios de ratos WT, após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Miocárdios corados em tricromio de gomori, aumento de 20 X. C= colágeno

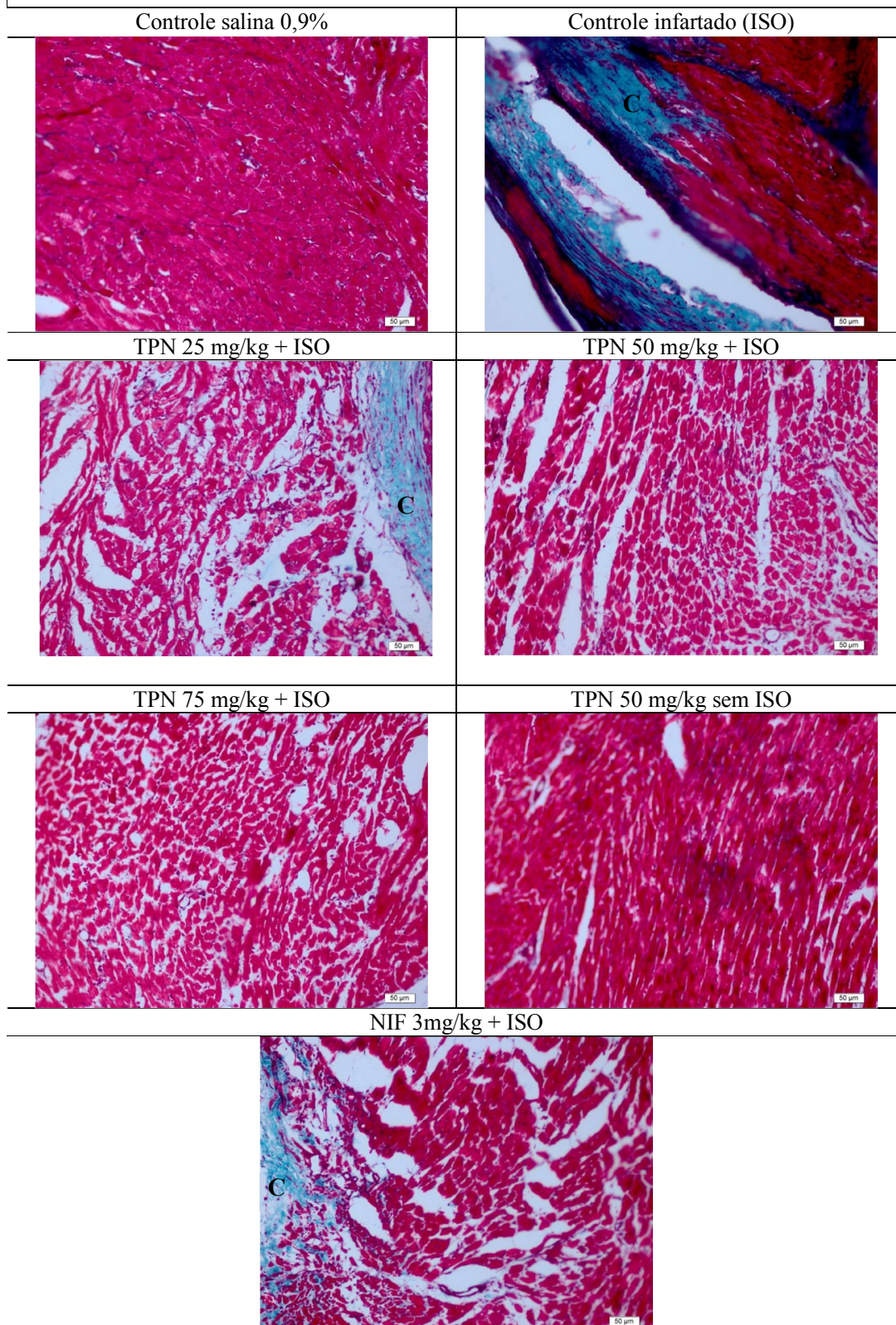
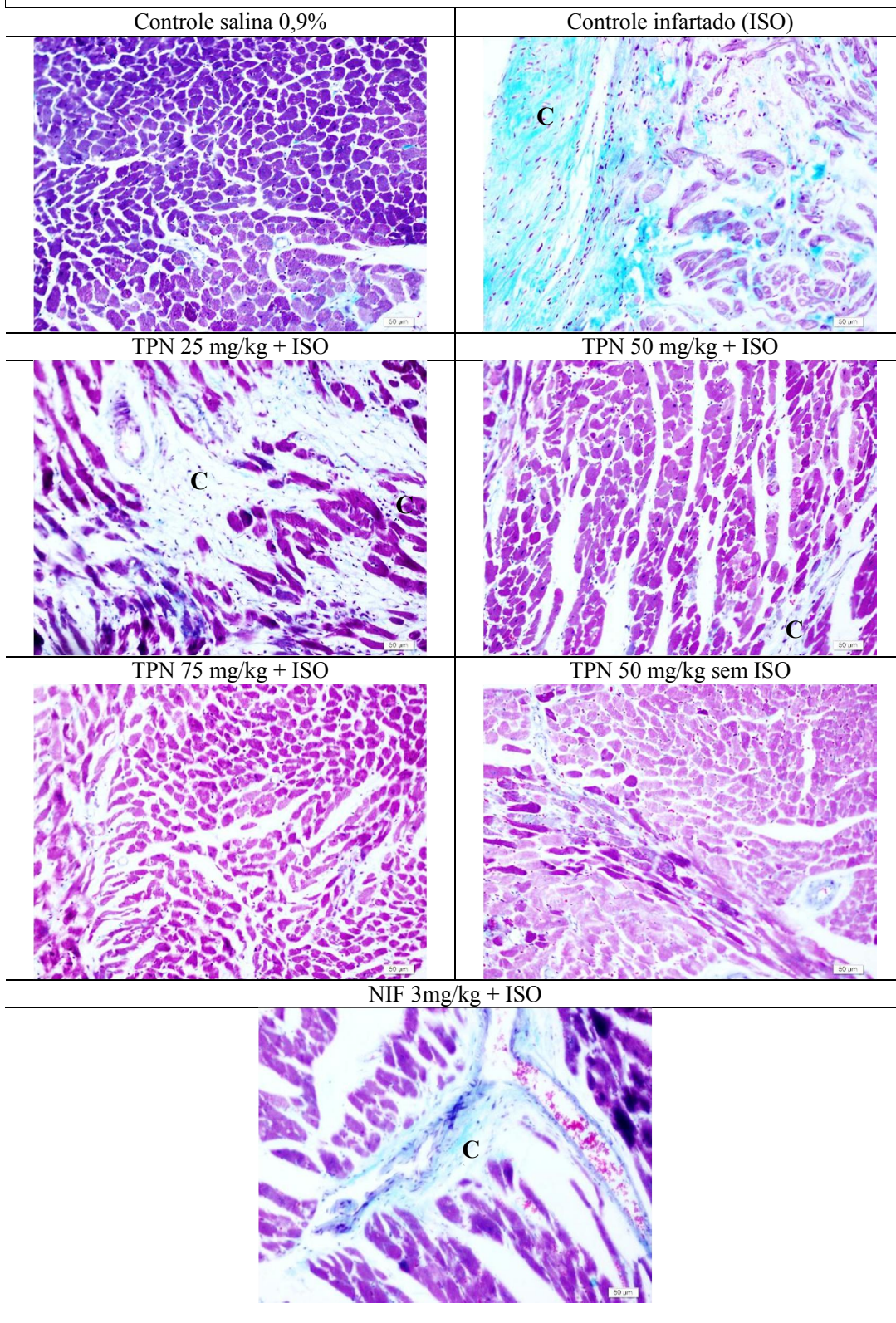


FIGURA 15 - Microfotografias de miocárdios de ratos SHR, após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Miocárdios corados em tricromio de gomori, aumento de 20 X. C= colágeno



5.3- Avaliação dos níveis lipídicos

5.3.1- Níveis séricos de colesterol total

Ao avaliar os níveis séricos de colesterol total, observou-se, que o isoproterenol não causou, quaisquer alterações significantes na linhagem wistar. Entretanto, em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa e infartada, houve aumento significativo nos níveis séricos de colesterol total (Gráfico 9A e 9B, pág. 111).

O pré-tratamento com TPN, não alterou de modo significativo os níveis de colesterol total em ratos wistar, em comparação com seus respectivos (Gráfico 9A, pág 111). Embora em ratos espontaneamente hipertensos e infartados, o tratamento prévio com TPN inibiu de modo significativo o aumento dos níveis de colesterol frente a indução com isoproterenol (Gráfico 9B, pág. 111). O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não causou alterações significantes em comparação com o grupo controle salina em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 9A e 9B, pág. 111).

O tratamento com nifedipina na presença de isoproterenol induziu inibição significativa dos níveis de colesterol total apenas em ratos da linhagem SHR (gráfico 9A e 9B, pág. 111).

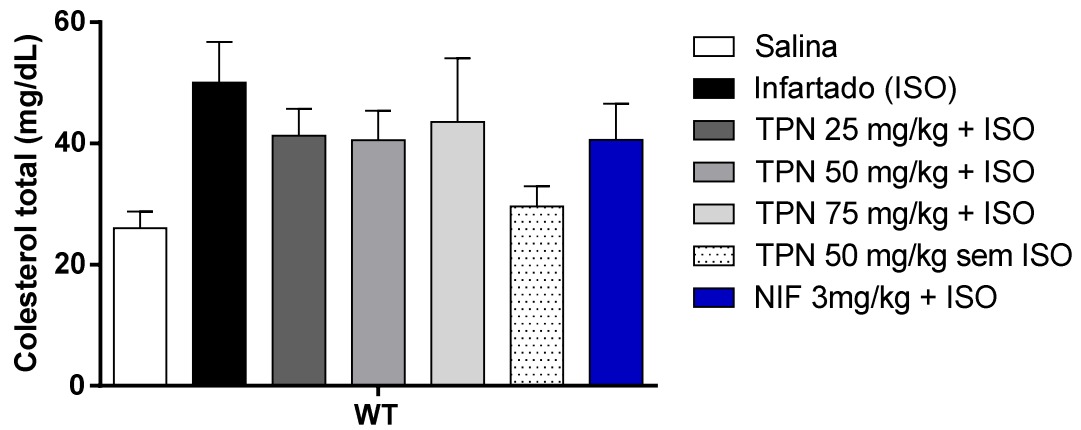
5.3.2- Níveis séricos de triglicérides

Isoproterenol foi capaz de induzir aumento nos níveis séricos de triglicérides em ambas as linhagens experimentais quando comparado aos respectivos controles salina (Gráfico 10A e 10B, pág. 112).

O tratamento prévio com TPN foi capaz de reduzir de modo significativo os níveis séricos triglicérides em ambas as linhagens experimentais em comparação aos respectivos controles infartados (gráfico 10B, pág 112). Os resultados do pré-tratamento com TPN na presença de isoproterenol ocorreu de maneira independente de dose. O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol não foi significativamente alterado em ambas as linhagens experimentais em comparação aos grupos controle salina.

Nifedipina 3mg/kg na presença de isoproterenol, inibiu de modo significativo o aumento do triglicérido produzido por isoproterenol em ambas as linhagens experimentais em comparação aos controles infartados (Gráfico 10A e 10B, pág 112).

A)



B)

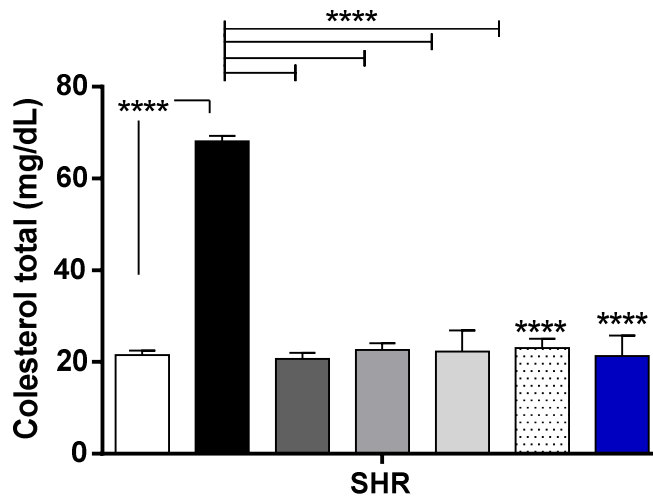
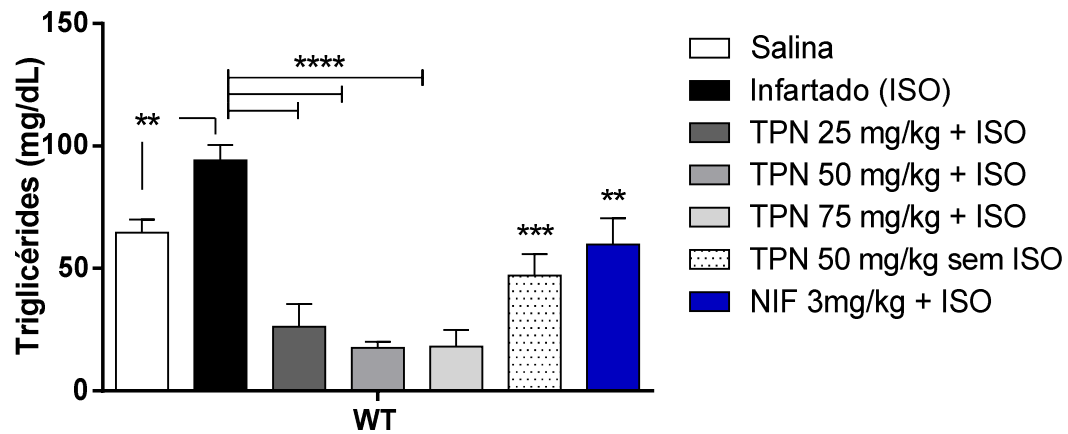


GRÁFICO 9- Níveis séricos de colesterol total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando *p <0.05 **p <0.01 e ***p <0.0001 (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). n=5.

A)



B)

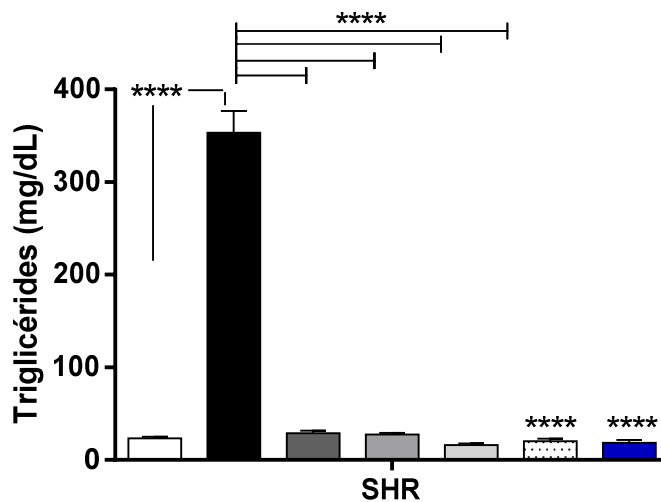


Gráfico 10- Níveis séricos de triglicérides após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando *p < 0.05 **p < 0.01 e ***p < 0.0001 (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). n=5

5.4 Avaliação dos mecanismos relacionados aos efeitos cardioprotetores

5.4.1- Avaliação dos efeitos antioxidantes *in vitro* induzido por TPN

5.4.1.1- Avaliação da atividade sequestradora radicalar

Nos testes de atividade sequestradora radicalar, TPN não produziu efeitos antioxidantes de modo significativo. Quando avaliada a curva concentração-resposta de inibição da formação de radical ABTS•, TPN produziu inibição > 2,0 % de atividade na máxima concentração testada TPN 400µg/mL (Tabela 15, pág. 114).

Quando avaliada a atividade sequestradora radicalar no teste DPPH, TPN também não produziu efeitos antioxidantes de modo relevante. Ao avaliar a curva concentração-resposta de inibição da formação do radical DPPH na proporção de solventes: 30% metanol e 70% água, TPN produziu efeito de inibição > 1% da formação de DPPH na máxima concentração testada TPN 100µg/mL (Tabela 15, pág. 114).

Avaliando-se a atividade sequestradora radicalar no teste DPPH, desta vez alterando a proporção de solventes para: 50% metanol e 50% água, houve persistência do resultado obtido nos teste DPPH anterior. TPN produziu efeitos de inibição > 1% da formação de DPPH na máxima concentração testada TPN 300µg/mL (Tabela 15, pág 114).

5.4.1.2 – Avaliação do poder de redução de Fe³⁺

Ao avaliar a atividade antioxidante do TPN em modelo de redução-oxidação, TPN também não produziu efeitos significantes. A curva concentração-resposta obtida na presença de TPN, foi estatisticamente não significativa para a capacidade de TPN reduzir íons Fe³⁺ à Fe²⁺. Assim, na máxima concentração testada houve um reduzido nível na diferença entre absorbâncias observadas na oxidação de Fe²⁺ à Fe³⁺ na presença de TPN (Tabela 15, pág.114).

5.4.1.3- Avaliação da atividade complexante com Fe³⁺

Quando avaliada a capacidade do TPN complexar-se com íons Fe³⁺ observa-se que a curva concentração-resposta obtida foi superior ao padrão de complexação EDTA. Assim, TPN produziu efeitos significantes no teste de complexação com íons Fe³⁺. TPN produziu uma concentração efetiva superior ao EDTA (Tabela 16, pág.114).

TABELA 15 – Perfil antioxidante do monoterpeneo (TPN) em testes de atividade sequestradora radicalar *in vitro* frente aos radicais DPPH, ABTS e poder redutor de ferro (Fe³⁺)

Metodologia empregada							
ABTS ^{•+}		DPPH [•] – 30% metanol/água (m/v)		DPPH [•] – 50% metanol/água (m/v)		Redução de Fe(III)	
C _{max} , µg mL ⁻¹	% I _{max}	C _{max} , µg mL ⁻¹	% I _{max}	C _{max} , µg mL ⁻¹	% I _{max}	C _{max} , µg mL ⁻¹	Δabs 700 _{nm}
400	1,3	100	-1,9	300	-2,9	100	0,034

TABELA 16 – Perfil antioxidante do monoterpeneo (TPN) em testes de atividade complexadora radicalar *in vitro* frente ao ferro no estado de oxidação Fe³⁺

Compostos	Capacidade de complexação de Fe(III)				
	Faixa Linear, µg mL ⁻¹	Nº de pontos	Curva analítica %I = a C _{Fe²⁺} + b	R	EC ₅₀ , µg mL ⁻¹
TPN	2,5 – 10,0	4	%I = 9,00 (±0,4) C _{Fe²⁺} – 2,51 (±2,29)	0,9980	5,8
EDTA	1,0 – 5,0	4	%I = 17,12 (±0,74) C _{Fe²⁺} + 5,98 (±2,12)	0,9981	2,6

5.4.1.4- Avaliação da atividade sequestradora radicalar de espécies derivadas do óxido nítrico.

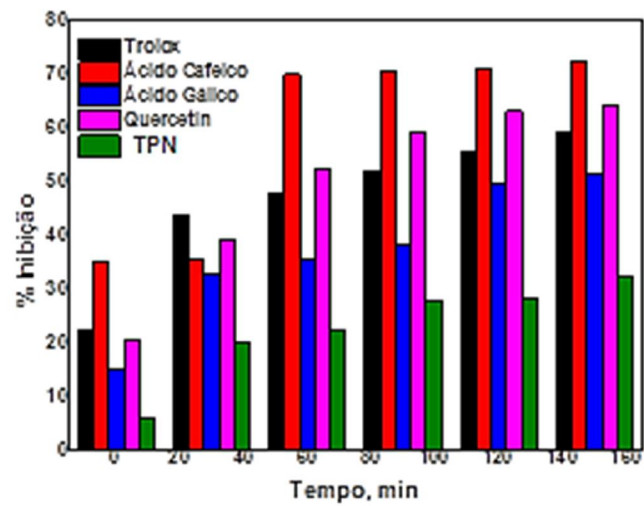
Ao avaliar a capacidade antioxidante do TPN frente à formação de espécies derivadas do óxido nítrico, verificou-se que TPN produziu reduzido nível de inibição da formação de espécies reativas do óxido nítrico. TPN produziu efeito de maneira dependente do tempo na concentração testada, entretanto, no tempo máximo de teste, a inibição da formação das espécies reativas de nitrogênio induzida por TPN foi de 30% em 160 min (Gráfico 11A, pág. 116).

Em comparação com os antioxidantes naturais, ácido gálico produziu 70 % de inibição da formação de espécies reativas de nitrogênio em 160 minutos. Trolox, um antioxidante sintético produziu máximo efeito em 160 minutos com 65 % de inibição de espécies reativas de nitrogênio (Gráfico 11 A, pág. 116).

Em relação a concentração de espécies reativas de nitrogênio obtidas no teste verificou-se que o metabolismo do nitroprussiato de sódio induziu a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) dependente do tempo e no tempo máximo de 160 minutos obteve-se concentração superior à 80 μ g/mL de ERN , entretanto na presença do TPN a concentração máxima obtida de ERN em 160 minutos foi de 20 μ g/mL (Gráfico 11B, pág. 116).

Na presença do ácido gálico a concentração de ERN obtida em 160 minutos foi de 30 μ g/mL e na presença do trolox, as concentrações de ERN obtida em 160 minutos foi de 40 μ g/mL.(Gráfico 11 B, pág 116).

A)



B)

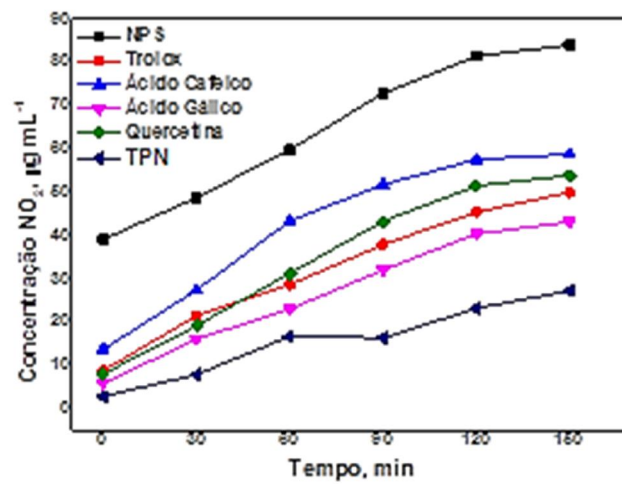


GRÁFICO 11- Atividade antioxidante do TPN no teste de atividade sequestradora radicalar *in vitro* frente às espécies reativas derivados do óxido nítrico (ERN) em função do tempo.(A) % de inibição da formação de ERN (B) Concentrações de NO formado µg/mL.

5.4.2- Avaliação dos efeitos cardiovasculares induzidos por TPN

5.4.2.1- Avaliação das alterações hemodinâmicas induzidas por TPN pós-infarto agudo do miocárdio.

Isoproterenol induziu alterações hemodinâmicas significativas pós-infarto agudo do miocárdio, A administração subcutânea de isoproterenol induziu redução sobre os parâmetros pressóricos e aumento da frequência cardíaca em comparação ao grupo controle salina em ambas as linhagens experimentais (Gráficos 12 e 13 págs. 118 e 119). Os parâmetros pressóricos basais das linhagens de ratos podem ser visualizadas através do gráfico 28, pág.226 (Anexo I).

O pré-tratamento com TPN não produziu alterações significantes nas pressões arteriais em comparação ao grupo infartado em ambas as linhagens, entretanto, o tratamento prévio com TPN inibiu o aumento da frequência cardíaca induzido pelo isoproterenol (Gráfico 12 e 13, págs. 118 e 119).

O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência da indução com isoproterenol produziu diferenças significantes nos parâmetros pressóricos em comparação com ratos controles salina em ambas as linhagens experimentais, quando observado o efeito do TPN 50 mg/kg na frequência cardíaca na ausência de isoproterenol, TPN reduziu a frequência cardíaca apenas em ratos tratados da linhagem wistar em comparação com seu respectivo controle salina (Gráfico 12 e 13 págs. 118 e 119).

O tratamento com nifedipina na presença de isoproterenol, não alterou os parâmetros pressóricos quando comparados ao grupo controle infartados em ambas as linhagens experimentais. Mas, alterou de modo significante a resposta sobre a frequência cardíaca em comparação aos respectivos controles infartados (Gráficos 12 e 13 págs. 118 e 119).

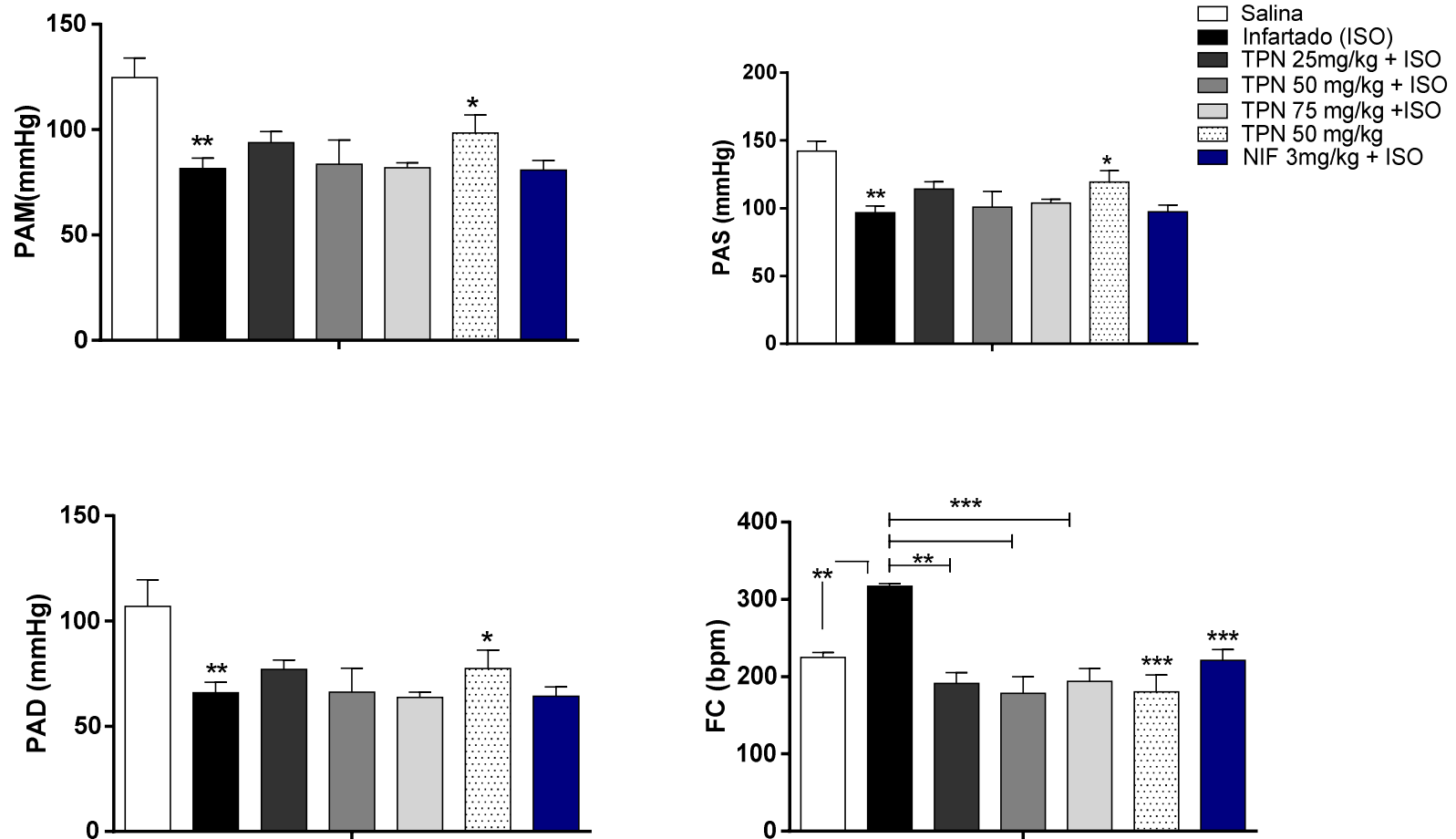


GRÁFICO 12- Alterações hemodinâmicas após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos WT. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. PAM=Pressão Arterial Média/PAS=Pressão Arterial Sistólica/ PAD= Pressão Arterial Diastólica/FC= Frequência Cardíaca. Considerado significativos quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). $n=5$

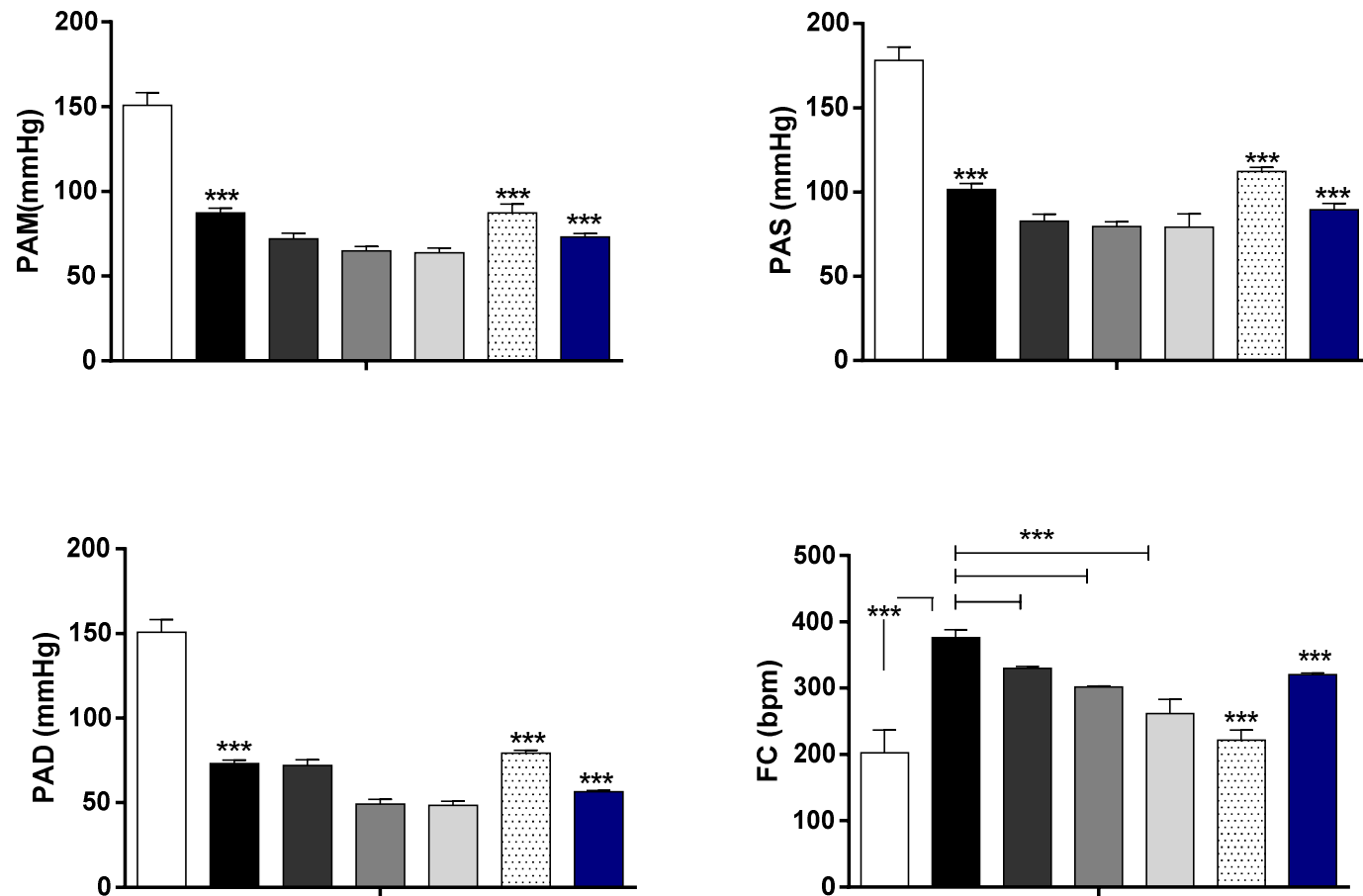


GRÁFICO 13- Alterações hemodinâmicas após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. PAM=Pressão Arterial Média/PAS=Pressão Arterial Sistólica/ PAD= Pressão Arterial Diastólica/FC= Frequência Cardíaca. Considerado significativo quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). $n=4$

5.4.2.2- Avaliação da demanda miocárdica de oxigênio após o infarto agudo do miocárdio induzido

A administração subcutânea de isoproterenol foi capaz de alterar a reperfusão miocárdica, produzindo um aumento significativo sobre a demanda de oxigênio fornecida ao miocárdio em ambas as linhagens experimentais em comparação aos seus respectivos controles (Gráfico 14A e 14B pág. 121). Contudo o pré-tratamento com TPN foi capaz de inibir o aumento da taxa de oxigênio ofertada ao miocárdio de modo significativo nas duas linhagens experimentais de maneira independente de dose (Gráfico 14B, pág 121).

