

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

AMANDA KARINE BARROS FERREIRA RODRIGUES

EFEITO CARDIOPROTETOR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO
DE *TRICHILIA CATIGUA* EM RATOS INFARTADOS

MACEIÓ

2017

Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues

Efeito cardioprotetor da fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua* 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

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

R696e Rodrigues, Amanda Karine Barros Ferreira.
Efeito cardioprotetor da fração de acetato de etila do extrato de
Trichilia catigua em ratos infartados. / Amanda Karine Barros Ferreira
Rodrigues. – 2017.
126 f.: il. Gráfs

Orientadora: 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, 2017.

Bibliografia: f. 114-125.
Anexo: f. 126

1. Plantas medicinais – *Trichilia catigua*. 2. Cardioproteção. 3. Infarto
do miocárdio. 4. Isoprotenol. 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

Amanda Karine Barros Ferreira

Efeito cardioprotetor da fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua* 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 11 de abril de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto - (UFAL)

Prof. Dr. Marcelo Duzioni - (UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite - (UNINASSAU Maceió)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. **Êurica Adélia Nogueira Ribeiro** pelas oportunidades, confiança depositada e ensinamentos que foram imprescindíveis na minha formação. Professora serei grata eternamente!

Aos professores **Gisely Cristiny Lopes, André Oliveira Fernandes da Silva e João Carlos Palazzo de Mello** do Laboratório Palafito (Universidade Estadual de Maringá) por cederem a fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua*.

Ao Prof. **Josué Caririnha Caldas** e seu aluno **Woodland de Souza Oliveira** do Laboratório de Química Analítica pela atenção, por disponibilizar seu ambiente laboratorial, pela orientação e execução dos ensaios antioxidantes.

Ao doutorando **Edeildo Ferreira da Silva Júnior** do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela atenção e execução do *docking* molecular.

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

Ao Prof. **Célio Rodrigues** do Laboratório Arteriosclerose Humana e Experimental pela atenção e por disponibilizar seu ambiente laboratorial para execução do processamento histológico e análise estereológica.

Ao amigo **Emanuel Tenório** por participar incansavelmente de todas as fases desse trabalho, pela amizade e apoio. Serei grata eternamente!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular que participaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho **Alessandro Bernardino, Jessyka Galvão, Roberta Lima, Edla Herculano, Cintia Alves e Carlos Alberto**.

Aos professores **Adriana Ximenes, Marcelo Duzzioni, Emiliano Barreto, Luiz Arthur Calheiros Leite e João Xavier** por participarem da qualificação e defesa do meu doutorado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pelo profissionalismo e conhecimentos compartilhados.

À coordenação e ao funcionário do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela prontidão em ajudar.

À FAPEAL, CAPES e UFAL pelo suporte financeiro e estrutural.

MUITO OBRIGADA!

A Deus e Nossa Senhora por estarem sempre ao meu lado, guiando meus passos e me capacitando para enfrentar os obstáculos da vida.

Aos meus amados Dora (mãe), Valdeck (pai), Lucas (irmão) e Célio (esposo) por todo amor, apoio e incentivo a mim dedicados.

RESUMO

Introdução: *Trichilia catigua* é uma árvore distribuída na Mata Atlântica conhecida como “catuaba” que é utilizada pela população como um tônico por suas atribuídas funções afrodisíacas e estimuladoras da memória. Estudos confirmam que *T. catigua* possui atividade antioxidante, atuando no sistema nervoso central estimulando a proliferação hipocampal, cognição, protetora do infarto cerebral, antinociceptiva e atividade antidepressiva. Os compostos fenólicos são os principais componentes das cascas de *T. catigua* e são comumente usados para fins medicinais. **Objetivo:** Avaliar o potencial cardioprotetor da fração acetato de etila do extrato de *T. catigua* (AETC) em ratos infartados. **Método:** Ratos Wistar machos foram randomizados em grupos (n=5) tratados cronicamente com AETC e o infarto induzido com isoproterenol. Após eutanásia, sangue e tecidos foram utilizados para análise de parâmetros de morfometria e bioquímica. Foram utilizadas abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de identificar vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor. **Resultados:** Expressos em média \pm EPM e análise de variância One-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls, valor de $p < 0,05$. AETC diminuiu ($p < 0,001$), não dependente de dose, a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (ISO) nas variáveis: peso do coração, peso do ventrículo esquerdo, espessura do ventrículo esquerdo, área e volume médio de cardiomiócitos. E a necrose cardíaca induzida por ISO nas variáveis: creatina quinase fração MB, creatina quinase total, lactato desidrogenase, transaminase glutâmico oxalacética, área de necrose após coloração com cloreto de trifeniltetrazólio, densidade de volume, densidade de perfis, densidade de número e número de cardiomiócitos íntegros. Além disso, AETC apresentou significativo efeito hipotensor, bradicárdico, vasorrelaxante e efeito antioxidante. **Conclusão:** O tratamento crônico com AETC apresenta efeito cardioprotetor para o infarto em ratos, por alterar variáveis relacionadas à hipertrofia e a necrose cardíaca causadas por isoproterenol.

Palavras-chave: *Trichilia catigua*. Cardioproteção. Infarto do miocárdio. Isoproterenol.

ABSTRACT

Introduction: *Trichilia catigua* is a tree distributed in the Atlantic Forest known as "catuaba" that is used by the population as a tonic for its attributed aphrodisiac and memory stimulating functions. Studies confirm that *T. catigua* has antioxidant activity, acting in the central nervous system stimulating hippocampal proliferation, cognition, protector of cerebral infarction, antinociceptive and antidepressive activity. Phenolic compounds are the main components of *T. catigua* bark and are commonly used for medicinal purposes. Objective: To evaluate the cardioprotective potential of ethyl acetate fraction of *T. catigua* extract (AETC) in infarcted rats. Method: Male Wistar rats were randomized into groups (n = 5) AETC treated for 30 days and the induced infarct with isoproterenol. After euthanasia, blood and tissue were used for analysis of morphometric parameters and biochemistry. Approaches have been used *in silico*, *in vitro* and *in vivo* in order to identify courses of action involved in the cardioprotective effect. Results: Expressed as mean \pm SEM and analysis of variance One-way ANOVA followed by multiple comparison test Newman-Keuls, $p < 0.05$. AETC decreased ($p < 0.001$) isoproterenol (ISO) induced cardiac hypertrophy in the variables heart weight, left ventricular weight, left ventricular thickness, mean area and volume of cardiomyocytes. And decreased non-dose dependent, ISO induced cardiac necrosis in the creatine kinase MB fraction, total creatine kinase, lactate dehydrogenase, glutamic oxalacetic transaminase, area of necrosis after staining with triphenyltetrazolium chloride, volume density, profile density, number density and number of intact cardiomyocytes. In addition, AETC showed a significant hypotensive, bradycardic, vasorelaxant and antioxidant effect. Conclusion: Chronic treatment with AETC cardioprotective effect for myocardial infarction in rats by altering variables related to hypertrophy and cardiac necrosis caused by isoproterenol.

KEYWORDS: *Trichilia catigua*. Cardioprotection. Myocardial infarction. Isoproterenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo das alterações cardíacas, vasculares e do estresse oxidativo promovidos por Isoproterenol (ISO) no método simpaticomimético.....	31
Figura 2	<i>Trichilia catigua</i>	34
Figura 3	Análise cromatográfica de AETC.....	36
Figura 4	Estruturas das Cinchonaínas.....	37
Figura 5	Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio farmacológico para o estudo cardioprotetor de infarto de AETC.....	42
Figura 6	Sistemas utilizados para avaliação estereológica.....	45
Figura 7	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre a PAM e FC em ratos Wistar.....	48
Figura 8	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito agudo de AETC sobre a PAM e FC em ratos infartados.....	48
Figura 9	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito crônico de AETC sobre a PAM e FC em ratos infartados.....	49
Figura 10	Representação esquemática do protocolo experimental para verificação da influência de bloqueadores no efeito de AETC sobre a PAM e FC em ratos Wistar.....	50
Figura 11	Sistema para experimentos com anéis de artéria mesentérica superior <i>in vitro</i>	51
Figura 12	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.....	52
Figura 13	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre contração induzida por KCl 80mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.....	53
Figura 14	Efeito de AETC sobre a morfometria do miocárdio.....	64
Figura 15	Efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio...	66
Figura 16	Área de necrose de fatias de ventrículo esquerdo após reação com TTZ.....	67
Figura 17	Efeito de AETC sobre o percentual de área de necrose de fatias de ventrículo esquerdo após reação com TTZ.....	67
Figura 18	Fotomicrografias de miocárdio em coloração Hematoxilina-Eosina de	

	ratos infartados tratados com AETC.....	68
Figura 19	Efeito de AETC sobre variáveis relacionadas à integridade de cardiomiócitos.....	70
Figura 20	Efeito de AETC sobre variáveis relacionadas ao volume de cardiomiócitos.....	71
Figura 21	Efeito hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos Wistar.....	73
Figura 22	Tempo de recuperação após doses de AETC <i>in vivo</i> em ratos Wistar.....	74
Figura 23	Comparação do efeito hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos anestesiados e não anestesiados.....	75
Figura 24	Efeito agudo hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos infartados.....	76
Figura 25	Efeito crônico hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos infartados.....	77
Figura 26	Efeito de bloqueadores sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por AETC em ratos.....	79
Figura 27	Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos Wistar.....	80
Figura 28	Efeito de KCl 80 mM sobre a resposta relaxante induzida por AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos Wistar.....	81
Figura 29	Comparação entre os efeitos de AETC em anéis pré-contraídos com FEN e KCl 80 com e sem endotélio funcional.....	82
Figura 30	Efeito de AETC em anéis com e sem endotélio funcional de artéria mesentérica de ratos infartados.....	83
Figura 31	Efeito de AETC em anéis com e sem endotélio funcional de artéria mesentérica de ratos infartados e não infartados.....	84
Figura 32	Ensaio da capacidade de seqüestro frente ao radical DPPH* (50% metanol/água, m/v) de AETC.....	86
Figura 33	Ensaio de capacidade antioxidante frente ao radical ABTS ^{•+} de AETC.....	87
Figura 34	Ensaio da capacidade de sequestro de óxido nítrico de AETC.....	88
Figura 35	Ensaio do poder antioxidante por redução de Ferro (FRAP) de AETC.....	89
Figura 36	Efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados.....	91
Figura 37	Efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados.....	91
Figura 38	Efeito de AETC sobre os níveis séricos lipídicos de ratos infartados.....	92
Figura 39	Morfometria do fígado de ratos infartados após tratamento crônico com	

	AETC.....	93
Figura 40	Efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados.....	94
Figura 41	Efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados.....	95
Figura 42	Canal de cálcio, sensível a voltagem, tipo L e suas interações químicas com Cinchonaína Ia e Nifedipina.....	98
Figura 43	Interação química entre Cinchonaína Ia e seu sítio de ligação ao canal BK _{Ca}	99
Figura 44	Interação química entre Cinchonaína Iib e seu sítio de ligação no receptor muscarínico do tipo M3.....	99
Figura 45	Interação química entre Cinchonaína Ia e seu sítio de ligação na enzima catalase.....	100
Figura 46	Interação química entre Cinchonaína Iia e seu sítio de ligação à enzima catalase.....	100
Figura 47	Interação química entre Cinchonaína Iib e seu sítio de ligação à enzima óxido nítrico sintase.....	101
Figura 48	Vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor do infarto de AETC.....	114
Quadro 1	Resumo dos efeitos farmacológicos de AETC.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da solução nutritiva Tyrode (pH = 7,4).....	40
Tabela 2	Composição da solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 80 mM (pH = 7,4)	40
Tabela 3	Determinação da concentração total de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteau de AETC.....	85
Tabela 4	Ensaio da capacidade de seqüestro frente ao radical DPPH* (50% metanol/água, m/v) de AETC.....	86
Tabela 5	Ensaio de capacidade antioxidante frente ao radical ABTS ^{•+} de AETC.....	87
Tabela 6	Ensaio do poder antioxidante por redução de Ferro (FRAP) de AETC.....	89
Tabela 7	Ensaio do poder antioxidante por complexação de Fe (II).....	90
Tabela 8	Relação entre os isômeros da Cinchonina Ia, Ib, IIa, IIb, os alvos moleculares de maior afinidade e seus principais ligantes endógenos.....	96
Tabela 9	Relação entre os isômeros da Cinchonina Ia, Ib, IIa, IIb, os alvos moleculares de maior afinidade e seus principais ligantes endógenos.....	97

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>A</i>	Coefficiente angular
<i>Ac</i>	Corresponde ao coeficiente angular da curva analítica
A[miócitos]	Área de cardiomiócitos
AETC	Fração acetato de etila do extrato de <i>Trichilia catigua</i>
ABTS	Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACh	Acetilcolina
ACh7R	Receptor de acetilcolina do tipo 7 presente em macrófagos
AC	Adenilil-ciclase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
ASS	Acetilsalicílico
At	Área teste
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Nó atrioventricular
<i>B</i>	Coefficiente linear
BK _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância
β-AR	Receptores β-adrenérgicos
β ₁ -AR	Receptores β-adrenérgicos tipo 1
β ₂ -AR	Receptores β-adrenérgicos tipo 2
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂ .H ₂ O	Cloreto de cálcio di-hidratado
CAT	Catalase
C _{av}	Canais de Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L
CAO	Concentração do composto antioxidante
CE ₅₀	Concentração que produz 50 % do efeito máximo
CK-MB	Fração MB da creatinoquinase
CK-NAC	Creatinoquinase total
DAG	Diacilglicerol
DE ₅₀	Dose que produz cinquenta por cento do efeito máximo
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<i>E</i>	Espessura da microtomia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Emáx	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íons ferrosos
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FA	Fosfatase alcalina
FRAP	Ensaio analítico de poder antioxidante por redução do ferro
G	Grama
G-6-PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Gama-GT	Gama-glutamyltransferase
GCS	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HO ⁻	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCT	Hematócrito
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HGB	Hemoglobina
HK	Hexoquinase
HUEM#19434	Exsicata
IM	Infarto do miocárdio
IECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IF	Percentual de inibição
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISSO	Isoproterenol
IL-6	Interleucina 6
cTnI	Troponina I

Kg	Kilograma
$K_3Fe(CN)_6$	Ferricianeto de potássio
K^+	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
L	Litros
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LO	Lipoxigenase
MPO	Mieloperoxidase
Mm	Milímetro
mm^3	Milímetro cúbico
mM	MiliMolar
Mg	Miligrama
MAPK	MAPquinase
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração da hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
Mg^{2+}	Magnésio
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloreto de magnésio hexa-hidratado
MAO	Monoaminoxidase
MoO_4^{2-}	Molibdato
<i>N</i>	Tamanho amostral
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sódio mono-hidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NO^-	Radical óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NADP	Dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato
NADPH	Enzima dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato oxidase
$N_{[miócitos]}$	Número de cardiomiócitos íntegros
$NV_{[miócitos]}$	Densidade de número de cardiomiócito íntegros
O_2	Oxigênio

O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
cTnT	Troponina T
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PDB-ID	<i>RSCB Protein Data Bank</i>
pD ₂	-log CE ₅₀
PE	Polietileno
pKa	Constante de acidez
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
P	Nível de significância
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PLC	Fosfolipase C
PLT	Plaquetas
Q _{a[miócitos]}	Densidade de perfis de cardiomiócitos na área-teste
R	Coefficiente de correlação linear
RBC	Contagem de células vermelhas do sangue
RDWSD	Coefficiente de variação da amplitude de distribuição de hemoglobina
RDWCV	Coefficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos
RSD	Desvio padrão relativo
rt	Tempo de retenção
t	Temperatura
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TPTZ	Complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina
sb	Desvio padrão do branco analítico
sp	Desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear
s.c.	Subcutâneo
SOD	Enzimas superóxido desmutase
TTZ	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio

TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
Vp	Peso do ventrículo esquerdo
v/v	Volume/volume
Vv	Densidade de volume
$V_{\text{miócitos}}$	Volume médio de cardiomiócitos
$Vv_{[\text{miócitos}]}$	Densidade de volume de cardiomiócitos íntegros
XO	Xantina oxidase
xp	Valor médio encontrado para este padrão
WBC	White blood cells
%	Percentual
<	Menor
°C	Graus Celsius
6-PG	6-fosfogluconato
μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
μm^3	Micrômetro cúbico
1J95	Canal de Potássio K_{CA2+}
1GP1	Enzima Glutathione Peroxidase
1QQW	Enzima Catalase
1XOS	Enzima fosfodiesterase 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
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
$\sum Pp$	Somatório de pontos que atingem cardiomiócitos íntegros
$\sum Pt$	Total de pontos no sistema teste
\sum perfis	Somatório de perfis “núcleos contados”
π	ligações <i>pi</i>
σ	ligações <i>sigma</i>
$-\log CE_{50}$	Logaritmo negativo da concentração que produz 50 % do efeito máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Considerações sobre o infarto do miocárdio.....	23
2.2	Considerações sobre o método simpaticomimético.....	26
2.3	Considerações sobre plantas medicinais.....	32
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Geral.....	38
3.2	Específicos.....	38
4	MATERIAL.....	39
4.1	Animais.....	39
4.2	Fração acetato de etila de <i>Trichilia catigua</i> (AETC).....	39
4.3	Soluções Fisiológicas.....	40
5	MÉTODO.....	41
5.1	Ensaio farmacológico para o estudo cardioprotetor do infarto de AETC.....	41
5.1.1	Avaliação do efeito de AETC sobre a morfometria do miocárdio.....	42
5.1.2	Avaliação do efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão miocárdica.....	43
5.1.3	Avaliação do efeito de AETC sobre a área de necrose do miocárdio.....	43
5.1.4	Avaliação do efeito de AETC sobre a histologia do miocárdio.....	43
5.1.5	Avaliação do efeito de AETC sobre a estereologia do miocárdio.....	44
5.2	Estudos das vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor de AETC.....	47
5.2.1	Estudos farmacológicos com AETC <i>in vivo</i>	47
5.2.1.1	Medida direta de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar.....	47
5.2.1.2	Protocolos experimentais para os estudos <i>in vivo</i>	47
5.2.1.3	Avaliação do efeito agudo de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados.....	48
5.2.1.4	Avaliação do efeito crônico de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados.....	49

5.2.1.5	Verificação da influência de bloqueadores no efeito induzido por AETC na PAM e FC de ratos Wistar.....	50
5.2.2	Estudos farmacológicos com AETC <i>in vitro</i>	51
5.2.2.1	Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.....	51
5.2.2.2	Curva concentração-resposta de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de rato Wistar.....	52
5.2.2.3	Efeito de AETC sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.....	53
5.2.2.4	Curva concentração-resposta de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de rato infartado.....	53
5.2.3	Estudos antioxidantes com AETC <i>in vitro</i>	54
5.2.3.1	Quantificação de compostos fenólicos em AETC.....	54
5.2.3.2	Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical DPPH*.....	54
5.2.3.3	Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical ABTS* ^o	55
5.2.3.4	Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical NO ⁻	55
5.2.3.5	Ensaio analítico de poder antioxidante de AETC por redução do ferro.....	56
5.2.3.6	Ensaio analítico de poder antioxidante de AETC por atividade quelante de ferro.....	56
5.3	Verificação de outros parâmetros não cardíacos alterados por isoproterenol após tratamento crônico com AETC.....	57
5.3.1	Avaliação do efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados.....	57
5.3.2	Avaliação do efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados.....	57
5.3.3	Avaliação do efeito de AETC sobre lipídeos séricos de ratos infartados.....	57
5.3.4	Avaliação do efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados.....	58
5.3.5	Avaliação do efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados.....	59
5.4	Experimentos de <i>docking</i> molecular das Cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb em alvos receptores relacionados à cardioproteção.....	59
5.5	Análise Estatística.....	61
6	RESULTADOS.....	62
6.1	Estudo cardioprotetor do infarto de AETC.....	62
6.1.1	Efeito de AETC na morfometria do miocárdio.....	62

6.1.2	Efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio.....	64
6.1.3	Efeito de AETC sobre a área de necrose do miocárdio.....	66
6.1.4	Efeito de AETC sobre a histologia do miocárdio.....	67
6.1.5	Efeito de AETC sobre a estereologia do miocárdio.....	68
6.2	Vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor de AETC.....	71
6.2.1	Estudos farmacológicos com AETC <i>in vivo</i>	71
6.2.1.1	Efeito de AETC sobre a PAM e a FC de ratos Wistar.....	71
6.2.1.2	Efeito agudo de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados.....	75
6.2.1.3	Efeito crônico de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados.....	76
6.2.1.4	Efeito de bloqueadores sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por AETC em ratos.....	77
6.2.2	Estudos farmacológicos com AETC <i>in vitro</i>	79
6.2.2.1	Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos Wistar.....	79
6.2.2.2	Efeito de KCl 80 mM sobre a resposta relaxante induzida por AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos Wistar.....	80
6.2.2.3	Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos infartados.....	82
6.2.3	Efeito de AETC sobre ensaios antioxidantes <i>in vitro</i>	84
6.2.3.1	Quantificação de compostos fenólicos em AETC através de teste de Folin-Ciocalteu.....	84
6.2.3.2	Efeito de AETC sobre o teste DPPH.....	85
6.2.3.3	Efeito de AETC sobre o teste ABTS.....	86
6.2.3.4	Efeito de AETC sobre o sequestro de óxido nítrico.....	87
6.2.3.5	Efeito de AETC sobre a redução de ferro (III).....	88
6.2.3.6	Efeito de AETC sobre a capacidade de complexação de ferro (II).....	89
6.3	Outros parâmetros alterados por Isoproterenol após tratamento crônico com AETC.....	90
6.3.1	Efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados.....	90
6.3.2	Efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados.....	90
6.3.3	Efeito de AETC sobre lipídeos séricos de ratos infartados.....	91
6.3.4	Efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados.....	92

6.3.5	Efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados.....	94
6.4	<i>Docking molecular</i>	95
7	DISCUSSÃO	101
8	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO A – ASPECTOS ÉTICOS	126

1 INTRODUÇÃO

O infarto do miocárdio caracteriza-se pelo fornecimento de sangue e oferta de oxigênio, através das artérias coronárias ao miocárdio, menor do que necessário por este tecido. Isso implica em lesão isquêmica do miocárdio e dano aos cardiomiócitos (WORLD BANK, 2011; LIAO et al., 2015). Estudos mostram que o dano isquêmico promove lesão celular do miocárdio com hipertrofia e necrose. Estas se manifestam em alterações funcionais, bioquímicas, histopatológicas, hemodinâmicas e na capacidade antioxidante que refletem em alterações na pressão arterial, frequência cardíaca, insuficiência ventricular, disfunção endotelial e estresse oxidativo (DAVEL et al., 2006; SUGAMURA; KEANEY, 2011; DAVEL; BRUM; ROSSONI, 2014; AZEVEDO et al., 2016).

Estas características tornam o infarto do miocárdio a doença isquêmica do coração mais encontrada clinicamente, assim como, o principal motivo de incapacidade e morte no mundo (BHATNAGAR et al., 2015; SANCHIS-GOMAR et al., 2016). Consequentemente, estratégias terapêuticas alternativas têm sido investigadas, especialmente métodos com a finalidade de reforçar a resistência do coração à morte celular isquêmica, as chamadas intervenções cardioprotetoras (PERRICONE; HEIDE, 2014).

Neste contexto, plantas medicinais desempenham importante papel na terapêutica de várias doenças, incluindo as doenças cardiovasculares. Têm sido utilizadas por oferecer uma terapêutica coadjuvante no tratamento dessas patologias, pelo uso como remédio caseiro, em preparações fitofarmacêuticas, no isolamento de compostos de interesse e no uso de seus constituintes químicos ativos como protótipos para novos agentes farmacológicos, bem como para medidas de uma abordagem terapêutica preventiva (RATES, 2001; SUN et al., 2002; MISHRA; TIWARI, 2011; DU et al., 2016; VASISHT; SHARMA; KARAN, 2016).

Entre as várias espécies de plantas medicinais está a *Trichilia catigua* popularmente conhecida como "Catuaba" ou "Catiguá". É uma árvore distribuída em florestas semidecíduais, Mata Atlântica, na América do Sul e Central, muito utilizada na população como tônico, afrodisíaco e para a melhora da memória (LONGHINI et al., 2013). Os principais componentes fitoquímicos identificados nas cascas de *T. catigua* são compostos fenólicos (RABELO; PAULA; BARA, 2013) como catuabine D (KLETTER et al., 2004), cinchonina Ib (BELTRAME et al., 2006), catiguanina, catiguanina B (TANG et al., 2007), ácido clorogênico, epicatequina, catequina, β -sitosterol, estigmasterol (LAGOS et al., 2012), procyanidin B2, cinchoninas Ia, IIa e IIb (LONGHINI et al., 2013).

Em numerosos estudos experimentais *T. catigua* apresentou efeito antioxidante (CHASSOT et al., 2011; RESENDE, 2011; KANDEM et al., 2012a; LONNI et al., 2012; TANG et al., 2007), antidepressivo (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012), melhora cognitiva (CHASSOT et al., 2011), estimulante da proliferação hipocampal em ratos (BONASSOLI et al., 2012) e protetor do infarto cerebral (KANDEM et al., 2012b).

Uma vez que a fração acetato de etila do extrato de *T. catigua* apresenta o melhor perfil fitoquímico (maior concentração de cinchonainas, consideradas o padrão de qualidade da Catuaba) entre as frações obtidas de *T. catigua* (RESENDE, 2007; LONGHINI et al., 2013), o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da fração acetato de etila do extrato de *T. catigua*, como um agente cardioprotetor em um modelo com infarto do miocárdio induzido por isoproterenol e investigar os mecanismos celulares envolvidos na cardioproteção. Este estudo também tenta elucidar vias de ação envolvidas em seu efeito cardioprotetor, através de abordagens *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.

O método simpaticomimético de indução de infarto com isoproterenol é um importante modelo animal para a avaliação experimental de agentes cardioprotetores, uma vez que o isoproterenol é uma catecolamina sintética com ação agonista em receptores adrenérgicos que causa alterações fisiopatológicas, cardíacas, vasculares e estresse oxidativo, que mimetizam o infarto do miocárdio humano (CARLL et al., 2011; LUCIA et al., 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre o infarto do miocárdio

As doenças cardiovasculares têm sido líder de causa de mortalidade, pois são responsáveis por 30% de todas as mortes no mundo e a razão de um terço de todas as mortes em pessoas com idade superior a 35 anos (BHATNAGAR et al., 2015; SANCHIS-GOMAR et al., 2016).

Representam mais de 7,5 milhões de internamentos nos Estados Unidos e mais de 2.500 a cada 100.000 internamentos na Europa por ano. Este cenário gera um encargo econômico significativo em pacientes e nos sistemas de saúde devido aos custos diretos no momento da emergência e aos custos no acompanhamento da saúde após a emergência, em consequência à morbidade gerada. Em 2010, os custos médicos diretos com doenças cardiovasculares totalizaram 272 bilhões de dólares nos Estados Unidos, enquanto na União Europeia estão estimados cerca de 106 bilhões de euros anualmente (NICHOLSON et al., 2016).

Neste contexto está inserido o infarto agudo do miocárdio (IAM) que se caracteriza por uma síndrome coronariana aguda causada por fluxo sanguíneo insuficiente e suprimento de oxigênio inadequado para o coração. Pode ocorrer após ruptura de uma placa aterosclerótica, adesão plaquetária, trombose e vasoespasmos. Como consequências ocorrem lesão isquêmica do miocárdio, dano irreversível aos cardiomiócitos, gerando necrose coagulativa do miocárdio e hipertrofia por compensação da sobrecarga de trabalho em áreas não infartadas (WORLD BANK, 2011; PERRICONE; HEIDE, 2014; LIAO et al., 2015).

O IAM gera no sistema cardiovascular alterações funcionais, bioquímicas, histopatológicas, hemodinâmicas e na capacidade antioxidante que refletem em mudanças patológicas, levando a lesão da parede ventricular alterada na diástole (pré-carga) e/ou na ejeção (pós-carga), prejudicando o débito cardíaco (DAVEL et al., 2006; DAVEL; BRUM; ROSSONI, 2014). Ocorre o declínio da função cardíaca devido à liberação de neuro-hormônios (catecolaminas, angiotensina II ou de endotelina) e citocinas, aumentando a retenção de água e carga de trabalho cardíaco, tornando um grande esforço preservar a pressão arterial e perfusão renal (SUGAMURA; KEANEY, 2011). Se persistente, a resposta neuro-hormonal pode sequencialmente provocar a ativação de genes do miocárdio, promovendo hipertrofia de cardiomiócitos, remodelamento estrutural do coração, dilatação

cardíaca, insuficiência cardíaca e congestão circulatória. Além da disfunção endotelial e do estresse oxidativo (CARLL et al., 2011; AZEVEDO et al., 2016).

O IAM pode ser evitado, no entanto a inatividade física, nicotina e práticas da má nutrição refletem um estilo de vida obesogênico que está diretamente relacionado à maioria dos fatores de risco primário para IAM (hipertensão arterial, diabetes mellitus, inatividade física, obesidade total ou abdominal, tabagismo, história familiar coronariana precoce, colesterol total e LDL elevados e HDL diminuído) (DANAEI et al., 2009).

Os fatores de risco secundários são idade acima de 60 anos, sexo masculino, homocisteína elevada, inflamação crônica, triglicerídeos alto, pós-menopausa sem reposição hormonal, baixo consumo de frutas, verduras e legumes, fatores psicossociais como raiva, tensão e depressão, além de HIV/AIDS em uso de antirretrovirais por décadas (OLIVEIRA; PEDROSO, 2014).

Os critérios que definem o diagnóstico de uma síndrome coronariana aguda são dor ou desconforto torácico prolongado, alterações eletrocardiográficas compatíveis com isquemia ou infarto (supradesnivelamento do segmento ST) e enzimas de necrose miocárdica elevadas (fração MB da creatinoquinase e as troponinas T e I) (ANTMAN et al., 2007; ANDERSON et al., 2007; FOY; FILIPPONE, 2015).

As enzimas de necrose cardíaca são marcadores séricos que aumentam algumas horas após o IAM. A fração MB da creatinoquinase (CK-MB) começa a aumentar entre 3 e 6 horas após o infarto, com pico entre 16 e 24 horas e normaliza em 3 a 4 dias. Por permanecer alterada durante um menor período de tempo a CK-MB torna-se mais eficaz na identificação de novos casos de infartos sequenciais e para avaliar o sucesso de intervenções de recanalização (WANG et al., 2014).

As troponinas T (cTnT) e I (cTnI) apresentam níveis séricos aumentados 2 a 4 horas após o IAM com pico entre 10 e 36 horas, estas persistem alteradas no sangue por 5 a 14 dias. São marcadores muito sensíveis e seus níveis estão relacionados a gravidade do infarto, assim suas concentrações plasmáticas podem identificar pacientes com baixo risco de eventos cardíacos, uma abordagem que poderia reduzir internações hospitalares e trazer benefícios para pacientes e serviços de saúde (CULLEN et al., 2013; SHAH et al., 2015)

Outros marcadores importantes são a enzima lactato desidrogenase (LDH) que apresentam aumento em seus níveis séricos 24 a 48 horas após o infarto, com pico plasmático entre 3 e 6 dias, assim como, a proteína C reativa ultrasensível (PCR), o amilóide A sérico e a interleucina 6. Tais marcadores são úteis na avaliação do prognóstico do IAM, no entanto não são eficazes em seu diagnóstico (STROMME; ROLSTAD; MANGSCHAU, 2000).

O tratamento inicial de um evento de IAM é feito por oxigenoterapia, nitrato sublingual e acetilsalicílico (ASS). Quando o eletrocardiograma apresenta supradesnivelamento do segmento ST é empregado o uso de um fibrinolítico injetável. Pode ainda ser utilizada morfina na dor intensa e refratária a nitratos. Por sua vez, o tratamento após a recuperação do evento agudo tem por objetivos reduzir a progressão da doença coronariana, o risco de novo IM ou morte súbita, prevenir a isquemia crônica ou em crises, reduzir a demanda de oxigênio pelo miocárdio, prevenir arritmias e melhorar a capacidade física e a qualidade de vida do paciente. Os fármacos usados são ASS, clopidogrel, β -bloqueadores, nitratos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores de receptores de angiotensina, bloqueadores dos canais de cálcio e suplementação de magnésio (OLIVEIRA; PEDROSO, 2014; ZHANG et al., 2015).