O tratamento subagudo de TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol não alterou de modo significativo a taxa de oxigenação miocárdica em comparação com o grupo controle salina nas duas linhagens experimentais (Gráfico 14A e 14B pág.121). Nifedipina 3mg/kg na presença de isoproterenol também inibiu de modo significativo a demanda miocárdica de oxigênio nas duas linhagens experimentais. (Gráfico 14A e 14B, pág 121).

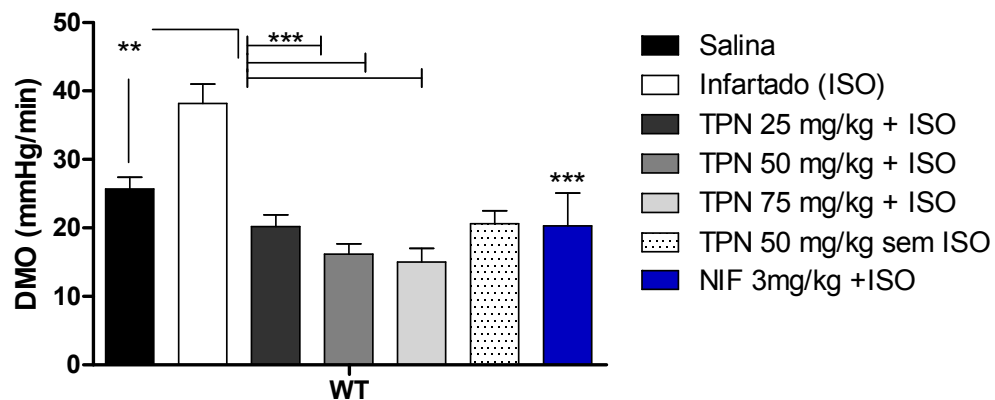
5.4.2.3- Avaliação morfológica das coronárias após o infarto induzido por isoproterenol.

A exposição subcutânea repetida e em alta dose de isoproterenol, induziu aparente redução do fluxo sanguíneo coronário, reduzindo a reperfusão miocárdica, devido ao estreitamento das artérias coronárias esquerda, direita, circunflexa e em especial houve aparente redução sobre a espessura da artéria coronária descendente anterior esquerda, em ambas as linhagens experimentais. (Figuras 16 e 17 pág.122).

O tratamento prévio com TPN foi capaz de produzir aparente efeito dilatador das artérias coronárias, de maneira dose dependente, aumentando a reperfusão miocárdica, mesmo na presença de isoproterenol, em especial quando analisada a artéria coronária descendente anterior esquerda em comparação com o grupo infartado com isoproterenol nas duas linhagens de ratos (Figuras 16 e 17 pág. 122).

O tratamento subagudo com TPN na ausência de isoproterenol induziu aparente efeito dilatador coronariano, quando comparado aos grupos controle salina e infartado, em ambas as linhagens experimentais aumentando a reperfusão miocárdica, observando dilatação sobre a coronária descendente anterior esquerda (Figura 16 e 17 pág. 122). Nifedipina, não apresentou quaisquer alterações sobre a morfologia dos ramos coronarianos em nenhuma das duas linhagens experimentais, na presença de isoproterenol (Figura 16 e 17, pág. 122).

A)



B)

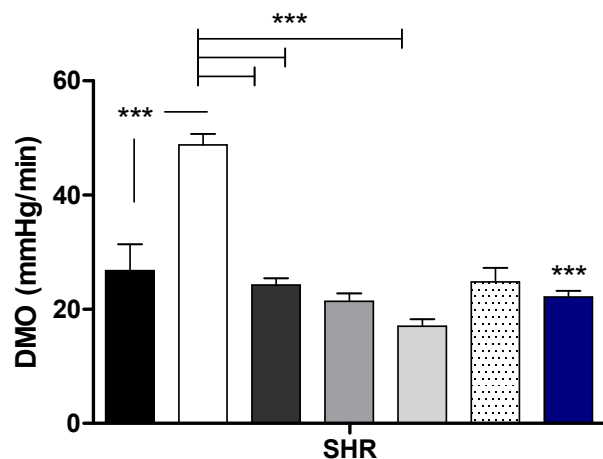


GRÁFICO 14- Demanda miocárdica de oxigênio após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: (A) WT (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerado significativo quando * $p > 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). WT n=5/ SHR n=4.

FIGURA 16- Aspectos morfológicos de corações isolados de ratos wistar (WT) após o tratamento subagudo. n=5

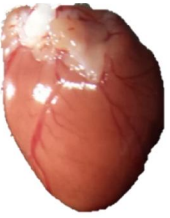
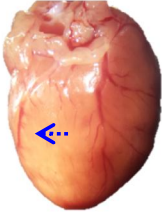


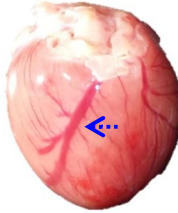




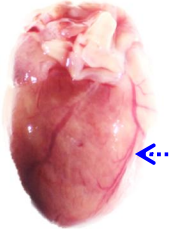
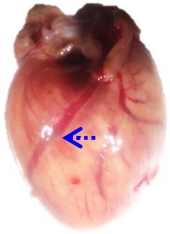
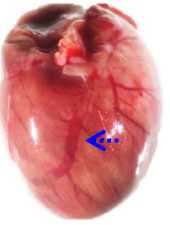
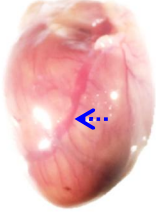
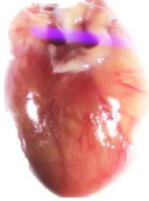
	Controle salina 0,9%	Isoproterenol 85 mg/kg	TPN 25 mg/kg	TPN 50 mg/kg	TPN 75 mg/kg	TPN 50 mg/kg	NIF 3 mg/kg
							
ISO	-	+	+	+	+	-	+

FIGURA 17- Aspectos morfológicos de corações isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após o tratamento subagudo. n=5

	Controle salina 0,9%	Infartado	TPN 25 mg/kg	TPN 50 mg/kg	TPN 75 mg/kg	TPN 50 mg/kg	NIF 3 mg/kg
							
ISO	-	+	+	+	+	-	+

5.4.2.4- Avaliação histopatológicas das aortas torácicas após o infarto induzido por isoproterenol.

Através de cortes histológicos transversais dos ramos torácicos aórticos, corados em hematoxilina-eosina (H&E), pode-se observar que isoproterenol apresentou aparente efeito dilatador em ambas às linhagens de ratos. Ao realizar a medida do diâmetro do lúmen aórtico observou-se, porém não haver diferenças estatísticas quando comparados aos seus respectivos controles salina (Figura 18 e figura 19 págs. 124 e 125).

O tratamento prévio com TPN induziu aparente efeito dilatador nos ramos torácicos aórticos, porém quando analisado estatisticamente o diâmetro interno aórtico não foi significativamente alterado em comparação com os grupos controles infartados e salina (Figura 18 e figura 19 págs. 124 e 125). Em ratos SHR, a resposta manteve-se semelhante a linhagem de ratos wistar (Figura 18 e figura 19 págs. 124 e 125).

O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, manteve aparente efeito dilatador aórtico, porém quando comparados estatisticamente com seus respectivos controles salina, não houve alteração significativa sobre o diâmetro luminal aórtico em ambas as linhagens experimentais (Figuras 18 e 19 págs. 124 e 125).

Nifedipina não mudanças sobre as aortas em ambas as linhagens experimentais quando comparados aos respectivos controles (Figuras 18 e 19 págs. 124 e 125). Quando os ramos aórticos torácicos foram analisados em cortes longitudinais, em coloração tricrômio de gomori (TG), observou-se que os ratos que foram induzidos ao infarto com isoproterenol apresentaram aparente redução sobre a túnica íntima e aumento da túnica media sem alterar a túnica adventícia, nas comparações com seus respectivos controles salina, em ambas as linhagens experimentais (Figuras 20 e 21 págs. 126 e 127)

O pré-tratamento com TPN na presença ou ausência de isoproterenol, induziu aparente aumento progressivo e dose dependente da túnica íntima em comparação com os grupos controles infartada e salina, sem alterar as túnicas média e adventícia. (Figuras 20 e 21 págs. 126 e 127). O tratamento com nifedipina, não produziu alterações sobre a histoarquitetura dos ramos aórticos torácicos (Figuras 20 e 21 págs. 126 e 127).

FIGURA 18- Microfotografias de aortas de ratos wistar (WT) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Aortas coradas em H&E, aumento de 4 x.

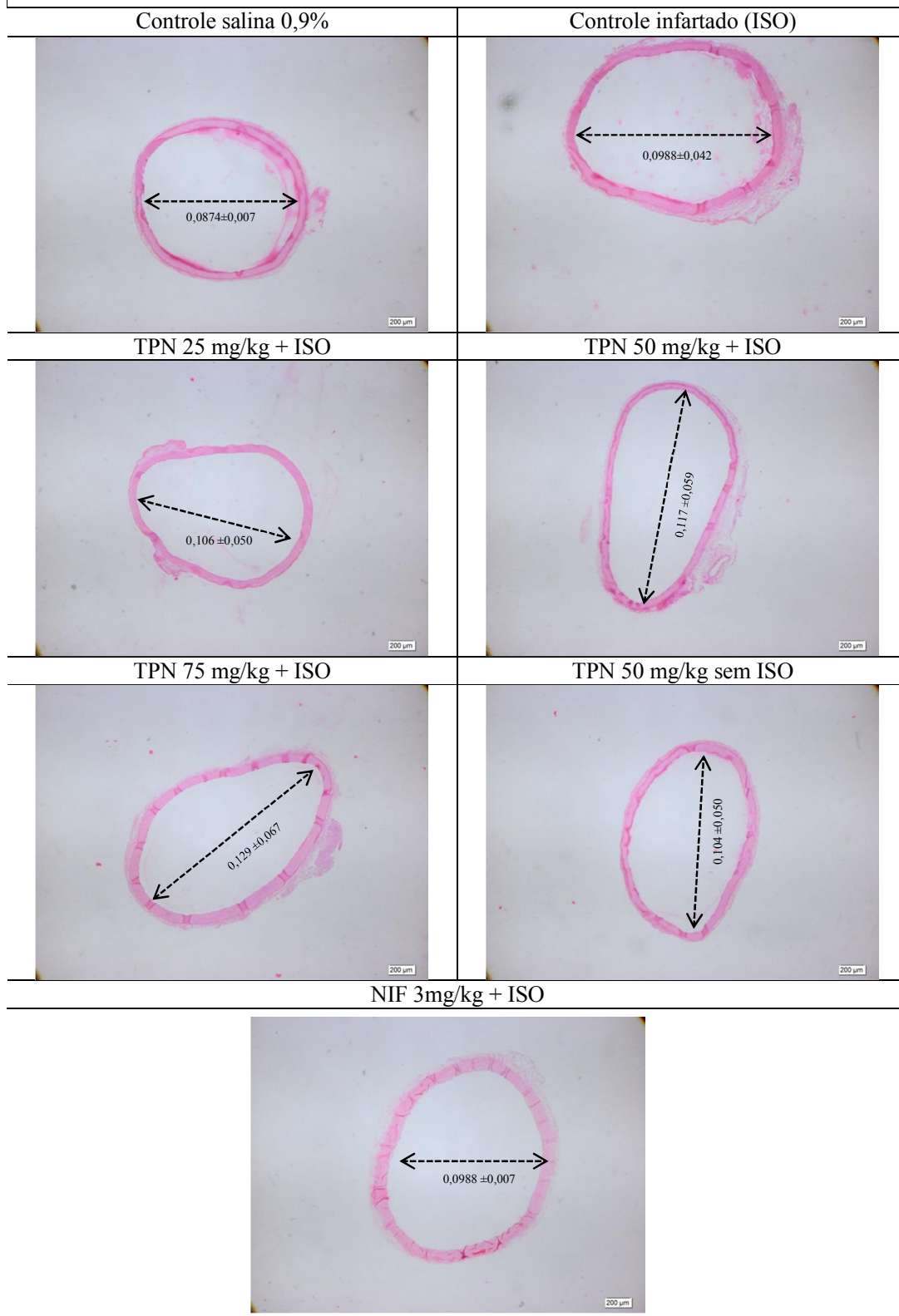


FIGURA 19- Microfotografias de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Aortas coradas em H&E, aumento de 4 x.

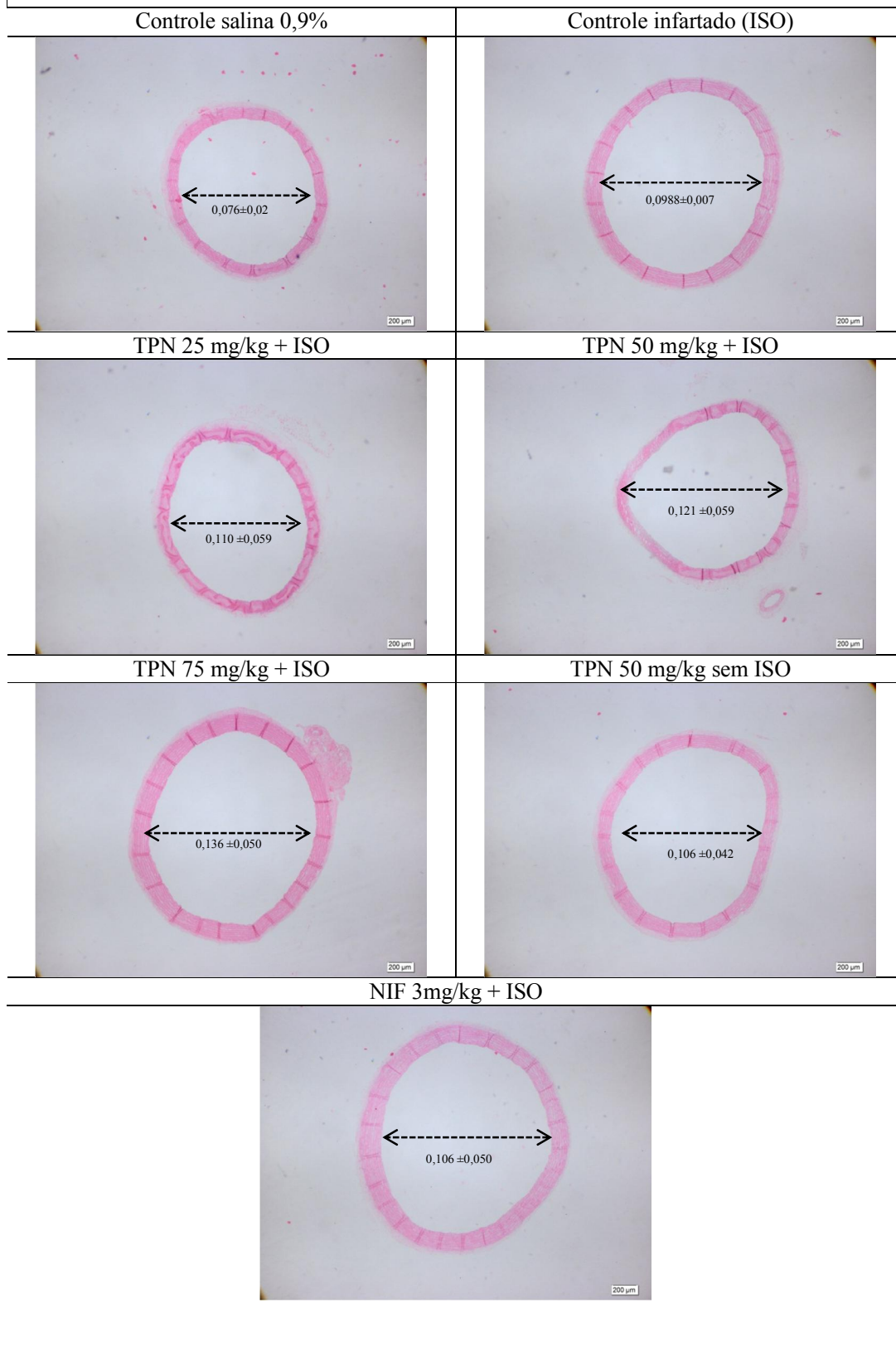


FIGURA 20- Microfotografias de aortas de ratos wistar, após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Aortas corados em tricromio de gomori, aumento de 100x. TA= Túnica adventícia/ TM= Túnica média/ TI= Túnica íntima/ L= Lúmen/ AP= área perivascular

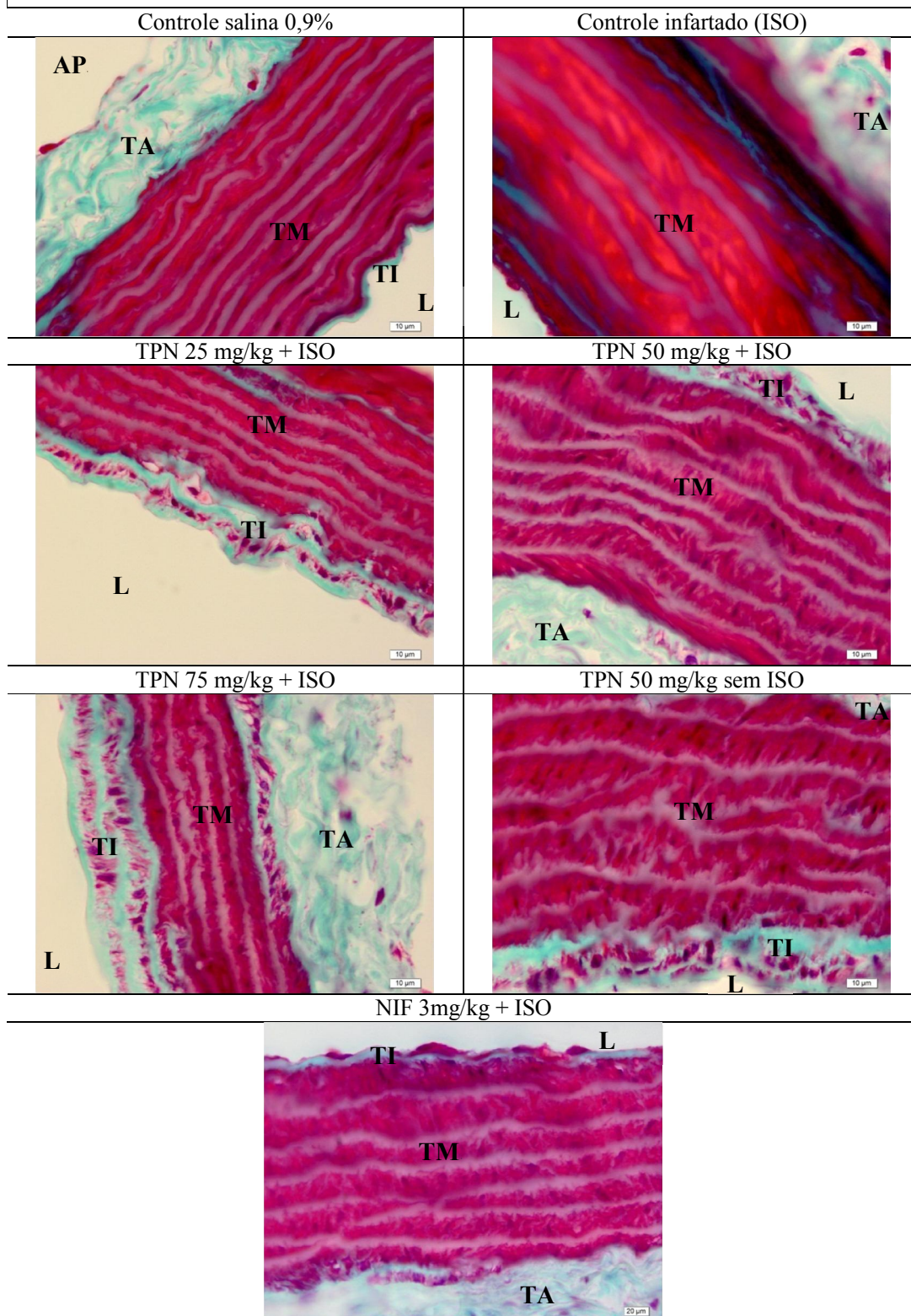
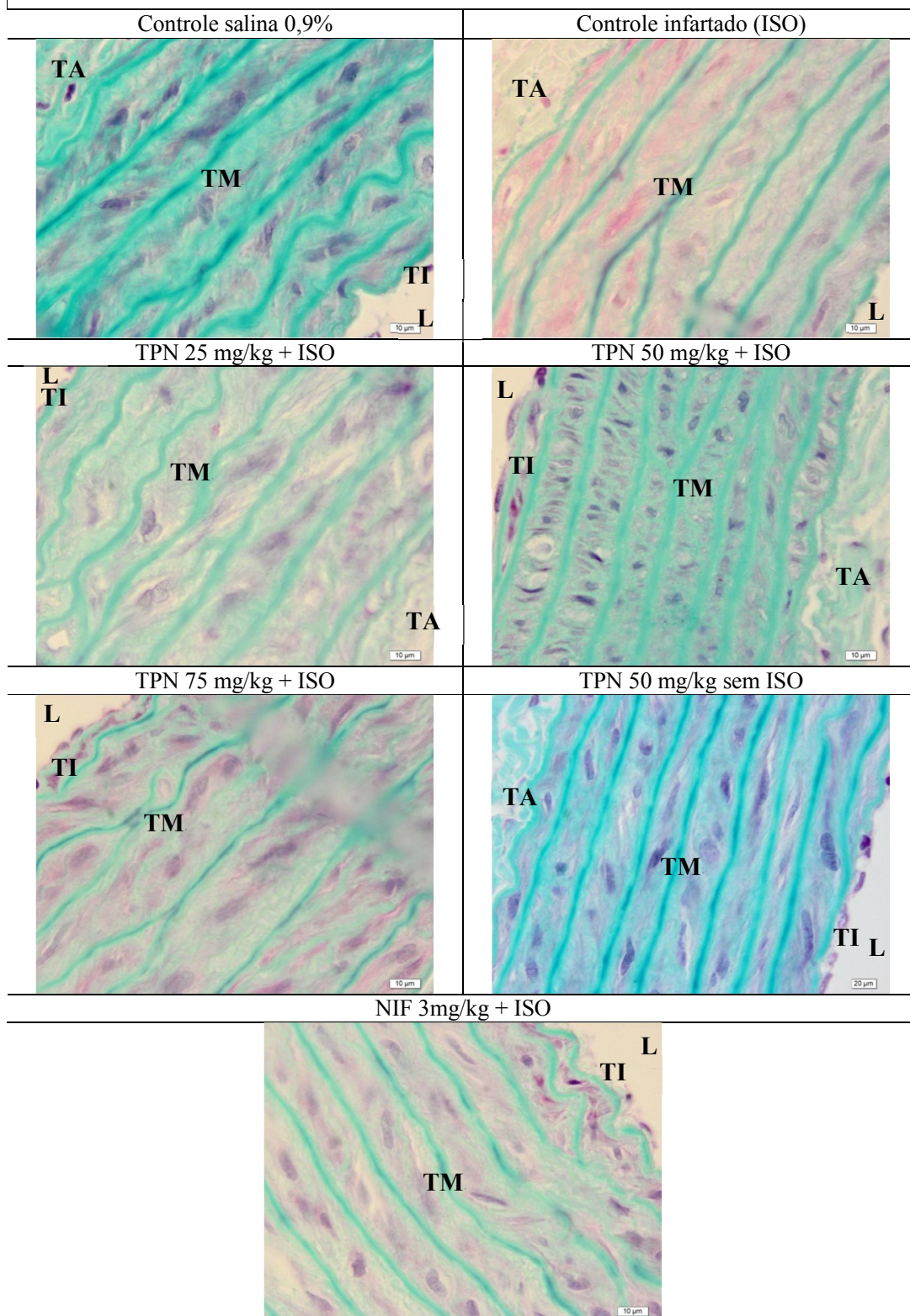


FIGURA 21- Microfotografias de aortas de ratos SHR, após o tratamento prévio com o monoterpeno (TPN). Aortas corados em tricromio de gomori, aumento de 100x. TA= Túnica adventícia/ TM= Túnica média/ TI= Túnica íntima/ L= Lúmen/ AP= área perivascular



5.4.2.5 – Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas pós-infarto agudo do miocárdio

O infarto induzido por isoproterenol, não foi capaz de induzir alterações significantes na potencia e no efeito máximo contrátil frente à fenilefrina em artérias mesentéricas isolada de ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 15 e tabela 17, págs. 129 e 130). O tratamento prévio com TPN e subsequente exposição subcutânea de isoproterenol também não produziram diferenças significantes na potência frente à contração induzida por fenilefrina, comparado aos seus respectivos controles, em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 15 e tabela 17 págs. 129 e 130).

Entretanto reduziu de modo significativo o efeito máximo apenas nas doses de 25 mg/kg e 75 mg/kg em relação aos controles (Gráfico 15 e tabela 17, págs. 129 e 130). O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de indução ao infarto com isoproterenol, não alterou de modo significativo a potência ou o efeito máximo contrátil induzido por fenilefrina em artérias mesentéricas isoladas de ratos espontaneamente hipertensos, quando comparados aos respectivos controles (Gráfico 15 e tabela 17, págs. 129 e 130). O pré-tratamento com nifedipina e subsequente indução ao infarto com isoproterenol não alterou a potência da contração induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas isoladas de ratos espontaneamente hipertensos em comparação aos controles, entretanto aumentou de modo significativo o efeito máximo contrátil induzido por fenilefrina (Gráfico 15 e tabela 17, págs. 129 e 130).

Quando avaliada a reatividade vascular frente ao relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos, houve aumento significativo na potencia e no efeito máximo induzido por isoproterenol (Gráfico 16 e tabela 18 págs. 130 e 131). O tratamento prévio com TPN foi capaz de aumentar de modo significativo a potência do vasorelaxamento induzido por nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas isolada de ratos espontaneamente hipertensos nas menores doses testadas, comparado ao infarto induzido por isoproterenol (Gráfico 16 e tabela 18 págs.130 e 131).

TPN também foi capaz de reduzir de maneira significativa o efeito máximo relaxante induzido por nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas isoladas de ratos espontaneamente hipertensos, na presença de isoproterenol, apenas nas doses de 25 mg/kg e 75 mg/kg, quando comparado ao grupo controle infartado (Gráfico 16 e tabela 18, págs. 130 e 131).

O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não alterou o vasorelaxamento produzido por nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de ratos hipertensos em comparação ao grupo controle salina (Gráfico 16 e tabela 18, págs. 130 e 131). O pré-tratamento com nifedipina na presença de isoproterenol, foi capaz de aumentar de modo significativo a potência e o efeito máximo do vasorelaxamento induzido por nitroprussiato de sódio em comparação aos respectivos controles (Gráfico 16 e tabela 18 págs. 130 e 131).

Ademais, as diferenças na curva concentração-resposta entre as linhagens de ratos na reatividade vascular em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos frente à contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio podem ser visualizadas no gráfico 30, pág. 228 (Anexo III)

A)

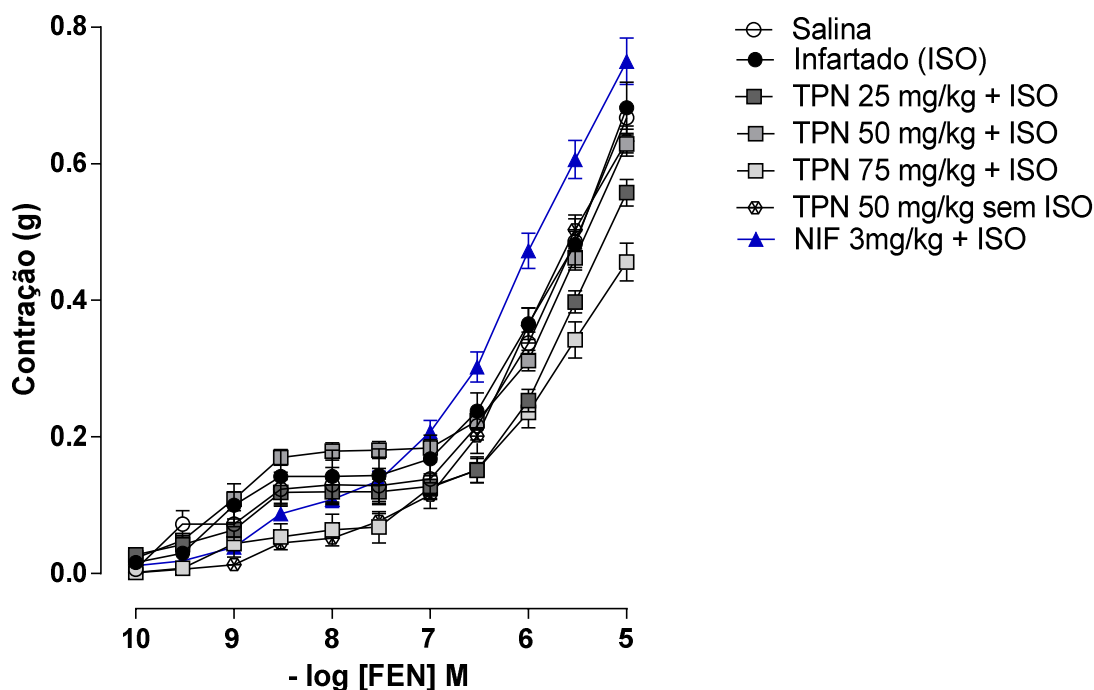


GRÁFICO 15- Reatividade vascular frente à contração obtida pela curva concentração-resposta de fenilefrina após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. n=5

TABELA 17 – Comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, frente as contrações com fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5} M).

Grupos Experimentais	pD_2 (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (g)
Salina	$6,22 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,02$
Infartado (ISO)	$6,25 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,04$
TPN 25 mg/kg + ISO	$6,04 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,02^*$
TPN 50 mg/kg + ISO	$6,35 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,01$
TPN 75 mg/kg + ISO	$6,24 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,03^{****}$
TPN 50 mg/kg sem ISSO	$6,20 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,02$
NIF 3mg/kg + ISO	$6,39 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,03^*$

Os valores estão expressos com média \pm E.P.M. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos teste Newman-keuls, significativa quando $*p < 0.05$ (TPN vs infartado/ NIF vs infartado/ NIF vs salina) $****p < 0.0001$ (TPN vs Infartado) ou (TPN vs. salina).

B)

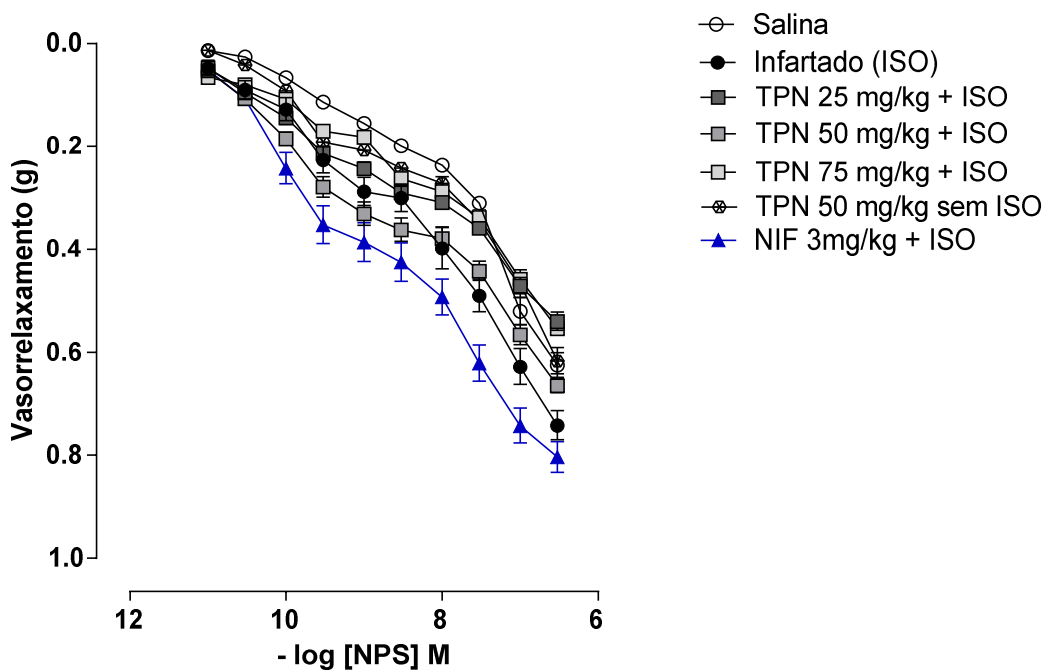


GRÁFICO 16- Reatividade vascular frente ao vasorrelaxamento obtido pela curva concentração-resposta de nitroprussiato de sódio após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. n=5

TABELA 18– Comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, frente ao relaxamento com NPS (3×10^{-11} - 10^{-7} M).