Diante dessas premissas, tornou-se indispensável um melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda, no IM e suas complicações, além da necessidade de novos tratamentos capazes de se opor as alterações miocárdicas, funcionais e relacionadas ao estresse oxidativo. A fim de atender a essas necessidades foram desenvolvidos modelos experimentais em animais, através de abordagem cirúrgica, farmacológica, manipulações dietéticas e genéticas (CARLL et al., 2011).

Consequentemente, muitos pesquisadores têm investido em estratégias que tem por objetivo tornar o coração mais resistente ao evento isquêmico, estas são as chamadas de intervenções cardioprotetoras. Assim, existe um grande interesse na elucidação dos mecanismos pelos quais a isquemia induz lesão celular letal, bem como a proteção cardíaca que pode ser provocada no miocárdio, permitindo a identificação de novos alvos para a terapia da doença cardíaca isquêmica (PERRICONE; HEIDE, 2014).

2.2 Considerações sobre o método simpaticomimético

A necessidade de mimetizar a fisiopatologia do IAM, assim como de sua evolução para insuficiência cardíaca em animais, levou ao desenvolvimento de diversos modelos experimentais. Modelos invasivos que requerem toracotomia (ligadura da artéria coronária e estenose aórtica) apresentam alta mortalidade, dor crônica, inflamação sistêmica, infiltração de células inflamatórias epicárdicas, aderências fibrosas e cicatrizes, interferindo na experimentação pós cirúrgica. Modelos inasivos que não requerem toracotomia (*aortocaval shunt* ou fístula) apresentam alta mortalidade, variabilidade de tempo para que a patologia se instale, além de alta reversão das alterações induzidas. Enquanto, os modelos farmacológicos (doxorubicina, isoproterenol, propiltiouracilo) são mais fáceis, simples, eficazes e menos invasivos, no entanto, o isoproterenol apresenta ainda baixa mortalidade, alta reprodutibilidade, tornando-se um bom modelo para mimetizar o IAM em humanos (CARLL et al., 2011).

O método simpaticomimético é um modelo de cardiopatia induzida farmacologicamente de forma aguda. Está baseado no conhecimento de que a ativação do sistema nervoso simpático é uma característica comum às doenças cardiovasculares. Neste método a ação da sobrecarga de catecolaminas está associada à cardiotoxicidade por déficit do suprimento de oxigênio, deficiência na síntese de adenosina trifosfato (ATP), hipertrofia por compensação da sobrecarga de trabalho e necrose do miocárdio que se manifestam em alterações cardíacas, vasculares, hemodinâmicas e estresse oxidativo (DAVEL et al., 2006; ESCUDERO; PINILLA, 2007; SUGAMURA; KEANEY, 2011; DAVEL; BRUM; ROSSONI, 2014; AZEVEDO et al., 2016).

Catecolaminas são compostos simpaticomiméticos que podem ter origem endógena como adrenalina, noradrenalina e dopamina ou origem sintética como isoproterenol, dobutamina e terbutalina. Estão associadas ao estado de excitação, alerta, nervosismo, medo ou pânico por sua ação no sistema nervoso autônomo simpático (PARATI; ESLER, 2012).

Nesta ferramenta experimental o isoproterenol (ISO) é administrado através de injeção subcutânea ou intraperitoneal de doses elevadas *in bolus* para alcançar necrose cardíaca e declínios associados na função cardíaca. Em experimentos com duas doses de 340 mg/Kg de ISO há alta mortalidade (50%), em doses de 200 mg/Kg há necrose hepática e renal, enquanto que em experimentos com doses mais baixas, 150 mg/Kg em dose única ou duas doses de 85 mg/Kg, há a produção de um modelo mais estável que pode mimetizar a patogênese do IM e

da insuficiência cardíaca de forma mais semelhante a que ocorre em humanos (CARLL et al., 2011).

ISO é um agonista não seletivo receptores β -adrenérgicos (β -AR), anteriormente prescrito como broncodilatador na asma, bem como no tratamento da parada cardíaca, bloqueio cardíaco e broncospasmo. Seus efeitos ao estimular β_1 -AR cardíacos são cronotropismo (aumento da frequência cardíaca), inotropismo (aumento da força contrátil), dromotropismo (aumento da taxa de condução elétrica do nó atrioventricular) e lusitropismo (relaxamento cardíaco), enquanto a estimulação de β_2 -AR provoca vasodilatação e broncodilatação. Estes efeitos cardíacos do ISO promovem a gênese e manutenção de estados patológicos através da estimulação dos receptores adrenérgicos, aumento do ritmo de contração do nó sinuatrial, aceleração da condução do nó atrioventricular (AV), diminui o período refratário do nó AV, do sistema Purkinje e dos ventrículos. Resultando no aumento patológico da contratilidade, ritmo, estimulação elétrica cardíaca e promovendo aumento na pós-carga cardíaca e diminuição da pré-carga (LUCIA et al., 2014).

O coração tem três subtipos de β -AR (1, 2 e 3), tendo os dois primeiros efeitos mais proeminentes sobre a função cardíaca. A estimulação β_1 -AR crônica promove remodelamento cardíaco através da hipertrofia, necrose, apoptose de cardiomiócitos e fibrose cicatricial que prejudicam ainda mais o desempenho cardíaco (CARLL et al., 2011).

A ligação de ISO aos β_1 -AR permite que as proteínas G do tipo *s* estimulem a adenilil-ciclase (AC) a usar ATP na síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), este ativa a proteína quinase A (PKA) a abrir canais de cálcio (Ca^{2+}) do tipo L transmembrana, permitindo que o influxo de Ca^{2+} que se liga à receptores de rianodina provocando a liberação de mais Ca^{2+} para o citoplasma a partir do retículo sarcoplasmático, o Ca^{2+} ativa o aparelho contrátil levando a contração dos cardiomiócitos. A PKA, uma serina/treonina quinase, também causa ativação de MAP quinases do tipo p38-MAPK14, induzindo hipertrofia cardíaca (LOCHNER et al., 2009).

Este estímulo hipertrófico causa alterações bioquímicas no interior da célula por ativação de mensageiros citosólicos e nucleares que irão agir no núcleo da célula, regulando a transcrição e finalmente determinando a expressão gênica, assim induzindo hipertrofia miocárdica. Trata-se do aumento da massa celular sem aumento do número de células, caracterizada por aumento da espessura do septo intraventricular, pela obstrução variável do fluxo ventricular, hipercontratilidade miocárdica e menor enchimento diastólico do ventrículo esquerdo (MATOS-SOUZA; FRANCHINI; NADRUZ, 2008).

A hiperestimulação simpática esgota as reservas de intermediários na síntese de ATP, causa arritmias, vasoespasma coronariano e IAM. Esta necrose induzida pelo ISO em ratos é localizada no vértice e no miocárdio do ventrículo esquerdo e menos frequente no músculo papilar e no ventrículo direito. É uma necrose do tipo coagulativa que apresenta áreas miócitos mortos com bandas de contração devido ao estado de hipercontração, infiltração polimorfonuclear e calcificação tardia. É seguida por um fenômeno de fibrose de intensidade gradual e paralela à necrose (CARLL et al., 2011).

ISO induz rápidas alterações nos cardiomiócitos: desorientação dos miofilamentos por aumento da largura e densidade das bandas-Z, desregulação do comprimento e alinhamento dos sarcômeros, ruptura dos miofilamentos e dilatação do retículo sarcoplasmático (4 – 6 minutos), turgescência da mitocôndria, desorganização e fragmentação das miofibrilas (10 minutos), depósitos granulares na mitocôndria, degeneração lipídica, desaparecimento dos grânulos de glicogênio, marginalização da cromatina nuclear, turgescência e ruptura dos túbulos longitudinais e transversais (30 a 60 minutos), edemas intersticiais e intracelulares resultantes de hemorragias subendocárdiais e subepicardeais, turgescência das fibras musculares, inflamação extensa, hernização dos discos celulares, vacuolização extensa e agregação de células linfomononucleares (1 a 24 horas) (REMIÃO et al., 2003).

Microscopicamente ocorrem cardiomiócitos com bandas de contração (1 a 6 horas), necrose coagulativa, focos de hemorragia, início de infiltração de neutrófilos (6 a 18 horas), bandas de contração na periferia da lesão (18 a 24 horas), necrose completa com extensa cariólise, intensa infiltração de leucócitos, predomínio de neutrófilos, com algumas células mononucleadas (24 a 72 horas), infiltrado predominantemente de mononucleares, com numerosos macrófagos e número crescente de linfócitos, início de neoformação vascular, depósito de matriz extracelular (tecido de granulação, início de processo cicatricial) (4 a 14 dias), neoformação vascular mais evidente, deposição de matriz extracelular, síntese de colágeno, início da formação cicatricial (14 a 21 dias), aumento da deposição de colágeno do tipo I, redução do número de vasos neoformados, início da remodelação da cicatriz e retração cicatricial (4 a 7 semanas) (MUSSO; PEREIRA, 2013).

Quanto aos efeitos metabólicos, ocorrem alterações ao nível do consumo de O₂ por aumento da demanda e por desperdício de O₂ (oxidação de catecolaminas), a ativação de β₂-AR cardíacos causa preferência da oxidação de ácido graxos livres em detrimento da glicólise (menor rendimento cardíaco), desacoplamento mitocondrial com prejudicada síntese de ATP e diminuição do índice de controle respiratório. ISO também induz lipólise alterando as membranas celulares, pois aumenta o conteúdo de ácido araquidônico diminuindo a atividade

das proteínas de membrana e favorecendo peroxidação lipídica, além da secreção de lactato (diminuição do pH induz instabilidade da membrana de lisossomos viabilizando a autólise) todos estes efeitos potencializam o potencial necrótico dessa catecolamina (REMIÃO et al., 2004).

A cardiotoxicidade do ISO altera o conteúdo celular de eletrólitos e a permeabilidade iônica da membrana. Na hipóxia ocorre perda de K^+ e Mg^{2+} pelo miocárdio. A depleção de Mg^{2+} causa inibição enzimática, especialmente em reações de transferência de fosfatos e também aumento de captação de Ca^{2+} pela mitocôndria (mecanismo de desacoplamento mitocondrial). Esta sobrecarga de Ca^{2+} é tóxica e induz inativação mitocondrial, ativação excessiva das bombas de Ca^{2+} , diminuição dos níveis energéticos, alteração do citoesqueleto por dissociação dos filamentos de actina ou quebras proteolíticas (levando à formação de vesículas na membrana), ativação exacerbada das fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases e a produção de espécies reativas de oxigênio (GROOT; RAUEN, 2007).

Quanto as alterações vasculares, a estimulação aguda dos receptores β -AR (1 e 2) em vasos sanguíneos causa relaxamento. No músculo liso vascular, a ativação dessa cascata induz hiperpolarização, principalmente por ativação de canais de potássio de alta condutância ativado por Ca^{2+} (BK_{Ca}), redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , aumento da captação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e diminuição do influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema nas células musculares lisas causando vasodilatação (MARINO et al., 2011).

No entanto, na hiperativação promovida por ISO o efeito vasodilatador é abolido e convertido em hiperreatividade vascular. Este efeito está associado à ativação da via β_2 -AR acoplada a uma proteína G do tipo *i* que induz a ativação de MAPK e p-ERK_{1/2} através da redução da atividade da PKA, ou seja, há uma hiperativação da via β_2 -AR/Gi/p-ERK que promove um estado de vasoconstrição patológica por hiperreatividade à catecolaminas. Este efeito também está relacionado ao desacoplamento da eNOS. Sendo assim, ocorrem em acréscimo estresse oxidativo e disfunção endotelial secundários a superestimulação simpática. E pode também estar relacionado à dessensibilização e *down regulation* de receptores β_2 -AR/Gs, por ativação de β -arrestinas (DAVEL et al., 2006; DAVEL; BRUM; ROSSONI, 2013).

Nas doenças isquêmicas como o IAM há diminuição da eficácia e da expressão de mecanismos antioxidantes fisiológicos como as enzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (Gpx). Esta deficiência somada a grande produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) formados pelo processo de isquemia e reperfusão só

potencializam os danos causados pelo estresse oxidativo na patogênese do IAM (ZEWEIER; TALUKDER, 2006).

EROs são potencialmente tóxicos por causar dano às estruturas celulares graças a sua capacidade de reagir com lipídeos, proteínas, nucleotídeos e carboidratos. No IAM esses danos se estendem a membrana plasmática, DNA e organelas, especialmente às mitocôndrias, assim contribuem de forma significativa para a necrose de cardiomiócitos e para a disfunção endotelial. No modelo de IAM simpaticomimético as EROs formadas podem ter origem na biotransformação hepática (metabolismo) do ISO ou na própria lesão isquêmica (SRIVASTAVA et al, 2007).

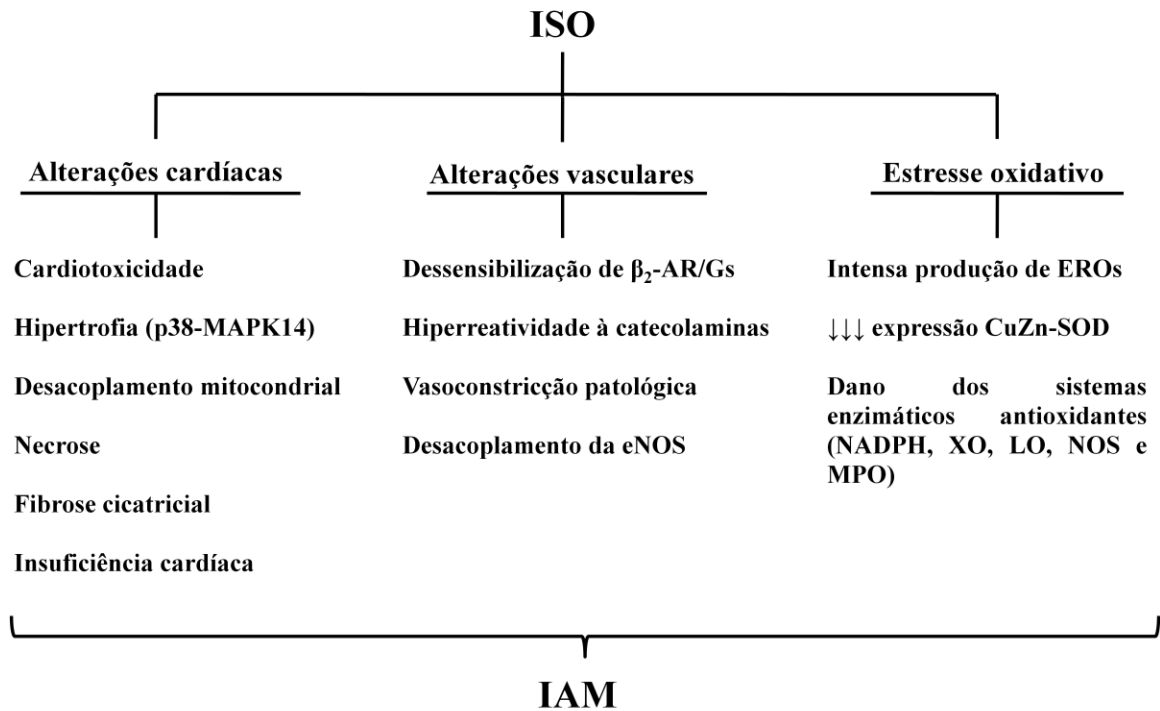
A biotransformação do ISO via monoaminoxidase (MAO) leva a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) contribuindo para sua cardiotoxicidade, pode ainda ser biotransformado via formação de quinonas e aminocromos. Os produtos formados através dessas vias levam a produção de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical em situações fisiológicas seria dismutado pela SOD formando o H_2O_2 que seria reduzido ao radical hidroxila (HO^{\cdot}), no entanto o estresse oxidativo induzido por ISO via receptores β_1 -AR reduz a expressão CuZn-SOD no miocárdio (CHAKRABORTY; PUJANI; HAQUE, 2015).

Quanto aos EROs gerados pelo processo isquêmico, estes são originados a partir de cinco principais mecanismos, a cadeia respiratória mitocondrial, as enzimas dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato oxidase (NADPH), xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LO), óxido nítrico sintase (NOS) e a mieloperoxidase (MPO) que potencializam a lesão de cardiomiócitos e a lesão endotelial devido ao dano destes sistemas enzimáticos antioxidantes (MCNALLY et al., 2003; NOJIRI et al., 2006; BEDARD; KRAUSE, 2007; SUGAMURA; KEANEY, 2011).