Grupos Experimentais	pD_2 (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (g)
Salina	$7,84 \pm 0,06$	$0,62 \pm 0,02$
Infartado (ISO)	$8,22 \pm 0,07^{**}$	$0,74 \pm 0,02^*$
TPN 25 mg/kg + ISO	$8,48 \pm 0,07^*$	$0,54 \pm 0,01^{***}$
TPN 50 mg/kg + ISO	$8,55 \pm 0,08^{**}$	$0,66 \pm 0,01$
TPN 75 mg/kg + ISO	$8,05 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,06^{***}$
TPN 50 mg/kg sem ISO	$8,08 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,02$
NIF 3mg/kg + ISO	$8,71 \pm 0,08^{***}$	$0,80 \pm 0,03^{**}$

Os valores estão expressos com média \pm E.P.M. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos teste Newman-keuls, significante quando $*p < 0.05$ (Infartado (ISO) vs salina/TPN vs infartado (ISO)) $**p < 0.01$ (Infartado (ISO) vs salina/ TPN vs infartado (ISO)/ NIF vs infartado (ISO)/ NIF vs salina) $***p < 0.001$ (TPN vs Infartado/ NIF vs Infartado)

5.4.2.6- Avaliação da sensibilidade baroreflexa pós-infarto agudo do miocárdio

A administração de isoproterenol não foi capaz de induzir alterações significantes sobre a sensibilidade baroreflexa frente à estimulação com fenilefrina $8\mu\text{g/kg}$ i.v em ambas as linhagens de ratos infartados quando comparado aos respectivos controles salina (Gráfico 17A e 17B, pág. 133).

De modo similar, o tratamento prévio com TPN não produziu mudanças significantes sobre o ganho bradicardico induzido por fenilefrina em ambas as linhagens de ratos quando comparados aos respectivos controles (Gráfico 17A e 17B, pág. 133). O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência do infarto induzido por ISO também não produziu alterações sobre o ganho bradicárdico em ratos das duas linhagens experimentais em relação aos respectivos grupos controles (Gráfico 17A e 17B, pág. 133). O tratamento prévio com nifedipina também não alterou significativamente a sensibilidade baroreflexa em ambas as linhagens experimentais em comparação aos respectivos controles (Gráfico 17A pág. 133).

Em relação ao tempo de ação da fenilefrina, a administração de isoproterenol induziu aumento significativo no tempo de ação da fenilefrina em ratos infartados espontaneamente hipertensos em relação ao respectivo controle. O tratamento prévio com TPN inibiu o aumento do tempo de ação da fenilefrina em ratos hipertensos e infartados quando comparado ao grupo infartado (Gráfico 18B, pág. 134). O tratamento

prévio com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol não produziu alterações no tempo de ação quando comparado ao grupo salina (Gráfico 18A e 18B, pág. 134). O tratamento prévio com nifedipina inibiu o aumento do tempo de ação da fenilefrina em ratos hipertensos e infartados quando comparado ao infartado (Gráfico 18B, pág. 134).

Ao avaliar a sensibilidade baroreflexa frente à estimulação com nitroprussiato de sódio 50 μ g/kg i.v., isoproterenol induziu redução no ganho taquicardico comparado ao grupo controle salina em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 19A e 19B, pag 135). O pré-tratamento com TPN não alterou a resposta taquicardica estimulada com nitroprussiato de sódio em ratos normotensos em comparação com seu respectivo controle infartado. Entretanto, melhorou o ganho taquicardico em ratos hipertensos e infartado em comparação ao respectivo controle infartado (Gráfico 19A e 19B, pág 135). O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol reduziu o ganho taquicardico frente a estimulação com nitroprussiato de sódio quando comparado aos seus respectivos controles infartados e salina na linhagem wistar (Gráfico 19 A, pág. 135). Porém, não mudou a resposta taquicardica estimulada com nitroprussiato de sódio de ratos hipertensos em comparação ao respectivo controle salina (Gráfico 19B, pág. 135). Nifedipina prejudicou o ganho taquicardico em ratos normotensos e infartados quando comparado aos respectivos grupos controle (Gráfico 19A, pág. 135). Mas, o tratamento prévio com nifedipina, aboliu de modo significativo o prejuízo taquicardico induzido por isoproterenol frente à estimulação com nitroprussiato de sódio em ratos hipertensos e infartados em comparação ao respectivo controle infartado (Gráfico 19B, pág. 135).

Em relação ao tempo de ação do nitroprussiato de sódio, na linhagem de ratos wistar, não houve alterações significantes na presença ou ausência de isoproterenol: infartado (Gráfico 20A pág. 136). O tratamento com TPN não alterou o tempo de ação do nitropussiato de sódio em ratos da linhagem normotensa infartada em comparação aos respectivos controles (Gráfico 20A, pág. 136). O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol não produziu mudanças no tempo de ação do nitroprussiato de sódio em comparação com seus respectivos controles na linhagem de ratos normotensos (Gráfico 20A pág. 136). Nifedipina, também não alterou de modo significativo o tempo de ação do nitroprussiato de sódio na presença de isoproterenol em ratos normotensos (Gráfico 20A pág. 136).

Contudo, em ratos da linhagem hipertensa, isoproterenol induziu aumento no tempo de ação do nitroprussiato de sódio (Gráfico 20B, pág. 136). Enquanto que o

tratamento com TPN foi capaz de reestabelecer o tempo de ação do nitroprussiato de sódio na presença de isoproterenol (Gráfico 20B, pág. 136). TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não produziu mudanças significantes sobre o tempo de ação do nitroprussiato de sódio comparado ao grupo controle salina (Gráfico 20B pág. 136). O pré-tratamento com nifedipina reduziu o tempo de ação do nitroprussiato de sódio na presença de isoproterenol quando comparado ao grupo infartado (Gráfico 20B, pág. 136).

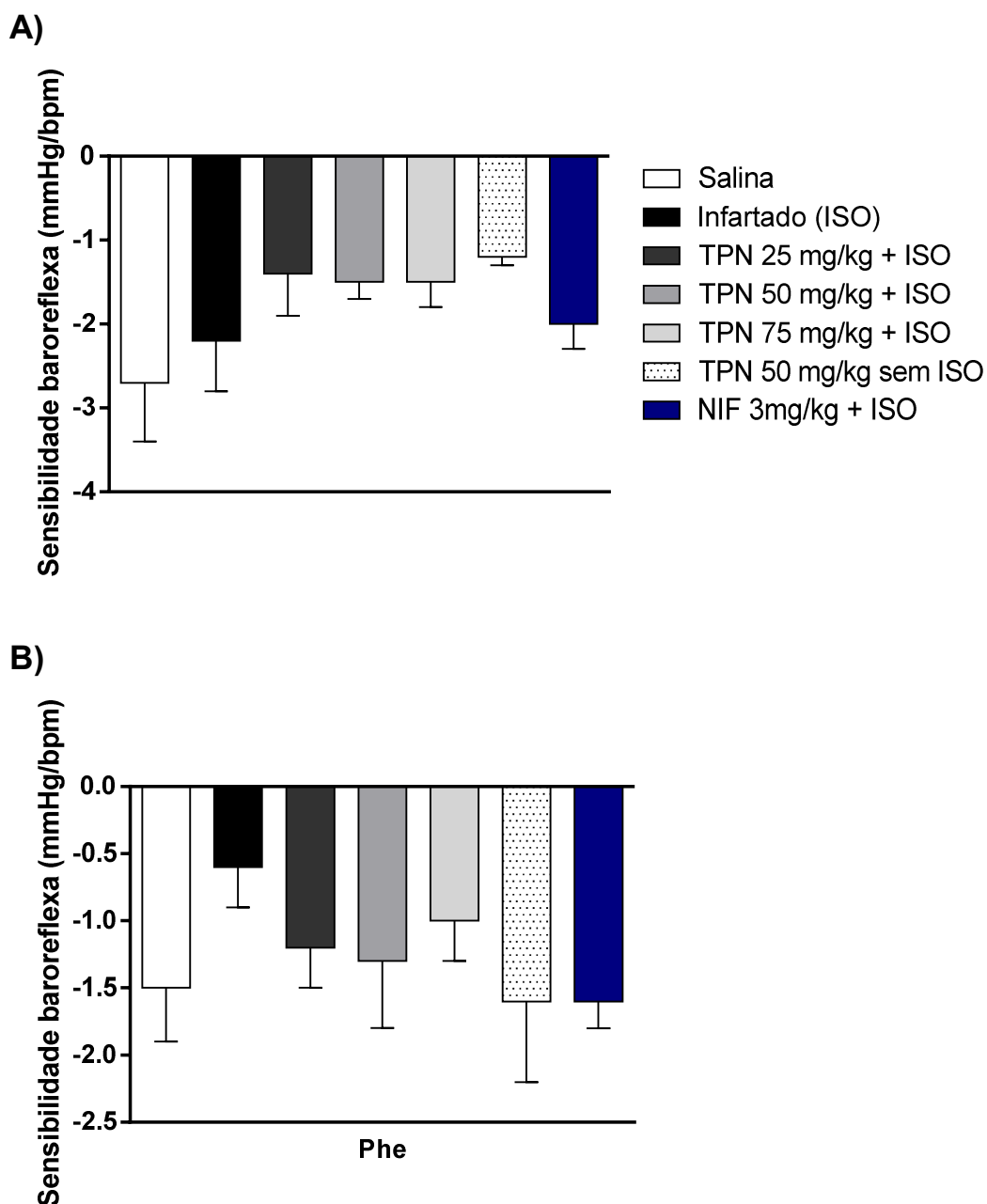
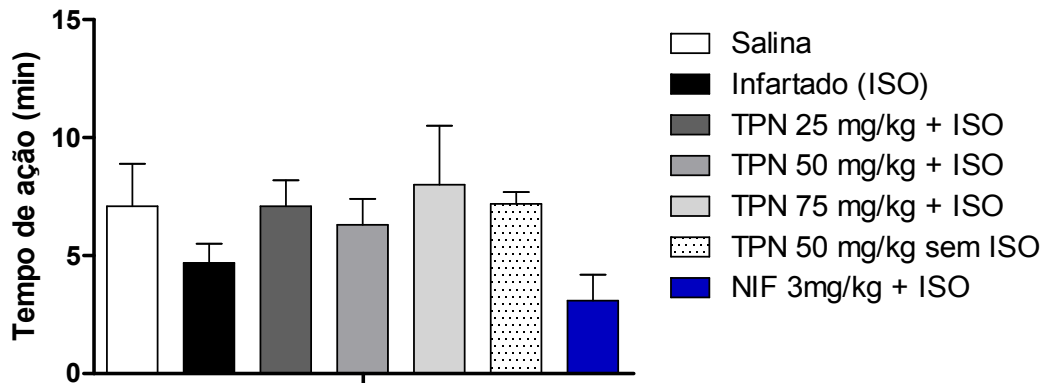


GRÁFICO 17- Sensibilidade baroreflexa frente à fenilefrina $8\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol ($85\text{mg}/\text{kg}$ 2x s.c) em ratos (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. WT=5/SHR=4

A)



B)

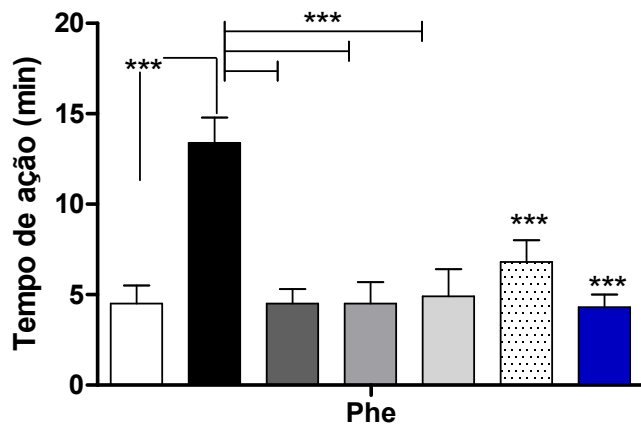


GRÁFICO 18- Tempo de ação da fenilefrina 8µg/kg i.v. no teste de sensibilidade baroreflexa após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. WT=5/SHR=4

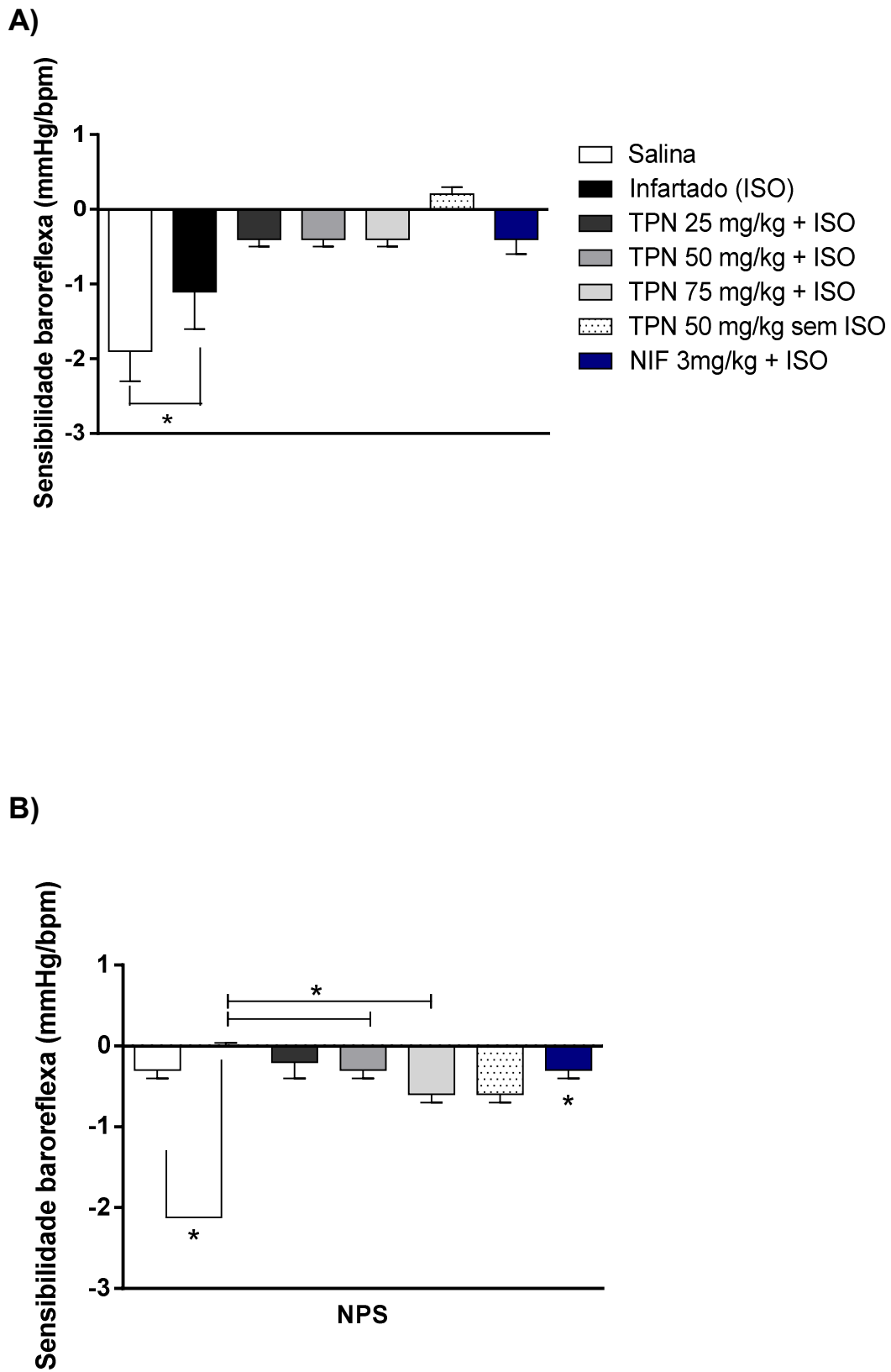


GRÁFICO 19- Sensibilidade baroreflexa frente ao nitroprussiato de sódio 50 μ g/kg i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. WT=5/SHR=4

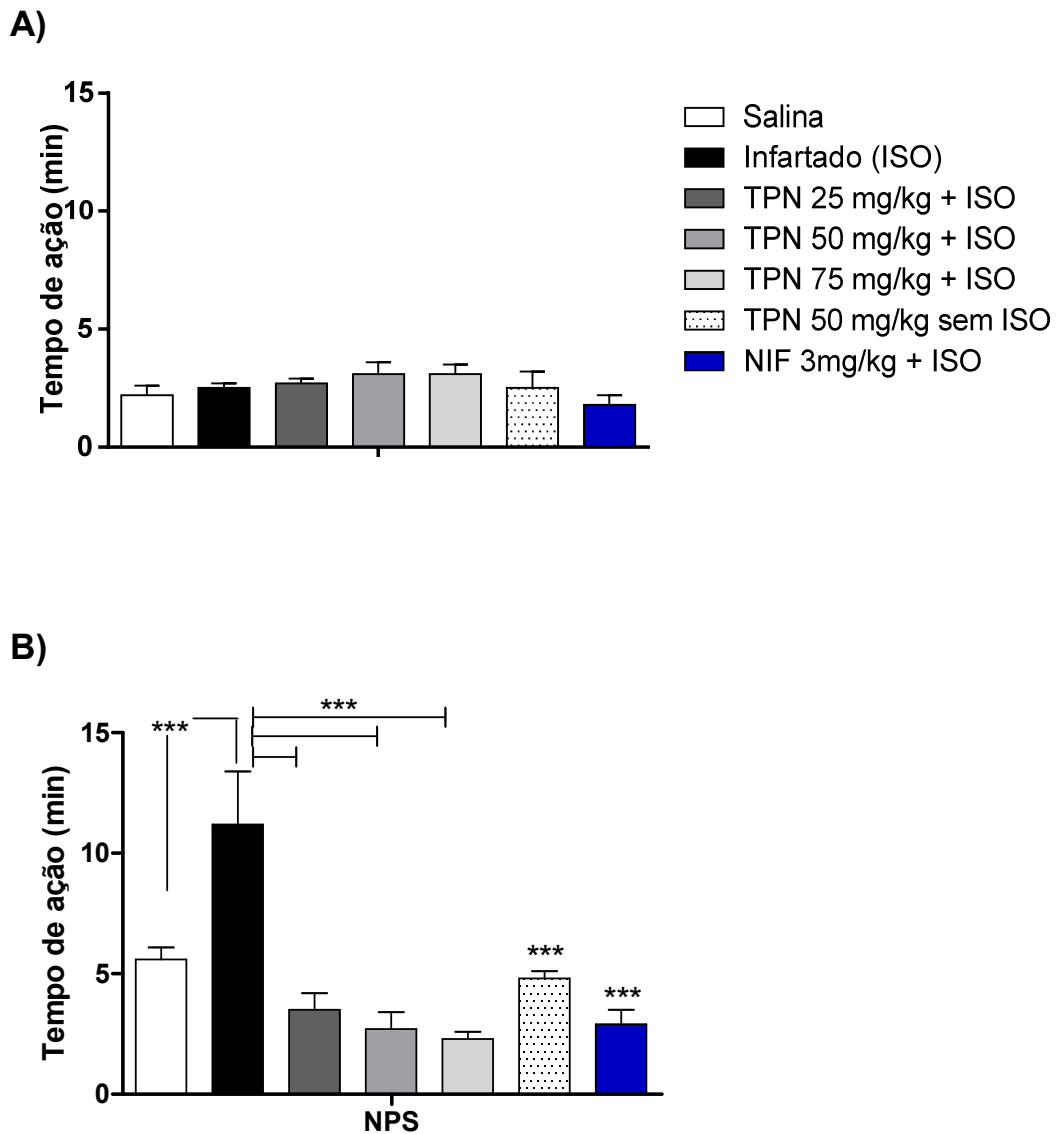


GRÁFICO 20- Tempo de ação do nitroprussiato de sódio 50 μ g/kg i.v. no teste de sensibilidade baroreflexa após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. WT=5/ SHR=4

5.4.2.7- Avaliação da resposta colinérgica pós-infarto agudo do miocárdio

A administração subcutânea de isoproterenol em ratos da linhagem wistar reduziu de maneira significativa as respostas pressóricas da acetilcolina $8\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. de ratos normotensos quando comparados ao grupo controle salina. (Gráfico 21, pág. 138). O pré-tratamento com TPN também induziu redução da reatividade pressórica frente à estimulação com acetilcolina em comparação ao grupo controle salina nas menores doses testadas em linhagens normotensas (Gráfico 21, pág. 138), mas não divergiu das respostas pressóricas de ratos normotensos e infartados quando comparados ao respectivo grupo infartado (Gráfico 21, pág. 138).

O tratamento com TPN $50\text{ mg}/\text{kg}$ na ausência de isoproterenol, não produziu alterações significantes na resposta pressórica da acetilcolina de ratos da linhagem wistar quando comparado ao controles infartado, mas foi diferente do grupo controle salina (Gráfico 21, pág. 138). Nifedipina obteve resposta colinérgica semelhante ao tratamento com TPN na presença de isoproterenol (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139).

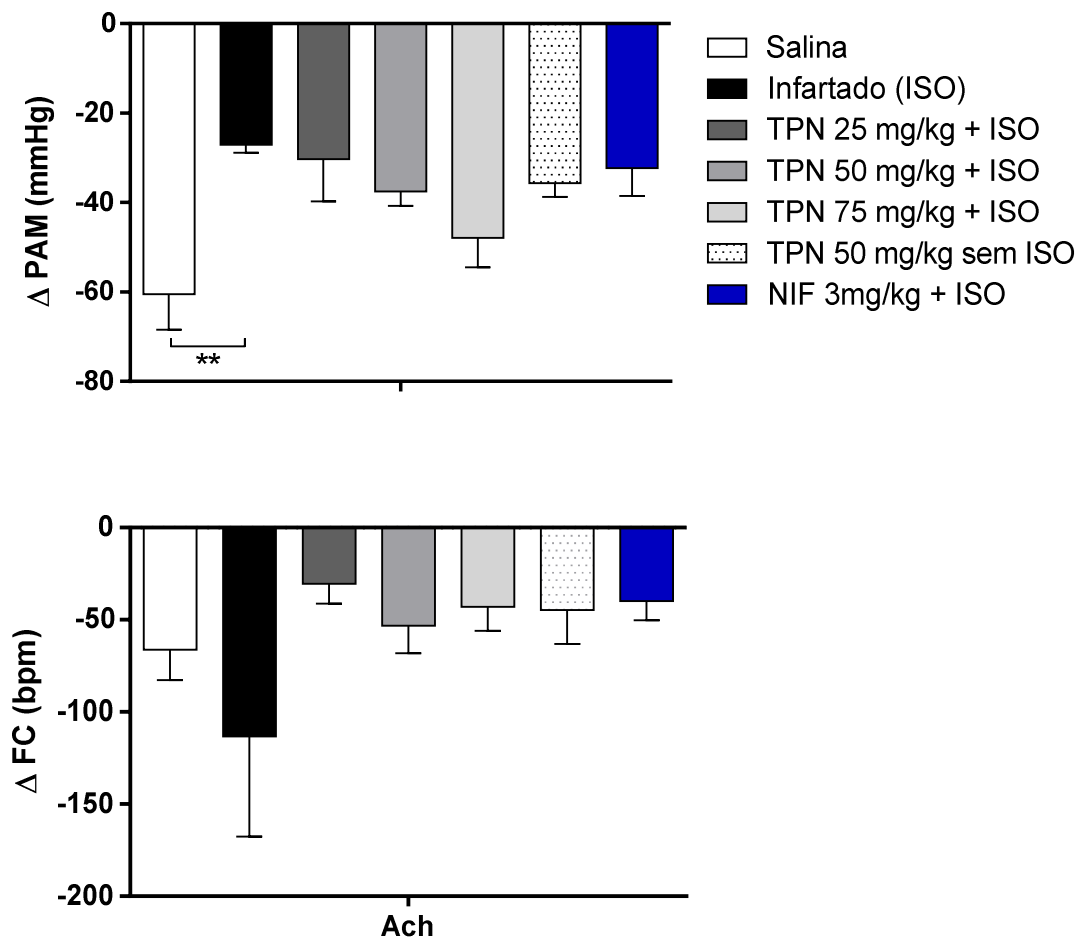
Em ratos da linhagem hipertensa, a administração de isoproterenol, não produziu quaisquer alterações significantes sobre as respostas pressóricas induzidas pela acetilcolina. (Gráfico 22 pág. 139). O tratamento prévio com TPN não alterou de modo significativo as respostas pressóricas induzidas por acetilcolina na presença de isoproterenol em ratos hipertensos (Gráfico 22 pág. 139). O tratamento com TPN $50\text{ mg}/\text{kg}$ na ausência de isoproterenol também não alterou a resposta pressórica em comparação aos seus respectivos controles experimentais salina (Gráfico 22 pág. 139).

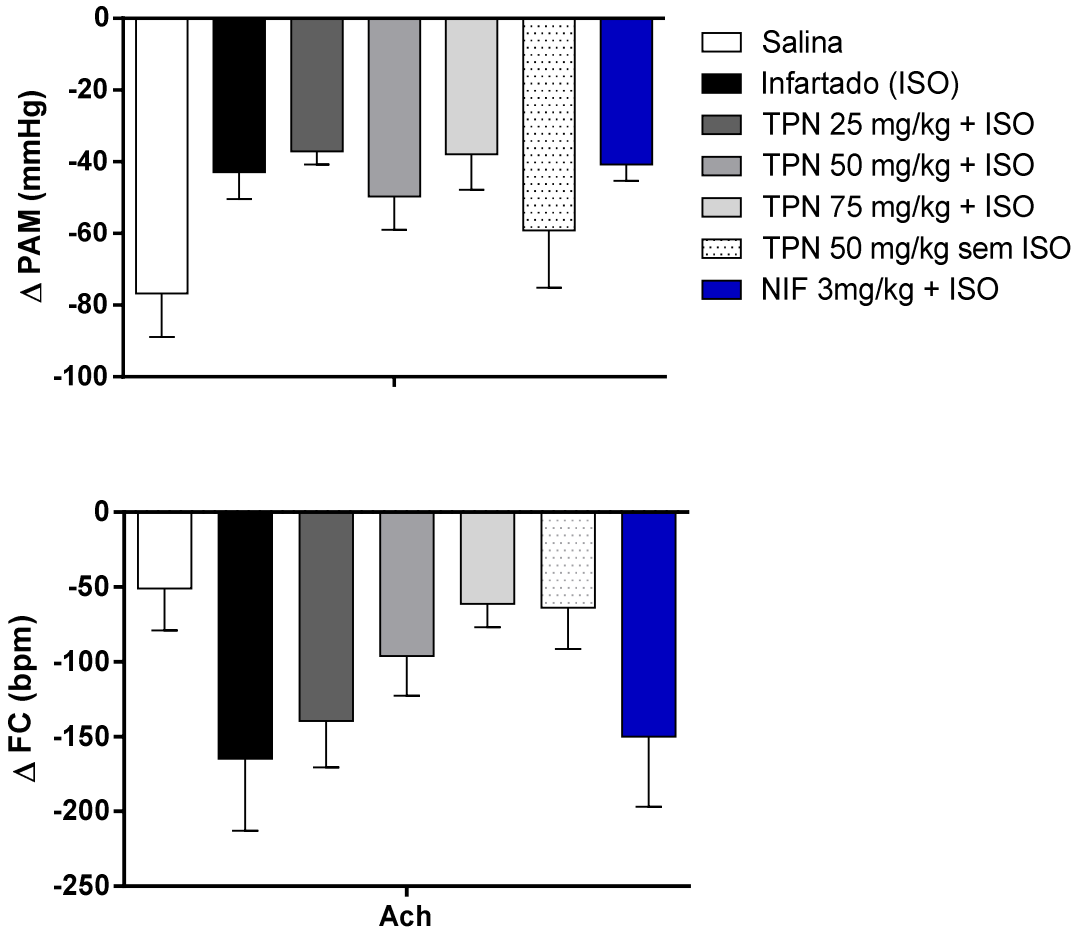
As respostas bradicárdicas induzidas por acetilcolina $8\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. não foram estatisticamente alteradas por isoproterenol em ambas as linhagens experimentais, (Gráfico 22 pág. 139). O tratamento prévio com TPN não alterou de modo significativo a bradicardia induzida pela acetilcolina na presença de isoproterenol em ambas as linhagens de ratos (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139). O tratamento subagudo com TPN $50\text{ mg}/\text{kg}$ na ausência de isoproterenol, também não causou mudanças significantes na bradicardia induzida por acetilcolina em ambas as linhagens experimentais (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139). Nifedipina também não foi capaz de induzir mudanças sobre a bradicardia induzida por acetilcolina em ambas as linhagens experimentais (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139).

Quando avaliado o tempo de ação da acetilcolina na reatividade cardiovascular, observa-se que isoproterenol não foi capaz de alterar o tempo de atividade colinérgica em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 23A e 23B pág. 140)

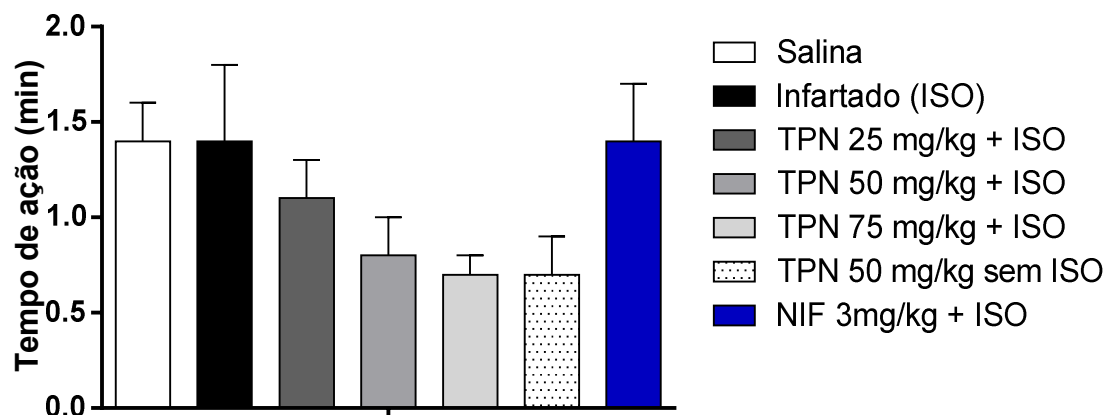
Porém, ao verificar o tempo de ação frente à acetilcolina $8\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. em ratos tratados com TPN na presença ou ausência de isoproterenol, observa-se uma redução significativa apenas em animais da linhagem espontaneamente hipertensa, em comparação aos seus respectivos controles (Gráfico 23B, pág. 140).

Nifedipina não foi capaz de induzir alterações significantes sobre o tempo de ação da acetilcolina na presença de isoproterenol em ambas as linhagens experimentais em comparação aos seus respectivos controles (Gráfico 23A e 23B, pág. 140).





A)



B)

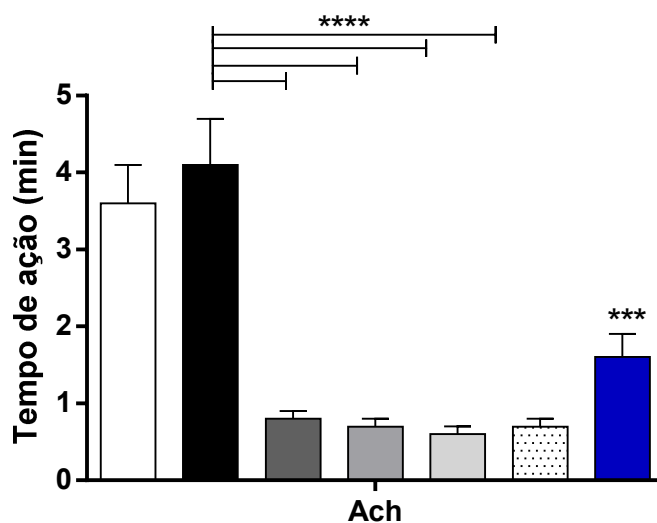


GRÁFICO 23- Tempo de ação da acetilcolina 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos (A) WT e (B) SHR. Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. WT=5/SHR=4

5.4.2.8- Avaliação das concentrações cardiovasculares de cálcio

O uso de isoproterenol subcutâneo foi capaz de produzir alterações significantes sobre os níveis de cálcio em ratos da linhagem wistar. A dosagem de cálcio demonstrou que isoproterenol diminuiu os níveis séricos de cálcio (gráfico 24A pág. 143) assim como, reduziu os níveis intracelulares de cálcio total em aortas (Gráfico 24C pág. 143) enquanto que aumentou os níveis intracelulares de cálcio total (Gráfico 24B, pág. 143).

Em ratos da linhagem wistar, o pré-tratamento com TPN na presença de isoproterenol inibiu a redução dos níveis séricos de cálcio de modo significativo nas menores doses testadas (Gráfico 24A pág. 143). O tratamento prévio com TPN interferiu nos níveis intracelulares de cálcio aórticos nas menores doses testadas (Gráfico 24C pág. 143). Em adição, o pré-tratamento com TPN na presença de isoproterenol inibiu de modo significativo o aumento nos níveis intracelulares de cálcio ventricular em todas as doses testadas de maneira independente de dose (Gráfico 24B pág. 143).

O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol causou redução significativa nos níveis intracelulares de cálcio ventricular em comparação aos respectivos controles em ratos da linhagem wistar (Gráfico 24B pág. 143). TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol também causou redução significativa nos níveis de cálcio nas aortas (Gráfico 24C pág. 143), bem como, reduziu os níveis séricos de cálcio (Gráfico 24A pág. 143).