As alterações cardíacas, vasculares e o estresse oxidativo promovidos por ISO no modelo simpaticomimético estão resumidas na Figura 1.

Diante do exposto, o uso de ISO para indução de infarto do miocárdio através de um método simpaticomimético em ratos, representa uma importante ferramenta experimental para o melhor conhecimento do IAM e sua progressão para a insuficiência cardíaca, bem como de vias de cardioproteção e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Figura 1 – Resumo das alterações cardíacas, vasculares e do estresse oxidativo promovidos por Isoproterenol (ISO) no método simpaticomimético.



Fonte: AUTORA, 2017.

2.3 Considerações sobre plantas medicinais

Plantas medicinais deram origem a cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo, além disso 11% dos fármacos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial de Saúde foram sintetizados a partir de precursores naturais. São exemplos de importantes drogas sintéticas obtidas a partir de plantas digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, atropina de *Atropa belladonna* e a morfina e a codeína de *Papaver somniferum*. Compostos usados como ferramentas farmacológicas importantes como muscarina, fisostigmina, canabinóides, ioimbina, forskolin, colchicina e ésteres de forbol também foram obtidos a partir de plantas (RATES, 2001).

Existe um grande interesse por terapias alternativas advindas de produtos naturais devido as dificuldades da medicina convencional em determinados processos patológicos, efeitos colaterais de tratamentos alopáticos e problemas socioeconômicos. Assim, plantas medicinais têm atendido a essa necessidade do mercado farmacêutico no desenvolvimento de novas drogas. No entanto, o percentual de espécies de plantas que tiveram seu perfil fitoquímico e propriedades farmacológicas estudadas ainda é ínfimo, bem como de moléculas isoladas ou protótipos de fármacos com desfecho clínico (MISHRA; TIWARI, 2011).

As plantas medicinais podem ser utilizadas como recurso terapêutico na forma de remédios caseiros, preparações farmacêuticas de fitofármacos, nutracêuticos, cosmeceuticos, medicamentos à base de plantas, podem ainda passar por processos de extração e purificação de compostos de interesse que podem ser utilizados diretamente como fármacos, como precursores em processos semisintéticos ou de síntese total e como protótipos de novos fármacos (VASISHT; SHARMA; KARAN, 2016).

No âmbito das doenças cardiovasculares estudos em modelos animais mostram que plantas medicinais podem atuar por diferentes vias de ação. Regulam a pressão arterial por exercer efeito vasorrelaxante (*Uncaria rhynchophylla*, *Paeoniae radix*, *Crataegus*, *Ginkgo biloba*, *Scutellaria baicalensis* e *Rheum undulatum*), antagonista de canais de cálcio (*Ligusticum wallichii* e *Evodiac rutaecarpa*), efeito antiarrítmico (*Menispermum dauricum*, *Nelumbo nucifera*, *Sophora*, *Sinomenium acutum* e *Ginkgo biloba*), antioxidante (*Paeonia Radix*, *Sinomenium acutum*, *Menispermum dauricum*, *Polygonum multiflorum*, *Rhizoma ligustici*, *Herba leonuri*, *Achyranthis bidentatae*, *Curcuma longa*, *Fructus schizandrae*, *Polygonum cuspidatum*, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Camellia sinensis*, *Paeoniae Radix*, *Moutan córtex* e *Paeoniaceae paeoniae*) e cardioprotetor para o infarto (*Panax*

pseudoginseng, *Magnolia officinalis*, *Salvia miltiorrhiza*, *Corydalis ambigua*, *Flos carthami*, *Polygonum multiflorum*, *Crataegus*, *Pueraria* e *Angelica sinensis*) todas estas pertencentes a diferentes famílias de plantas (SUN et al., 2002).

De maneira semelhante, estudos farmacológicos provaram que polifenóis amplamente distribuídos pelo reino vegetal e isolados de plantas medicinais são eficazes no tratamento de doenças cardiovasculares, especialmente em doenças isquêmicas do coração. Os polifenóis são um grande grupo de produtos naturais classificados com base no número de anéis de fenol e nas propriedades estruturais. Estes são divididos em subclasses tais como ácidos, flavonóides, estilbenos, lignanos e taninos (DU et al., 2016).

Atuam nas doenças isquêmicas do coração reduzindo o consumo de oxigênio do coração ou aumentando a oferta de oxigênio (quercetina, ácido tânico, resveratrol, malvidina, ácido salvianólico B, piceatanol, catequina e epigalocatequinamalato), efeito anti-aterosclerótico e protetor da função vascular coronariana (antocianina, resveratrol, ácido salvianólico B e procianidinas), efeito protetor sobre as células do miocárdio e remodelamento cardíaco (ácido salvianólico A, resveratrol, magnolol, ácido cafêico, α -mangostins, luteína, baicaleína, quercetina, apigenin, miricetina, isoflavonas, rutina e epigalocatequinamalato), fortalecendo o metabolismo do miocárdio (ácido fenólico), pro-angiogênico e na regeneração de cardiomiócitos (resveratrol e ácido salvianólico B) (DU et al., 2016).

Diante dessas premissas está inserida a família *Meliaceae* que apresenta distribuição pantropical, inclui cerca de 50 gêneros e mais de 600 espécies. No Brasil ocorrem 6 gêneros e cerca de 100 espécies (JOLY, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005). Destas espécies algumas são plantas medicinais com estudos de seus efeitos sobre o sistema cardiovascular. *Azadirachta indica* possui efeito hipotensor (THOMPSON; ANDERSON, 1978; KOLEY; LAL, 1994; CHATTOPADHYAY, 1997; KHOSLA; GUPTA; SINGH, 2002), antiarrítmico (THOMPSON; ANDERSON, 1978), bradicárdico (KOLEY; LAL, 1994; KHOSLA; GUPTA; SINGH, 2002), vasodilatador coronariano (KHOSLA; GUPTA; SINGH, 2002) e cardioprotetor do infarto (PEER et al., 2008). *Ekebergia capensis* possui efeito hipotensor, anti-hipertensivo e vasorrelaxante (KAMADYAAPA et al., 2009). *Toona sinensis* possui efeito antioxidante, anti-angiogênico e anti-aterosclerótico (YANG et al., 2014). *Trichilia emetica* possui efeito antioxidante, anti-hipertensivo, hipolipidêmico e anti-hiperglicemiante (KONATÉ et al., 2014).

O gênero *Trichilia* que compreende 70 espécies distribuídas na América Tropical, África e região Indo-Malásica, das quais aproximadamente 43 espécies ocorrem no Brasil.

Deste gênero foram isolados e considerados os principais metabólitos secundários isolados: triterpenos (cicloartanos e damaranso), fitosteroides, esteroides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos, aminoácidos, taninos e limonóides (LONGHINI et al., 2011).

Quatorze espécies de plantas brasileiras pertencentes ao gênero *Trichilia* são conhecidas e utilizadas como catuaba: *T. catigua* A. Juss., *T. clausenii* C. DC., *T. dregeana* Sond., *T. ramalhoi* Rizzini, *T. emetica* Vahl, *T. hirta* L., *T. glabra* L., *T. casareti* C. DC., *T. elegans* subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T.D. Penn., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw, *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC., *T. silvatica* C. DC. (LONGHINI et al., 2011; LAGOS et al., 2012).

A espécie *Trichilia catigua*, Figura 2, é uma árvore distribuída em florestas semidecíduais, Mata Atlântica, na América do Sul e Central. Popularmente é conhecida como catiguá, catiguá vermelho, catuama, pau-ervilha e catuaba-do-norte. É utilizada na população como tônico, afrodisíaco e para a melhora da memória (LONGHINI et al., 2011).

Figura 2 – *Trichilia catigua*.



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9709

Em numerosos estudos experimentais *T. catigua* apresentou efeito sedativo (ANTUNES et al., 2001), antimicrobiano (PIZZOLATI et al., 2002a), tripanocida (PIZZOLATI et al., 2002b), anti-inflamatório (BARBOSA et al., 2004), anticelulite (BABY et al., 2006; BABY et al., 2007), antiviral (ESPADA et al., 2015), antioxidante (TANG et al., 2007; RESENDE, 2007; BRIGHENT et al., 2007; CHASSOT et al., 2011; RESENDE, 2011; KAMDEM et al., 2012a; LONNI et al., 2012), antidepressivo (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012), melhora cognitiva (CHASSOT et al., 2011; TRUITI et al., 2015), estimulante da proliferação hipocampal (BONASSOLI et al.,

2012; TRUITI et al., 2015) protetor do infarto cerebral (KANDEM et al., 2012b) e antinociceptivo (VIANA et al., 2011).

O produto farmacêutico chamado CATUAMA é composto de uma mistura das espécies vegetais *T. catigua* (cascas), *Paullinia cupana* (sementes secas), *Zingiber officinalis* (rizomas) e *Ptychopetalum olacoides* (folhas). Possui efeito vasorrelaxante (CALIXTO; CABRINI, 1997; ANTUNES et al., 2001), antiarrítmico (PONTIERI et al., 2007), cronotrópico e lusotrópico negativo (COUTINHO, 2010) e protetor de isquemia e reperfusão cardíaca (MOREIRA, 2012).

Estudos da toxicologia de *T. catigua* ainda são pouco explorados, ainda assim não apresentou efeito comedogênico (LONNI et al., 2012) doses de até 5.000 mg/Kg, v.o. do extrato bruto e até 3.000 mg/Kg, v.o. da fração acetato de etila do extrato das cascas não apresentou efeito tóxico (CHASSOT et al., 2011), bem como não foram observadas reações adversas severas, alterações bioquímicas, nem hematológicas (OLIVEIRA et al., 2005). Também não há alteração de parâmetros reprodutivos da prole masculina (DOS-SANTOS et al., 2011).

Os principais componentes fitoquímicos identificados nas cascas de *T. catigua* são compostos fenólicos (LONGHINI et al., 2013; RABELO; PAULA; BARA, 2013) como catuabine D (KLETTER et al., 2004), cinchonaína Ib (BELTRAME et al., 2006), cinchonaínas a e b (MARTINELLI, 2010), ácido gálico (LONNI et al., 2012), ácido clorogênico, epicatequina, catequina, β -sitosterol, estigmasterol (LAGOS et al., 2012), procyanidin B2, chinchonains Ia, IIa, IIb (LONGHINI et al., 2013) catiguanina e catiguanina B (TANG et al., 2007).

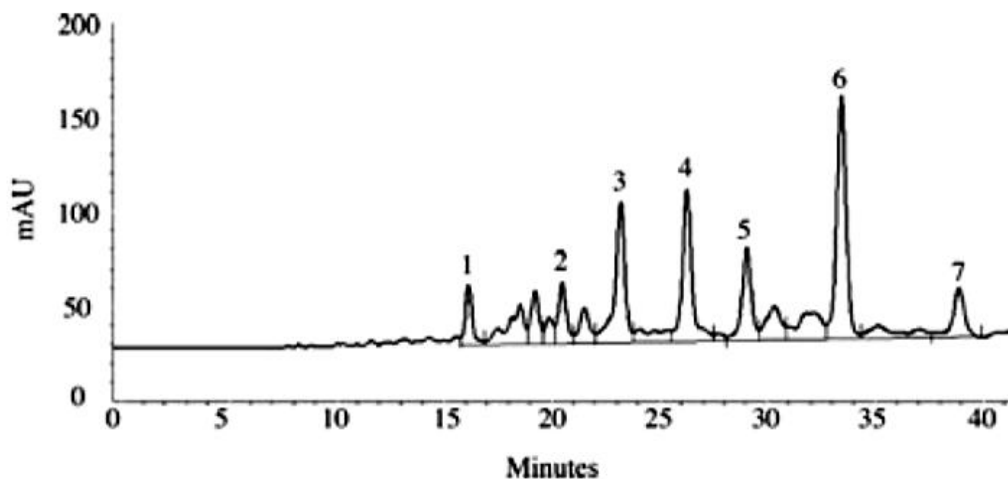
A fração acetato de etila obtida a partir do extrato acetona:água das cascas do caule de *T. catigua* (AETC) tem despertado grande interesse, uma vez que apresenta o melhor perfil fitoquímico e a maior quantidade de cinchonaínas entre as frações estudadas. As cinchonaínas são flavan-3-ol a quem são atribuídos os principais efeitos farmacológicos da *T. catigua* e também sua quantificação é considerada o padrão de qualidade desta espécie (LONGHINI et al., 2013).

A análise cromatográfica de alta eficiência (HPLC) de AETC usado neste estudo revela uma mistura de (2) catequina e ácido clorogênico, $rt = 16,5$ min (concentração – $6,43 \pm 0,14$ $\mu\text{g/mL}$); (3) **cinchonaína IIb**, $rt = 23,6$ min (concentração – $18,70 \pm 0,64$ $\mu\text{g/mL}$); (4) **cinchonaína IIa**, $rt = 26,6$ min (concentração – $21,94 \pm 0,46$ $\mu\text{g/mL}$); (6) **mistura de cinchonaína Ia e Ib**, $rt = 33,8$ min (concentração – $30,41 \pm 0,88$ $\mu\text{g/mL}$) (LONGHINI et al.,

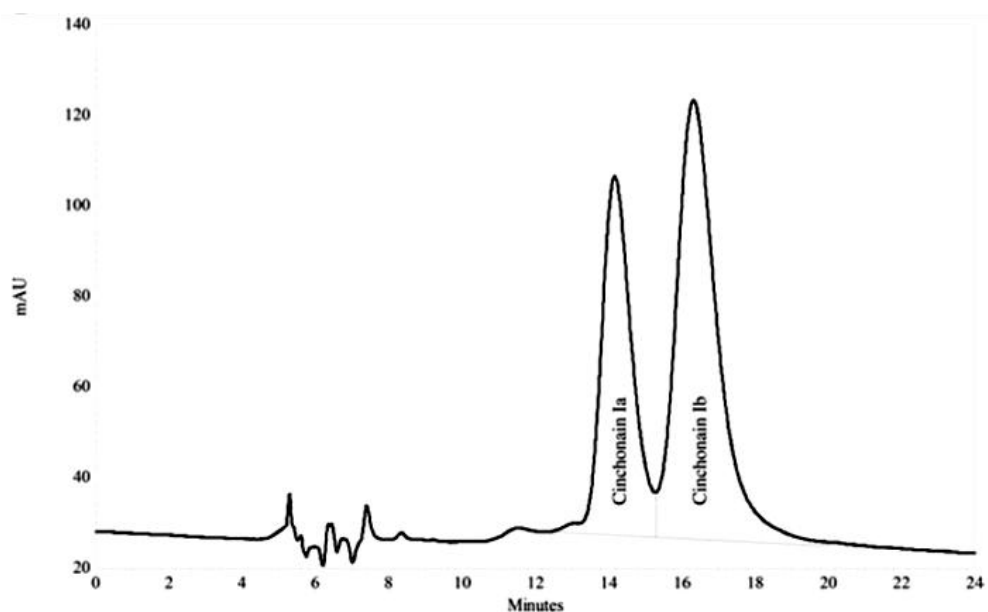
2013), Figura 3a. Separação dos enantiômeros Ia e Ib, Figura 3b. As cinchonainas representam mais de 70% do conteúdo de AETC.