Nifedipina produziu respostas semelhantes ao tratamento com TPN na presença de isoproterenol, reduzindo os níveis séricos de cálcio (Gráfico 24A pág. 143), também reduziu os níveis de cálcio sobre os ventrículos (Gráfico 24B, pág. 143), assim como, também reduziu os níveis intracelulares de cálcio sobre as aortas (Gráfico 24C, pág.143). Em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa, isoproterenol não alterou de modo significativo sobre os níveis séricos de cálcio (Gráfico 24D pág. 143). Mas, aumentaram de modo significativo os níveis de cálcio ventricular (Gráfico 24E, pág. 143), assim como, também aumentou os níveis de cálcio sobre as aortas (Gráfico 24F pág. 143).

O pré-tratamento com TPN foi capaz de aumentar de modo significativo os níveis séricos de cálcio na presença de isoproterenol, nas menores doses testadas em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 24D pág. 143). O tratamento prévio com TPN reduziu o aumento dos níveis de cálcio sobre as aortas na presença de isoproterenol em

todas as doses testadas de modo dependente de dose (Gráfico 24F pág. 143). O pré-tratamento com TPN aboliu o aumento dos níveis intracelulares de cálcio ventricular na presença de isoproterenol em todas as doses testadas de modo independente de dose (Gráfico 24E pág. 143).

O tratamento subagudo com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não produziu mudanças significantes sobre os níveis séricos de cálcio em comparação aos respectivos controles em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 24D pág. 143). Do mesmo modo, TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não produziu alterações significantes sobre os níveis de cálcio aórtico (Gráfico 24F pág. 143), assim como, não alterou os níveis de cálcio ventricular quando os níveis de cálcio eram comparados ao grupo controle salina (Gráfico 24E, pág. 143)

Nifedipina não alterou os níveis de cálcio sérico na presença de isoproterenol em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 24D pág. 143) e aboliu o aumento dos níveis intracelulares de cálcio em aortas de ratos espontaneamente hipertensos na presença de isoproterenol (Gráfico 24F pág. 143), do mesmo modo, aboliu o aumento dos níveis intracelulares de cálcio ventricular induzido por isoproterenol em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 24E pág. 143).

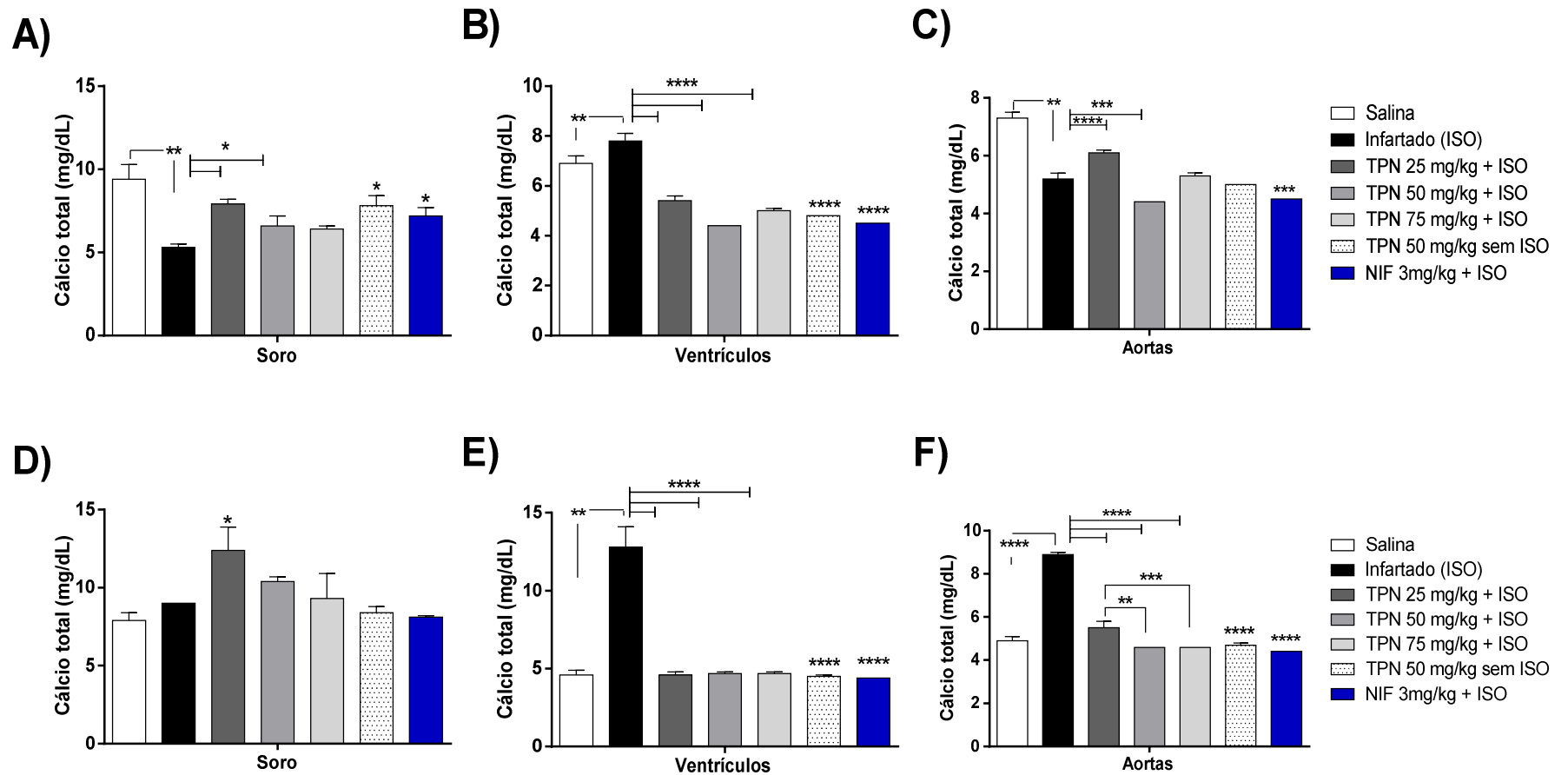


GRÁFICO 24 - Níveis de cálcio total após o infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) em ratos: WT (A) Soro (B) ventrículos (C) Aortas e SHR (D) Soro (E) ventrículos (F) Aortas . Análise estatística ANOVA one-way seguido de pos-teste Newman-Keuls. Considerados significativos quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$ (Infartado versus salina) ou (TPN versus infartado). $n = 5$

5.4.2.9- Efeitos cardiovasculares intravenosos induzidos por TPN

A administração intravenosa de TPN nas doses 1, 5 e 10 mg/kg em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados e não infartados induziu hipotensão e bradicardia nas maiores doses testadas. Os efeitos cardiovasculares induzidos por TPN ocorreram de modo dose dependente, tanto sobre a hipotensão quanto sobre a bradicardia (Gráfico 25 pág. 145). TPN também foi capaz de induzir efeito dose dependente sobre o tempo de ação na bradicardia induzida (Gráfico 25 pág. 145).

Em ratos hipertensos anestesiados (tiopental sódico 45 mg/kg i.p.) a hipotensão foi aumentada na maior dose (Gráfico 26 pág. 146), enquanto a bradicardia induzida foram significativamente alteradas nas menores (Gráfico 26 pág. 146). Na presença de hexametônio (20 mg/kg i.v.), houve alteração na hipotensão apenas na menor dose (Gráfico 27 pág.147), enquanto a bradicardia foi significativamente alterada nas duas primeiras doses (Gráfico 27 pág.147). Na presença de atropina (2 mg/kg i.v.), houve atenuação da bradicardia em todas as doses testadas, sem alterar a hipotensão induzida (Gráfico 27 pág. 147).

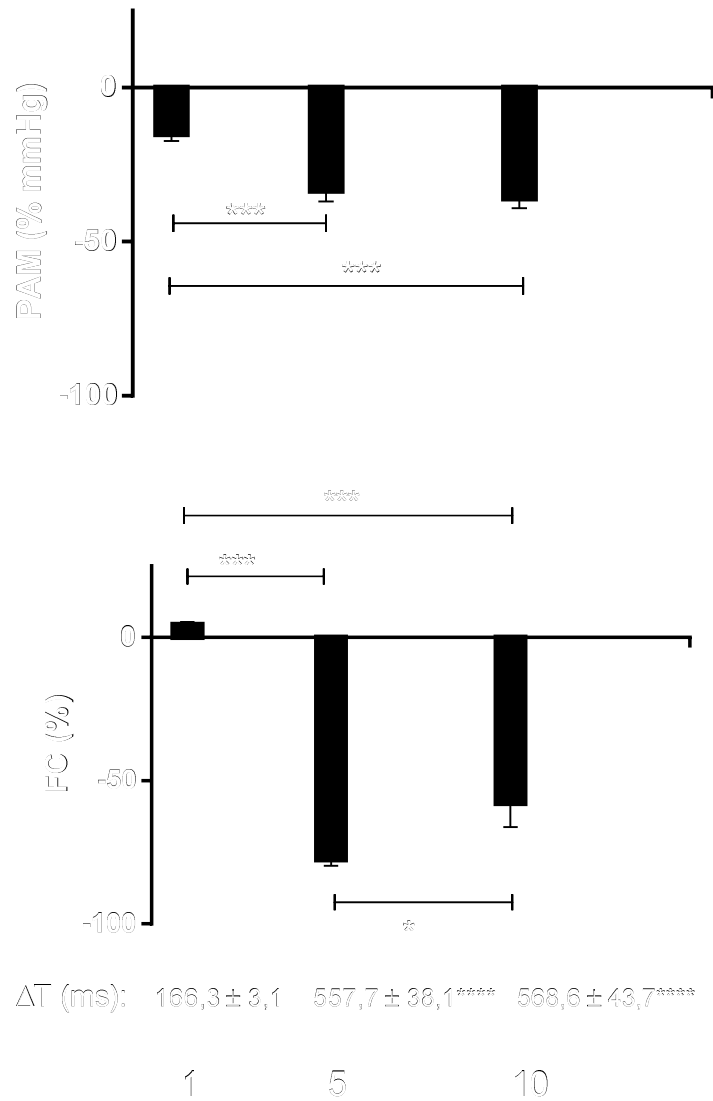


GRÁFICO 25- Efeitos cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados e não-infartados nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v. Os resultados são expressos em M± EPM e análise estatística ANOVA one-way seguido de Newmans-keuls considerados significante quando *p<0.05 **p<0.001 e ***p<0.0001. n=7

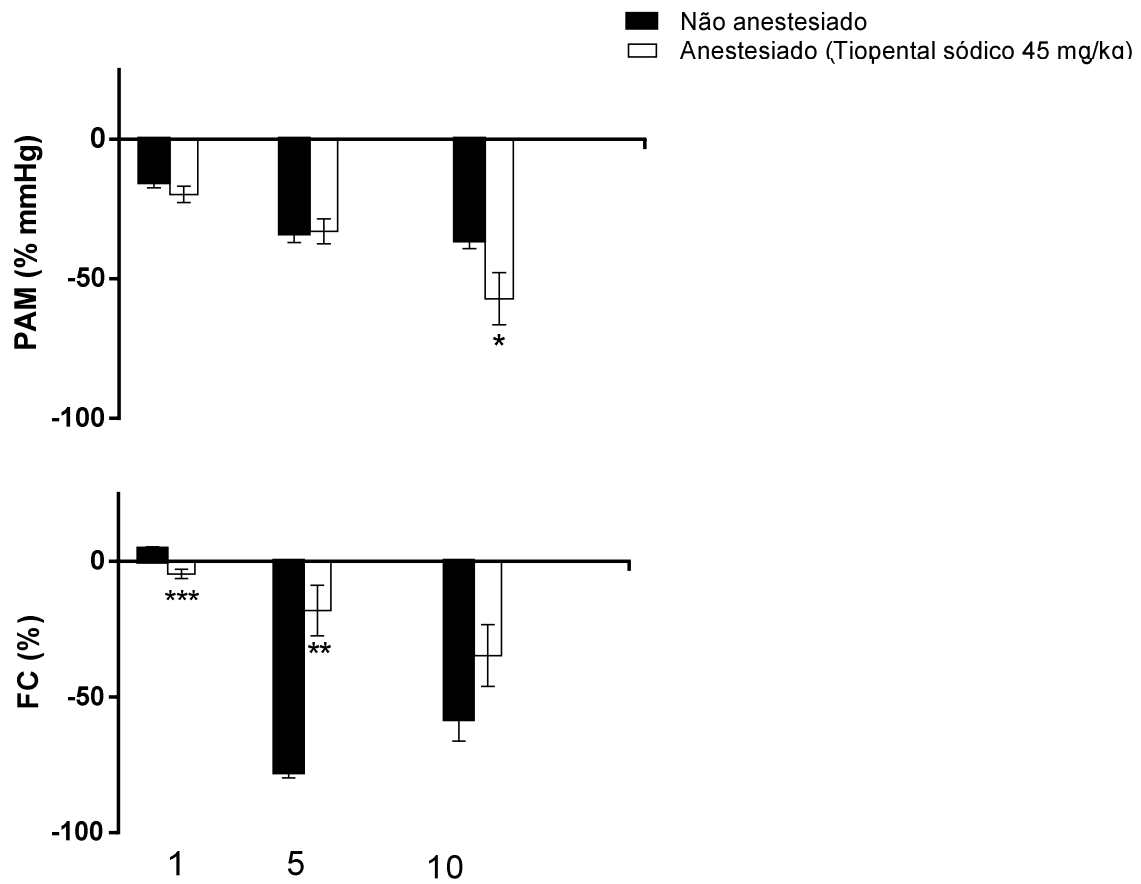


GRÁFICO 26- Efeitos Cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos não infartados e anestesiados nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v. Os resultados estão expressos em $M \pm EPM$ e análise estatística teste "t" student e considerados significante quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.0001$. $n=5$

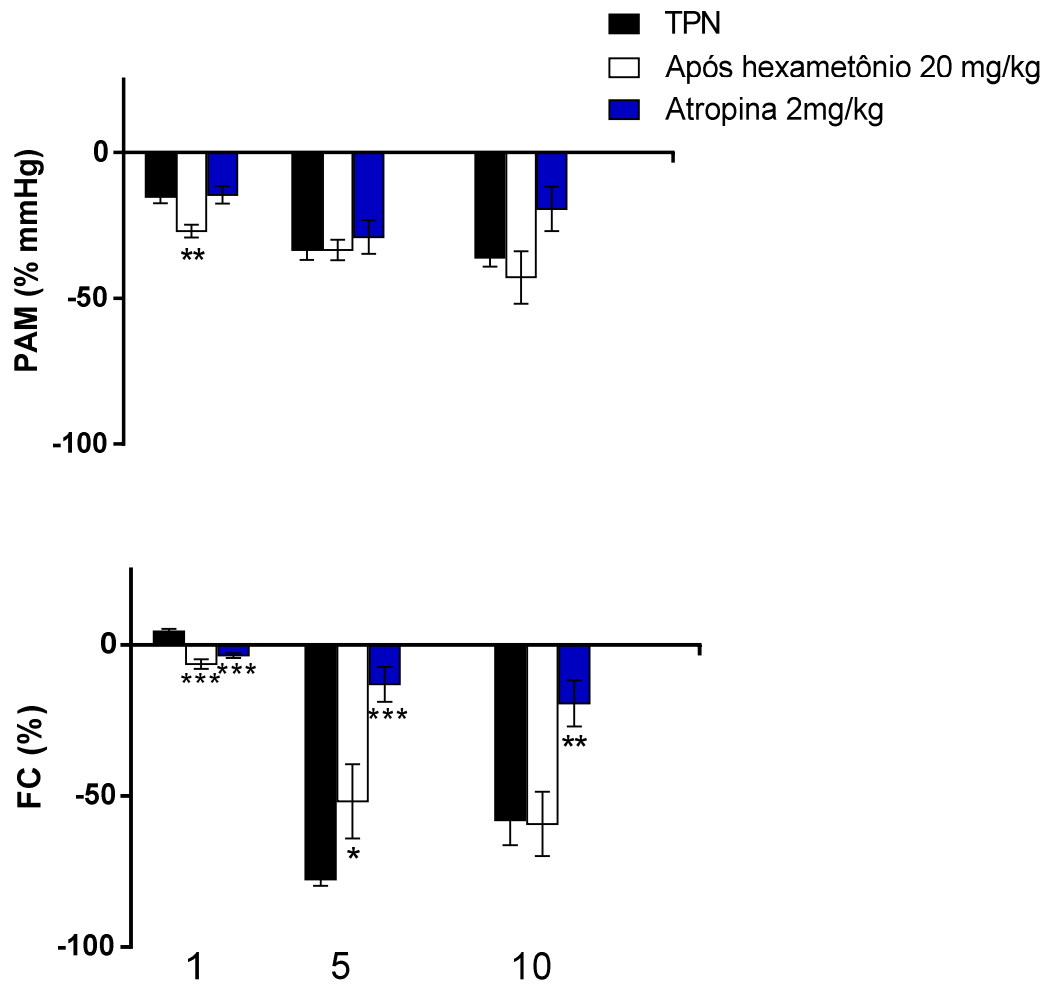


GRÁFICO 27 -Efeitos cardiovasculares induzidos por TPN em ratos espontaneamente hipertensos não-infartados após hexametônio (20 mg/kg i.v.) e atropina (2 mg/kg) nas doses 1, 5 e 10 mg/kg i.v. Os resultados estão expressos em $M \pm EPM$ e análise estatística teste "t" student e considerados significante quando * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.0001$. $n = 5$

5.4.2.10- Docking molecular do TPN em alvos cardíacos

Ao realizar ensaio *in silico*, verificou-se que TPN possui médio valor de hidrofobicidade, com $cLog P = 2,3$. No preparo gridbox molecular, TPN demonstrou em seu mapa eletrostático maior grau reativo na hidroxila livre situada na posição α da porção alifática ligada ao anel aromático (representada pela cor vermelha), devido à ligação orgânica do tipo simples (C-O \cdots H), conferindo menor grau de estabilidade e menor grau reativo, tornando-se mais susceptíveis as reações nucleofílicas, enquanto na porção aromática, houve menor grau reativo (representada pela cor verde) devido a presença de ligações duplas do tipo Π que conferem maior rigidez molecular e maior grau de estabilidade. Figura 22B, pág. 149.

O ensaio de docking molecular revelou que TPN apresentou energia de afinidade significativa para: albumina $= -7,7$ kcal/mol vs. $-8,5$ kcal/mol do ácido palmítico; também apresentou significativa energia de afinidade para NO sintase $= -7,1$ kcal/mol vs $-8,4$ kcal/mol de tetraidrobiopterina e de modo semelhante apresentou elevada energia de afinidade para o sítio dihidropiridínico de canais para cálcio voltagem dependente tipo L $= -4,8$ kcal/mol vs $-5,7$ kcal/mol da nifedipina, assim como para o receptor muscarínico tipo $M_2 = -6,9$ kcal/mol vs $-6,5$ kcal/mol da acetilcolina.

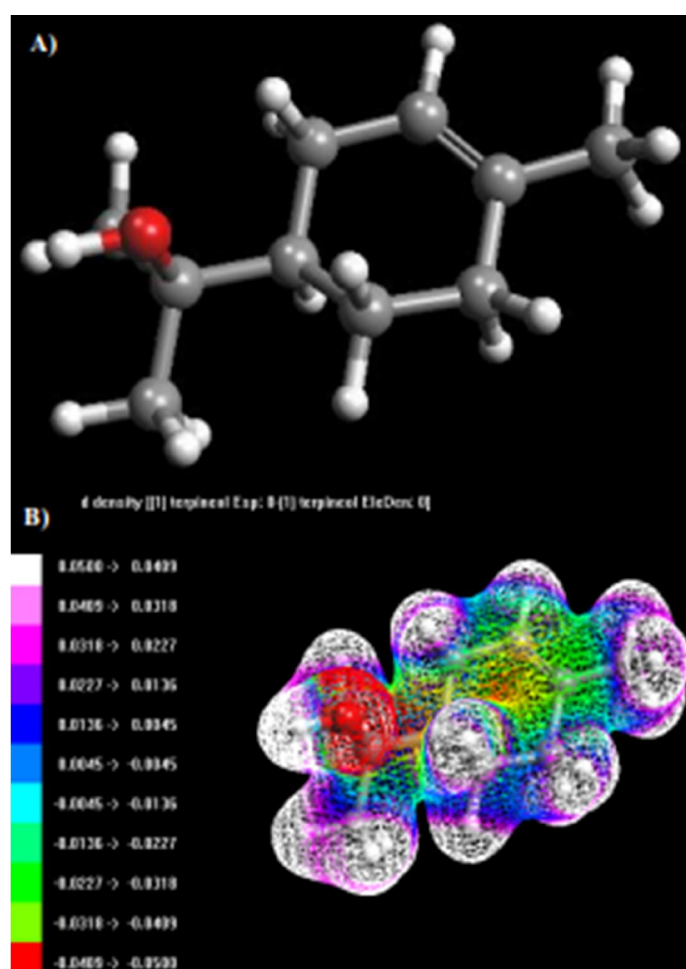
Quando analisado o tipo de ação produzida por TPN no receptor muscarínico, é possível observar que TPN atua preferencialmente como um agonista de receptores muscarínicos M_2 , devido à equiparável energia de afinidade do seu agonista muscarínico M_2 iperóxido ($-6,7$ kcal/mol) enquanto que a energia de afinidade se distancia do valor de afinidade eletrônica do antagonista de receptores M_2 atropina ($-11,5$ kcal/mol).

Ao observar as interações formadas pelo TPN no receptor muscarínico M_2 , verifica-se que TPN é capaz de interagir com os resíduos de aminoácidos: serina 107 (SER107), tirosina 430 (TYR 430), tirosina 104 (TYR 104) e tirosina 426 (TYR 426). Figura 31B, pág.150. Enquanto o agonista iperóxido interage com os resíduos de aminoácidos: tirosina 426A (TYR 426A) triptofano 400A (TRP 400A) e asparagina 404A (ASN 404 A). Figura 24A, pág.151.

Quando analisadas as interações que TPN é capaz de produzir no sítio dihidropiridínico de canais para cálcio voltagem dependente tipo L, verifica-se que TPN liga-se aos resíduos de aminoácidos: triptofano 52 (TRP 52), fenilalanina 19 (PHE 19) e fenilalanina 68 (PHE 68). Figura 23B, pág.150. Nifedipina estabelece interações entre

os resíduos de aminoácidos histidina 256 (HIS 256), fenilalanina 253 (PHE 253), alanina 249 (ALA 259) e isoleucina 477 (ILE 457) no sítio dihidropiridínico. Figura 23A, pág. 150.

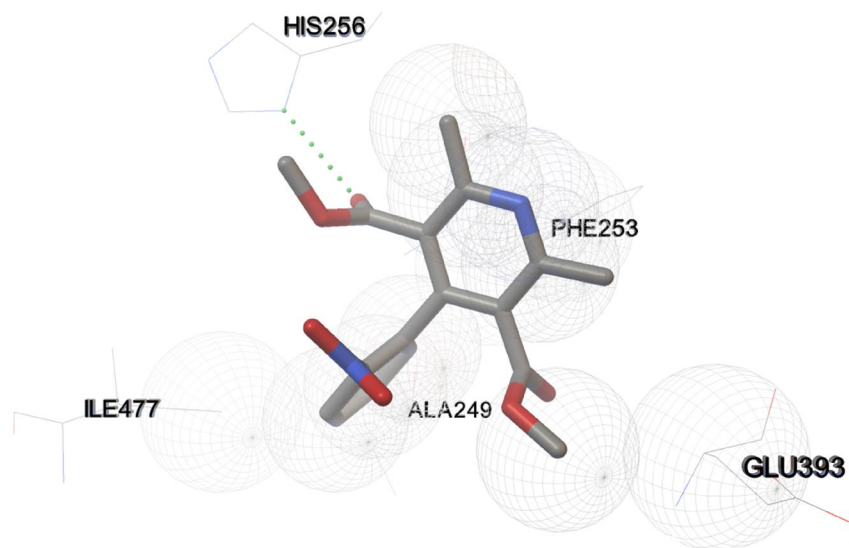
FIGURA 22- Docking molecular na análise do composto monoterpene. (A) Estrutura molecular do monoterpene (TPN) (B) Mapa eletrostático do monoterpene (TPN)



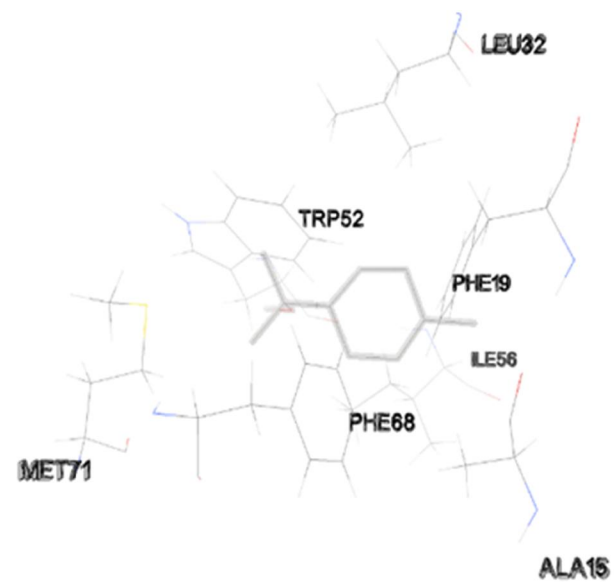
Fonte: Autor, 2019.

FIGURA 23- Docking molecular frente ao sítio de ação dihidropiridínico em canais para cálcio tipo L. (A) ligação molecular da nifedipina no sítio de ação dihidropiridínico (B) Ligação molecular do monoterpeno (TPN) no sítio de ação

A)

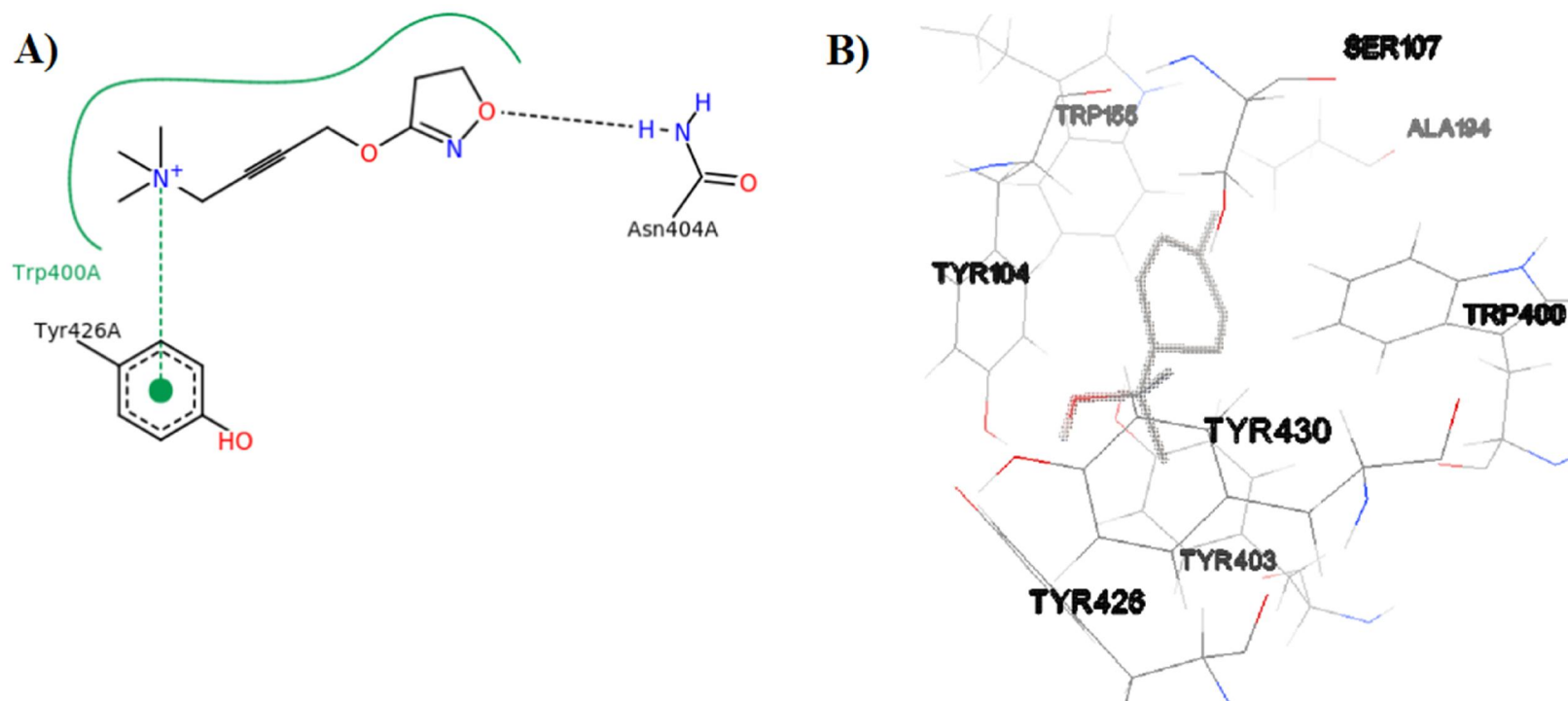


B)



Fonte: Autor, 2019.

FIGURA 24- Docking molecular frente ao sítio de ação em receptores muscarínicos M₂ de ratos. (A) ligação molecular do iperoxo no sítio de ação (B) Ligação molecular do monoterpreno (TPN) no sítio de ação.



Fonte: Autor, 2019.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs-se a avaliar a possível atividade cardioprotetora do monoterpeno TPN e seus mecanismos intrínsecos a atividade farmacológica, frente a um modelo de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol. Para isto foram utilizadas abordagens experimentais: *in vivo*, *in vitro*, *ex-vivo* e *in silico*.

A RDC 251/1997 do Conselho Nacional de Saúde orienta que em estudos pré-clínicos para desenvolvimento de moléculas candidatas a novos fármacos e seus protótipos, devem ser estudados os aspectos toxicológicos prévios como requisito de garantia para a segurança de medicamentos (CNS, RDC 251/1997). De acordo com Hansen & Bross 2010, o uso do ensaio de viabilidade celular em linhagens de células da imunidade são usadas como estratégia adotada para avaliar a toxicidade de novos fármacos (HANSEN & BROSS, 2010). Em adição, Postnikova e colaboradores, descreveram a proximidade entre as relações existentes nos ensaios de triagem de novos agentes terapêuticos baseados modelos de viabilidade celular *in vitro* com células primárias da imunidade com os efeitos toxicantes de fármacos em estudos clínicos (POSTNIKOVA et al., 2018).

Assim, atividade citotóxica do composto foi testada em culturas celulares de macrófagos da linhagem J774, para investigar ações tóxicas do composto, visando à inserção do monoterpeno avaliado como possível candidato a fármaco cardiovascular em posterior avaliação farmacológica em modelo *in vivo*

De acordo com a escala de citotoxicidade descrita na ISO 10993-5 de 1999, TPN variou sua resposta de maneira concentração dependente, na menor concentração testada demonstrou efeito não citotóxico (viabilidade celular > 90 %), enquanto na maior concentração testada revelou-se moderadamente citotóxico (viabilidade celular = 50-79 %) (ISO 10993-5, 1999). É válido ressaltar, que não foi possível determinar a $CI_{50\%}$ do composto, visto que os níveis de citotoxicidade não atingiram 100% de citotoxicidade nas concentrações avaliadas (gráfico 1 pág.77). Estes achados em conjunto corroboram que TPN, quando utilizado nas concentrações escolhidas no presente estudo, não esteja induzindo efeitos tóxicos significativos.

Com base neste resultado, a atividade cardioprotetora em testes *in vivo*, do TPN, no infarto agudo do miocárdio, em modelo de lesão por isquemia-reperfusão induzido por isoproterenol foi avaliada.

Deste modo, avaliou-se a capacidade do TPN induzir sobrevivência em ratos frente à indução de infartos produzidos com isoproterenol. Os resultados mostram que o tratamento com TPN aumentou a sobrevivência dos ratos normotensos (WT) e hipertensos (SHR) frente ao infarto induzido com isoproterenol.

A administração repetida de ISO em alta dosagem (85 mg/kg s.c. 2x) pode induzir infartos letais *in vivo* nos ratos, apesar do isoproterenol, ser considerado um método eficaz na busca por novas terapias experimentais por não produzir alta letalidade, apresentando $DL_{50} = 680$ mg/kg (RAHMATHULLA & DEVI, 2013; SADDIQUI et al, 2016). Nos testes *in vivo*, verificou-se que nos grupos controles infartados, houve um aumento de mortes induzidas pelo infarto com isoproterenol. Entretanto, o tratamento prévio com TPN foi capaz de aumentar de modo significativo o percentual de sobrevivência a letalidade induzida por isoproterenol nas doses testadas em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 2A e 2B, pág 79).

Nifedipina, um bloqueador dos canais para cálcio tipo L voltagem dependente, possui atividade cardioprotetora em modelo de infarto por lesões de isquemia-reperfusão em modelo *in vitro* Langendorff (NAYLER, 1990). Em nosso estudo, utilizou-se a nifedipina como grupo controle para o ensaio de cardioproteção, deste modo, elegeu-se a dose de 3 mg/kg, uma dose amplamente utilizada em estudos anti-hipertensivos (YAMANAKA et al., 1991; WANG et al., 2006). Nifedipina, também foi capaz de aumentar o percentual de sobrevivência aos infartos letais induzidos por isoproterenol em ambas as linhagens de ratos em comparação aos grupos infartados (Gráfico 2A e 2B, pág.79). O aumento na sobrevivência em testes *in vivo* aos infartos letais podem indicar que o TPN inibiu os agravos das lesões cardíacas produzidas pela catecolamina produzindo cardioproteção. O tratamento com TPN 50 mg/kg, na ausência de isoproterenol, não produziu alterações significantes no percentual de sobrevivência em comparação aos seus respectivos controles salina e infartados em ambas as linhagens de ratos (Gráfico 2A e 2B, pág 79).

Para verificar o efeito cardioprotetor induzido por TPN sobre o miocárdio, avaliou-se o grau e a extensão das lesões miocárdicas produzidas por isoproterenol no

teste colorimétrico trifeniltetrazólio. Já está descrito que a lesão isquêmica no coração produz morte celular dependente das vias mitocondriais (NING et al., 2000; MARIN-GARCÍA, et al., 2001). Assim, avaliações necropsiais, são uteis para verificar a magnitude dos infartos sobre o coração, sendo rotineiros em institutos de medicina legal (KOTABAGI et al.,2000; KAKIMOTO et al.,2013).

Também já é descrito que isoproterenol é capaz de induzir IAM, causando redução na área viável cardíaca por mecanismos de ativação de necrose celular, provocando alterações na funcionalidade mitocondrial e assim exercendo papel crucial no desenvolvimento patológico nas lesões de isquemia-reperfusão (SANCHÉZ et al., 1997).

Não obstante, o emprego da viabilidade celular dos cardiomiócitos com trifeniltetrazólio, tem sido largamente empregado em avaliações farmacológicas pré-clínicas de cardioproteção (MOHAN et al., 2010; AMAN et al., 2012; CHEN et al., 2015). Os sais de trifeniltetrazólio são incolores em soluções aquosas e são convertidos a formazan de maneira dependentes dos sistemas NADPH redutases mitocondriais, tornando-se uma solução vermelha. Células viáveis adquirem coloração vermelha que se depositam no citosol na forma de cristais insolúveis e representa o miocárdio remanescente viável, enquanto, que células degradadas, possuem o sistema oxido-redutases nas matrizes mitoncodriais desnaturados, assim, a conversão dos sais de trifeniltetrazólio não ocorrem, e as regiões de necróticas permanecem na coloração amarelo-pálidas ou brancas (KLEIN et al., 1981; KHALIL et al.,2006).

Os resultados obtidos demonstraram que TPN foi capaz de inibir o desenvolvimento de áreas de necrose de maneira dependente de dose em ambas as linhagens de ratos em comparação aos grupos de ratos infartados (Gráfico 5A e 5B, pág. 84). A Nifedipina também foi capaz de inibir a formação de áreas de necrose, reduzindo o percentual de área de necrose nas duas linhagens de ratos, em comparação aos grupos infartados (Gráfico 5A e 5B, pág. 84).

Ao analisar macroscopicamente, verificamos que os grupos salina em ambas as linhagens apresentam coloração vermelha em toda a extensão cardíaca transversal, enquanto que os grupos controles infartados de ambas as linhagens, apresentam áreas brancas ou amarelas que correspondem às áreas de necrose formadas durante as lesões

de isquemia-reperfusão, enquanto outras áreas permanecem em cor vermelha, correspondendo ao miocárdio remanescente. O tratamento prévio com TPN apresenta maior proporcionalidade de regiões vermelhas que amarelas, demonstrando a propriedade de inibir a formação de áreas de necrose em todas as extensões transversais cardíacas analisadas no sentido ápice-base (Figura 10 e figura 11, pág. 84). Os resultados apresentados pela nifedipina foram similares ao tratamento prévio com TPN na presença de isoproterenol (Figura 10 e figura 11, pág.85 Gráfico 5A e 5B, pág. 84).

O tratamento com TPN 50 mg/kg na ausência de isoproterenol, não produziu mudanças significantes sobre a viabilidade miocárdica quando comparados aos seus respectivos controles salina e infartado em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 5A e 5B, pág. 84). Os resultados acima apresentados indicam que o tratamento subagudo com TPN nas doses testadas, assim como, com a nifedipina, é capaz de reduzir tanto o grau de severidade quanto a extensão do infarto produzidos por lesões de isquemia-reperfusão induzidos por isoproterenol em modelo *in vivo* em linhagens de ratos normotensas e hipertensas, e ainda que haja uma relação de dose-dependência na cardioproteção induzida pelo TPN.

Já é apontado que isoproterenol é capaz de produzir alterações em microestruturas cardíacas, que são demonstradas em análises histopatológicas (RONA, 1985). É descrito que exposições frequentes de isoproterenol, é capaz de induzir as seguintes alterações na histoarquitetura cardíaca: aumento na invasão de leucócitos no miocárdio, degeneração e separação miofibrilar, edema, hemorragia miocárdica, e alterações degenerativas nucleares: picnose, cariorexe e cariólise, além de remodelamento hipertrófico cardíaco sem neogênese celular, como resposta adaptativa de sobrevivência às agressões de injúria isquêmica (WEXLER & JUDD, 1970; LOBO-FILHO, et al., 2011; RAMATHULLA, et al., 2013).

Os resultados histopatológicos apresentados neste estudo mostram que o infarto produzido por isoproterenol foi capaz de mimetizar todos os processos patológicos de lesões por isquemia-reperfusão, induzindo aumento na invasão de leucócitos nos miocárdios em comparação aos controles salina em ambas as linhagens experimentais, produzindo intensa miocardite, além disto, produziu degenerações e rupturas fibrilares, edema e alterações progressivas e degenerativas nucleares em lâminas de corações coradas com hematoxilina e eosina (Figura 12 e figura 13, págs. 87 e 88).

Ao realizar a contagem dos leucócitos totais, verificou-se que houve um aumento significativo sobre o número de polimorfos totais em comparação aos controles salina em ambas as linhagens experimentais (tabela 1 e tabela 2, pág. 89) o mesmo ocorreu quando quantificou-se a presença de núcleos em picnose (tabela 3 e tabela 4, pág.90) cariorrexe (tabela 5 e tabela 6, pág. 91) e cariólise (tabela 7 e tabela 8, pág. 92).

Os resultados do tratamento prévio com TPN mostram redução significativa em todos os parâmetros histológicos analisados nas doses testadas, quando na presença de isoproterenol, indicando que TPN foi capaz de prevenir as alterações sobre a histoarquitetura. O tratamento prévio com nifedipina, também foi capaz de inibir as alterações histológicas produzidas por isoproterenol.

Os resultados histopatológicos encontrados neste estudo foram similares aos estudos cardioprotetores de produtos naturais descritos na literatura (SHUKLA, et al., 2010; BRAMACHARI. et al 2014; OJHA, et al.,2016). Assim, algumas moléculas derivadas de produtos naturais têm atraído à atenção farmacêutica devido ao potencial cardioprotetor produzido frente ao infarto previamente induzido em avaliações pré-clínicas, prevenindo alterações histológicas.

Contudo, em humanos, os infartos são clinicamente diagnosticados com base na união de análises: laboratoriais (através da detecção de marcadores biológicos), eletrocardiográficas (através de alterações em ondas e segmentos elétricos cardíacos) hemodinâmicas e de imageamento (SBC, 2017; PANDEY & GUPTA, 2011).

Neste contexto, para avaliar o potencial cardioprotetor de TPN foram mensuradas as alterações sobre os marcadores bioquímicos, bem como sobre a atividade elétrica cardíaca e parâmetros hemodinâmicos após o infarto induzido com isoproterenol nas linhagens experimentais.

A Creatino-fosfoquinase é uma enzima formado por um conjunto de três isoformas. A CK-MB é mais abundante no músculo cardíaco e sua liberação em grandes quantidades no sangue está associado a morte de cardiomiócitos por lesões de isquemia-reperfusão no infarto do miocárdio, e por este motivo, é usada junto com a CK total (CK-NAC) no diagnóstico precoce do infarto do miocárdio desde a década de 1970. (WHITE et al., 1985). Apesar, de novas metodologias serem propostas para o diagnóstico prévio do IAM, o emprego da creatino-fosfoquinase total e MB

permanecem entre os métodos mais úteis, sensíveis e eficazes no manejo clínico e rotineiro do infarto nos últimos anos (CHAN & LEONG, 2010; MYTHILI & MALATHI, 2015; HAJAR, 2016).

De maneira análoga, o uso do isoproterenol como método de mimetizar o IAM em modelos experimentais tem se demonstrado eficaz no aumento da creatinofosfoquinase total e sua isoforma específica (CK-MB), em amostras sanguíneas de pequenos animais de laboratório (BERNAUER, 1978; LOBO-FILHO, et al., 2011; KOLMANOVÁ, et al., 2015). Por esta razão, creatino-fosfoquinase total e suas isoformas vem sendo exaustivamente utilizada como método de identificação farmacológica em estudos de atividade cardioprotetora de produtos naturais ou compostos sintéticos (WONG, et al., 2017).

Os resultados descritos neste trabalho mostraram que a indução com isoproterenol foi capaz de aumentar de modo significativo os níveis de creatinofosfoquinase total e isoforma MB em ratos das duas linhagens experimentais em comparação com seus respectivos controles salina, de modo similar aos achados na literatura (Gráfico 3 e 4 págs.80 e 82). O tratamento prévio com TPN foi capaz de inibir de modo significativo a liberação destes marcadores enzimáticos nos soros sanguíneos nas duas linhagens experimentais em comparação com seus respectivos controles infartados, demonstrando ação cardioprotetora (Gráfico 3 e 4 págs. 80 e 82). O tratamento prévio com TPN na ausência de isoproterenol não alterou de maneira significativa os níveis de creatinofosfoquinase total e MB em comparação com animais controles salina, revelando que o tratamento com TPN não produz lesões miocárdicas citotóxicas.

O tratamento subagudo com nifedipina também foi capaz de inibir a liberação destes marcadores de lesão cardíaca no soro das duas linhagens experimentais em comparação com seus respectivos controles infartados (Gráfico 3 e 4, págs. 80 e 82), evidenciando atividade cardioprotetora, corroborando com os estudos de NAYLER, et al., 1990 que demonstraram a ação cardioprotetora da nifedipina em modelo *ex vivo*.

O eletrocardiograma vem sendo considerado o exame de maior utilidade no diagnóstico rápido e precoce das lesões de injúria miocárdica (GOLDBERGER et al., 2018). As alterações eletrocardiográficas no infarto costumam caracterizar-se de acordo com a fase evolutiva e localização das lesões miocárdicas. Em função da fase evolutiva,

lesões de isquemia-reperfusão com duração inferior a 20 minutos de hipóxia/anoxia, costumam produzir alterações na onda T do eletrocardiograma, reduzindo a amplitude ou invertendo-se no plano elétrico (LUNA, et al. 2012). As Lesões miocárdicas mais persistentes iniciam mecanismos de reentrada e por este motivo, causam mudanças sobre o segmento ST do eletrocardiograma, que se caracteriza por depressão do segmento ST na derivatização DI e supradesnívelamento recíproco na derivatização DII no ECG, sendo comumente chamadas de imagens eletrocardiográficas em espelho (ZIMETBAUM, et al., 2003; O'GARA, et al., 2013).

A oclusão de ramos coronários com isquemia superior à 6 horas, costumam produzir o aprofundamento da onda Q, nas mesmas derivatizações que as alterações do segmento ST manifestam-se, e são consideradas um sinal de presença de necrose transmural, entretanto necroses com tempo de anoxia superior à 12 horas, iniciam processo de perda da onda R, alterando o intervalo R-R nas mesmas derivatizações. Entretanto, as alterações no intervalo R-R também podem representar alterações sobre o ritmo cardíaco e podem ser não patológico, portanto faz-se necessário avaliar o conjunto de alterações eletrocardiográficas, no intuito de identificar de modo precoce lesões por injúria, para melhor escolha do manejo clínico do infarto (ZIMETBAUM, et al., 2003; O'GARA, et al., 2013).

Outras alterações secundárias ao infarto podem ser vistos no eletrocardiograma, como: alterações sobre o ritmo sinusal, alterando a despolarização atrial que é marcada por alterações na amplitude e duração na onda P (LUNA, 2012) e bloqueios de condução caracterizados por ativação de mecanismos de reentrada desviando a condução do potencial de ação pós-infarto agudo do miocárdio, com mudanças sobre o intervalo P-R (SHAMROTH & BRADLOW, 1964; GINEFRA, et al., 2005; GOLDBERGER, 2006).

Em relação a sua localização, as alterações sobre derivatizações precordiais costumam ser mais precisas em relação à parede lesionada e profundidade das lesões. Entretanto, nas derivatizações periféricas as alterações no segmento ST usualmente ocorrem nas lesões isquêmicas da parede ventricular esquerda anterior se ocorrer: elevação no segmento ST nas derivatizações I e aVL associado à elevação do segmento ST em V2, indicando bloqueio no primeiro ramo diagonal, ou depressão do segmento ST em aVL, indicando oclusão do ramo distal na artéria coronária descendente

esquerda, bem como, elevação do segmento ST em aVR, indicando oclusão no ramo proximal septal da artéria coronária descendente esquerda (PANDEY & GUPTA, 2011).

As lesões isquêmicas ocorrem na parede ventricular esquerda inferior somente se: ocorrer elevação do segmento ST na derivatização DIII for maior que na DII, denotando, oclusão do ramo arterial circunflexo coronário direito ou se a elevação do segmento ST for maior na derivatização DII que na DIII, apontando oclusão do ramo arterial circunflexo coronário esquerdo (PANDEY & GUPTA, 2011).

Já está claramente descrito que isoproterenol é capaz de induzir infarto agudo do miocárdio mimetizando as alterações eletrocardiográficas previstas nas lesões de isquemia-reperfusão com ocorrência em humanos e em ratos (KELA, et al., 1980; YADAV, 2014).

Neste trabalho, observou-se que isoproterenol induziu alterações significantes sobre o eletrocardiograma em comparação com seus respectivos controles, compatíveis com as lesões de injúria do IAM (Tabelas 9-14, págs 97-102). Em relação à duração das lesões, o isoproterenol induziu lesões de isquemia, alterando a onda T, na derivatização DI no grupo infartado da linhagem wistar, e nas derivatizações DII, aVL, aVR e aVF no grupo infartado da linhagem espontaneamente hipertensos, entretanto, também produziu alterações no segmento ST, apresentando-se em espelho nas derivatizações DI e DII nas duas linhagens de ratos infartados, assim como, produziu o aprofundamento da onda Q patológica em DI nas duas linhagens de ratos infartados (Tabelas 9-14, págs 97 e 102).

Isoproterenol também foi capaz de produzir alterações secundárias no eletrocardiograma. No grupo de ratos infartados da linhagem wistar houve mudança sobre o ritmo sinusal, causando retardo sobre a despolarização atrial, visto na derivatização DII, enquanto em ratos infartados da linhagem espontaneamente hipertensos, houve parada sinusal, vistos pela ausência da onda P nas derivatizações DI, DII e aVF, atingindo o ponto isolétrico. Sobre o bloqueio átrio-ventricular, isoproterenol induziu retardo sobre condução no átrio-ventricular produzindo bloqueio de condução átrio-ventricular de grau I, infra hisiano, devido o retardo na passagem do potencial de ação do intervalo P-R na derivatização aVF do eletrocardiograma em

ambas as linhagens de ratos infartados comparado aos seus respectivos controles salina (Tabelas 9-14, págs. 97-102).

Em relação à localização, percebeu-se que isoproterenol induziu maior grau de lesão sobre a parede inferior esquerda em infatados da linhagem de ratos espontaneamente hipertensos devido à elevação de o segmento ST ter sido maior derivatização DIII que na DII. Enquanto em ratos infartados da linhagem wistar, não foi possível prever a localização dos infartos, pois não se observou elevação significativa na derivatização DIII.

O tratamento prévio com TPN foi capaz de inibir as alterações sobre o segmento ST do eletrocardiograma quando induzidos ao infarto em todas as doses testadas. TPN também reduziu de maneira significativa o aprofundamento da onda Q patológica, demonstrando efeito cardioprotetor nas lesões de injúria persistente. Entretanto, TPN não preveniu as alterações sobre a onda T na presença de isoproterenol (Tabelas 9-14 págs. 97 e 102).

Deste modo, verificou-se, que TPN foi capaz de prevenir as lesões de isquemia-reperfusão miocárdicas superiores a 20 minutos, mas não foi eficaz na prevenção de lesões com tempos inferiores. Contudo, faz-se necessários novos experimentos, com abordagens *ex-vivo* para melhor avaliação farmacológica do composto no ensaio tempo dependente.

O tratamento prévio com TPN também foi capaz de prevenir o bloqueio de condução átrio-ventricular de grau I induzido por isoproterenol. Portanto, TPN preveniu de maneira significativa o aumento do intervalo P-R na derivatização aVF, protegendo o coração de alterações sobre o ritmo cardíaco frente a indução de lesões de isquemia-reperfusão. Em relação ao ritmo sinusal, TPN demonstrou tendência em prevenir desbalanço sobre o ritmo sinusal, assim como, em prevenir a parada sinusal. No entanto, não foram estatisticamente significantes, nas doses testadas.

De modo similar, o tratamento com nifedipina foi útil na prevenção das lesões de isquemia-reperfusão prolongada induzida por isoproterenol e não preveniu as lesões isquêmicas breves. Nifedipina preveniu os desvios de condução átrio-ventriculares de grau I, corrigiu a desregulação do ritmo e reverteu a parada sinusal. E também inibiu a redução do intervalo R-R na presença de isoproterenol, inibindo a taquicardia induzida

pelo isoproterenol no infarto agudo do miocárdio (Tabelas 9-14 págs. 97 e 102). corroborando com o efeito cardioprotetor da nifedipina descrito por NAYLER et al, 1990.

Ainda, o tratamento prévio com TPN, na ausência de isoproterenol, não produziu alterações significantes no eletrocardiograma, mas reduziu a taquicardia induzida por isoproterenol no intervalo R-R, sem alterar o ritmo cardíaco.

Nos últimos anos, a proteína C reativa, uma mucoproteína produzida pelo fígado, liberada na corrente sanguínea e seus altos títulos nos órgãos, tem sido considerada um importante biomarcador para o infarto agudo do miocárdio na fase inflamatória (DEDOBBELEER et al, 2004; MARTINS et al, 2011; CHACKO et al., 2018), ao mesmo tempo que tem sido considerado um importante fator de risco para a isquemia miocárdica (COZLEA et al., 2013; CREA & MORROW, 2018).

De maneira similar, isoproterenol tem demonstrado a capacidade de elevar os níveis de proteína C reativa em ratos em associação à miocardite induzida no IAM mimetizado por este agonista β -adrenérgico (ZAAFAN, M et al, 2012; SHUKLA, et al, 2015). Por este motivo, os baixos níveis de proteína C reativa tem sido considerada um importante biomarcador nos estudos de cardioproteção de produtos naturais frente ao IAM induzido por isoproterenol (UPAGANLAWAR et al, 2011).

Os resultados deste trabalho mostram que isoproterenol foi capaz de induzir aumento significativo sobre os níveis ventriculares de proteína C reativa, demonstrando que houve indução de inflamação miocárdica associada ao IAM produzido pela administração subaguda de doses repetidas de isoproterenol em comparação aos seus respectivos controles salina (Gráfico 6, pág. 94). Estes resultados confirmam os resultados previamente mostrados na migração e invasão de polimorfos nucleares na contagem de leucócitos totais em miocárdios demonstrando a eficácia de isoproterenol induzir miocardite em ratos pelo método de infarto por isoproterenol (Tabelas 1 e 2 pág. 89).

O tratamento prévio com TPN preveniu o aumento dos níveis de proteína C reativa de modo significativo, nas doses testadas (Gráfico 6 pág. 94). Assim, demonstrase a eficácia de TPN em produzir cardioproteção na fase inflamatória do infarto induzido por isoproterenol. De modo similar, o tratamento subagudo com nifedipina

também reduziu de maneira significativa os níveis de proteína C reativa na presença de isoproterenol (Gráfico 6 pág. 94). O tratamento prévio com TPN na ausência de isoproterenol não produziu alterações significantes nos níveis de proteína C reativa quando comparados aos seus respectivos controles salina (Gráfico 6, pág. 94).

Estudos recentes têm apontado que as dislipidemias é um importante fator de risco para a doença isquêmica cardíaca, assim os altos níveis de colesterol total e triglicérides mostram-se desfavoráveis para o prognóstico cardíaco em humanos, aumentando os desfechos clínicos de mortalidade (ANAND et al, 2008; KIANI et al; 2016; RATHORE et al; 2018). O potencial protetor do TPN nestes fatores de risco, monitorando os níveis de colesterol total e triglicérides no soro dos ratos

Está descrito que isoproterenol é capaz de provocar desbalanço sobre o metabolismo glicídico e lipídico em ratos durante o desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio experimental (LIU et al, 2013; WONG et al, 2017). Já está claramente descrito que agonistas beta-adrenérgicos são capazes de aumentar a recirculação dos ácidos graxos devido ao estímulo lipolítico em adipócitos, graças à ação exercida em receptores β -adrenérgicos tipo III, ativando a fosfolipase como segundo mensageiro e consequente fosforilação da proteína kinase tipo A (PKA), e claro envolvimento dos canais para cálcio voltagem dependentes, aumentando o influxo citosólico de cálcio (PHILIPSON, 2002; SAMANI et al, 2016) e dos estoques intracelulares de cálcio, com envolvimento da ciclase de adenilil (AC) na reprogramação do metabolismo lipídico (MAUS et al., 2017).

Deste modo, os níveis lipídicos têm sido monitorados em estudos de atividade cardioprotetora de produtos naturais no modelo isoproterenol (UPAGANLAWAR et al, 2011; WONG et al, 2017). Em nosso estudo, isoproterenol foi capaz de induzir aumento nos níveis de colesterol total, quando comparados com seus respectivos controles salina. Do mesmo modo, a indução do IAM foi capaz de aumentar os níveis séricos de triglicérides em ratos ao serem comparados com seus respectivos controles salina (Gráfico 10 pág 111).

O tratamento prévio com TPN inibiu de modo significativo o aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides, em todas as doses testadas. Deste modo, TPN é capaz de atuar na prevenção dos fatores de risco para a doença isquêmica cardíaca,

demonstrando sua ação cardioprotetora, reduzindo o risco de mortalidade no estudo experimental (Gráficos 9 e 10, págs.111 e 112).

Ao mesmo tempo, o tratamento subagudo com TPN na ausência de isoproterenol não produziu quaisquer alterações sobre os níveis lipídicos, portanto, não alteraram de modo significativo as taxas de colesterol total ou triglicérides em nenhuma das linhagens de ratos em comparação com seus respectivos controles salina (Gráfico 9, pág.111).

Foi reportado recentemente, que nifedipina é capaz de reduzir a isquemia em camundongos obesos, melhorando a revascularização, devido à redução na recirculação lipídica vascular, promovida pelo bloqueio do influxo de cálcio em processos lipolíticos nos tecidos adiposos marrom (KITO et al, 2012).

Em nossos experimentos, nifedipina inibiu de modo significativo os níveis de colesterol total e triglicérides na presença da indução de infarto com isoproterenol em comparação aos animais infartados, os resultados foram similares aos estudos de KITO et al, 2012 que mostram redução dos níveis lipídicos em um modelo de isquemia induzido por dieta hipercalórica e foi complementar aos estudos cardioprotetores *ex-vivo* explicitados por NAYLER et al, 1990.

A prevenção do desbalanço sobre níveis lipídicos induzidos por TPN foram similares aos resultados da nifedipina. Estes efeitos em reduzir os níveis lipídicos podem ser correlacionados ao bloqueio do influxo de cálcio em canais para cálcio voltagem dependentes, inibindo a recirculação e desbalanço lipídico induzido por isoproterenol.

Também já está claramente descrito que após o IAM, o estímulo de reparo tecidual é ativada, induzindo a formação de hipertrofia cardíaca concêntrica, como mecanismo de adaptação, após o estímulo de agressão e defesa celular (ERTL & FRANTZ, 2005). Este mecanismo ocorre sem gênese de novos cardiomiócitos e deve-se a deposição de colágeno na matriz extracelular (JUGDUTT, 2003). Este mecanismo de hipertrofia cardíaca por remodelamento ventricular é considerado uma defesa às agressões de hipóxia/anóxia e previne a fatalidade no infarto. Porém, em longo prazo a hipertrofia cardíaca gera redução na complacência dos ventrículos e induz disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, produzindo morbidades e risco cardiovascular

(FRENCH & KRAMER, 2007; ZORNOFF et al, 2009; GALLI & LOMBARDI, 2016; AZEVEDO et al., 2016; HASSEL et al, 2017).

O infarto produzido por isoproterenol é capaz de mimetizar a hipertrofia cardíaca pós-infarto agudo do miocárdio, sem gênese de novos cardiomiócitos, com aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular (REMIÃO, 2002; LIAUDET et al, 2014). A disfunção ventricular do remodelamento cardíaco, contribui para a evolução da cardiomiopatia e induzem insuficiência cardíaca ao longo do tempo com envolvimento da ativação do sistema renina-angiotensina, aumentando a morbidade e mortalidade (SETHI & DHALLA, 1995; GRIMM et al, 1998; BROOKS & CONRAD, 2009; LOBO-FILHO et al, 2011).

Em nossos experimentos, isoproterenol também foi capaz de induzir aumento na morfometria dos ventrículos, produzindo hipertrofia ventricular esquerda (Gráficos 7 e 8, págs.105 e 106). Ao analisar os ventrículos em experimentos histológicos corados com tricrômio de gomori, um corante que evidencia a presença de colágeno da matriz extracelular, percebeu-se que houve aumento na deposição de colágeno intersiticial, em substituição das células cardíacas das áreas de necrose ventricular (Figuras 14 e 15 págs 107 e 108).

O tratamento prévio com TPN inibiu o aumento morfométrico, indicando prevenção da hipertrofia pós-infarto em comparação aos respectivos grupos infartados (Gráficos 7 e 8 págs. 105 e 106). O mesmo foi observado nos cortes histológicos corados com tricrômio de gomori, verificou-se que o tratamento prévio com TPN inibiu o desenvolvimento da fibrose induzida por isoproterenol, reduzindo o colágeno intersiticial da matriz extracelular (Figuras 14 e 15 págs. 107 e 108).

Do mesmo modo, o tratamento prévio com TPN na ausência de isoproterenol, não produziu alterações significantes na morfometria ventricular. Assim, evidencia-se que não houve desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em animais tratados com TPN na ausência de isoproterenol (Gráficos 7 e 8 págs. 105 e 106). Quando analisados os cortes histológicos dos ventrículos de ratos tratados com TPN na ausência de isoproterenol, não produziu aumento na deposição de colágeno na matriz extracelular em ambas as linhagens experimentais (Figuras 14 e 15, págs. 107 e 108).

O tratamento com nifedipina também foi capaz de prevenir as alterações na morfometria após o infarto induzido (Gráfico 7 e 8, págs. 105 e 106), Portanto, demonstrando que houve inibição da hipertrofia desenvolvida após o infarto induzido por isoproterenol. Ao analisar os cortes histológicos de ventrículos houve redução na deposição de colágeno intersiticial, reduzindo o grau de fibrose no remodelamento induzido (Figuras 14 e 15 págs. 107 e 108).

Estes resultados foram similares ao estudo descrito por Sandmann e cols, 2001, demonstrando que bloqueadores de canais para cálcio como mibefradil, verapamil e anlodipina, foram capazes de reduzir de maneira significativa o remodelamento cardíaco e a hipertrofia induzida e a insuficiência cardíaca pós-infarto (SANDMANN et al, 2001).

Após a verificação do efeito cardioprotetor do TPN, este trabalho objetivou-se em verificar quais os possíveis mecanismos de ação estavam relacionados à atividade cardioprotetora induzida por TPN. Diversos mecanismo de ação podem ser correlacionados com os efeitos cardioprotetores, em sua maioria devem-se a ação enzimática ou não enzimática antioxidante (DHALLA et al, 2000; PUGSLEY et al 2003; FARIÁS et al, 2017), ativação das vias mitocondriais, aumentando a fosforilação oxidativa e incremento sobre o metabolismo no ciclo de Krebs (CARREIRA et al, 2011; DONGWORTH et al, 2014; FORINI et al, 2015; PANEL et al, 2017), inibição das vias de apoptose e morte celular (LI et al, 2006; KOSHINUMA et al,2014) ou ações dependentes da ativação de alvos cardiovasculares (GARCÍA-DORADO et al, 2017; LEE et al, 2017; HAUSENLOY et al, 2017).

Em adição, diversos produtos naturais são capazes de ativar as vias de cardioproteção por múltiplos mecanismos demonstrando-se eficazes na cardioproteção produzida frente ao IAM induzido (UPAGANLAWAR et al, 2011; WONG et al, 2017). Assim nós avaliamos os mecanismos intrínsecos a ação cardioprotetora do TPN aqui descrita.

É claramente descrito que o IAM produz um aumento significativo na geração de espécies radiculares derivadas de oxigênio, assim como, espécies derivadas de nitrogênio (SIMPSON & LUCCHESI 1985; ZWEIER & TALUKDER, 2006; VERNARDOS et al, 2007). De modo similar, isoproterenol é capaz de induzir o aumento de espécies radiculares durante o desenvolvimento de infarto em

cardiomiócitos isolados e em animais de laboratório (ZHANG et al, 2005; REMIÃO et al, 2002; BOVO et al, 2012; BOVO et al, 2015). Em contrapartida, os compostos antioxidantes foram apontados por desempenharem importante papel na cardioproteção frente à injúria de reperfusão miocárdica através do sequestro de espécies radicalares (JEROUDI et al, 1994).

Assim, avaliou-se o potencial sequestrador de espécies radicalares induzido por TPN em testes *in vitro*, demonstrando sua ação antioxidante. Entretanto, as associações dos resultados dos testes *in vitro* revelam que TPN possui reduzida atividade sequestradora radicalar e por tanto pouco efeito antioxidante. Assim nós refutamos a hipótese do TPN possuir significativa ação antioxidante como mecanismo proposto para os efeitos cardioprotetores aqui demonstrados.

Em comparação os diversos compostos naturais testados no modelo *in vitro* que possuíam atividade cardioprotetora descrita na literatura (KAGLI et al, 2005; TAN et al, 2005; HO et al, 2014; LI et al, 2013; PRINCE et al, 2009; RYU et al, 2016), obtiveram efeitos antioxidantes superiores ao induzidos por TPN, deste modo a evidência da ação antioxidante induzida por TPN em desempenhar papel fundamental no efeito cardioprotetor do TPN no estudo *in vivo* aqui explicitado torna-se baixa ou nula.

Diante desta premissa, resolvemos avaliar as repercussões cardiovasculares produzidas por TPN na presença ou ausência do isoproterenol após o tratamento subagudo. Já é reportado na literatura que isoproterenol é uma catecolamina sintética, que farmacologicamente ativa receptores beta-adrenérgicos (MARTINSSON et al, 1989) e assim, produzem a reduzem a pressão arterial devido sua ação vasodilatadora reduzindo a resistência periférica total, mediada por receptores β_2 adrenérgicos (KIEFFER & ABEL, 2016) e aumentam o débito cardíaco devido ao aumento da frequência cardíaca pela indução de efeitos cronotrópicos, inotrópicos, dromotrópicos e lusitrópicos positivos no coração, mediados por receptores $\beta_{1,2}$ adrenérgicos (AVERIN et al, 2010; ENGELHARDT & AHLES, 2014; KIEFFER & ABEL, 2016).

O aumento sobre a frequência cardíaca induzida por isoproterenol desenvolve papel fundamental na sobrecarga de cálcio e trabalho cardíaco extenuante e, portanto exercem papel crucial na lesão de isquemia-reperfusão induzida por isoproterenol

(BLOOM & DAVIS, 1972; LOHSE et al, 2003; BRUM et al, 2006; RAMATHULLA & DEVI, 2013).

Em nossos experimentos, a administração subcutânea de isoproterenol reduzindo a pressão arterial média, sistólica e diastólica e aumentou a frequência cardíaca, comparados aos seus respectivos grupos controles salina (Gráficos 12 e 13, págs. 118 e 119), isto se deve à atividade β_2 adrenérgica vascular, reduzindo a resistência periférica total. Isoproterenol, também foi capaz de induzir aumento na frequência cardíaca (Gráficos 12 e 13, págs. 118 e 119) estes efeitos são atribuídos as atividades cronotrópicas, inotrópicas, dromotrópicas e lusitropicas positivas induzidas por isoproterenol.

O tratamento prévio com TPN não produziu alterações significantes nos valores pressóricos duas linhagens experimentais, na presença de isoproterenol quando comparados aos respectivos controles infartados (Gráficos 12 e 13, págs. 118 e 119). Entretanto, apresentaram redução nos parâmetros pressóricos em comparação com os grupos controles salina (Gráficos 12 e 13, págs. 118 e 119). Estes efeitos são oriundos da ativação beta-adrenérgica induzida por isoproterenol. Contudo, o tratamento prévio com TPN inibiu de maneira significativa o aumento da frequência cardíaca induzida por isoproterenol (Gráfico 12 e 13, págs. 118 e 119). Estes resultados mostram a capacidade do TPN em modular ações cardíacas, impedindo ativação do cronotropismo, inotropismo, dromotropismo e lusitropismo positivo induzido por isoproterenol.