Figura 3 – Análise cromatográfica de AETC.

a)



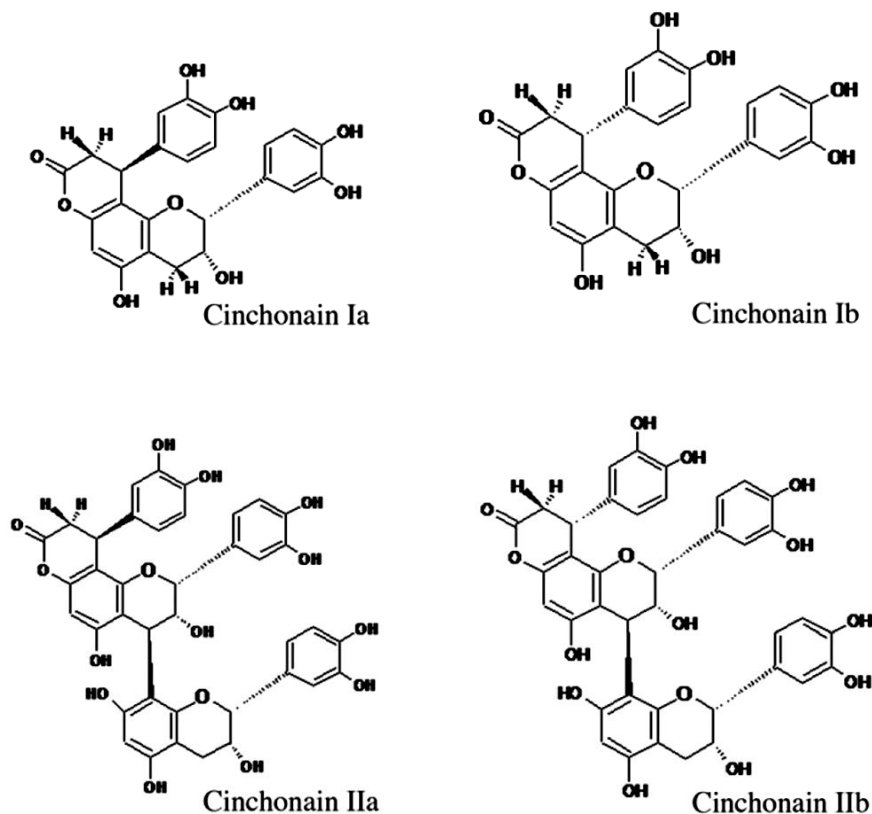
b)



Análise cromatográfica de AETC (a), onde (2) mistura catequina e ácido clorogênico, (3) cinchonainá IIb, (4) cinchonainá IIa, (5) epicatequina e (6) mistura de cinchonainá Ia e Ib. Separação dos enantiômeros Ia e Ib (b). Estes resultados estão publicados em LONGHINI e colaboradores (2013).

Estruturas químicas das cinchonainas, Figura 4, componentes majoritários de AETC.

Figura 4 – Estruturas das Cinchonainas.



Cinchonainas presentes em AETC (LONGHINI et al., 2013).

Não existem estudos publicados sobre o efeito cardioprotetor de AETC em método simpaticomimético, assim como uma definição dos mecanismos envolvidos. Além disso, tendo em vista o crescente interesse por AETC e a avaliação farmacognóstica, fitoquímica, farmacotécnica e de formulação farmacêutica (realizados pelo grupo PALAFITO por Resende em 2007 e por Longhini em colaboradores em 2013), AETC nos foi cedida por este grupo e se tornou o objeto desse estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito cardioprotetor de AETC em ratos infartados.

3.2 Específicos

- ✓ Caracterizar os efeitos de AETC em ensaios farmacológicos *in vivo* em ratos infartados e seus controles;
- ✓ Caracterizar os efeitos de AETC em ensaios farmacológicos *in vitro* em preparações de artéria mesentérica superior ratos infartados e seus controles;
- ✓ Avaliar os efeitos de AETC em ensaios antioxidantes *in vitro* Folan, sequestro dos radicais DPPH, ABTS e NO, redução e complexação de ferro;
- ✓ Avaliar os efeitos de AETC sobre o peso corporal, glicemia, parâmetros lipídicos, hepáticos e renais de ratos infartados;
- ✓ Caracterizar os efeitos das Cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb em ensaios *in silico* em alvos receptores relacionados à cardioproteção através de *docking* molecular;

4 MATERIAL

4.1 Animais

Foram utilizados 84 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) normotensos, pesando entre 250 e 350 g, provenientes do biotério central da UFAL. Todos os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 horas), em gaiolas contendo no máximo 5 animais e com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho estão de acordo com as normas da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da UFAL com um parecer substanciado sob o N° 50/2014, ANEXO A.

Para o cálculo de tamanho da amostra foi considerada a equação $P = (0,5)^{n^\circ \text{ de eventos}}$, onde: P se trata do nível de significância, 0,05 ou menos; (0,5) se trata de 50% de chance de um evento acontecer ou não; e o exponencial “n° de eventos” se trata do número de animais por grupo. Sendo assim, P só será igual ou menor que 0,05 se o número de animais for igual ou maior que 5 (CRUZ-ORIVE; WEIBEL 1990). Então, para esse trabalho foi adotado o n amostral 5.

4.2 Fração acetato de etila de *Trichilia catigua* (AETC)

As cascas do caule de *Trichilia catigua* A. Juss. foram coletadas em maio de 2011, na cidade de Caitité estado da Bahia, Brasil. A exsicata se encontra depositada no *Herbarium* da Universidade Estadual de Maringá (HUEM#19434), Maringá, Paraná, Brasil.

As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e secas à temperatura ambiente, estas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. A extração foi realizada por Ultra-turrax UTC 115 KT, utilizando acetona/água (7:3; v/v) como líquido extrator, na proporção de 10% (m/v). Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto.

O extrato bruto (50 g) foi ressuspensionado em água destilada (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 12 vezes). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a fração acetato de etila de *T. catigua* (AETC).

AETC foi confeccionada e cedida pela Universidade Estadual de Maringá, laboratório PALAFITO.

4.3 Soluções fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e EDTA. As tabelas a seguir mostram as composições das soluções utilizadas:

Tabela 1 – Composição da solução nutritiva Tyrode (pH = 7,4).

Sal	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl_2	2,0
MgCl_2	1,05
NaHCO_3	10,0
NaH_2PO_4	0,42
Glicose	5,6

Tabela 2 – Composição da solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl 80 mM (pH = 7,4).

Sal	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl_2	2,0
MgCl_2	1,05
NaHCO_3	10,0
NaH_2PO_4	0,42
Glicose	5,6

5 MÉTODO

5.1 Ensaio farmacológico para o estudo cardioprotetor do infarto de AETC

A indução do infarto do miocárdio foi realizada por método simpaticomimético através da administração de isoproterenol (ISO, 85 mg/Kg, s.c.) dissolvido em solução salina (0,9%) e injetado na região dorsal intraescapular dos ratos dois dias consecutivos (RAJADURAI; PRINCE, 2007).

35 ratos foram randomizados pelo método tabela de números aleatórios (STEVENSON, 1981), em sete grupos:

- **SALINA** – Tratados com salina (0,3 mL, v.o.) durante 30 dias, n=5;
- **ISO** – Tratados com salina (0,3 mL, v.o.) durante 30 dias mais ISO (85 mg/Kg, s.c.) nos dias 29 e 30, n=5;
- **AETC 10 mg/Kg** – Tratados (v.o.) durante 30 dias mais ISO nos dias 29 e 30, n=5;
- **AETC 20 mg/Kg** – Tratados (v.o.) durante 30 dias mais ISO nos dias 29 e 30, n=5;
- **AETC 50 mg/Kg** – Tratados (v.o.) durante 30 dias mais ISO nos dias 29 e 30, n=5;
- **AETC 100 mg/Kg** – Tratados (v.o.) durante 30 dias mais ISO nos dias 29 e 30, n=5;
- **AETC 200 mg/Kg** – Tratados (v.o.) durante 30 dias mais ISO nos dias 29 e 30, n=5;

O tratamento por via oral com salina ou AETC foi realizado diariamente às 9 horas da manhã, enquanto o tratamento com ISO por via subcutânea foi realizado às 15 horas nos dias 29 e 30 do protocolo experimental. A Figura 5 apresenta de forma esquemática o delineamento deste protocolo experimental.

No dia 31 após 12 horas em jejum os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (45 mg/Kg, i.p.) e eutanasiados por exsanguinação sob anestesia para realização dos protocolos *ex vivo*.

Foi realizada a punção cardíaca do sangue (4 mL), centrifugação (3.000 rpm por 15 minutos) e obtenção do soro que foi congelado e armazenado para as análises bioquímicas (seções 5.1.2, 6.4.3, 6.4.4 e 6.4.5). Os corações, fígados e rins foram coletados para análises morfométricas e/ou histológicas (seções 6.2.1, 6.2.3, 6.2.4, 6.2.5, 6.4.4 e 6.4.5).

Figura 5 – Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio farmacológico para o estudo cardioprotetor de infarto de AETC.



Protocolo Experimental

ISO (isoproterenol), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*). Fonte: AUTORA, 2017.

5.1.1 Avaliação do efeito de AETC sobre a morfometria do miocárdio

Os ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) foram eutanasiados, conforme descrito na seção 5.1 e após toracotomia os corações foram excisados, isolados (quando sem artérias aorta e veia cava), desprovidos de tecidos conectivos e lavados com solução salina. Em seguida, pesados em balança analítica em meio hidrostático por método de Sherle, baseado no princípio de Arquimedes. Este princípio consiste em suspender o coração por um fio de algodão fixado em uma base fora da balança analítica em um béquer contendo solução salina sem aplicação de tensão isométrica para realização da pesagem (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). Após dissecação os ventrículos esquerdos (VE) foram pesados segundo o mesmo princípio. Os pesos dos corações e VE foram normalizados pelo peso corporal de cada animal. Então, com o auxílio de um paquímetro foram medidas as espessuras da parede do VE.

5.1.2 Avaliação do efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão miocárdica

O soro sanguíneo (obtido conforme descrito na seção 5.1) dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) foram utilizados para a dosagem de marcadores bioquímicos de lesão miocárdica (CK_{MB}, CK_{NAC}, LDH e TGO) usando sistemas teste baseados em método cinético Liquiform da Labtest® e analisadas uma duplicata em microplaca de cada amostra por espectrofotômetro de ultravioleta.

5.1.3 Avaliação do efeito de AETC sobre a área de necrose do miocárdio

Corações excisados (obtidos conforme descrito na seção 5.1) dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) foram congelados (15 minutos), seccionados em posição transversal em fatias 2 mm, imersos em solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ) 1% em meio tamponado com pH 7,4 e mantidos protegido da luz em banho-maria (37 °C) por 20 minutos. Após esse período as secções foram examinadas sob luz, fotografadas e analisadas utilizando o *software Image J* para calcular área da imagem avaliando regiões com diferença de cor. TTZ promove a coloração de cor vinho escuro as áreas de miocárdio íntegro e de cor branca-amarelada as áreas de miocárdio infartado. O cálculo da área de necrose em cada fatia foi realizado pela seguinte fórmula (KIM et al., 2007):

$$\% \text{ Área de Necrose} = \frac{\text{Área de Necrose} \times 100}{\text{Área total}}$$

5.1.4 Avaliação do efeito de AETC sobre a histologia do miocárdio

Os ventrículos esquerdo (obtidos conforme descrito na seção 5.1) dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) foram clivados pelo método *orthotrip* 20, obtendo fragmentos aleatórios e uniformemente isotrópicos (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). O material processado histologicamente por fixação com formol 10% (por 24 horas a 5°C), lavagem com água corrente (20 min), desidratação com álcool etílico (1

banho de álcool 80% de 15 min, 1 banho de álcool 90% de 30 min e 4 banhos de álcool P.A. de 30 min), diafanização com Xilol P.A. (3 banhos de 30 min), inclusão em parafina de ponto de fusão 60 °C (2 banhos de 30 min, confecção do bloco histológico) e microtomia com 5 µm de espessura. Os cortes (3 por bloco histológico) foram corados com hematoxilina-eosina para confecção das lâminas (1 por rato, um total de 35 lâminas) que foram analisadas em microscopia óptica no aumento de 40x. A análise qualitativa do miocárdio foi feita através da observação de necrose coagulativa, rompimento de miofibrilas, alteração do núcleo de cardiomiócitos e presença de infiltrado leucocitário.

5.1.5 Avaliação do efeito de AETC sobre a estereologia do miocárdio

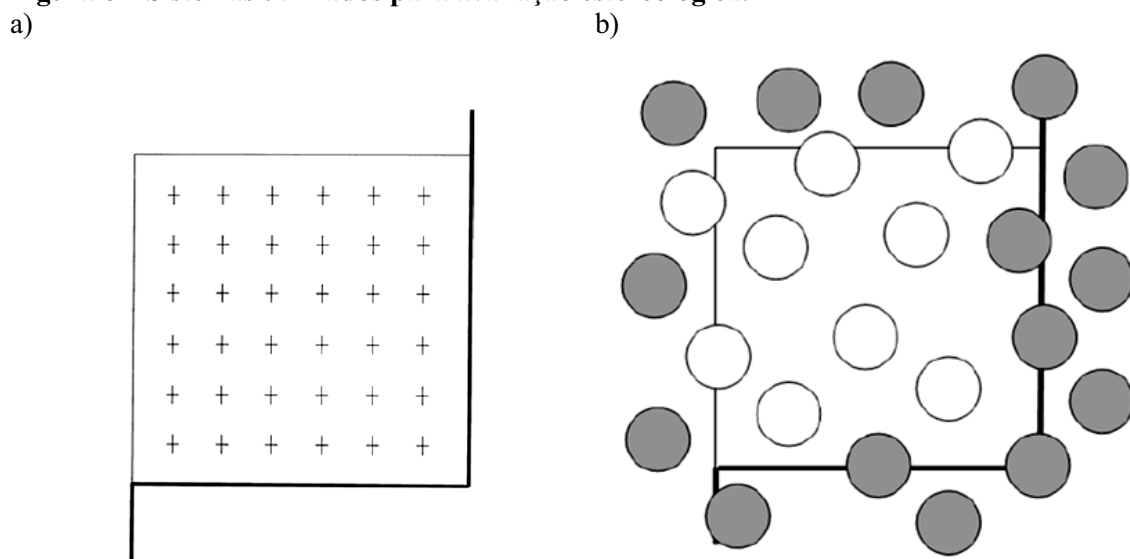
A partir das lâminas histológicas de ventrículo esquerdo (obtidas conforme descrito na seção 5.1.4) foram fotografados 10 campos aleatórios de cada lâmina para avaliação da estereologia. Esta consiste numa ferramenta que através de dados quantitativos bidimensionais de estruturas histológicas e cálculos matemáticos estima a composição tridimensional dos tecidos (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). Sendo assim, foram avaliadas de forma quantitativa as alterações histopatológicas nas lâminas de ventrículo esquerdo dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) através da avaliação de variáveis relacionadas à integridade dos cardiomiócitos (necrose) e de variáveis relacionadas ao volume de cardiomiócitos (hipertrofia).

Variáveis relacionadas à integridade dos cardiomiócitos:

- Densidade de volume de cardiomiócitos íntegros ($V_{V_{[miócitos]}}$) utilizando o *sistema teste de pontos* (Figura 6a) que deve ser sobreposto em transparência sobre as imagem do campo histológico e a contagem feita somando os pontos que tocam a célula cardíaca íntegra incluindo o núcleo e excluindo os pontos que tocam a célula cardíaca em necrose. Em seguida se aplica a seguinte fórmula:

$$(Vv = \frac{\sum Pp}{\sum Pt})$$

Onde, Vv (densidade de volume) é igual $\sum Pp$ (somatório de pontos que atingem cardiomiócitos íntegros) dividido pelo $\sum Pt$ (total de pontos no sistema teste), unidade de medida mm⁰ ou %.

Figura 6 – Sistemas utilizados para avaliação estereológica.

Sistema teste de 36 pontos (a) devem ser somados os pontos que tocam a estrutura contada. Sistema teste de linhas proibidas e linhas permitidas (b) estruturas sobre as linhas proibidas (negrito) não devem ser somadas, enquanto estruturas dentro da área teste ou que tocam as linhas permitidas (sem negrito) devem ser somadas (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). At neste protocolo foi 14.994 μm^2 .

- Densidade de perfis de cardiomiócitos na área-teste ($Q_{a[\text{miócitos}]}$) utilizando o sistema teste de linhas proibidas e linhas permitidas (Figura 6b), foram contados todos os núcleos de cardiomiócitos em evidência respeitando o limite das linhas proibidas. Este sistema representa a quantidade de imagens da estrutura avaliada numa determinada área teste e calculada tendo considerado o aumento microscópico. Em seguida se aplica a seguinte fórmula:

$$(Q_a = \frac{\sum \text{perfis}}{At})$$

Onde, Q_A (densidade de perfis de cardiomiócitos por área) é igual a \sum perfis (somatório de perfis “núcleos contados”) dividido por At (área teste, μm^2), unidade de medida $1/\text{mm}^2$.

- Densidade de número de cardiomiócito íntegros ($N_{v[\text{miócitos}]}$) para determinar a perda de miócitos, aplicando a seguinte fórmula:

$$(N_v = \frac{Q_a}{e \times At})$$

Onde, N_v (densidade de número de miócitos íntegros) é igual ao Q_A (densidade de perfis de cardiomiócitos por área) dividido por e (espessura da microtomia) multiplicada por At (área teste), unidade de medida $1/\text{mm}^3$.