O tratamento subagudo com TPN na ausência de isoproterenol induziu redução na pressão arterial em ratos normotensos, assim como, produziu efeito anti-hipertensivo em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa em comparação com seus respectivos controles salina (Gráfico 12 e 13 págs. 118 e 119).

O tratamento subagudo com nifedipina, um bloqueador de canais para cálcio clinicamente usado no tratamento da hipertensão arterial, não produziu alterações significantes na pressão arterial quando comparados com ratos controles infartados (Gráfico 12 e 13 págs. 118 e 119), entretanto inibiu de modo significativo o aumento da frequência cardíaca na presença de isoproterenol (Gráfico 12 e 13, págs 118 e 119). Estes resultados revelam inotropismo negativo induzido por bloqueadores de canais para cálcio, descritos na literatura (EZZAHER et al, 1991; PUNT et al, 1998; BLOCH, 2017). Também é descrito que bloqueadores de canais para cálcio produzem ações

cardioprotectoras devido ao inotropismo produzido em cardiomiócitos (SCHWINGER et al, 1990; SANDMANN et al, 2001).

O sistema baroreflexo é notavelmente um mecanismo fisiológico de rápido ajuste e controle da pressão arterial (GUYNET, 2006; VALENTI et al, 2010). Também é claramente conhecido que a hipertensão arterial e o infarto agudo do miocárdio são capazes de induzir de modo significativo falhas na ativação do sistema baroreflexo em modelos experimentais, produzindo redução na efetividade dos controles hemodinâmicos (DOWARD et al, 1985; FLUCKIGER et al, 1985; KRÜEGER et al, 1997; KAWADA et al, 2014; AIRES et al, 2017). As falhas na ativação baroreflexa são apontadas como preditores para os desfechos clínicos correlacionados à mortalidade após o IAM, devido a redução do tônus autonômico produzido pelo infarto (LA ROVERE et al, 1998).

Os estudos de Zengh et al, 1999 demonstram que ratos hipertensos possuem severa disfunção baroreflexa, devido a hiperativação do sistema nervoso autonômico simpático, responsável pela manutenção da hipertensão espontânea e consequente depressão das respostas colinérgicas, afetando a sensibilidade do sistema baroreflexo, controle da pressão arterial e variabilidade cardíaca (ZENGH et al, 1999).

Krüger e cols, 1997 foram reafirmados por Aires et al, 2017, onde mostram que no infarto do miocárdio, há severa lesão sobre os barorreceptores cardíacos e aórticos no sistema cardiovascular, prejudicando a ativação do controle autonômico cardiovascular, a disfunção baroreflexa gera descontrole dos parâmetros pressóricos e consequente evolução do infarto para a mortalidade (KRÜEGER et al, 1997; AIRES et al, 2017). Nossos estudos corroboram com os estudos de Zengh e Aires, revelando que possuem menor controle do sistema baroreflexo, produzindo menor sensibilidade do baroreflexo na presença de estimuladores farmacológicos do sistema baroreflexo.

Em nosso estudo, observamos que o infarto produzido por isoproterenol não foi capaz de produzir alterações sobre o ganho bradicárdico induzido pela administração intravenosa de fenilefrina, um agonista de receptores adrenérgicos, assim não houve redução na sensibilidade do sistema baroreflexo induzida pelo infarto com isoproterenol em ambas as linhagens experimentais (Gráfico 17 pág. 133). Entretanto, quando observado o tempo de ação dos efeitos cardiovasculares induzidos por fenilefrina, verificamos que houve um retardo sobre o efeito cardiovascular adrenérgico, quando

comparado aos respectivos controles salina apenas em ratos espontaneamente hipertensos (Gráfico 18 pág. 134).

Quando investigado o ganho taquicardico induzido pela administração de nitroprussiato de sódio, um nitrovasodilatador que doa de modo espontâneo óxido nítrico, verificou-se que houve significativa redução sobre a sensibilidade do sistema baroreflexo, induzindo redução sobre o ganho taquicardico. Ao observar o tempo de ação dos efeitos cardiovasculares produzidos por nitroprussiato de sódio, também verificamos que em animais infartados houve um retardo significativo apenas em ratos espontaneamente hipertensos (Gráficos 19 e 20 págs. 135 e 136).

O tratamento prévio com TPN não foi capaz de prevenir alterações significantes sobre as falhas do sistema baroreflexo, tanto na presença da administração intravenosa de fenilefrina, quanto do nitroprussiato de sódio (Gráficos 17 e 19 págs. 133 e 135). Contudo, preveniu o retardo das respostas cardiovasculares produzidos pelos agentes farmacológicos em ratos infartados e hipertensos (Gráficos 18 e 20 págs. 134 e 136).

Nossos estudos corroboram com os estudos de Ribeiro, 2012 quando analisadas as melhoras sobre o baroreflexo, entretanto, na presença de infarto, TPN foi incapaz de prevenir de modo significativo a disfunção baroreflexo. O tratamento com nifedipina não foi capaz de produzir melhoras no sistema baroreflexo no infarto com isoproterenol tanto na presença de fenilefrina (Gráficos 17 e 18 págs. 133 e 134) quanto na presença de nitroprussiato de sódio (Gráficos 19 e 20, págs. 135 e 136).

Para melhor avaliar a integridade ou disfunção no sistema autonômico colinérgico no infarto agudo do miocárdio experimental, avaliamos as respostas cardiovasculares colinérgicas mimetizada pela administração intravenosa de acetilcolina. Verificamos que a resposta pressórica induzida por acetilcolina foi significativamente reduzida na presença do infarto em ratos da linhagem normotensa e infartada, mas não foi estatisticamente diferente sobre ratos infartados e hipertensos (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139). Quando analisada a resposta cardíaca, verificamos que o infarto não alterou de modo significativo a bradicardia induzida por acetilcolina em ambas as linhagens de ratos (Gráficos 21 e 22 págs. 138 e 139). Em relação ao tempo de ação da acetilcolina intravenosa não houve alteração significativa (Gráfico 23 pág. 140). Os resultados sugerem que o infarto por isoproterenol não produziu disfunção colinérgica nos ratos, porém a redução no tempo de ação da acetilcolina de

ratos tratados com TPN indica possível ocupação dos receptores muscarínicos, que foram confirmados no ensaio *in silico*.

TPN não alterou de maneira significativa as respostas cardiovasculares da acetilcolina, na presença ou ausência do infarto por isoproterenol (Gráficos 21 e 22, págs. 138 e 139). Porém, reduziu de modo expressivo e significativo o tempo de ação das respostas cardiovasculares induzidas por acetilcolina na presença ou ausência do infarto induzido por isoproterenol em ambas às linhagens de ratos (Gráfico 23 pág. 140). O tratamento subagudo com nifedipina não produziu alterações significantes nas respostas cardiovasculares produzidas por acetilcolina intravenosa, tanto sobre a hipotensão e bradicardia induzida quanto sobre o tempo de ação em ratos normotensos e infartados (Gráficos 21, 22 e 23, págs. 138, 139 e 140), em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa e infartada, nifedipina reduziu apenas o tempo de ação da acetilcolina, sem alterar os parâmetros pressóricos ou cardíacos (Gráfico 23 pág. 140).

É estabelecido que o IAM induz disfunções endoteliais em ratos (CHEN et al, 2011; KANDHAI-RAGUNATH et al 2016), alterando a morfologia em grandes vasos (KONG et al, 2013) e a funcionalidade de pequenas artérias, tornando artérias mesentéricas hiporeativas e artérias coronárias hiperreativas (STASSEN et al, 1997; COUTO et al, 2012)

Ao analisar os cortes histológicos de aortas torácicas, observou-se que houve aparente aumento no diâmetro do lúmen aórtico após o infarto induzido por isoproterenol, entretanto, não foi estatisticamente diferente, em comparação com os grupos controles salina (Figuras 18 e 19 págs. 124 e 125) O tratamento prévio e subagudo com TPN produz aparente aumento no diâmetro do lúmen aórtico torácico na presença ou ausência do infarto com isoproterenol, porém não foram estatisticamente diferentes entre os grupos em ambas as linhagens experimentais (Figuras 18 e 19 págs. 124 e 125). O tratamento prévio com nifedipina não produziu aparente aumento no diâmetro do lúmen vascular (Figuras 18 e 19 págs. 124 e 125).

Quando foram analisados os cortes histológicos de aortas torácicas no eixo longitudinal, observou-se que o infarto induzido por isoproterenol produziu redução sobre a camada da túnica íntima vascular (Figuras 20 e 21 págs. 126 e 127). No entanto, o tratamento subagudo com TPN produziu um aumento expressivo sobre a túnica íntima vascular na presença ou ausência do infarto induzido por isoproterenol (Figuras 20 e 21

págs. 126 e 127). Estes resultados nos levam a crer que TPN é capaz de induzir respostas angiogênicas, aumentando as camadas internas vasculares. Porém, novos experimentos são necessários para confirmar esta ação.

O tratamento subagudo com nifedipina não produziu efeitos significantes sobre a camada íntima vascular, porém, apresentou aparente redução na túnica média vascular, correspondente à camada muscular lisa (Figuras 20 e 21 págs. 126 e 127) quando comparados aos controles infartados.

A túnica íntima frequentemente é descrita como a camada vascular que corresponde ao endotélio vascular como componente majoritário (GERRITY & CLIFF, 1972; KHAN et al; 2000; LIBBY et al, 2011) e por esta razão o aumento desta camada tem sido correlacionado com benefícios cardiovasculares (HEENEMAN et al, 2003). Deste modo, acreditamos que a neovascularização e os mecanismos angiogênicos possam se correlacionar com os efeitos cardioprotetores induzidos por TPN, aumentando a disponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio como o óxido nítrico, e assim promovam melhorias nas funções vasculares, contribuindo para a ação cardioprotetora.

Investigou-se as alterações produzidas por isoproterenol sobre a morfologia macroscópica de ramos arteriais e em corações de ratos infartados com isoproterenol. Não houve alterações significantes na artéria coronária descendente esquerda (Figuras 16 e 17 pág 122). Entretanto, o tratamento subagudo com TPN induziu aparente efeito dilatador sobre a artéria coronária descendente esquerda de maneira dose dependente, na presença ou ausência de isoproterenol (Figura 16 e 17 pág 122). Em contraste, o tratamento subagudo com nifedipina não produziu alterações significantes sobre a artéria coronária descendente esquerda, em comparação com seus respectivos controles (Figura 16 e 17 pág. 122). Portanto, admite-se que TPN possa influenciar alterações sobre o tônus vascular coronariano e possa contribuir na redução das lesões miocárdicas de isquemia-reperfusão. No entanto, novos estudos são necessários para melhor avaliar esta resposta.

Ao investigar a reatividade vascular de artérias mesentéricas, verificou-se que o infarto induzido por isoproterenol não alterou de modo significativo a potência e o efeito máximo do estímulo vasoconstrítor frente à fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico, em artérias mesentéricas superiores isolados de ratos espontaneamente hipertensos em

comparação ao respectivo controle salina (Gráfico 15 e tabela 17, págs.129 e 130) assim o infarto pelo método simpaticomimético não mudou a reatividade vascular contrátil em ratos da linhagem hipertensa. Todavia, quando se verificou a reatividade vascular induzida pelo estímulo vasorelaxante de nitroprussiato de sódio, um doador espontâneo de óxido nítrico em artérias mesentéricas isoladas e perfundidas de ratos espontaneamente hipertensos, verificou-se que houve mudança tanto na potência quanto no efeito máximo relaxante induzido por nitroprussiato de sódio (Gráfico 16 e tabela 18 págs. 130 e 131).

Os resultados aqui demonstrados revelam que o infarto induzido por isoproterenol foi capaz de induzir disfunção na resposta vascular frente aos estímulos relaxantes. Já está descrito, que isoproterenol pode ativar receptores β_2 -adrenérgicos em artérias de resistência reduzindo o tônus vascular produzindo redução na pressão arterial (GARLAND et al, 2011; ENGELHARDT & AHLES, 2014). Também já foi demonstrado que o nitroprussiato de sódio reduz a resistência periférica total, devido à ação doadora de óxido nítrico (LOVREN & TRIGGLE 2000; HOTTINGER et al, 2014).

O tratamento subagudo com TPN foi capaz de reduzir de maneira significativa o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) da fenilefrina na presença do infarto induzido por isoproterenol sem alterar a potência farmacológica (pD_2) de maneira independente de dose, porém, na ausência do infarto TPN não reduziu estatisticamente a resposta vasocontrátil da fenilefrina em comparação ao controle salina (Gráfico 15 e tabela 17, págs. 129 e 130). Enquanto, o tratamento com TPN foi capaz de aumentar o efeito vasorelaxante do nitroprussiato de sódio, tanto no efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) quanto na potencia farmacológica (pD_2), de modo independente de dose na presença de isoproterenol. Mas, na ausência de isoproterenol o tratamento subagudo com TPN não foi significativamente diferente nos parâmetros farmacológicos avaliados em comparação ao controle salina.

Dessa maneira, verificamos que TPN foi capaz de modular ações vasculares, melhorando as respostas vasorelaxantes do nitroprussiato, prevenindo a disfunção vascular em ratos hipertensos. Os resultados do TPN aqui apresentados corroboram com o estudo de SABINO, 2013, que mostra que TPN é capaz de produzir mudanças no tônus de artérias mesentéricas isoladas de ratos hipertensos por L-NAME, envolvendo

alvos de ação independente de endotélio, como os canais para cálcio voltagem dependentes (SABINO, 2013).

O tratamento subagudo com nifedipina na presença do infarto induzido por isoproterenol alterou apenas o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) da curva concentração-resposta vasocontrátil da fenilefrina, mas aumentou a potência (pD_2) e o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) da curva concentração-resposta induzida por nitroprussiato de sódio quando comparados aos respectivos controles em ratos espontaneamente hipertensos. Nifedipina promoveu melhora da reatividade vascular, devido ao bloqueio do influxo de cálcio voltagem dependente em artérias mesentéricas isoladas de ratos hipertensos.

Não obstante, os resultados apresentados na avaliação *ex-vivo* do TPN e da nifedipina, na reatividade vascular em artérias de resistência foram similares aos resultados encontrados nos ensaios *in vivo* na reatividade do sistema baroreflexo frente aos mesmos estímulos farmacológicos.

Assim resolvemos avaliar o envolvimento da sinalização de cálcio nas respostas cardioprotetoras, através da dosagem dos níveis de cálcio intracelular em aortas e ventrículos isolados de ratos, ademais foram dosados os níveis séricos de cálcio na presença ou ausência do infarto induzido por isoproterenol. É amplamente descrito que o infarto agudo do miocárdio produz mudanças sobre a sinalização de cálcio nos corações, induzindo sobrecarga intracelular de cálcio engatilhando a morte celular mitocondrial e consequente sinalização apoptótica (BLOOM & DAVIS, 1972 BRUM et al, 2006), o infarto por isoproterenol mimetiza este efeito sobre o influxo de cálcio miocárdico (REMIÃO, 2001).

Enquanto que substâncias que previnem esta sobrecarga sejam através de estímulos a SERCA ou sobre o bloqueio de canais para cálcio voltagem dependente previnem o infarto inguido do miocárdio (SANDMANN et al, 2001; EL-ANI, 2007).

O infarto agudo do miocárdio induzido com isoproterenol aumentou de modo significativo os níveis ventriculares de cálcio total em comparação com ventrículos de ratos controles salina (Gráficos 24B e 24E, pág. 143). Enquanto que o tratamento subagudo com TPN inibiu de modo significativo a sobrecarga de cálcio intracelular nos ventrículos (Gráfico 24B e 24E, pág. 143). O tratamento subagudo com TPN na ausência do isoproterenol produziu redução significativa dos níveis de cálcio intracelular

dos ventrículos (Gráfico 24B e 24E, pág. 143). O tratamento subagudo com nifedipina foi capaz de produzir significativa redução dos níveis intracelulares de cálcio dos ventrículos de ratos em ambas as linhagens, na presença do infarto induzido quando comparados ao grupo controle salina. Estes resultados indicam o envolvimento do influxo de cálcio através dos canais para cálcio voltagem dependentes no efeito cardioprotetor induzido por TPN.

Ao analisar os níveis intracelulares de cálcio em aortas, observou-se que o isoproterenol aumentou as concentrações de cálcio apenas em aortas de ratos hipertensos quando comparado com seu respectivo controle salina (Gráfico 24C e 24F, pág. 143), indicando sobrecarga de cálcio. Entretanto o tratamento com TPN reduziu os níveis de cálcio (Gráfico 24C e 24F pág. 143). Enquanto em aortas de ratos o tratamento subagudo com TPN afetou as concentrações de cálcio somente em ratos wistar. Nifedipina em tratamento suagudo também preveniu o aumento a do influxo de cálcio em aortas de ratos das duas linhagens experimentais (Gráfico 24C e 24 F pág. 143).

Estes resultados sugerem participação dos canais para cálcio voltagem dependentes na modulação vascular promovida por TPN. Embora os efeitos vasorelaxantes induzidos por TPN nos estudos de RIBEIRO, 2012 sejam atribuídos a presença de endotélio em artérias de ratos hipertensos, envolvendo a estimulação da via de sinalização NOS-GMPc. Em contrapartida, os estudos de SABINO, 2013 demonstram o envolvimento dos canais para cálcio nas respostas vasorelaxantes de TPN em artérias de ratos hipertensos por L-NAME. Os resultados aqui descritos podem contribuir com os achados de ambos os estudos, revelando que TPN pode envolver o bloqueio de canais para cálcio em artérias de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

É bem reportado que os diferentes tipos de canais para cálcio estão implicados na manutenção da hipertensão arterial espontânea, como aumento nos canais para cálcio voltagem dependentes, aumento nos níveis intracelulares de cálcio sem aumento da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (GRAY et al 1993; ARII et al, 1999; LIU et al, 2005) e redução na no relaxamento arterial devido a ativação dos canais para potássio sensíveis ao aumento de cálcio intracelular (WESTON et al, 2010). Entretanto, também já foi evidenciada a redução na sensibilidade do sítio de ativação dihidropiridínico dos canais para cálcio voltagem dependentes em ratos

espontaneamente hipertensos comparado com ratos wistar (EBATA et al, 1991; FUKUDA et al, 2014).

Assim, a evidência do envolvimento dos canais para cálcio no efeito vasorelaxante do TPN apontado por SABINO cols, 2013 ainda que não encontrada pelos estudos de RIBEIRO et al, 2012 deve-se a natureza do tipo de animal eleito para os estudos vasorelaxantes, animais hipertensos L-NAME são pertencentes a linhagem wistar e tornam-se hipertensos devido a redução na disponibilidade de óxido nítrico pela suplementação com inibidor das óxido nítrico sintases, enquanto que ratos espontaneamente hipertensos possuem origem gênica modificada (FAZANS et al, 2001). Estas diferenças na sensibilidade dos canais para cálcio voltagem dependentes nas duas linhagens experimentais apontadas por EBATA, 1991 também são evidenciadas nas concentrações de cálcio em aortas de ratos em nossos estudos e por esta razão possam divergir na modulação induzida por TPN entre os modelos experimentais em semelhança aos estudos de RIBEIRO, 2012 e SABINO, 2013.

Os estudos de REMIÃO, 2001 mostram que após 24 horas do infarto induzido por isoproterenol há uma redução significativa sobre os níveis séricos de cálcio e normalização dos outros eletrólitos em ratos wistar (REMIÃO, 2001). Nossos estudos corroboram com os achados de REMIÃO, 2001. Através do gráfico 24A, pág. 143, verifica-se que os níveis séricos de cálcio foi significativamente afetada pelo infarto induzido por isoproterenol em comparação ao respectivo controle salina. Entretanto, o mesmo não foi observado em ratos hipertensos e infartados (Gráfico 24D pág. 143). A divergência nos resultados obtidos deve-se as diferenças na natureza dos canais para cálcio e sua funcionalidade em ratos da linhagem espontaneamente hipertensa quando comparados aos ratos da linhagem wistar (GRAY et al 1993; ARII et al, 1999; LIU et al, 2005 EBATA et al, 1991; FUKUDA et al, 2014).

O tratamento prévio com TPN foi capaz de restaurar os níveis séricos de cálcio, porém não atingiu os níveis basais em comparação ao grupo controle salina (Gráfico 24A pág.143). Na ausência do isoproterenol, o tratamento prévio com TPN reduziu os níveis séricos de cálcio em comparação ao grupo controle salina em ratos wistar (Gráfico 24A pág. 143), o mesmo efeito foi observado com o tratamento com nifedipina (Gráfico 24A pág. 143). Em ratos hipertensos, TPN aumentou os níveis séricos de cálcio apenas na menor dose testada na presença do isoproterenol quando comparados

aos grupos controles e nifedipina não afetou a concentração sérica de cálcio. Assim, TPN foi capaz de modular ações cálcio-dependentes em ratos da normotensos e infartados de modo similar à nifedipina.

Diante das alterações cardiovasculares induzidas por TPN na presença e ausência de isoproterenol, tornou-se necessário investigar os efeitos cardiovasculares e seus mecanismos induzidos pela administração intravenosa de TPN em ratos espontaneamente hipertensos

A administração intravenosa de TPN induziu hipotensão e bradicardia de modo dependente de dose em ratos espontaneamente hipertensos não anestesiados e não infartados (Gráfico 25 pág.145). A bradicardia induzida por TPN aumentou o tempo em função da dose (Gráfico 25 pág.145). O uso de tiopental sódico (45 mg/kg i.p.) foi capaz de atenuar o efeito bradicárdico induzido por TPN (Gráfico 26, pág. 146). Tiopental sódico, um anestésico de uso geral é capaz de deprimir os reflexos autonômicos do sistema nervoso, assim reduzem a ativação do sistema cardiovascular (PEISS & MANNING, 1964). Neste contexto, a bradicardia induzida por TPN parecer exercer alguma influência sobre o sistema autonômico cardíaco.

Para avaliar se o TPN reduz o tônus cardíaco por via indireta, utilizou-se hexametônio, um bloqueador ganglionar antagonista dos receptores nicotínicos, que reduz as ações do sistema nervoso autonômico diminuindo o controle homeostático do sistema cardiovascular através do nervo vago (BELESLIN 1972; DING 2017). A presença de hexametônio (20 mg/kg i.v.) alterou em menor grau a hipotensão, porém influenciou a bradicardia induzida por TPN (Gráfico 27 pág 147), assim, as respostas bradicárdicas do TPN possui influência de mecanismos indiretos para reduzir o tônus cardíaco, possivelmente através dos gânglios do sistema nervoso autonômico por inervação vagal.

As fibras C são fibras não mielinizadas que se conectam ao átrio a partir do núcleo do trato solitário do tronco cerebral (CHENG et al., 1999; CHENG & POWLEY, 2000). A estimulação destas fibras geram bradicardia através da ativação colinérgica (NOSAKA et al., 1979; CLOZEL et al., 1985; JONES et al., 1995) aumentando as concentrações de substância P nas terminações nervosas cardíacas, porém este efeito pode ser inibido pela ação da atropina (WOOLLEY et al., 1987;

HAXHIU-POSKURICA, 1992), mas o mesmo não ocorre com o hexametônio (WOOLLEY et al.,1987).

Assim, utilizamos a atropina, um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, que exerce influência principalmente sobre o tônus cardíaco, amentando a contratilidade cardíaca via receptores M_2 com inibição do AMP_C (PERERA et al, 2017). A presença de atropina (2 mg/kg i.v.) atenuou de maneira significativa a bradicardia induzida por TPN, sem alterar a hipotensão (Gráfico 27 pág.147), deste modo as respostas bradicardicas induzidas por TPN são mediadas por receptores muscarínicos.

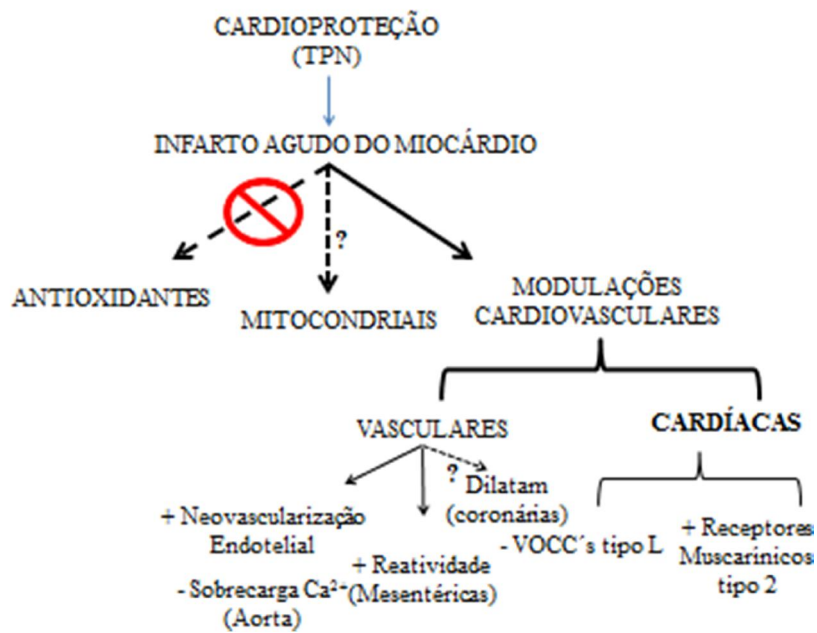
Os receptores muscarínicos tem sido apontados por exercer papel fundamental na cardioproteção em lesões de isquemia-reperfusão, produzindo efeitos benéficos para o sistema cardiovascular devido as suas múltiplas funções no organismo (SUN et al, 2011). A variedade dos subtipos de receptores muscarínicos pode suprimir a sinalização de micro RNA's mensageiros prevenindo a reação de agressão cardíaca em cadeia nos sinais de lesões iniciados e emitidos via micro RNA e assim desempenhando efeito cardioprotetor (PAN et al, 2012) também podem preservar a fosforilação de conexinas e reduzir a expressão de cicloxigenases como mediadores inflamatórios no infarto produzindo atraso nas lesões de injúria cardíaca (ZHAO et al, 2010) assim como podem desenvolver efeitos diretos sobre as funções cardiovasculares, produzindo vasodilatação coronariana evitando a lesão por isquemia via receptores M_3 em coronárias devido ao aumento na disponibilidade de óxido nítrico (RADICO et al, 2014) ou ainda produzindo efeitos cardíacos evitando o descontrole do debito cardíaco, suprimento de oxigênio cardíaco e das pressões ventriculares (HARDOUIN et al 2002). Por estas razões as vias colinérgicas têm sido apontadas como novos alvos terapêuticos para as doenças cardíacas como o infarto agudo do miocárdio (ROY et al, 2014).

Neste contexto, nós avaliamos a capacidade de interação do TPN com os variados alvos moleculares de interesse cardiovascular através de abordagem *in silico*. Verificamos que TPN possui maior energia de eletroafinidade para o receptor muscarínicos tipo 2 e sua energia de afinidade comportou-se de maneira similar aos agonistas de receptores muscarínicos, no ensaio de comparação de atividade agonista/antagonista.

TPN também demonstrou energia de eletroafinidade comparável à nifedipina no sítio de ação dihidropiridínico em canais para cálcio tipo L, e demonstrou afinidade

eletrônica para albumina como possível carreador plasmático. Assim, o respectivo trabalho demonstra a ação cardioprotetora induzida por TPN e seus possíveis mecanismos de maneira resumida na figura 25, pág 178.

Figura 25- Representação esquemática do efeito cardioprotetor induzido por TPN e seus possíveis mecanismos de ação.



FONTE: Autor, 2019.

7 Conclusões

Através dos resultados demonstrados nesta tese, conclui-se que:

- TPN produz efeito cardioprotetor em modelo experimental *in vivo* em ratos das linhagens normotensa e espontaneamente hipertensa;
- O efeito cardioprotetor do TPN mostrou-se mais eficaz na linhagem hipertensa e infartada;
- Os mecanismos correlacionados com o efeito cardioprotetor do TPN envolvem modulações cardiovasculares;
- O mecanismo cardíaco envolve duplo efeito: ativação de receptores muscarínicos tipo 2 e inibição dos canais para cálcio tipo L voltagem dependentes.
- O tratamento subagudo com TPN produziu dilatação coronariana e neovascularização endotelial em aortas;
- TPN representa um possível candidato a fármaco cardioprotetor e pode ser um importante agente na estratégia terapêutica de pacientes com risco de infarto atuando na cardioprevenção.

8 Perspectivas

- Avaliar os possíveis efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos do TPN em preparações de átrios e músculos papilares isolados e perfundidos de ratos;
- Avaliar o efeito vasorelaxante do TPN sobre artérias coronárias isoladas de ratos;
- Avaliar a participação dos subtipos de receptores muscarínicos na resposta cardioprotetora do TPN em cultura de cardiomiócitos;
- Avaliar a atividade antagonista de canais para cálcio do TPN através do isolamento pelo *patch clamp*;
- Determinar o estado energético do tecido cardíaco na presença e ausência do TPN através de estudos com ressonância magnética nuclear de fosfato durante a função contrátil-relaxante de corações isolados e perfundidos;
- Avaliar a participação das vias mitocondriais no efeito cardioprotetor do TPN em corações de ratos;
- Avaliar a atividade cardioprotetora de TPN associado a um nanocarreador em ratos;
- Avaliar o efeito vasorelaxante do TPN sobre artérias de cordão umbilical humano;
- Determinar a farmacocinética do TPN em modelo *in vivo*;
- Avaliar a atividade cardioprotetora do TPN em estudos clínicos.

9 Referências

- ABE N et al. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v.62, p.661–666.1998.
- ADKINS, Y & KELLEY D.S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*.v.21,p.81-792.2010.
- AFANA, M et al. Hospitalization costs for acute myocardial infarction patients treated with percutaneous coronary intervention in the United States are substantially higher than Medicare Payments. *Clin. Cardiol*. 38, 1, 13–19. 2015.
- AIRES, R. et al. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 50, p.1-9.2017.
- ALVES-SILVA, J. M. et al. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. *Curr Med Chem*. V.23, p.4559-4600.2016.
- AMAN, U. et al. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: electrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study. *Asian Pac J Trop Biomed*. v. 2, p. 345-351.2012.
- ANAND, S.S et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *European Heart Journal*. v. 29, p.932-940. 2008
- ARII, T et al. Increased function of the voltage-dependent calcium channels, without increase of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in the arterioles of spontaneous hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, v. 12, p. 1236–1242,1999.

AVERIN, et al. Isoproterenol effects on the contractility of papillary muscles in the heart of ground squirrel. *Biophysics*. V.5, p.800-806.2010.

AYDIN Y, et al. Hypotensive effects of carvedilol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med* v.73, p.1365-1371.2007.

AZEVEDO, P.S. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*. v.106, p.62–69.2016.

BAIGENT C, et al.: Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* v.366, p.1267–1278.2005.

BANGASH, M.N et al. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. *Br J Pharmacol*. v.165, p.2015–2033.2012.

BAROLDI, G Myocardial necrosis: the need for definition, *J. Mol. Cell. Cardiol*. v.6, p.401–402.1974.

BASTOS J.F, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* v.106, p.331-337.2010.

BAYLIE R.L. et al. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *J Physiol Pharmacol* v.61, p.543-550.2010.

BELESLIN, D.B. *Methods in Psychobiology: Specialized Laboratory Techniques in Neuropsychology and Neurobiology. The Neurobiological Assay*. V.2.p.83.124.1972.

BENJAMIN, E.J et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *V.137*, p.67-492.2018.

BERNAUER, W. Effect of isoproterenol on myocardial creatine kinase activity in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* V.231, p.90-97. 1978.

BHAGAT, K. Endothelial function and myocardial infarction. *Cardiovascular Research,* V. 39, p.312–317. 1998.

BHATIA, S.P. et al. Fragrance material review on alpha-terpineol. *Food and chemical toxicology.* V. 46. n° 11 p S280-S285.2008.

BJÖRKLUND, E. et al. Pre-hospital thrombolysis delivered by paramedics is associated with reduced time delay and mortality in ambulance-transported real-life patients with ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J.* v.27, p.1146-1152.2006.

BLOCH, M.J. Major side effects and safety of calcium channel blockers. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/major-side-effects-and-safety-of-calcium-channel-blockers>. Acesso em: 30/11/2018.

BLOOM, S. & DAVIS, D.L. Calcium as a mediator of isoproterenol induced myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.,* V.69, p. 459–470.1972.

BODEN W.E. et al. Diltiazem in acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents: a randomised placebo-controlled trial. *Incomplete Infarction Trial of European Research Collaborators Evaluating Prognosis post-Thrombolysis (INTERCEPT).* *Lancet.* V.355, p.1751-1756.2000.

BOVO, E. et al. Increased Energy Demand during Adrenergic Receptor Stimulation Contributes to Ca^{2+} Wave Generation. *Biophysical Journal* V. 109, p.2015 1583–1591.2015.

BOVO, E. et al. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca^{2+} waves during β -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol.* v.590, p.3291-304.2012.

BRAHMACHARI, G. et al. Cardioprotective natural products: promises and hopes. 1^a Ed. World scientific. 2014.

BREITBACH, U.B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. *Journal of ethnopharmacology*. V.147, p.180–189.2013.

BROOKS , W.W & CONRAD, C.H. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med*. v.59, p.339-43.2009.

BRUM, P.C. et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An. Acad. Bras. Ciênc*. v.78 p. 485-503. 2006.

BRUNTON, L.L; HILAL-DADAN, R et al. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 13^a ed. Mc Graw Hill.2018.

BURLS, A. et al. Oxygen therapy for acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Emerg Med J*. v.28,p.917-923.2011.

CABELLO, J.B et al. Oxygen therapy for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. v.19.2016.

CAHIL T.J & KHARBANDA, R.K. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol*. V.9, p.407-415.2017.

CANNAVO, A, et al. β_1 -Adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 reciprocal down-regulation influences cardiac hypertrophic response and progression toward heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy, *Circulation* v.128, p.1612–1622.2013.

CANNON CP, et al.: Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* V.350, p.1495-1504.2004.

CARREIRA, R.S. et al. Mitochondrial Therapeutics for Cardioprotection. *Curr Pharm Des.* v.17. p.2017–2035. 2011.

CARVALHO, K.M.M.B et al. The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*v.2015, p.1-13.2015.

CASTRILLO, G. D. et al. Coronary ischemia-reperfusion: role of nitric oxide and endothelin-1. A.Review. *Anales de la real academia nacional de farmácia.* V.82, p.14-50.2016.

CHACKO, S et al. The role of biomarkers in the diagnosis and risk stratification of acute coronary syndrome. *Future Sci OA.* v.4(1): FSO251.2018.

CHAN, D & LEONG, L.N.G. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC medicine.* v. 8, p. 1-11.2010.

CHEN, H. et al. Baicalin ameliorates isoproterenol-induced acute myocardial infarction through iNOS, inflammation and oxidative stress in rat. *Int J Clin Exp Pathol* v. 8, p.10139-10147.2015.

CHENG, Z. & POWLEY, T. L. Nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia of rat atria anterograde tracing study. *J Comp Neurol*, v.42, p.588-606. 2000.

CHENG, Z.; POWLEY, T. L.; SCHWABER, J. S.; DOYLE, F. J. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia atria: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol*, v.410, p.320-341.1999.

CHEN, S.M et al. Endothelial dysfunction in young patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Heart Vessels.* v. 26, p.2-9.2011.

CHEN, X. QSAR and Primary Docking Studies of Trans-Stilbene (TSB) Series of Imaging Agents For β -amyloid Plaques. J. Mol. Struct. THEOCHEM. v.763 p.83-89. 2006.

CHEN, Y et al. Role of carvedilol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. Eur J Pharmacol. v.5, p. 90-100.2017.

CHEN, Z.M. et al. Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2005 v.366, p.1622-1632.2005.

CHENG S.S et al. Insecticidal activities of *Cunninghamia konishii* Hayata against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae), Pest. Manag. Sci., v.70, p. 1215-1219.2014.

CLOZEL, J. P.; ROBERTS, A. M.; HOFFMAN, J.I.; COLERIDGE, H. M.; COLERIDGE, J. C. Vagal chemoreflex coronary vasodilation evoked by stimulating pulmonary C-fibers in dogs. Cir Res. v.57, p.450-460.1985.

COPPOLA, G et al. ST segment elevations: Always a marker of acute myocardial infarction?. Indian Heart J. v.65, p.412-423.2013.

CORREA-BASURTO, J et al. Docking and Quantum Mechanic Studies on Cholinesterases and Their Inhibitors. Eur. J. Med. Chem. V.42 p.10-19.2007.

COSTA, V.M et al. Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. Curr Med Chem v.18, p.2272-2314. 2011.

COUTO, G.K. Estudo da função em artérias de resistência de ratos pós-infarto do miocárdio. Tese de doutorado da Universidade de São Paulo, Brasil. 2012.

COZLEA, D.L et al. The Impact of C Reactive Protein on Global Cardiovascular Risk on Patients with Coronary Artery Disease. *Curr Health Sci J.* v.39, p. 225–231.2013.

CREA, F & MORROW, D.A. C-reactive protein in cardiovascular disease. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/c-reactive-protein-in-cardiovascular-disease>. Acesso em: 29/11/2018.

CUADRADO-BERROCAL, I et al. A labdane diterpene exerts ex vivo and in vivo cardioprotection against post-ischemic injury: involvement of AKT-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* v.93, p.428-439.2015.

CUADRADO-BERROCAL, I et al. Labdane diterpenes protect against anoxia/reperfusion injury in cardiomyocytes: involvement of AKT activation. *Cell Death Dis.* V.2, p. 1-7.2011.

CUNG, T.T et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* v.373, p.1021-1031.2015.

DANESE, E & MONTAGNA, M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Transl Med.* V.4.P. 1-11.2016.

DAS D.K & MAULIK N. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Molecular interventions.* vol.1. p.36-46.2006.

DAVIT II. Effect of verapamil on mortality and major events after acute myocardial infarction (the Danish Verapamil Infarction Trial II--DAVIT II). *Am J Cardiol.* V.66,p.779-785.1990.

DE LUCA G et al. Drug-Eluting Stent in Primary Angioplasty (DESERT) Cooperation. Drug-eluting vs bare-metal stents in primary angioplasty. A pooled patient-level meta-analysis of randomized trials. *Arch Intern Med.* V.172,p. 611-621.2012.

DE OLIVEIRA M et al. α -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.111, p.120-125.2012.

DE SOUSA D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents, *Molecules*. v.16, p.2233-2252.2011.

DEDOBBELEER, C et al. C-reactive protein increase in acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*. V 59, p.291-296. 2004.

DERIAN, C.K et al. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J Immunol* v.154, p. 308-317.1995.

DERNEK, S. et al. Cardioprotection with resveratrol pretreatment: improved beneficial effects over standard treatment in rat hearts after global ischemia. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. V.38, p.245-254.2004.

DESNoyERS, M. et al. Cardioprotective Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Dichotomy between Experimental and Clinical Studies. *Mar Drugs*. V.16(7). p.234.2018.

DEWIK, P.M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons, 2002.

DHALLA, N et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. v.47, p.446–456. 2000.

DHALLA, N.S. et al. Catecholamine-induced cardiomyopathy. In: Acosta, D (ed.) *Cardiovascular Toxicity*. Raven Press, New York, p. 269-318, 2001.

DING, X.Q. Drugs Affecting Nicotinic Receptors. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. V. 7. P.650-655.2017.

DINICOLANTONIO, J.J. et al. β -Blockers in hypertension, diabetes, heart failure and acute myocardial infarction: a review of the literature. *Open Heart*. V.2, p. 1-12.2015.

DINIS T C P et al. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*v.315, p.161-169.1994.

DONGWORTH, R et al. Targeting mitochondria for cardioprotection: examining the benefit for patients. *Future cardiology*. v. 10, p. 255-272.2014.

DORWARD, P.K. et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. *Cir research*, v. 57, p.618-633.1985.

EARLEY S, et al. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Mol Pharmacol* v.77 p.612-620.2010.

EBATA, H et al. Reduced calcium sensitivity of dihydropyridine binding to calcium channels in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. v.17, p.234-41.1991.

EBRAHIMZADEH M A. et al. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turkish J Biol*. v.32, p.43-49.2008.

EHNHEART. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. Disponível em: [http://: http://www.ehnheart.org/component/downloads/downloads/2452](http://www.ehnheart.org/component/downloads/downloads/2452). Acesso em 07/08/2017.

EL TAHIR K.E.H et al. Some cardiovascular effects of the dethymoquinonated *Nigella sativa* volatile oil and its major components α -pinene and p-cymene in rats. *Saudi Pharm J* v.113, p.104-110.2003.

EL TAHIR K.E.H et al. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: Elucidation of the mechanism of action. Gen Pharmacol v.24, p.1123-1131.1993

EL TAHIR K.E.H & AGEEL A.M. Effect of the volatile oil of *Nigella sativa* on the arterial blood pressure and heart rate of the guinea-pig. Saudi Pharm J v.2, p.163-168.1994

EL-SAYED, M et al. Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. The journal of biochemical and molecular toxicology. V.30, p.37-44.2016.

ENDO, J & ARITA, M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Journal of Cardiology.V. 67, p.22-27.2016.

ENGELHARDT, S & AHLES, A. Polymorphic Variants of Adrenoceptors: Pharmacology, Physiology, and Role in Disease. Pharmacol Rev v.66,p.598–637.2014.

ERTL, G & FRANTZ, S. Healing after myocardial infarction. Cardiovascular Research. V.66. p.22–32.2005.

EZZAHER, A et al. Increased negative inotropic effect of calcium-channel blockers in hypertrophied and failing rabbit heart. J Pharmacol Exp Ther. v.257, p.466-71.1991.

FARÍAS, J.F et al. Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. Nutrients. v.9 p.960-966. 2017.

FARIAS, M.M & MOREIRA, D.M. Impacto de protocolo de dor torácica sobre a adesão às diretrizes societárias: um ensaio clínico. V.25.2012.

FAZANS, R et al. Modelos de hipertensão arterial. Rev Bras Hipertens v 8, p.19-29.2001.

FERNÁNDEZ-MORIANO, C. Antioxidant and cytoprotective potentials of *Parmeliaceae lichens* and identification of active compounds. *An Real Acad Farm Vol.* 81, p. 164-178.2015.

FERRANTI, S.D. et al. Type 1 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care.* v.37, p.2843-2863.2014.

FLECKENSTEIN A et al. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload—a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* v.4, p.563–580.1974.

FLECKENSTEIN, A et al. Key role of Ca in the production of noncoronarogenic myocardial necroses. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* v.6, p.21–32.1975.

FLOYD, C. Indications for anticoagulant and antiplatelet combined therapy. *BMJ.* V.359. p. 3782.2017.

FLUCKIGER, J.P et al. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agent in normotensive rat. *Eur J. Pharmacol.* v.109, p.105-109.1985.

FONSECA-SILVA, F. et al. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *Plos one.* V.10, p1-16. 2016.

FORINI, F et al. Mitochondria as Key Targets of Cardioprotection in Cardiac Ischemic Disease: Role of Thyroid Hormone Triiodothyronine. *Int J Mol Sci.* v.16, p.6312–6336. 2015.

FREEMANTLE N et al. Beta blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ.* V.318, p.1730-1737.1999.

FRENCH, B. A & KRAMER, C.M. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech.* v.4 p. 185–196.2007.

FUKUDA, T. Attenuation of L-Type Ca²⁺ Channel Expression and Vasomotor Response in the Aorta with Age in Both Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. *Plos One.* v.9,p.1-10.2014.

GALLI, A & LOMBARDI, F. Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure. *Cardiology Research and Practice.* v. 2016, p. 1-12. 2016.

GANESTSKY, M & BIRD, S.B. Acute Myocardial Infarction Associated with the Serotonin Syndrome. *Annals of Internal medicine.* v.144, p.1-2.2006.

GARCÍA-DORADO, D et al. Pre-clinical studies in remote ischaemic conditioning: a solid foundation for on-going clinical research? *Cardiovascular research.* v.113. 2017.

GARLAND,C.J. et al. Vascular hyperpolarization to β -adrenoceptor agonists evokes spreading dilatation in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* v.164, p. 913–921.2011.

GARLTON, M. COMMIT/CCS-2 studies. *The Lancet.* V.368. p. 642.2006.

GERRITY,R.G & CLIFF,W.J. The aortic tunica intima in young and aging rats. *Experimental and Molecular Pathology.*V.16, p. 382-402.1972.

GHAFFARI, S et al. The effect of prethrombolytic cyclosporine-A injection on clinical outcome of acute anterior ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Ther.* 2013 v.31, p.34-39.2013.

GINEFRA P, CORREA E, et al. Distúrbios da Condução Intraventricular – Parte 1. Rev SOCERJ v.18 p.307-323. 2005.

GODOY, M.F. et al. A Troponina como Marcador de Injúria Celular Miocárdica. Arq. Bras. Cardiol. v.71.p.629-633. 1998.

GOLDBERGER, A et al. Electrocardiogram in the diagnosis of myocardial ischemia and infarction.

GOLDBERGER, A. Clinical Electrocardiography: A Simplified Approach. 7a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006.

GOLDBERGER, A. Clinical Electrocardiography: A Simplified Approach. 9a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2018.

GOUTAM, B. Cardioprotective Natural Products: Promises and Hopes. 1ª Ed. World Scientific Publishing Co., Singapore.2017.

GOYAL, S.N et al. Protective Effects of Cardamom in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. Int J Mol Sci. v.17, p.27457-27469. 2015.

GRAY, G.A et al. Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. v.22, p.569-756.1993.

GRIMM, D et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. Cardiovascular Research. v. 37 p.91–100. 1998.

GUIMARÃES, A.G et al. Modulation of opioid and serotonergic systems by alpha-terpineol complexed in beta-cyclodextrin reduces hyperalgesia in a chronic muscle pain model. The faseb journal. V.31, p.1-10.2017.

GURUSAMY, M et al. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc Res.* V.86, p.103-112.2009.

HACKAM, D & SHUMAK, S.L. C-reactive protein for the prediction of cardiovascular risk: Ready for prime-time? *CMAJ.* v.170 p.1563–1565. 2004.

HAJAR, R. Evolution of Myocardial Infarction and its Biomarkers: A Historical Perspective. *Heart Views.* v.17,p. 167–172.2016.

HAN, M. et al. Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression via the activation of the ERK pathway. *International Journal of molecular medicine.* v.39, p.380-386, 2016.

HANSEN, J; BROSS, P. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. *Methods Mol Biol.* V. 648, p.303-11, 2010.

HARDOUIN, S.N et al. Altered Cardiovascular Responses in Mice Lacking the M₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* V.301, p.129-137.2002.

HASSAN S.B. et al, Alpha-terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signaling, *Anticancer Res.* v.30, p. 1911-1920.2010.

HASSELL, M.E.C.J et al. Long-term left ventricular remodelling after revascularisation for ST-segment elevation myocardial infarction as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *BMJ journal, open heart.* v.4, p.1-7.2017.

HAUSENLOY, D et al. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovascular Research,* v.113, p.564–585. 2017.

HAUSENLOY, D.J. et al. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res.*v.113, p.564-585.2017.

HAUSENLOY, D.J. Future Perspectives. Management of Myocardial Reperfusion Injury .v. 1,p.293-295.2012.

HAUSENLOY,D.J. et al. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol.* V.105, p.677–686.2010.

HAYBAR, H et al. Strategies to increase cardioprotection through cardioprotective chemokines in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Int J Cardiol.* V.15,p.:276-282.2018.

HEENEMAN, S et al. The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *The journal of pathology.* v.200, p.516-525.2003.

HERRING, N & PATERSON, D.J. ECG diagnosis of acute ischaemia and infarction: past, present and future. *QJM.*V.99,p.219-230. 2006.

HO Y.J et al. Caffeic acid phenethyl amide ameliorates ischemia/reperfusion injury and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* vol 13.p.1-13.2014.

HÖFERL M et al. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. *Planta Med* v.72, p.1188-1192.2006.

HOFFMAN, B.B. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics.* McGraw-Hill, New York, p. 215-268, 2001.

HOFFMAN, J.I.E. & BUCKBERG, G.D. The Myocardial Oxygen Supply:Demand Index Revisited. *J Am Heart Assoc.* V.3 P. 1-10.2014.

HOTTINGER, D.G et al. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. v.30, p.462–471.2014.

HSU C.F et al. ABTS•+ scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly (3,4-ethylenedioxythiophene). *Polym Int*. v.60, p.69-67.2011.

HUANG D et al. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.6, p.1841-1856.2005.

HAXHIU-POSKURICA, B et al. Tracheal smooth muscle response to substance P and neurokinin A in the piglet. *J Appl Physiol*, v.72, p.1090-1091.1992

HURLEN M, et al. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. *N Engl J Med*. V.347, p.969-974.2002.

HWANG, C. ECG Diagnosis: ST-Elevation Myocardial Infarction. *Perm J*.v.18, p.133. 2014.

IBANEZ B, et al. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* v.115, p.2909–2916.2007.

IBANEZ B, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) Trial. *Circulation* v.128, p.1495–1503.2013.

INSERTE, J & GARCÍA-DORADO,D. The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*. v.172(8): 1996–2009.2015.

ISO document 10993-1:2003, Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests.

ISO document 10993-12:2007, Biological evaluation of medical devices, Part 12, Sample preparation and reference materials.

ISO document 10993-5:1999, Biological evaluation of medical devices, Part 5, Test for cytotoxicity: in vitro methods.

ITANCHAI, K. et al. Revisiting the Cardioprotective Effects of Acetylcholine Receptor Activation against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. V.19, p.1-20.2018.

JACOBSON, K.A. et al. A Novel Pharmacological Approach to Treating Cardiac Ischemia. *The journal of biological chemistry*. V.275, p. 30272–30279.2000.

JAFFE, A.S. et al Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem* v.42 p.1770-1776.1996.

JEROUDI, M.O et al. Myocardial reperfusion injury: Role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *The American Journal of Cardiology*. V.73, p.B2-B7. 1994.

JONES, J. F. X. et al. Heart rate responses to selective stimulation of cardiac vagal C fibres in anaesthetized cats, rat and rabbits. *J Physiol*, v.489, p.203-214.1995.

JOHNSON C.D et al. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* v.296 p.1868-1877.2009.

JUGDUTT, B. Ventricular Remodeling After Infarction and the Extracellular Collagen Matrix. When Is Enough Enough? *Circulation*. v.108, p.1395–1403.2003.

KAGLI K, et al. *In Vivo* Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Apoptotic Changes in Rats. *Ann Clin Lab Sci.* vol. 35 p.440-448.2005.

KAKIMOTO, Y. et al. The effectiveness and limitations of triphenyltetrazolium chloride to detect acute myocardial infarction at forensic autopsy. *Am J Forensic Med Pathol.* v.34, p. 242-247, 2013.

KANDHAI-RAGUNATH, J.J et al. Endothelial Dysfunction After ST-segment Elevation Myocardial Infarction and Long-term Outcome: A Study With Reactive Hyperemia Peripheral Artery Tonometry. *Rev Esp Cardiol.*v. 69, p.664-71. 2016.

KANG, A & LEE, T.S. Secondary Metabolism for Isoprenoid-based Biofuels. IN: *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization.* P.35-71. 2016.

KANNAM, J.P. et al. Nitrates in the management of stable angina pectoris. 2017. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/nitrates-in-the-management-of-stable-angina-pectoris>. Acesso: 14/12/2018.

KAUFMANN, K. et al. The Cytoprotective Effects of E- α -(4-Methoxyphenyl)-2',3,4,4'-Tetramethoxychalcone (E- α -p-OMe-C₆H₄-TMC)—A Novel and Non-Cytotoxic HO-1 Inducer. *Plos one.* v.10, p.1-20. 2015.

KAWADA, T. et al. Calibration of Baroreflex Equilibrium Diagram Based on Exogenous Pressor Agents in Chronic Heart Failure Rats. *Clinical medicine insights: Cardiology* v. 9, p.S1-S9.2015.

KELA, A. K. et al. ECG findings in normal rats and after administration of isoproterenol. *Indian journal of physiology and pharmacology.* v.24 p.84-90.1980.

KEZERASHVILI, A. et al. Beta Blocker Use After Acute Myocardial Infarction in the Patient with Normal Systolic Function: When is it “Ok” to Discontinue?. *Curr Cardiol Rev.* v.8, p.77–84.2012.

KHALEEL, C et al. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open chemistry* v.16, p. 349–361.2018.

KHALIL, P. et al. Histochemical assessment of early myocardial infarction using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in blood-perfused porcine hearts. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* v. 54, p.307-312. 2006.

KHAN, A.A. Structural changes in the tunica intima of varicose veins: a histopathological and ultrastructural study. *Pathology.* v. 32, p. 253-257.2000.

KHAN, M.U et al. Mitochondria play a central role in nonischemic cardiomyocyte necrosis: common to acute and chronic stressor states. *Pflugers Archiv: Eur J Physiol* v.464, p.123–131.2012.

KIANI, F et al. Assessment of Risk Factors in Patients With Myocardial Infarction. *Glob J Health Sci.* v.8, p.255–262. 2016.

KIEFFER, C.M & ABEL, P.W. Isoproterenol. *Reference Module in Biomedical Sciences.* V.2007, p.1-7.2016.

KINGMA, J.G et al. Influence of cardiac nerve status on cardiovascular regulation and cardioprotection. *World J Cardiol.* V.26, p. 508-520.2017.

KITAKAZE, M. et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *The Lancet.* V.370, p.1483-1493.2007.

KITO, T, et al. Nifedipine Ameliorates Ischemia-Induced Revascularization in Diet-Induced Obese Mice. *American journal of hypertension*. v.25, p. 401-406. 2012.

KLEIN H.H., PUSHMANN S.S.,SCHAPER J., SHAPER,W. The mechanism of the tetrazolium reaction of identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch*. v.393. p.287-297. 1981.

KOLEY, D; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci USA*. v.107, p.16783–16787, 2010.

KOLMANOVÁ, E. et al. Comparison of the specificity of cardiac troponin I and creatine kinase MB in isoproterenol-induced cardiotoxicity model in rats. *ACTA VET. BRNO*. v.84, p.343–350.2015.

KONG,C.H et al. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. v.16, p.11–15.2013.

KOSHINUMA, S et al. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Anesth*. v28, p.235-241.2014.

KOTABAGI, R. B; APTE, V.V; PATHAK,P.R. Post mortem diagnosis of early myocardial infarction. *Med J Armed Forces India*. v.56, p.99-102, 2000.

KRAMER, K & REMIE, R. Measuring blood pressure in small laboratory animals. *Methods Mol Med*.v.108 p.51-62.2005.

KRÄNKEL, N et al. Early detection of myocardial infarction—microRNAs right at the time?.*Ann Transl Med*. V.4,p.1-14.2016.

KRÜEGER C. et al. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. The American Physiological Society. V. 97, p.H2240-H2246. 1997.

KUBO, T. et al. Antihypertensive effects of nifedipine on conscious normotensive and hypertensive rats. J Pharmacobiodyn. v. 4, p. 294-300. 1981.

LA ROVERE M.T et al.. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators.Lancet. v.351, p.478-484.1998.

LAGRAND, W et al. C-Reactive Protein as a Cardiovascular Risk Factor. Circulation.v. 100. p.96-102.1999.

LAHLOU S. et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. Fundam Clin Pharmacol v.17, p.323-330.2003.

LAHLOU S. et al.Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. Can J Physiol Pharmacol v.80, p.1125-1131.2002.

LANAS, F et al. Risk Factors for Acute Myocardial Infarction in Latin America The INTERHEART Latin American Study. Circulation. V.6, p.1068-1074.2007.

LASLEY, R. D. Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection—Current Limitations and Future Directions. Front Pharmacol. v.9 p.1-7.2018.

LAVIE, C.J. et al. Obesity and Cardiovascular Disease: Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. Journal of the American College of Cardiology V.53,p.1925-1932.2009.

LEE, J.H. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockers as a first choice in patients with acute myocardial infarction. *Korean J Intern Med.*v.31, p.267–276.2016.

LEE, J.H. et al. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc.* V.83, p.324-332.2008.

LEE, K.H et al. Cardioprotective effects of PKG activation by soluble GC activator, BAY 60-2770, in ischemia-reperfusion-injured rat hearts. *PLOS ONE.* 2017.

LEFER, D.J et al. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* V.109, p.315-323.2000.

LEMMER, J & VLAHAKES, G. Postoperative management. IN: Lemmer, J & Vlahakes, G. *Handbook of patient care in cardiac surgery.* 7^a Ed. Portland. Lippincott Williams & Wilkins.2010.

LÉON-LATRE, M et al. Sedentary Lifestyle and Its Relation to Cardiovascular Risk Factors, Insulin Resistance and Inflammatory Profile. *Rev Esp Cardiol.* V.67, p.449-455, 2014.

LI, D.P & PAN, H.L. Glutamatergic Inputs in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Maintain Sympathetic Vasomotor Tone in Hypertension. *Hypertension.* V.74.p.916-925.2007.

LI, D et al. Role of ERK_{1/2} in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis.* v. 11, p.923–930.2006.

LI, M et al. Quercetin provides greater cardioprotective effect than its glycoside derivative rutin on isoproterenol-induced cardiac fibrosis in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* v11,p.951-959.2013

LIAUDET L et al. Pathophysiological mechanisms of catecholamine and cocaine-mediated cardiotoxicity. *Heart Failure Review*.v.19, p.815–824.2014.

LIBBY, P et al. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. v.473, p. 317–325.2011.

LIM, W. et al. Elevated cardiac troponin measurements in critically ill patients. *Arch Intern Med*. V. 166, p.2446-2454.2006.

LIU X.C. et al. Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel, *Molecules*, v.18, p.10733-10746. 2013.

LIU Y.T et al.The metabolic disturbances of isoproterenol induced myocardial infarction in rats based on a tissue targeted metabonomics. *Molecular biosystem*. 9, 2823-2834. 2013.

LIU Z.L. et al. Identification of [84] insecticidal constituents of the essential oil of *Curcuma wenyujin* rhizomes active against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel, *Molecules*, v.17, p. 12049-12060.2012.

LIU, D et al. Increased Transient Receptor Potential Channel TRPC3 Expression in Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*. v.18,p. 1503–1507.2005.

LOBO-FILHO, H.G. et al. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. V. 26. p. 469-476.2011.

LOHSE M. et al. What Is the Role of-Adrenergic Signaling in Heart Failure?. *Circulation research*. 93(10):896-906.2003.

LONBORG J et al. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. v.33, p.1491-1499.2012.

LOVREN, F & TRIGGLE, C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol*. v.131, p.521–529. 2000.

LU, D & KASSAB, G.S. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface*. V.8, p.1379–1385.2011.

LUNA A, B; FIOL-SALA M. La electrocardiografía de la cardiopatía isquémica. Correlaciones clínica y de imagen e implicaciones pronósticas. Barcelona: Publicaciones Permanyer ; 2012.

LÜSCHER, T.F. Epidemiology of cardiovascular disease: the new ESC Atlas and beyond. *European Heart Journal* v.39, p.489–492.2018.

MAC KAY, J & MENSAH, G. The atlas of heart disease and stroke. Geneva, Switzerland, world health organization (WHO).2004.

MAGYAR J et al. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* v.487, p.29-36.2004.

MAGYAR J, et al. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* v.136, p.330-338.2002.

MAGYAR, K. et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. V.50, p.179-187.2012.

MAIA-JOCA, R.P.M et al. Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. *Life Sciences* v.115, p.52-58.2014.

MALI V.R et al. Antihypertensive and cardioprotective effects of the *Lagenaria siceraria* fruit in NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) induced hypertensive rats, *Pharmaceutical Biology*, v.50.p.1428-1435.2012.

MARIN-GARCÍA, J; GOLDENTHAL, M.J; MOE, G.W. Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovascular Research*, v.49, p. 17–26, 2001.

MARQUES, D.D. et al. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta amazonica*. V.40, p.227-230.2010.

MARQUES, R. et al. Custos da cadeia de procedimentos no tratamento do infarto agudo do miocárdio em hospitais brasileiros de excelência e especializados. *Rev Assoc Med Bras*; 58(1):104-111.2012.

MARTINS, O.M et al. C-Reactive protein predicts acute myocardial infarction during high-risk noncardiac and vascular surgery. *Clinics*. v. 66 p. 773–776.2011.

MARTINSSON, A. et al. Beta-adrenergic receptor responsiveness to isoprenaline in humans: concentration-effect, as compared with dose-effect evaluation and influence of autonomic reflexes. *Br J Clin Pharmacol*. v.28, p.83-94.1989.

MAUS, M. et al. Store-Operated Ca²⁺ Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism. v.25, p.698-712.2017.

McHUGH, J. et al. Beta-blockers in the management of cardiovascular diseases. *Osteopathic Family Physician* v.2,p.131-138.2010.

MENDES, A.S et al. Access of patients with myocardial infarction to cardiology reference hospital. *Acta paul. enferm*. V.27. p.1-8.2014.

MENEZES I.A.C et al. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *J Bioscience* v.65, p.562-566.2010.

MENYAR, A. Drug-Induced Myocardial Infarction Secondary to Coronary Artery Spasm in Teenagers and Young Adults. *Journal of postgraduate medicine*. v.52. p.51-56.2006.

MEWTON, N. et al. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. V.55, p.1200-1205.2010.

MINUZZO, L. et al. Association between Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Troponin in Acute Coronary Syndrome. *Arq. Bras. Cardiol*. v.103.p.513-520.2014.

MIRI, M et al. Inhibitors of Alzheimer's BACE-1 with 3,5-bis-N-(aryl/heteroaryl) carbamoyl-4-aryl-1,4-dihydropyridine Structure. *Arch. Pharm. Res*. v. 1, p.1-14.2014.

MOBIN, M et al. Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry Analysis and Vasorelaxant Effect of Essential Oil from *Protium heptaphyllum (Aubl.) March.* *BioMed Research International*. V.2017. p. 1-7.2017.

MOBIN, M et al. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum(Aubl.)* and their antifungal activity against *Candida* specie. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, p.531-538. 2016.

MOHAN, M. et al. Cardioprotective potential of *Punica granatum* extract in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Journal of pharmacology and pharmacotherapeutics*. v.1. p.32-37.2010.

MOHAN, P & BLOOM, S. Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovasc Pathol*. V.8, p.:255-261.1999.

MOKI, M. et al. Resveratrol Provides Cardioprotection after Ischemia/reperfusion Injury via Modulation of Antioxidant Enzyme Activities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. v. 12, p.867-875.2013.

MOOR. V.C.A et al. Dyslipidemia in Patients with a Cardiovascular Risk and Disease at the University Teaching Hospital of Yaoundé, Cameroon. *Int J Vasc Med.* V.2017, p.1-5.2017.

MORRISON, L.J. et al. Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis. *JAMA.* V. 283, p.2686-2692.2000.

MOSMMAN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunology Methods.*v.65, p.55-63.1983.

MOTTA, V.T. *Bioquímica clínica.*2ª ed.2011.

MOURA, P.R. & VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia medica,* v. 21, p. 31-36, 2011.

MOYER, P et al. Development of Systems of Care for ST-Elevation Myocardial Infarction Patients The Emergency Medical Services and Emergency Department Perspective. *Circulation.* V.116. p.43.38.2007.

MUKAMAL, K & LAZO, M. Alcohol and cardiovascular disease. *The BMJ.* V.356, p. 1-2. 2017.

MYTHILI, S & MALATHI, N. Diagnostic of acute myocardial infarction (Review). *Biomedical reports.* v.3, p.743-748.2015.

NADE V.S et al. Cardioprotective and Antihypertensive Potential of *Morus alba*L. in Isoproterenol induced Myocardial Infarction and Renal Artery Ligation-induced Hypertension. *Journal of natural remedies.* V.13.p.57-64.2013.

NAYLER, W.G; LIU, J; PANAGIOTOPOULOS, S. Nifedipine and experimental cardioprotection. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* v.4, p 879-886.1990.

NETO, A.A.C et al. Nutrição mineral: avaliando a escassez nutricional em plantas. IN: VII Botânica no Inverno 2017, 7ª ed. p. 245-275.2017.

NIIJIMA, A et al. The effects of interleukin-1 on the activity of adrenal, splenic and renal sympathetic nerves in the rats. *J Auton Nerv Syst.* Vol.36.p.183-192.1991.

NING X.H. ZHANG J. LIU J. et al. Signalling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction *J Am Coll Cardiol* v. 36.p. 282-287.2000.

NORDMANN AJ, et al. Clinical outcomes of primary stenting vs. balloon angioplasty in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med.* V.116, p.253-262.2004.

NOSAKA, S. et al. Vagus cardioinhibitory fibers in rats. *Arc Eur J Physiol*, v.379,p.281-285.1979.

OCARANZA, M.P et al. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* v.40 p.246-254.2002.

OHMAN, E.M. et al. Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST elevation. *Br Heart J.* v.63,p.335-338.1990.

OJHA, S. et al. Cardioprotective Potentials of Plant-Derived Small Molecules against Doxorubicin Associated Cardiotoxicity *Oxid Med Cell Longev.* V.2016, p.1-19. 2016.

OLAFSSON B. et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* v.76, p.1135-1145.1987.

OLIVEIRA, A. P. Estudos dos efeitos cardiovasculares do ácido (8)17, 12E, 14-labdatrieno-18-(óico), um diterpeno isolado da *Xylopi langsdorfiana* St. Hil & Tul. (Annonaceae) em Ratos. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB.2004.

OLIVEIRA, A.P et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). *Vascul Pharmacol.* v.44, p.338-44.2006.

OLIVEIRA, A.P. Efeitos cardiovasculares do diterpeno labdano-302 - Estudos em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME). Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB.2008.

OLIVEIRA, M.G. et al. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. *Chem Biol Interact.* V.25, p.254:54-62.2016.

OLIVETTI, G et al. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* vol.45, p.68-75.2000.