- Número de cardiomiócitos íntegros ($N_{[\text{miócitos}]}$) empregando a seguinte fórmula:

$$(N = \frac{N_V}{V_p})$$

Onde, N (número total de cardiomiócitos) é igual a N_V (densidade de número de miócitos) dividido por V_p (peso do ventrículo esquerdo).

Variáveis relacionadas ao volume de cardiomiócitos:

- Área de cardiomiócitos ($A_{[\text{miócitos}]}$) indicando alterações bidimensionais no volume dos cardiomiócitos aplicando a seguinte fórmula:

$$(A = \frac{V_V}{Q_a})$$

Onde, A (área de cardiomiócitos) é igual a V_V (densidade de volume de cardiomiócitos) dividido por Q_a (densidade de perfis de cardiomiócitos por área), unidade de medida μm^2 .

- Volume médio de cardiomiócitos ($V_{\text{miócitos}}$) indicando alterações tridimensionais no volume de cardiomiócitos aplicando a seguinte fórmula:

$$(Vm = \frac{V_V}{N_V})$$

Onde, V_m (volume médio de cardiomiócitos) é igual a V_V (densidade de volume de cardiomiócitos) dividido por N_V (densidade de número de cardiomiócitos), unidade de medida μm^3 .

5.2 Estudos das vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor de AETC

5.2.1 Estudos farmacológicos com AETC *in vivo*

5.2.1.1 Medida direta de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar

Ratos Wistar machos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1:20 v/v), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas imediatamente após o procedimento cirúrgico (ratos anestesiados) ou 24h após (ratos não anestesiados) o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, Brasil) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital usando um software AQCAD (AVS Projetos, SP, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculará pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

5.2.1.2 Protocolos experimentais para os estudos *in vivo*

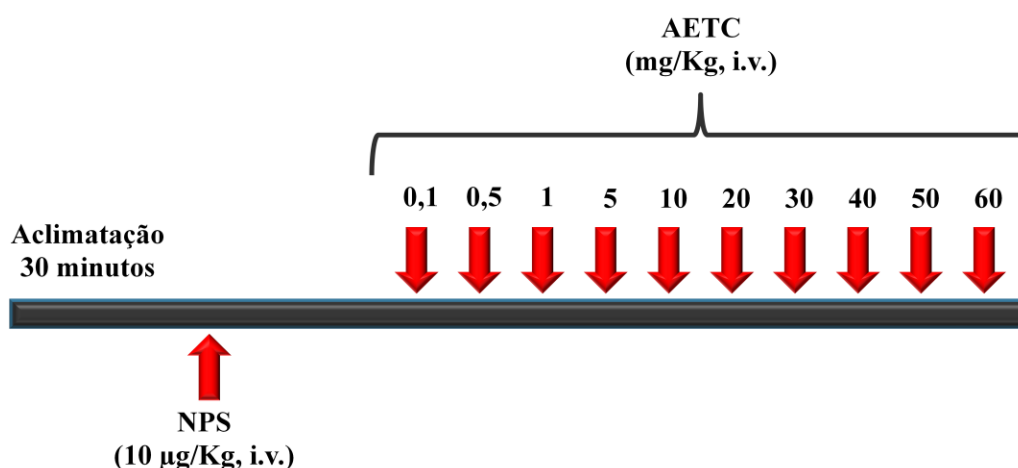
Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais (ratos anestesiados, n=5 e ratos não anestesiados, n=5) foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (10 µg/Kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 minutos, doses crescentes de AETC (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50 e 60

mg/kg) foram administradas de forma randômica pela via endovenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornem aos seus valores da linha de base (Figura 7). Os valores de PAM e FC foram expressos em porcentagem, computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, calculadas através das fórmulas:

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

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

Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre a PAM e FC em ratos Wistar.



NPS (nitroprussiato), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*). Fonte: AUTORA, 2017.

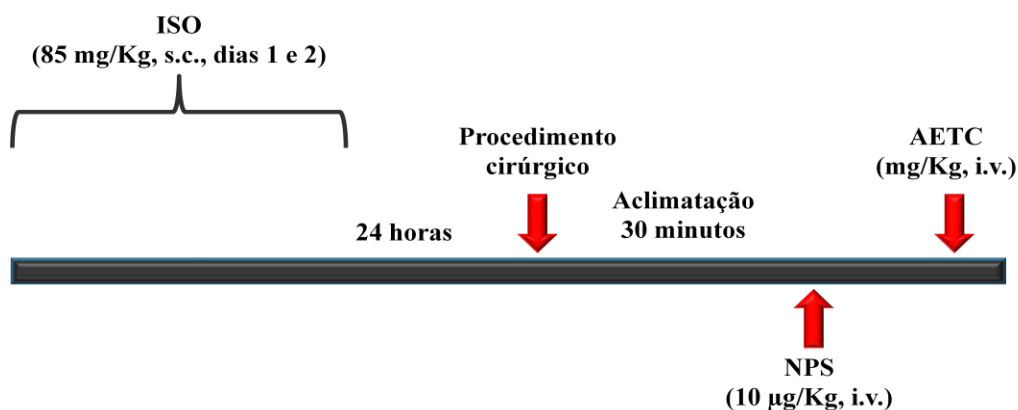
O cálculo da dose que produz cinquenta por cento do efeito máximo (DE₅₀) foi feito através de uma curva de regressão não linear do log do agonista versus o efeito utilizando o software Prisma 5.0.

5.2.1.3 Avaliação do efeito agudo de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados

Ratos Wistar foram infartados com ISO (85 mg/Kg, s.c., n=5) dois dias consecutivos e submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 5.2.1.1 sob efeito do anestésico tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), um barbitúrico com ação anestésica geral, foi obtido uma

dose-resposta empregando AETC na dose na concentração obtida através da curva de regressão não linear (DE_{50}), Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito agudo de AETC sobre a PAM e FC em ratos infartados.

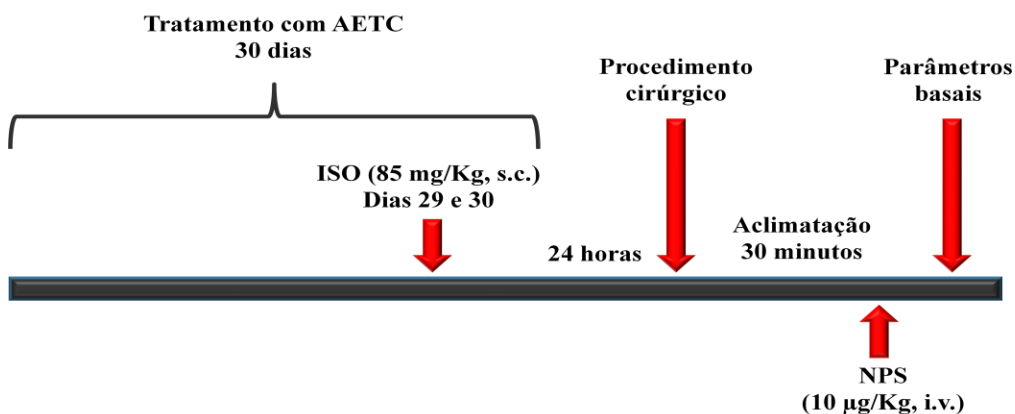


NPS (nitroprussiato), ISO (isoproterenol), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*). Fonte: AUTORA, 2017.

5.2.1.4 Avaliação do efeito crônico de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados

Ratos Wistar (protocolo apresentado na seção 5.1) que foram tratados por 30 dias com AETC nas doses 20 e 200 mg/Kg, n=5, via oral, nos dias 29 e 30 foram infartados com ISO (85 mg/Kg, s.c.), após 24 horas foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 5.2.1.1 sob efeito do anestésico tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), foram obtidos os parâmetros basais por 30 minutos, Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito crônico de AETC sobre a PAM e FC em ratos infartados.



NPS (nitroprussiato), ISO (isoproterenol), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*). Fonte: AUTORA, 2017.

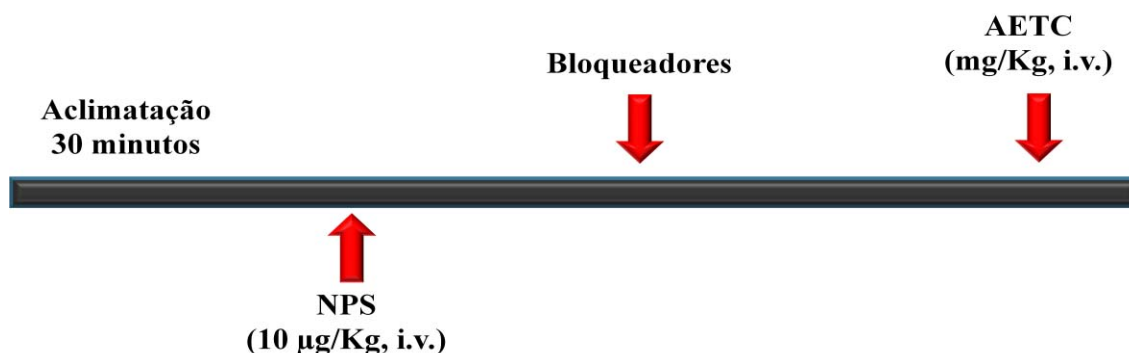
5.2.1.5 Verificação da influência de bloqueadores no efeito induzido por AETC na PAM e FC de ratos Wistar

A verificação da participação muscarínica no efeito produzido por AETC na PAM e FC foi feito após um registro controle obtido como descrito no item 5.2.1.1, os ratos Wistar (n=5) foram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após 15 minutos, uma nova dose-resposta empregando AETC na dose obtida através da curva de regressão não linear (DE₅₀) era obtida. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AETC eram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com atropina, Figura 10.

A verificação da participação de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L (C_{av}) no efeito produzido por AETC na PAM e FC foi feito após um registro controle obtido como descrito no item 5.2.1.1, os ratos Wistar (n=5) eram tratados com nifedipina (1,5 mg/kg, i.v.), um bloqueador de C_{av}. Após 15 minutos, uma nova dose-resposta empregando AETC na dose obtida através da curva de regressão não linear (DE₅₀) era obtida. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AETC eram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com nifedipina, Figura 10.

A influência do bloqueio ganglionar no efeito produzido por AETC na PAM e FC foi feito após um registro controle obtido como descrito no item 5.2.1.1, os ratos Wistar (n=5) eram tratados com hexametônio (20 mg/kg, i.v.), um bloqueador ganglionar (TAKAHASHI; OWYANG, 1997). Após 30 minutos, uma nova dose-resposta empregando AETC na dose obtida através da curva de regressão não linear (DE₅₀) era obtida. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AETC eram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com hexametônio, Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para verificação da influência de bloqueadores no efeito de AETC sobre a PAM e FC em ratos Wistar.



NPS (nitroprussiato), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*). Fonte: AUTORA, 2017.

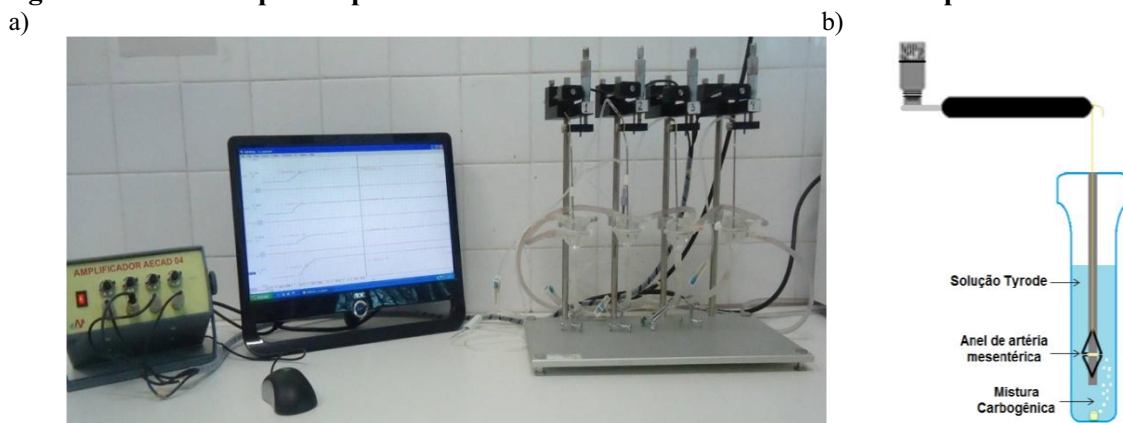
5.2.2 Estudos farmacológicos com AETC *in vitro*

5.2.2.1 Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar

Ratos Wistar (n=5) foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação. Em seguida, através de uma incisão no abdômen 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, e foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução nutritiva de Krebs a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂), Tabela 1. Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (Dataq, Brasil) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Dataq, Brasil) para o registro das contrações isométricas, Figura 11a e 11b. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,5 g por um período de no mínimo 60 min. Durante este tempo, a solução nutritiva será trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Anéis sem endotélio funcional foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso. A presença ou ausência do endotélio funcional foi verificada pela habilidade, medida em percentagem (%), da ACh (100 µM) em relaxar os anéis pré-contraídos com 10 µM de fenilefrina (FEN). Eram considerados com endotélio funcional, os anéis que apresentarem relaxamentos superiores a 70% sobre a pré-contracção com FEN. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, serão considerados sem endotélio funcional (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) para os protocolos realizados em anéis com ausência de endotélio o mesmo foi removido mecanicamente e foi obtida uma nova curva concentração-resposta.

Figura 11 – Sistema para experimentos com anéis de artéria mesentérica superior *in vitro*.



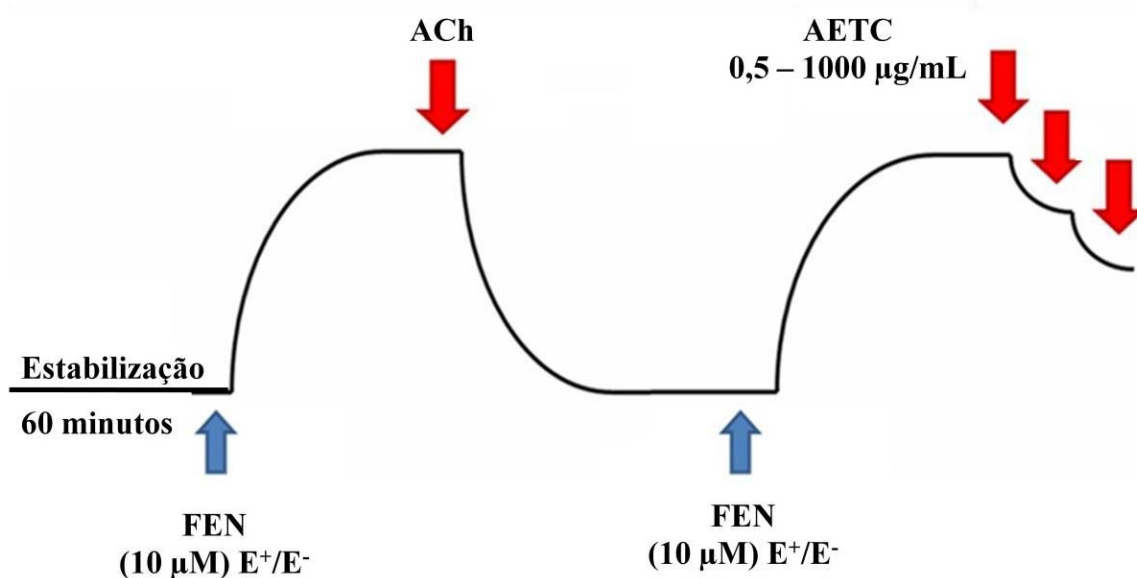
Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato (a). Representação esquemática da cuba para órgãos isolados (b) (MACHADO, 2013).

5.2.2.2 Curva concentração-resposta de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de rato Wistar

Após o período de estabilização de 60 min e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito no item 5.2.2.1, foi induzida uma contração com FEN (10 μ M) (aproximadamente 30 minutos) e concentrações crescentes de AETC (0,5; 1; 10; 50; 100; 500 e 1000 μ g/mL), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa na fase tônica, tanto em anéis com como em anéis sem endotélio, Figura 12, para obtenção de uma curva concentração-resposta na ausência e na presença do endotélio vascular.