OTTANI, F. et al. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol.* V.67, p.365-374.2016.

PANDEY S.K et al. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae., *Pest. Manag. Sci.*, v.69, p. 1235-1238.2013.

PANDEY, R. & GUPTA, N.K. Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. Supplementary material of journal of the association of physicians of India. v. 51.p.8-13.2011.

PANEL, M et al. Targeting mitochondrial permeability as a pharmacological cardioprotective strategy.. *Medical Research Archives.*v. 5, p.1-31.2017.

PARASURAMAN, S & RAVEENDRAN, R. Measurement of invasive blood pressure in rats. . Pharmacol Pharmacother.v.3, p. 172–177.2012.

PASOTTI, M et al. The pathology of myocardial infarction in the pre- and post-interventional era. Heart. V.92, p.1552–1556.2006.

PAUDEL K R et al. Pharmacological effects of traditional herbal plant garlic (*Allium sativum*): A review. Journal of Kathmandu Medical College.V.3, p.158-161.2014.

PEISS, C.N & MANNING, J.W. Effects of Sodium Pentobarbital on Electrical and Reflex Activation of the Cardiovascular System. Circulation Research, v.14, p.228-235. 1964.

PEIXOTO-NEVES D, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. Fundam Clin Pharmacol v.24, p.341-350.2010.

PERERA, R.K. et al. Atropine augments cardiac contractility by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase type 4. Sci Rep. v.7 p.1.8.2017.

PERIOTTO, A.C.M et al. Síndrome coronariana aguda sem elevação do segmento st - angina instável e infarto agudo sem supradesnível de ST. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. V.8.2009.

PHILIPSON, L.H. β -agonist and metabolism. In: non-respiratory effects. Journal of allergy clinical immunology. v.110. p.S313-S317.2002.

PIEGAS, L et al. Aspectos epidemiológicos do infarto agudo do miocárdio no Brasil. Tópicos em epidemiologia p.93-96.2005.

PINTO N.V, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. *Phytomedicine* v.16, p.1151-1155.2009.

PIOT, C et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. V.359, p.473-481.2008.

PITT, B et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* v.348, p.1309-1321.2003.

PIZARRO G et al. Long-term benefit of early pre-reperfusion metoprolol administration in patients with acute myocardial infarction: results from the METOCARD-CNIC trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction). *J Am Coll Cardiol* v.63, p.2356–2362.2014.

POSTNIKOVA, E. et al. Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs. *Plos one*. V. 13, p. 1-18, 2018.

POZNER, C.N. Advanced cardiac life support (ACLS) in adults. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/advanced-cardiac-life-support-acls-in-adults/print>. Acesso em: 13/12/2018.

PRABODH, V et al. Importance of Cardiac Marker Enzymes (Aspartate Transaminase and Troponin I) in Acute Myocardial Infarction: A Case-Control Study from South India. *International Journal of Medical Science and Public Health*. V.1. p.118-120.2012.

PRINCE, P.S. et al. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem Biol Interact*. V.179, p.118-124.2009.

PUGLEY, M et al. Cardiac drug development: from animal models to clinical trials. In: Methods in pharmacology and toxicology. Cardiac drug guide. Human press. Vol. 1. P. 3-26. 2003.

PULEO, P.R et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for subforms of creatine kinase-MB. Circulation. V.82,p.759-64.1990.

PUNT, N.C et al. Positive inotropic effects of calcium channel antagonists are not necessarily caused by partial calcium channel agonism. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. v338, p.211-4.1988.

QUINTANS-JÚNIOR L.J. et al. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice, Pharm. Biol., v.49, p. 583-586.2011.

RADICO, F et al. Angina pectoris and myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: practical considerations for diagnostic tests. JACC cardiovascular interventions. V.7, p.454-462.2014.

RAHIMI, K. et al. Mortality from heart failure, acute myocardial infarction and other ischaemic heart disease in England and Oxford: a trend study of multiple-cause-coded death certification. J Epidemiol Community Health. 69:1000–1005. 2015.

RAHMATULLA, M.S; DEVI, K.L. Origination and development of isoproterenol-induced myocardial infarction in male wistar rats. International Research Journal of Pharmacy, v. 4. P.26-34. 2013.

RAJADURAI M. & PRINCE P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. Toxicology.v.228, p. 259–268.2006.

RATHORE, V et al. Risk Factors for Acute Myocardial Infarction: A Review. Euroasian Journal of Medical Investigation. v. 2, p. 1-7.2018.

RAZZAGHI-ASL, N et al. Molecular Docking and Quantum Mechanical Studies on Biflavonoid Structures as BACE-1 Inhibitors. *Struct. Chem.* v. 1, p.1-15.2014.

RDC 251/1997. Resolução da Diretoria Colegiada do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, Brasil, 1997. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/cns/1997/res0251_07_08_1997.html. Acesso em: 19/11/2018.

REMIÃO, F et al. Cu²⁺-Induced Isoproterenol Oxidation into Isoprenochrome in Adult Rat Calcium-Tolerant Cardiomyocytes. *Chem. Res. Toxicol.* v.15, p.861-869.2002.

REMIÃO, F et al. The study of oxidative stress in freshly isolated Ca²⁺-tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicology in Vitro* v.15, p.283–287.2001.

REMIÃO, F.M.G. Cardiotoxicidade do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação: estudos mecanísticos em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto. Tese de doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal. 2002.

RIBEIRO, Ê.A.N. Estudo das ações cardiovasculares de dois compostos (ácido ent-15 α -acetoxicaur-16-en-19-óico - CAacetoxi e 4-Nitro-N-fenilmaleimida - 4-NO₂-NFM) EM RATOS. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB. 2005.

RIBEIRO, T.P. et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* V.37. p.1440-1681.2010.

RIPPS, H & SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Mol Vis.* v.18, p.2673–2686.2012.

RISENFORS, M et al. Early treatment with thrombolysis and beta-blockade in suspected acute myocardial infarction: results from the TEAHAT Study. *J Intern Med Suppl.* V.19.p.734:735.1991.

RISÉRIUS, U. et al. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res.* V.48, p.44–51.2009.

ROGER, V.L. Epidemiology of myocardial infarction *Med Clin North Am.* vol 91p. 537-541.2007.

RONA G. Catecholamine cardiotoxicity. *Journal of Molecular Cellular Cardiology.* v.17 p.291–300 1985.

ROOLVINK V et al. Early intravenous beta-blockers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* v.67, p.2705–2715.2-16.

ROSS, A.M et al. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Adenosine as an Adjunct to Reperfusion in the Treatment of Acute Myocardial Infarction (AMISTAD-II). V.45, p.1775-1780.2005.

ROY, A et al. Cholinergic Activity as a New Target in Diseases of the Heart. *Mol Med.* v.20, p.527-537. 2014.

ROY, J & GUENNEC, J.Y. Cardioprotective effects of omega 3 fatty acids: origin of the variability. *J Muscle Res Cell Motil.* V.38, p.25-30.2017.

RYU, Y et al. Gallic acid prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulation of JNK2 signaling and Smad3 binding activity. *Sci Rep.* v.6, p.1-14.2016.

SABATINE, M.S et al. Addition of Clopidogrel to Aspirin and Fibrinolytic Therapy for Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation. *N Engl J Med* , v.352, p.1179-1189.2005.

SABINO, C.K.B et al. Cardiovascular effects induced by alpha-terpineol in hypertensive rats. *Flavor and fragrance journal*. v.28, p.333-339. 2013.

SADEGHZADEH, S et al. The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats. *Physiol Pharmacol* v.22, p.54-62.2018.

SAITO K, et al. The biological properties of monoterpenes: Hypotensive effects on rats and antifungal activities on plant pathogenic fungi of monoterpenes. *Mokuzai Gakkaishi* v.42, p.677-680.1996.

SANCHES, V.C.D. et al. Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* v.75, p.1300-1311.1997.

SANDER, T Osiris Property Program, developed by Actelion Pharmaceuticals Ltd. Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland, available in <http://www.organicchemistry.org/prog/peo/>

SANDMANN, S et al. Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. v.37, p.64-77.2001.

SANTOS, M.R.V et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* v.21, p.764-771.2011.

SARKIC, A & STAPPEN, I. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics* V.5, p11.2018.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia sobre angina instável e infartoagudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST (II edição, 2007) – atualização2013/2014. 2014.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). V Diretriz da sociedade brasileira de cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. 2015.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia).III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. Arq. Bras. de Cardiol. - Volume 83, Suplemento IV, São Paulo. 2004.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia).IV Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento ST. Arq. Bras.de Cardiol. - Volume 93, São Paulo. 2009.

SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). Diretriz da sociedade brasileira de cardiologia e da sociedade brasileira de hemodinâmica e cardiologia intervencionista sobre intervenção coronária percutânea. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. V. 109, Nº 1, Supl. 1, 2017.

SCARABELLI T.M. et al. Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. FEBS letter. Vol 583.p.531-541.2009.

SCHAMROTH L, BRADLOW BA Incomplete Left Bundle-Branch Block. Heart J. v.26 p.285–288. 1964.

SCHWARTZ G.G, et al.: Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. JAMA v.285, p. 1711–1718.2001.

SCHWINGER, R. et al. Negative Inotropic Properties of Isradipine, Nifedipine, Diltiazem, and Verapamil in Diseased Human Myocardial Tissue. Journal of Cardiovascular Pharmacology. v.15p.892-899.1990.

SETHI, R & DHALLA, N. Inotropic responses to isoproterenol in congestive heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. Journal of Cardiac Failure.v 1, p.391-399. 1995.

SHUKLA, S.K et al. β -Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats, Indian J. Clin. Biochem. V.30, p.27–34, 2015.

SHUKLA, S.K et al. Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. Nat Prod Res. v.24, p. 873-898.2010.

SHUKLA, S.K et al. β -Adrenoreceptor Agonist Isoproterenol Alters Oxidative Status, Inflammatory Signaling, Injury Markers and Apoptotic Cell Death in Myocardium of Rats. Indian J Clin Biochem. v.30. p.27-34. 2015.

SIDDIQUI, M.A et al. Isoprenaline: A tool for inducing myocardial infarction in experimental animal. International Journal of Research and Reviews in Pharmacy and Applied Sciences.v.6, p.1318-1326.2016.

SIMÕES, C.M.O. et al. (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2017.

SIMPLÍCIO, J.A. et al. O Labdano Ácido Ent-3-Acetóxi-Labda-8(17),13-Dieno-15-Óico Reduz Pressão Arterial Em Ratos Hipertensos. Arq Bras Cardiol. V.106, p.481-490.2016.

SIMPSON, P.J & LUCHESSI,B.R. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. J Lab Clin Med. V.110, p.13-30.1987.

SLUITJER, J.P et al. Novel therapeutic strategies for cardioprotection. Pharmacol Ther. V.144, p.60-70.2014.

SMANI, T et al. Phospholipase A2 as a Molecular Determinant of Store-Operated Calcium Entry. In: Calcium Entry Pathways in Non-excitable Cells. Experimental Medicine and Biology. v. 868, p.111-131. 2016.

SOARES M.C, et al. Eucalyptol, na essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res* v.38, p.453-461.2005.

SOEIRO, A.M. et al. Mortality reduction with use of oral beta-blockers in patients with acute coronary syndrome. *Clinics [online]*. V.71, p.635-638. 2016.

SONNE, D.P. et al. Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9–36) amide against ischemia–reperfusion injury in rat heart. *Regulatory Peptides*. V. 146, p.243-249.2008.

SOUZA R.H., et al. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats, *DARU J. Pharm. Sci.*, v.19, p.277-281.2011.

SPATH, N et al. Novel cardioprotective and regenerative therapies in acute myocardial infarction: a review of recent and ongoing clinical trials. *Future Cardiology*. v. 12, p. 655-672.2016.

STASSEN,F.R et al. Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. v.29,p.780-788.1997.

STOCKBURGER, M. et al. The Emergency Medical Care of Patients With Acute Myocardial Infarction. *Dtsch Arztebl Int*. v.113, p.497–502.2016.

STONE, N.J. et al. ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults. A report of the American College of Cardiology/ American Heart Association task force on practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 63. P.2889-2934.2013.

SUN, L et al. The Role of Muscarinic Receptors in the Beneficial Effects of Adenosine against Myocardial Reperfusion Injury in Rats. *Plos One*. v.6, p.1-8.2011.

SZASZ, G et al. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. Clin Chem, v. 22, p.650- 656.1976.

SZENTANDRÁSSY, N et al. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. Life Sci v.74: p.909-921.2004.

TAN J, et al. Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Vol.289. p.2265-2271.2005.

TANI, S et al. Efficacy of calcium channel blocker in the secondary prevention of myocardial infarction-retrospective analysis of the 10-year prognosis or coronary thrombolysis-treated patients. Circ J. v. 68, p.853-859.2004.

THOMPSON, M. Planaria Software LLC (1994-2004). ArgusLab 4.0.1, available in: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>.

THYGESEN K., et al..Third universal definition of myocardial infarction. Journal of the American college of cardiology. 60 (3), 1-5. 2012.

TIMERMAN,A et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST (II Edição, 2007). SBC, 2007.

TIMMERS, L. et al. Exenatide Reduces Infarct Size and Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Ischemia and Reperfusion Injury. V.53. p.501-510.2009.

TIWARI R. et al. Cardioprotective potential of myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. Phytotherapy Research. V.23, p.1361-1366.2009.

TONINO PA, et al. FAME Study Investigators. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med.* V.360, p.213-224.2009.

TOUVAY C, et al. Effect of limonene and sabinol on monocrotaline induced lung alterations and pulmonary hypertension. *Int Arch Allergy Immunol* v.107, p.272-274.1995.

TRINDER P et al. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann. Clin. Biochem.*v.6, p.24–27.1969.

TROTT, O et al. AutoDockVina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* v.31, p. 455-461.2010.

UPAGANLAWAR, A et al. Isoproterenol Induced Myocardial Infarction: Protective Role of Natural Products. *Journal of Pharmacology and Toxicology.* v.6 p.1-17, 2011.

VALENTI, V.E et al. Strain differences in baroreceptor reflex in adult wistar kyoto rats. *Clinics* v. 65.p.203-208.2010.

VAN ES RF et al. Antithrombotics in the Secondary Prevention of Events in Coronary Thrombosis-2 (ASPECT-2) Research Group. Aspirin and coumadin after acute coronary syndromes (the ASPECT-2 study): a randomised controlled trial. *Lancet.* V.360, p.109-113.2002.

VERNARDOS K. et al. Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury, Antioxidant Enzyme Systems, and Selenium: A Review. *Current medicinal chemistry.* v14,p.1539-1549.2007.

WANG, G et al. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. In: *Natural products: drug discovery and therapeutic medicine.* Human press. Totowa, NJ. p.197-227.2005.

WANG, J. et al. Effects of nine antihypertensive drugs on blood pressure variability in sinoaortic-denervated rats. *Acta Pharmacologica Sinica* v. 27, p 1013–1017. 2006.

WANG, Q. et al. Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. V.96, p.1-11.2017.

WANG, X. et al. Huaier extract induces autophagic cell death by inhibiting the mtor/s6k pathway in breast cancer cells. *Plos one* v. 10, p 1-14.2015.

WARNICA, J.W. Infarto Agudo do Miocárdio. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArbios-cardiovasculares/doen%C3%A7a-arterial-coronariana/infarto-agudo-do-mioc%C3%A1rdio-iam>. Acesso: 14/12/2018.

WESTON A.H et al. Impairment of endothelial SKCa channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology*. v.160, p.836-843.2010.

WEVER, W.D et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA*.v.278,p.2093-2098.1997.

WEXLER, B.C; JUDD, J.T. Acute Myocardial Histopathology in Normal and Arteriosclerotic Rats During Isoproterenol-induced Infarction. *Br J Exp Pathol*. V.51, p.646–652.1970.

WHITE, R.D; GRANDE, P; WAGNER, G.S. Serum CK-MB in Diagnosis and Assessment of Acute Myocardial Infarction. *Acute coronary care*. p.159-165.1985.

WONG, Z.W. et al. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy*. V.94. p.1145-1166.2017.

WOO, J.S. & KIM, W. Do exenatide truly improve the myocardial infarction size?. International Journal of Cardiology. v.168. p.2993.2013.

World Health Organization WHO's Human Genetics areas of work. 2018. Disponível em: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: 15/12/2018.

World Health Organization. Cardiovascular diseases, 2018. Disponível em: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: 15/12/2018.

World Health Organization. Cardiovascular diseases: key facts 2017. Disponível em: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: 15/12/2018.

WU, A.H. et al. Comparison of myoglobin, creatine kinase-MB, and cardiac troponin I for diagnosis of acute myocardial infarction. Ann Clin Lab Sci v. 26, p. 291-300.1996.

WU, J.M. et al. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. Am J Cardiovasc Dis.v.1, p.38-47.2011.

WU, J.M. et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). Int J Mol Med.v.8, p.3-17.2001.

YADAV, C.H et al. Isoproterenol toxicity induced ecg alterations in wistar rats: role of histamine H₃ receptor agonist imetit. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. v. 6, p. 654-658.2014.

YAHALOM, M et al. Clinical Significance of Conditions Presenting with ECG Changes Mimicking Acute Myocardial Infarction. Int J Angiol. V.22, p.115-122.2013.

YAMANAKA, K. et al. Antihypertensive effects of amlodipine, a new calcium antagonist. Nihon Yakurigaku Zasshi. v. 97, p. 115-126. 1991.

YANAGITA, T et al. Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells". *Lipids in Health and Disease*. V.7, p.38.2008.

YANG, T. Biosynthesis of monoterpene alcohols, derivatives and conjugates in plants. Roles in resistance to western flower thrips. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2013.

YANG, X.M. et al. Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts. *Basic Research in Cardiology*.v. 101.p 311–318.2006.

YILDIRIM E et al. Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleopte *Curculionidae*), *J. Appl. Bot. Food Qual.*, v.86, p.198-204.2013.

YU, W. et al. Carvacrol Protects against Acute Myocardial Infarction of Rats via Anti-oxidative and Anti-apoptotic Pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v..36, p.584.2013.

YUSUF S et al. Update of effects of calcium antagonists in myocardial infarction or angina in light of the second Danish Verapamil Infarction Trial (DAVIT-II) and other recent studies. *Am J Cardiol*. v67, p.1295-1297.1991.

ZAAFAN, M.A et al. Isoprenaline-induced myocardial infarction in rats: protective effects of hesperidin. *Egyptian Journal of Basic and Clinical Pharmacology*.v.2,13-22.2012.

ZAUGG, M. & SCHAUB, M.C.. Cellular mechanisms in sympathomodulation of the heart. *Brith Journal of Anaesthesia*. Vol. 23.p 34-52.2004.

ZHANG J. WILKE N. WANG Y. et al. Functional and bioenergetic consequences of post infarction left ventricular remodelling in a new porcine model *Circulation* v. 94. P.1089-1100. 1996

ZHANG, G et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovascular Research*. v.65. p.230 – 238. 2005.

ZHANG, J. et al. Isoproterenol-induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats: Correlation of Reversible and Irreversible Myocardial Injury with Release of Cardiac Troponin T and Roles of iNOS in Myocardial Injury. *Toxicology pathology*. v.36.p.277-278. 2008.

ZHAO, J et al. Activation of cardiac muscarinic M₃receptors induces delayed cardioprotection by preserving phosphorylated connexin43 and up-regulating cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology* v.159, p.1217–122.2010.

ZHENG, X.H. et al. Protective effect and mechanistic evaluation of linalool against acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *RSC Adv.*v. 7, p.34473–34481.2017.

ZHOU,B et al. Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.Vol.52, 2012, p.43–47.

ZIPES, D et al. Braunwald Tratado de Doenças Cardiovascular. Vol 2, 10^a ed. 2017.

ZORNOFF, L.A.M et al. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq. Bras. Cardiol.* V.92 , p.150-156.2009.

ZUZARTE, M & SALGUEIRO, L. Essential Oils Chemistry. *Bioactive Essential Oils and Cancer*. P.19-28.2015.

ZWEIER,J.L & TALUKDER, M.A.H. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* v.70, p.181–190,2006.

WOOLLEY, D. C.; MCWILLIAM, P. N.; FORD, T. W.; CLARKE, R. W. The effect of selective electrical stimulation of non-myelinated vagal fibres on heart rate in the rabbit. *J Auton Nerv Syst*, v.21, p.215-221, 1987.

(ANEXOS)

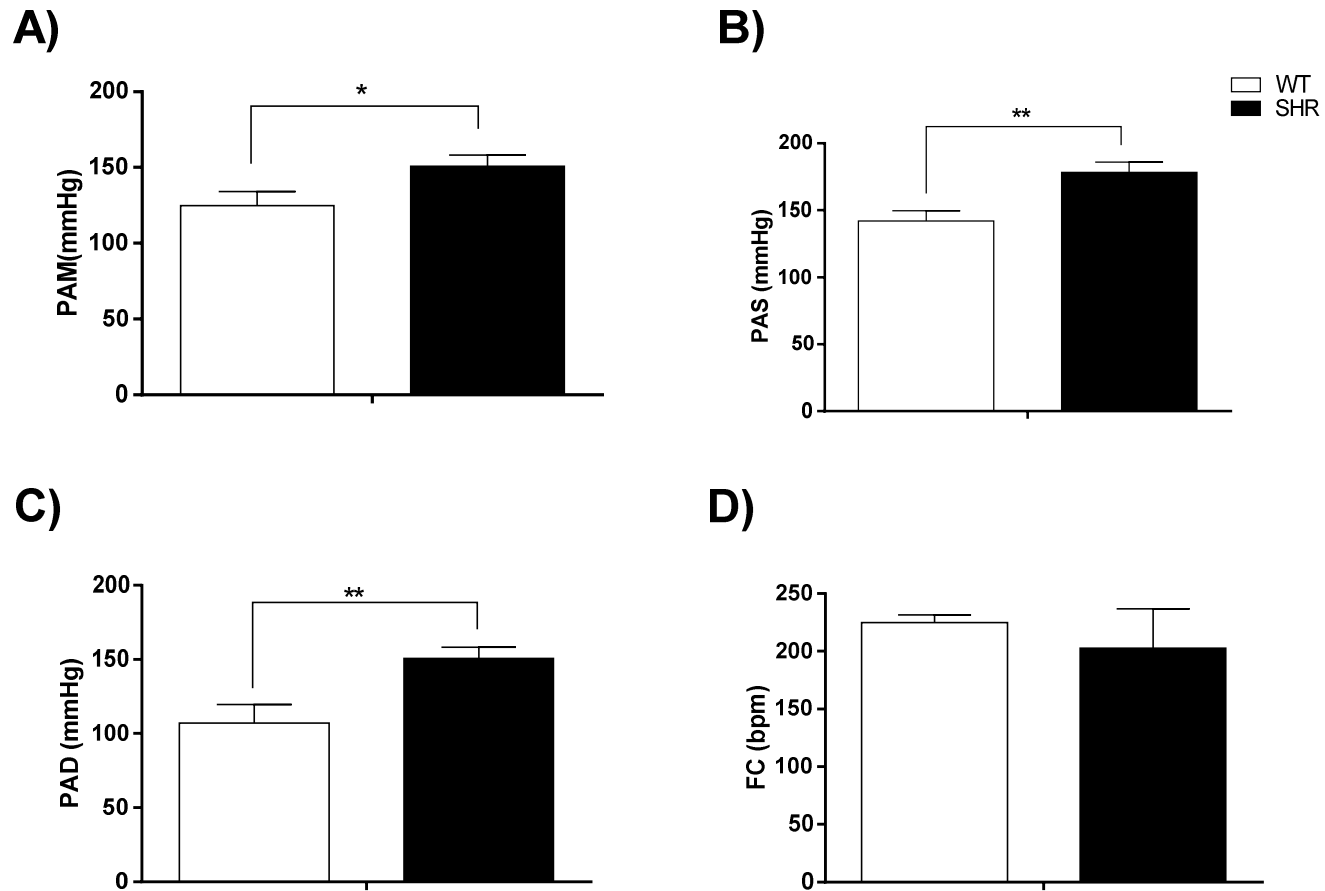
ANEXO I (Parâmetros pressóricos nas linhagens de ratos wistar e SHR)

GRÁFICO 28 – Parâmetros hemodinâmicos basais nas linhagens de ratos WT e SHR. Resultados expressos em média \pm E.P.M e análise estatística teste "t" student. Significantes quando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ N=5.

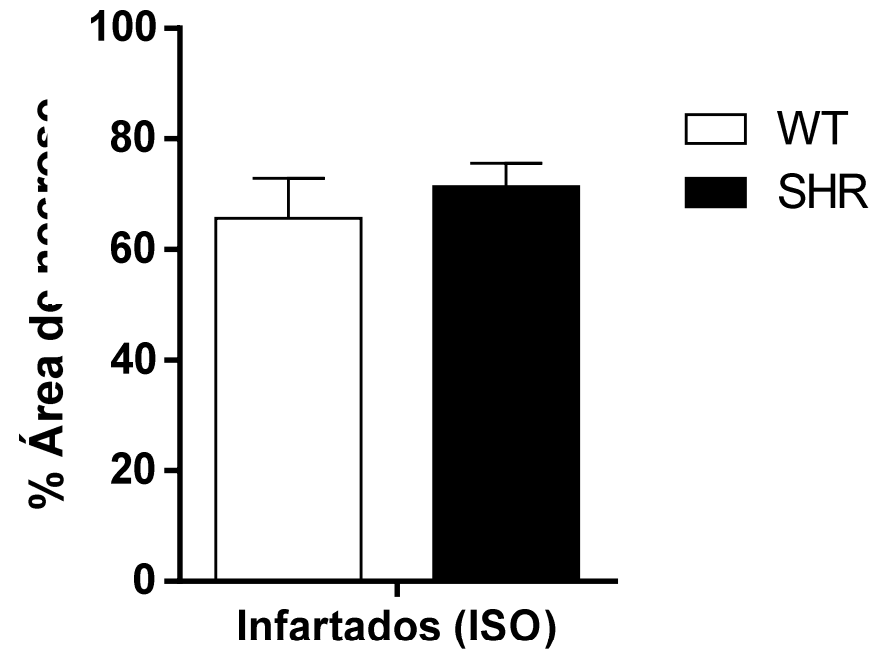
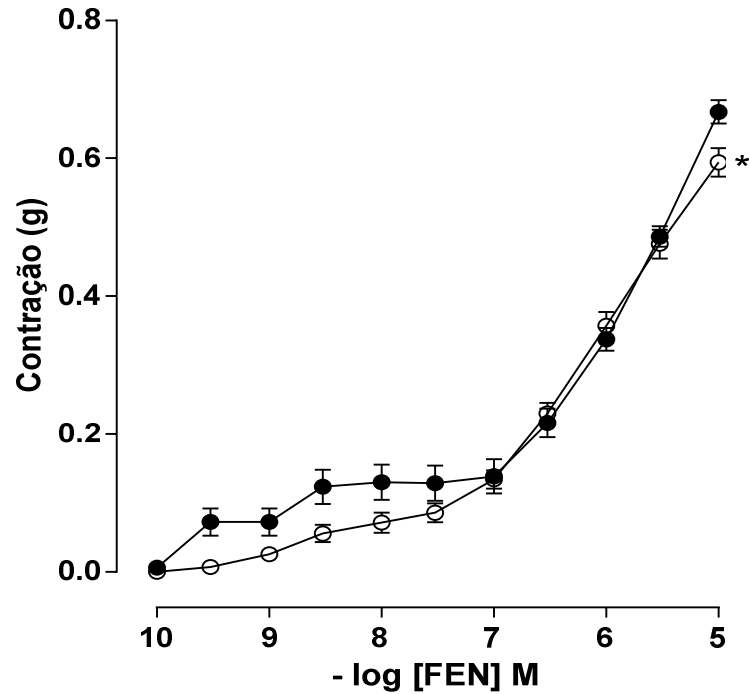
ANEXO II (área de necrose ratos infartados wistar e SHR)

GRÁFICO 29 - Percentagem de área de necrose após infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (85mg/kg 2x s.c) nas linhagens de ratos WT e SHR. Análise estatística teste "t" student. n=5.

Anexo III (Reatividade vascular nas linhagens de ratos wistar e SHR)

A)



B)

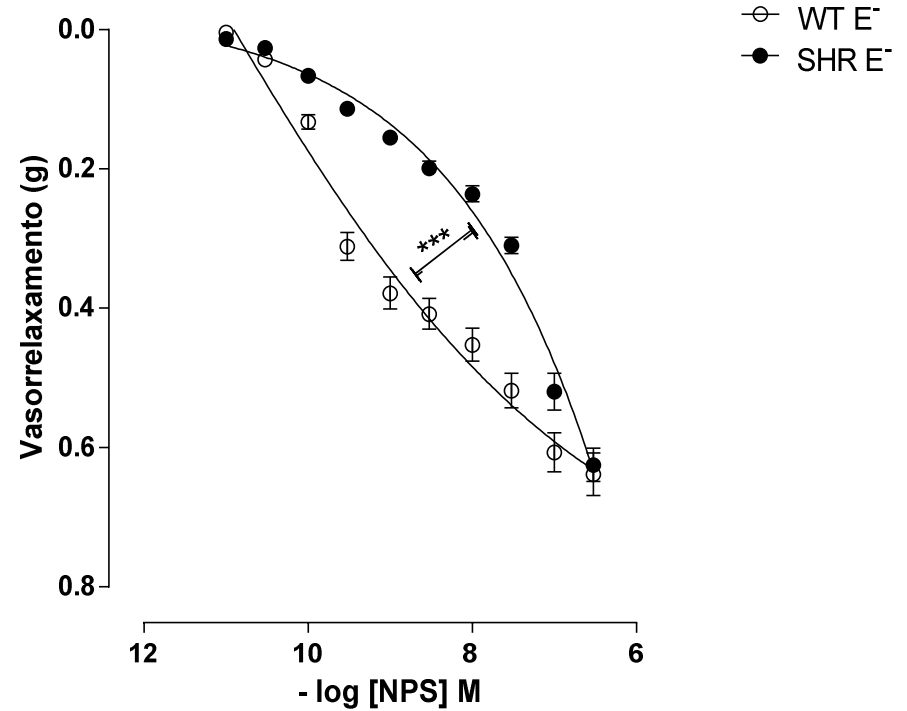


GRÁFICO 30 – Reatividade vascular obtida pela curva concentração-resposta para: (A) fenilefrina (FEN) (10^{-10} - 10^{-5} M) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) (3×10^{-11} - 10^{-7} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada, sem endotélio funcional de ratos Wistar (○) e ratos SHR (●). Valores expressos com média \pm e.p.m. Análise estatística teste “t” student * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. WT. n=5

Anexo IV (Parecer do comitê de ética CEUA 09/2015)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº09/2015

TÍTULO: Estudo dos potenciais citoprotetores do miocárdio induzidos por *Alpha-terpineol* isolado e por lipossomas de *Alpha-terpineol* em ratos wistar e espontaneamente hipertensos.

RESPONSÁVEL: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

OBJETIVO: Investigar o potencial citoprotetor do miocárdio induzido por alpha-terpineol isolado e em lipossomas em ratos *wistar* e espontaneamente hipertensos.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 12.08.2015 a 12.08.2019

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Rato heterogênico	Wistar	140
Rato isogênico	SRH	140

Maceió, 09 de julho de 2015.

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL
Prof. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120888

ANEXO V (Depósito patentário)

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 004434 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/03/2019 às 10:47, Petição 870190021822

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Usos terapêuticos do alpha-terpineol para o tratamento das doenças cardiovasculares**Resumo:** As doenças cardiovasculares (DC's) ocupam o primeiro lugar em óbitos no mundo, devido à injúria por anóxia. A complexidade da farmacoterapia das DC's associada à inexistência de fármacos cardioprotetores incentiva o desenvolvimento de estratégias de cardioproteção. Assim, a-terpineol (TPN) é um monoterpeneo que exibe ações vasorelaxante, mas não cardioprotetora. Este trabalho objetivou-se em avaliar a cardioproteção do TPN nas lesões cardíacas. Para isto ratos foram alocados em 6 grupos e tratados por 15 dias por via oral, em seguida induzidos ao infarto: (G1= salina 0,9%); (G2= Infartado salina 0,9%); (G3=TPN 25 mg/kg); (G4=TPN 50 mg/kg); (G5=TNP 75 mg/kg) e (G6=TPN 50 mg/kg sem ISO). No 16º os animais foram anestesiados e foram realizados ensaios bioquímicos, morfométricos, hemodinâmicos, reatividade baroreflexa e eletrocardiográficos. Os resultados mostraram que TPN aumentou a sobrevivência dos animais ao infarto induzido, reduziu a área de necrose no miocárdio, preveniu as alterações eletrocardiográficas e inibiu a liberação de marcadores cardíacos, além disso, TPN inibiu a elevação da frequência cardíaca induzida por isoproterenol. Adicionalmente, TPN produziu dilatação coronariana e neovascularização endotelial em aortas de ratos. TPN induziu bradicardia intravenosa e seus mecanismos envolvem receptores M2 cardíacos e o bloqueio sobre os VOCC's. Conclui-se que o TPN produz cardioproteção.**Figura a publicar:** 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 07/03/2019 às 10:47, Petição 870190021822