O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração produzida pela FEN. A eficácia do efeito vasorelaxante dos derivados foram avaliadas através dos valores do Emáx. Os valores da concentração de AETC que produzem 50% de seu efeito máximo (CE_{50}) foram obtidas por regressão não-linear, a partir das curvas de relaxamento, obtida na ausência e na presença de endotélio funcional. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) foram obtidos dos valores de CE_{50} de cada experimento.

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.

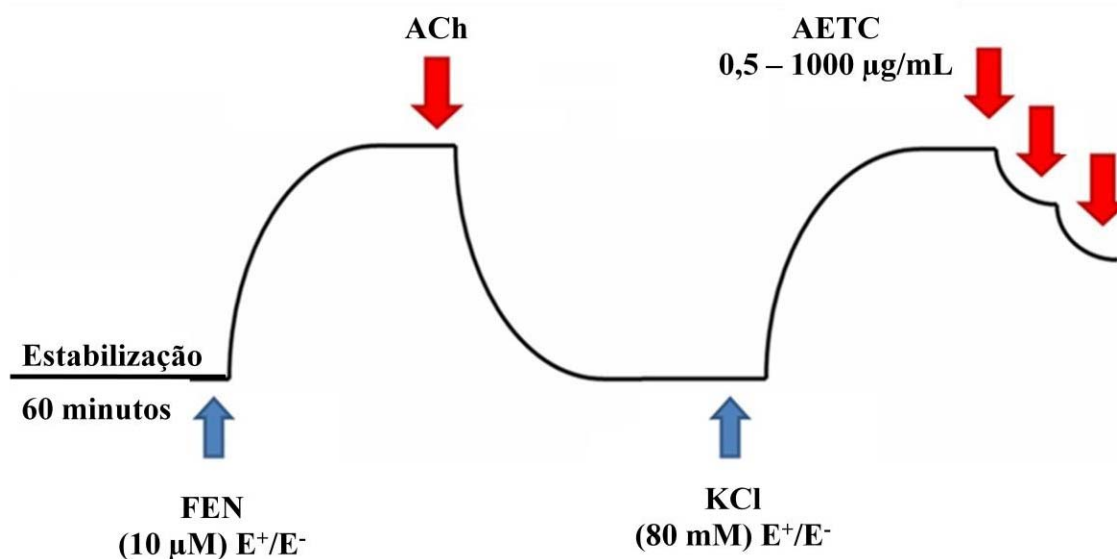


FEN (fenilefrina), ACh (acetilcolina), AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*), E⁺ (anéis com endotélio) e E⁻ (anéis sem endotélio). Fonte: AUTORA, 2017.

5.2.2.3 Efeito de AETC sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no item 5.2.2.1, as preparações eram lavadas com Tyrode e após 30 minutos, duas respostas contráteis eram induzidas com KCl 80 mM. Durante a fase tônica da segunda resposta, uma curva concentração-resposta cumulativa para AETC foi obtida em anéis com endotélio e sem endotélio, Figura 13. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo KCl 80 mM. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito no item 5.2.2.2. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) foram obtidos dos valores de CE_{50} de cada experimento.

Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AETC sobre contração induzida por KCl 80mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar.



FEN (fenilefrina), ACh (acetilcolina), KCl (cloreto de potássio) AETC (fração acetato de etila de *Trichilia catigua*), E^+ (anéis com endotélio) e E^- (anéis sem endotélio). Fonte: AUTORA, 2017.

5.2.2.4 Curva concentração-resposta de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de rato infartado

Ratos Wistar ($n=5$) foram infartados com ISO (85 mg/Kg, s.c.) por dois dias consecutivos e realizado o protocolo experimental foi conforme descrito no item 5.2.2.1 e 5.2.2.2.

5.2.3 Estudos antioxidantes com AETC *in vitro*

5.2.3.1 Quantificação de compostos fenólicos em AETC

A quantificação de compostos fenólicos presentes em AETC foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (FC). Neste é utilizada uma mistura de molibdato e tungstato de sódio (solução amarela) em meio básico (5 a 10% (m/v) de bicarbonato de sódio (Na_2CO_3)). A alcalinidade proporcionada pelo Na_2CO_3 causa desprotonação dos compostos fenólicos ($\text{pK}_a \sim 10$), sendo o íon fenolato um redutor mais eficiente (facilidade para transferência de elétrons) que a sua forma associada. Os íons fenolato, por sua vez, reagem com o molibdato reduzindo-o a molibdato (MoO_4^{2-}) de coloração azul com absorvância máxima em 750 nm. A avaliação quantitativa deste método foi realizada por espectrofotometria, utilizados como padrões o ácido gálico, ácido caféico, trolox e quercertina e a concentração total de compostos fenólicos é calculada em equivalentes de cada padrão (mg/L), partir dos dados obtidos pela equação da curva analítica. Sendo assim, em um balão volumétrico de 5,0 mL foram inseridos, 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:10), 500 μL da solução de Na_2CO_3 (75 g/L) e 2,0 mL da amostra ou solução de referência. O volume final de 5,0 mL foi completado com água deionizada e aguardou-se 30 minutos. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 770 nm com cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O branco (sinal analítico de referência) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o volume da amostra foi substituído por água deionizada (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.2.3.2 Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical DPPH*

A capacidade antioxidante de AETC frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi medida pela redução da molécula radicalar DPPH $^\circ$ formando hidrazina, a cinética de sua formação correspondente a doação de átomos de hidrogênio (radical). A hidrazina formada possui uma coloração amarelo pálido, resultando no decréscimo da absorvância em relação ao sinal do branco analítico (na ausência do composto antioxidante). Em um tubo falcon de 10 mL foram adicionados 0,20 mL da solução do radical DPPH $^\circ$ (600 $\mu\text{mol/L}$), 1,0 mL da amostra previamente diluída ou solução de referência e 2,80 mL de água deionizada, nesta ordem, totalizando um volume final de 4,0 mL. Foi aguardado 30 min e realizou-se a

medida espectrofotométrica em 527 nm com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água. Os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em equivalentes (mg/L) dos padrões (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.2.3.3 Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical ABTS*°

A capacidade antioxidante de AETC frente ao radical ABTS*° (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), de coloração verde intensa e 734 nm, foi mensurada por sua redução a ABTS²⁻. O aumento da concentração do antioxidante acarreta na diminuição da intensidade da cor e a avaliação quantitativa se dá espectrofotometricamente. A inibição é estabelecida em função da concentração e do tempo, sendo a medida relativa as concentrações conhecidas dos padrões sob as mesmas condições da amostra avaliada. Para o método empregando o radical ABTS*° procedeu-se de forma similar ao DPPH°, em um tubo falcon de 10 mL adicionou-se 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS*°, 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 15 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a medida espectrofotométrica em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água. A curva analítica para o procedimento empregando ABTS*° foi construída empregando-se ácido gálico como padrão de calibração. Os mesmos padrões citados acima foram usados como referência e os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em equivalentes (mg/L) dos mesmos (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.2.3.4 Avaliação do efeito de AETC sobre o sequestro do radical NO⁻

A geração de óxido nítrico a partir de nitroprussiato de sódio foi descrito pela reação de Griess. O nitroprussiato de sódio em solução aquosa e pH fisiológico gera óxido nítrico espontaneamente, a partir de interações com o oxigênio produz íons nitrito e podem estimar o uso do reagente de Griess. Nitroprussiato de sódio (5mM) em tampão fosfato foi adicionado em diferentes concentrações de AETC dissolvido em álcool e incubado a 25°C por 150 min. 0,5 mL das soluções (AETC ou padrões) foi incubado em 0,5 mL do reagente de Griess (1%

sulfanilamida, 2% H_3PO_4 e 0,1% naftiletilediamina diidrocloreto). A absorvância do cromóforo formado durante a diazotização do nitrito com sulfonilamida e subsequente acoplamento com naftiletilediamina é visível a 546 nm. O resultado é apresentado em concentração de NO_2 formado e o % inibição da formação de óxido nítrico (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.2.3.5 Ensaio analítico de poder antioxidante de AETC por redução do ferro

O ensaio analítico de poder antioxidante por redução do ferro (FRAP) baseia-se na redução do complexo férrico 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), de $[\text{Fe}(\text{TPZT})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}(\text{TPZT})_2]^{2+}$ o qual apresenta uma coloração azul intensa, 593 nm, em pH \sim 3,6. A faixa linear de absorvância é geralmente medida na faixa de 0 a 4 min e a variação ($A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) é relacionada à concentração do complexo de ferro (II) formado. Diferentes concentrações de AETC em 0,75 mL de água destilada foram misturadas a 1,25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, em pH 6,6 e 1,25 mL de ferricianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). A mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos. Após 20 minutos de incubação, a mistura reacional foi acidificada com 1,25 mL de ácido tricloroacético (10%). Finalmente, 0,5 mL de FeCl_3 (0,1%) foram adicionados a solução e a absorvância mensurada a 700nm. Aumentos na absorvância da reação indicam redução da capacidade redutora (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.2.3.6 Ensaio analítico de poder antioxidante de AETC por atividade quelante de ferro

A atividade quelante de íons ferrosos (Fe^{2+}) foi medida através da inibição da formação do complexo de Fe^{2+} -ferrozina após o tratamento de material de ensaio com Fe^{2+} . A capacidade inibidora da complexação de Fe^{2+} de AETC foi monitorada pela absorvância do complexo em 562 nm. Onde, diferentes concentrações de AETC em 0,4 mL de metanol foram adicionados a uma solução de FeCl_2 0,6 mM (0,1 mL). A reação foi iniciada pela adição de 5 mM de ferrozina (0,1 ml) dissolvido em metanol. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente e deixada à temperatura ambiente durante dez minutos. A absorvância da solução foi então medida espectrofotometricamente a 562 nm e calculada a percentagem de inibição de formação do complexo (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

5.3 Verificação de outros parâmetros não cardíacos alterados por isoproterenol após tratamento crônico com AETC

5.3.1 Avaliação do efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados

O peso corporal dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5), conforme descrito na seção 5.1, foi verificado individualmente com uso de balança semi-analítica no primeiro e último dia de protocolo experimental. Esse parâmetro foi utilizado a fim de avaliar o ganho ou perda de massa corporal entre os grupos ao fim do tratamento e em cada grupo antes e depois do tratamento com AETC. Além disso, foi utilizado para o cálculo das doses e para normalizar os pesos dos órgãos retirados para a morfometria.

5.3.2 Avaliação do efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados

A glicemia após 12 horas em jejum dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5), conforme descrito na seção 5.1, foi realizada após coleta de 50 μ L de sangue por secção da cauda e com auxílio de monitor de glicemia (TRUEread™) para determinar a glicemia de jejum baseada em um sistema amperométrico.

Nesse sistema a glicose presente no sangue total é oxidada através da ação da enzima glicose oxidase formando ácido glucônico. Os elétrons gerados nessa reação são transferidos do sangue para os eletrodos e a corrente resultante é proporcional a concentração de glicose no sangue que é quantificada e convertida para uma leitura no monitor.

5.3.3 Avaliação do efeito de AETC sobre lipídeos séricos de ratos infartados

O soro sanguíneo (obtido conforme descrito na seção 5.1) dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5) foi utilizado para dosagem de colesterol total e triglicerídeos.

O colesterol total foi quantificado usando um sistema enzimático colorimétrico através de kit Labtest. Este teste se baseia em ésteres de colesterol presentes no soro que são hidrolisados pela enzima colesterol esterase formando colesterol livre e ácido graxos. O

colesterol livre é então oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Por fim, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogeno, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvividade máxima em 500 nm em espectrofotômetro de ultravioleta. O produto final formado confere cor vermelha a amostra analisada que é diretamente proporcional a concentração de colesterol na amostra.

As dosagens de triglicérides plasmáticos foram determinadas por sistema enzimático colorimétrico utilizando kit Labtest, onde, a lipoproteína lípase promove sua hidrólise liberando glicerol, que por ação da glicerolquinase forma glicerol-3-fosfato que é então oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, na presença de glicerolfosfato oxidase. Por ação da peroxidase ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-cloranfenicol, produzindo quinoneimina com absorvância em 505 nm que também promove cor vermelha que é proporcional a concentração de triglicérides na amostra.

5.3.4 Avaliação do efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados

Os fígados dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5), obtidos conforme descrito na seção 5.1, foram dissecados e pesados segundo o método de Sherle. Este parâmetro foi normalizado pelo peso corporal de cada animal. O soro sanguíneo (conforme descrito na seção 5.1) foi utilizado para as dosagens bioquímicas de albumina, transaminase glutâmico pirúvica (TGP), gama-glutamiltanspeptidase (γ -GT) e fosfatase alcalina (FA), em microplaca com análise em duplicata utilizando kits Labtest.

A determinação da albumina foi realizada por um sistema de medição baseado no desvio de pico de absorvividade máxima de um corante complexo, o verde de bromocresol, quando este se liga a albumina. A cor formada foi medida colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra.

A determinação da TGP foi realizada através de método enzimático cinético. Esta catalisa a transferência de um grupamento amina da alanina para o cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. O piruvato é então reduzido a lactato por ação da enzima lactato desidrogenase e o NADH é oxidado a NAD. A absorvância em 340 nm é oriunda da oxidação do NADH, sendo diretamente proporcional à atividade da TGP na amostra.

A determinação de γ -GT foi realizada através de um sistema cinético baseado no princípio de Szasz o produto p-nitroanilina, que apresenta elevada absorvância em 405 nm, é diretamente proporcional à atividade de γ -GT.

A determinação da FA foi realizada por método cinético, empregando a metodologia de Bowers e Mc Comb modificada, onde um substrato p-nitrofenilfosfato que é hidrolisado pela FA, o p-nitrofenol produto dessa hidrólise, possui alta absorvância molar, 405 nm, que é diretamente proporcional à atividade enzimática da FA na amostra.

5.3.5 Avaliação do efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados

O rim esquerdo dos ratos dos grupos SALINA, ISO, AETC 10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg (n=5), obtidos conforme descrito na seção 5.1, foram dissecados e pesados segundo o método de Sherle. Este parâmetro foi normalizado pelo peso corporal de cada animal. O soro sanguíneo (conforme descrito na seção 5.1) foi utilizado para as dosagens bioquímicas de ureia e creatinina.

A uréia foi determinada a partir do soro sanguíneo por um sistema enzimático cinético, onde esta é hidrolisada pela urease formando amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com 2-cetoglutarato e NADH pela ação enzimática da glutamato desidrogenase NADH é oxidado a NAD. A absorvância medida em 340 nm é proporcional a concentração de uréia na amostra.

A creatinina foi determinada pelo método de Jaffé UV modificado. Trata-se de um sistema enzimático colorimétrico onde a creatinina reage com picrato em meio alcalino, o complexo formado apresenta absorvância em 520 nm, a fim de minimizar a ação de interferentes é aplicado um índice de correção de 0,25 mg/dL.

5.4 Experimentos de *docking* molecular das Cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb em alvos receptores relacionados à cardioproteção

A fim de dar continuidade aos estudos de cardioproteção com substâncias ativas isoladas a partir AETC foram selecionadas as cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb para estudos de *docking* molecular frente a alvos receptores relacionados à cardioproteção. Uma vez que representam mais de 70% do conteúdo de AETC, são consideradas o padrão de controle de

qualidade da *T. catigua* e a estas substâncias têm sido atribuídos os efeitos biológicos de AETC (LONGHINI et al., 2013).

As estruturas tridimensionais das cinchonaínas foram desenhadas utilizando o *software ArgusLab*®, bem como a execução da minimização das energias. Para a execução dos experimentos de ancoragem molecular foi utilizado o *software AutoDock Tools*® versão 1.5.6. Para a otimização das energias de ligação estimadas para a formação do complexo ligante-receptor pelo *AutoDock Tools*®, foi utilizado o *software, AutoDock Vina*®. Para a visualização dos resultados calculados através do *AutoDock Tools*®, bem como, cálculos das distâncias das interações ligante-receptor e elaboração de figuras, foi utilizado o *software PyMol*®, versão 0.99.

Foram selecionados receptores frequentemente estudados como alvo terapêutico para planejamento de novos candidatos a fármacos com atuação no sistema cardiovascular e enzimas provenientes de estudos dos sistemas antioxidantes. Dessa forma, foram selecionados os PDB-ID – alvos 4MQS (Receptor M₂), 4DAJ (Receptor M₃), 1J95 (Canal de Potássio K_{CA2+}), 3NAF (Canal de BkCa), 4GPO (Receptor β₁), 3NOS (Enzima Óxido Nítrico Sintase), 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), 2RH1 (Receptor β Adrenérgico tipo 2), 1QQW (Enzima Catalase), 2SOD (Enzima Superóxido Dismutase), 1GP1 (Enzima Glutaciona Peroxidase) e 1XOS (Enzima fosfodiesterase 4) obtidas no *RSCBProtein Data Bank (PDB)*.

Após a conversão das estruturas tridimensionais, as ligações *sigma* (σ) dos ligantes foram admitidas como flexíveis e as ligações *pi* (π) foram mantidas fixas. O *docking* molecular objetiva prever ligações não covalentes, reproduzir os potenciais químicos que determinam a principal conformação ligante e a energia de ligação desta (TROTT; OLSON, 2009; COSCONATI et al., 2010).

A energia de ligação se refere ao campo de força de energia livre é baseado em um campo de força mecânico molecular, que inclui dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostáticos, de solvatação e entropia de torção (COSCONATI et al., 2010). A conformação que apresentou a menor energia de ligação (em kcal/mol) para a formação do complexo foi considerada como sendo a mais viável.

5.5 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.

Os valores de CE_{50} e DE_{50} foram obtidos através de regressões não-lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas induzidas por AETC para cada experimento. Para estudar o efeito vasorelaxante induzido por AETC, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o E_{max} (efeito máximo gerado pelo agonista) e pD_2 ($-\log EC_{50}$) que representam a eficácia e a potência farmacológica, respectivamente.

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%.

6 RESULTADOS

6.1 Estudo cardioprotetor do infarto de AETC

6.1.1 Efeito de AETC na morfometria do miocárdio

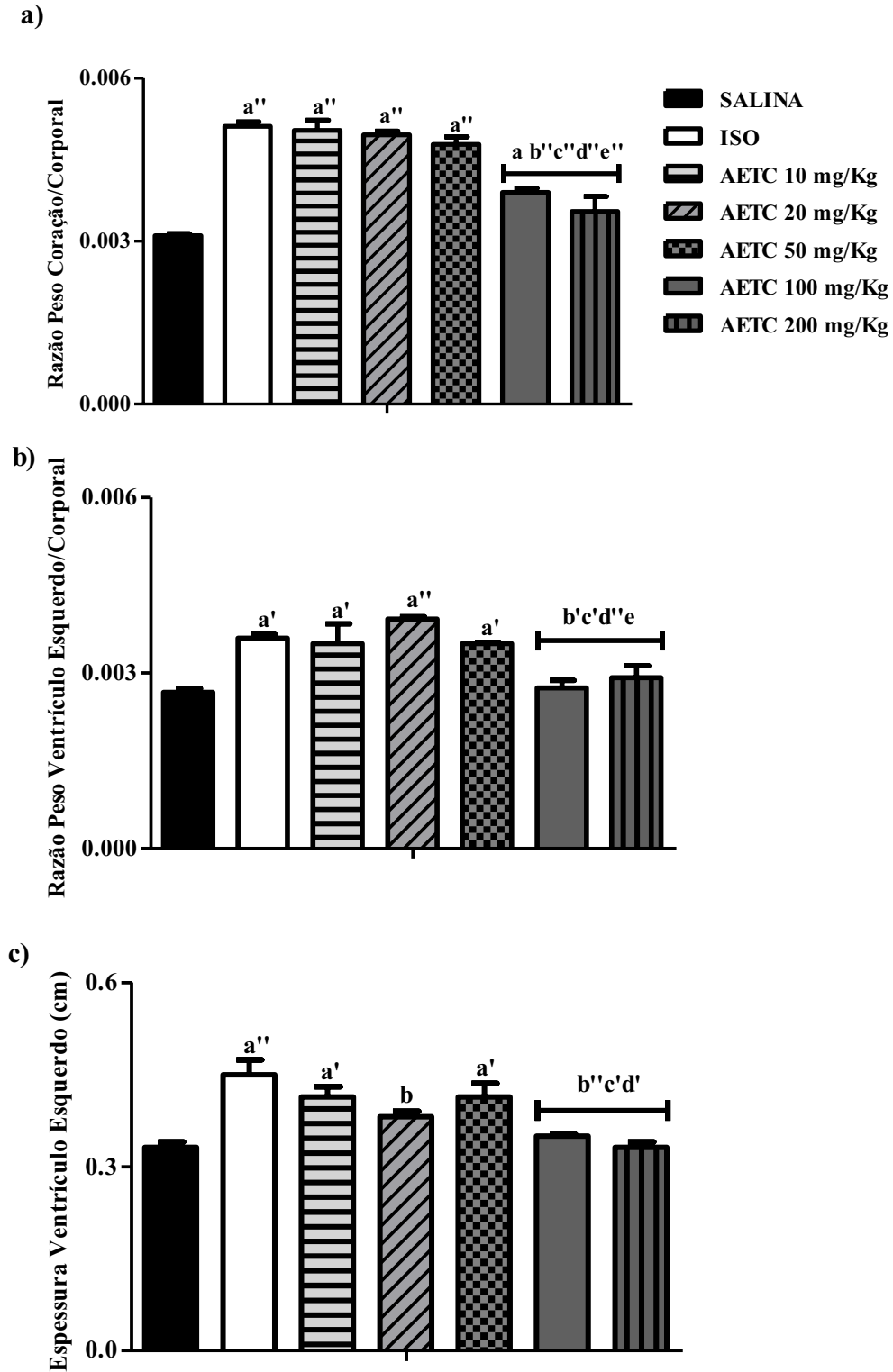
O pré-tratamento com AETC por 30 dias bloqueou o aumento do peso do coração, do peso do ventrículo esquerdo e da espessura do ventrículo esquerdo em ratos infartados de forma não dependente de dose.

Na avaliação da morfometria do miocárdio, o grupo ISO apresentou aumento de 25,48% ($p < 0,001$) na razão peso do coração/peso corporal, quando comparado ao grupo SALINA. Já os grupos tratados com AETC (100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 18,61% e 22,73% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 14a.

Com relação à razão peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, o grupo ISO apresentou aumento de 34,81% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SALINA. Enquanto, os grupos tratados com AETC (100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 23,79% e 19,24% ($p < 0,01$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 14b.

Quanto à espessura do ventrículo esquerdo, o grupo ISO apresentou aumento de 32,9% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SALINA. Os grupos tratados com AETC (20, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 14,29% ($p < 0,05$), 21,29% e 25,55% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 14c.

Figura 14 – Efeito de AETC sobre a morfometria do miocárdio.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, ^{a''}p<0,001 ^{a'}p<0,01 ^ap<0,05 vs. SALINA; ^{b''}p<0,001 ^{b'}p<0,01 ^bp<0,05 vs. ISO; ^{c''}p<0,001 ^{c'}p<0,01 ^cp<0,05 vs. AETC 10 mg/Kg; ^{d''}p<0,001 ^{d'}p<0,01 ^dp<0,05 vs. AETC 20 mg/Kg; ^{e''}p<0,001 ^{e'}p<0,01 ^ep<0,05 vs. AETC 50 mg/Kg; ^{f''}p<0,001 ^{f'}p<0,01 ^fp<0,05 vs. AETC 100 mg/Kg. Fonte: AUTORA, 2017.

6.1.2 Efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio

O pré-tratamento com AETC por 30 dias bloqueou o aumento dos marcadores CK_{MB}, CK_{NAC}, LDH e TGO em ratos infartados de forma não dependente de dose.

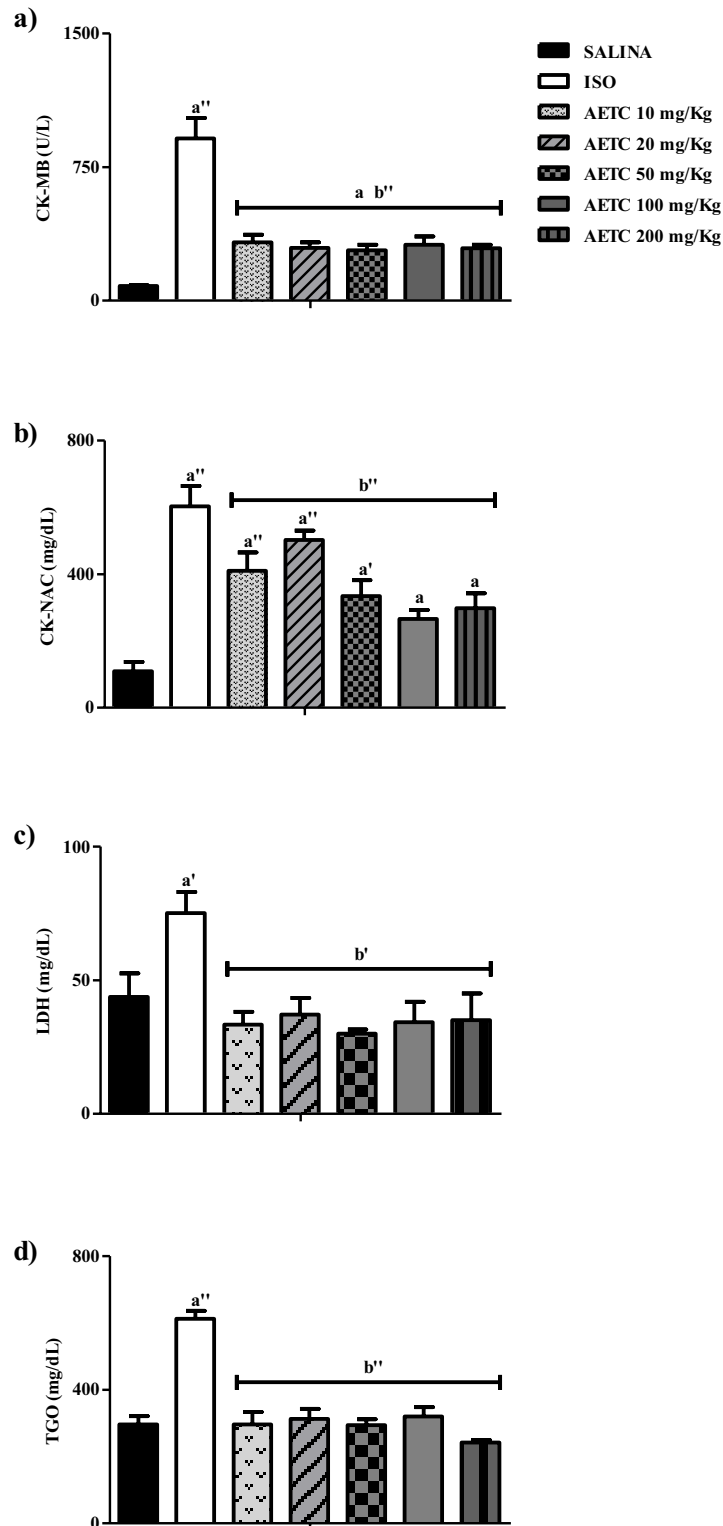
Os animais do grupo ISO apresentaram aumento de 998,77% ($p < 0,001$) nos níveis de CK_{MB}, principal marcador de necrose miocárdica, quando comparado ao grupo SALINA. Já os grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 64,09%, 67,12%, 68,65%, 65,94% e 66,55% ($p < 0,001$) respectivamente, de CK_{MB} quando comparados ao grupo ISO, Figura 15a.

Quanto aos marcadores secundários de necrose miocárdica. Os animais do grupo ISO apresentaram aumento de 629,62% ($p < 0,001$) nos níveis de CK_{NAC}, quando comparado ao grupo SALINA. Enquanto os grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 37,86%, 22,48%, 48,94%, 59,59% e 54,61% ($p < 0,001$) respectivamente, de CK_{NAC} quando comparados ao grupo ISO, Figura 15b.

Os níveis séricos de LDH o grupo ISO apresentou aumento de 100,6% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SALINA. Os grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 56,48%, 51,57%, 59,01%, 57,05% e 56,79% ($p < 0,01$) respectivamente, de LDH quando comparados ao grupo ISO, Figura 15c.

Quanto ao marcador TGO, o grupo ISO apresentou aumento de 122,54% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SALINA. Já os grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram diminuição de 52,36%, 49,49%, 52,26%, 48,33% e 60,42% ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo ISO, Figura 15d.

Figura 15 – Efeito de AETC sobre marcadores bioquímicos de lesão do miocárdio.

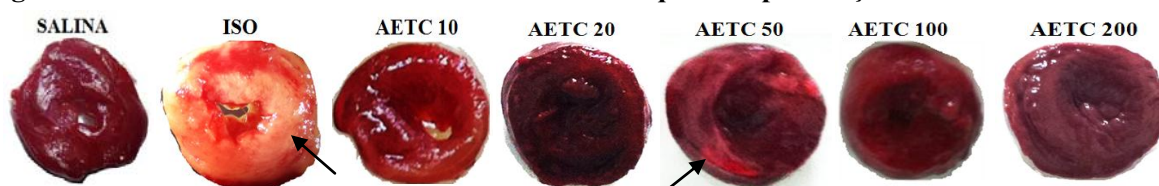


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, ^{a''}p<0,001 ^{a'}p<0,01 ^ap<0,05 vs. SALINA; ^{b''}p<0,001 ^{b'}p<0,01 ^bp<0,05 vs. ISO; ^{c''}p<0,001 ^{c'}p<0,01 ^cp<0,05 vs. AETC 10 mg/Kg; ^{d''}p<0,001 ^{d'}p<0,01 ^dp<0,05 vs. AETC 20 mg/Kg; ^{e''}p<0,001 ^{e'}p<0,01 ^ep<0,05 vs. AETC 50 mg/Kg; ^{f''}p<0,001 ^{f'}p<0,01 ^fp<0,05 vs. AETC 100 mg/Kg. Creatinacina fração MB (CK_{MB}), creatinacina total (CK_{NAC}), lactato desidrogenase (LDH) e transaminase glutâmico oxalacética (TGO). Fonte: AUTORA, 2017.

6.1.3 Efeito de AETC sobre a área de necrose do miocárdio

A análise qualitativa da área de necrose do miocárdio, após coloração com trifeniltetrazólio (TTZ), revelou amplas regiões esbranquiçadas no grupo ISO, indicando áreas necróticas, essa característica não foi observada no grupo SALINA. Com relação aos grupos tratados com AETC, são observadas pequenas e espaçadas regiões esbranquiçadas, sugerindo uma diminuição da área de infarto, Figura 16.

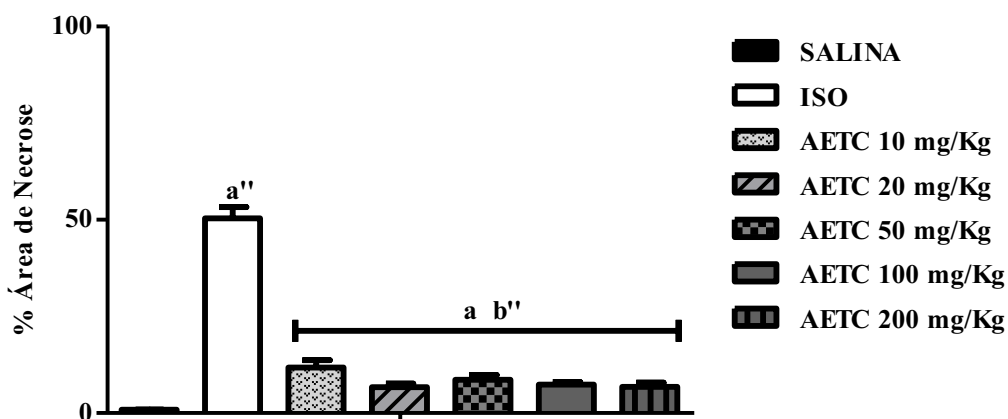
Figura 16 – Área de necrose de fatias de ventrículo esquerdo após reação com TTZ.



Áreas esbranquiçadas e setas indicam área de necrose miocárdica. Fonte: AUTORA, 2017.

O pré-tratamento com AETC por 30 dias bloqueou o aumento da área de necrose em ratos infartados de forma não dependente de dose. A análise quantitativa das áreas de necrose revelou um aumento de 47,64% ($p < 0,001$) na área de necrose no grupo ISO, quando comparado ao grupo SALINA, enquanto o tratamento com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) promoveu uma diminuição de 38,61%, 43,67%, 41,78%, 43,03% e 43,58% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparadas ao grupo ISO, Figura 17.

Figura 17 – Efeito de AETC sobre o percentual de área de necrose de fatias de ventrículo esquerdo após reação com TTZ.



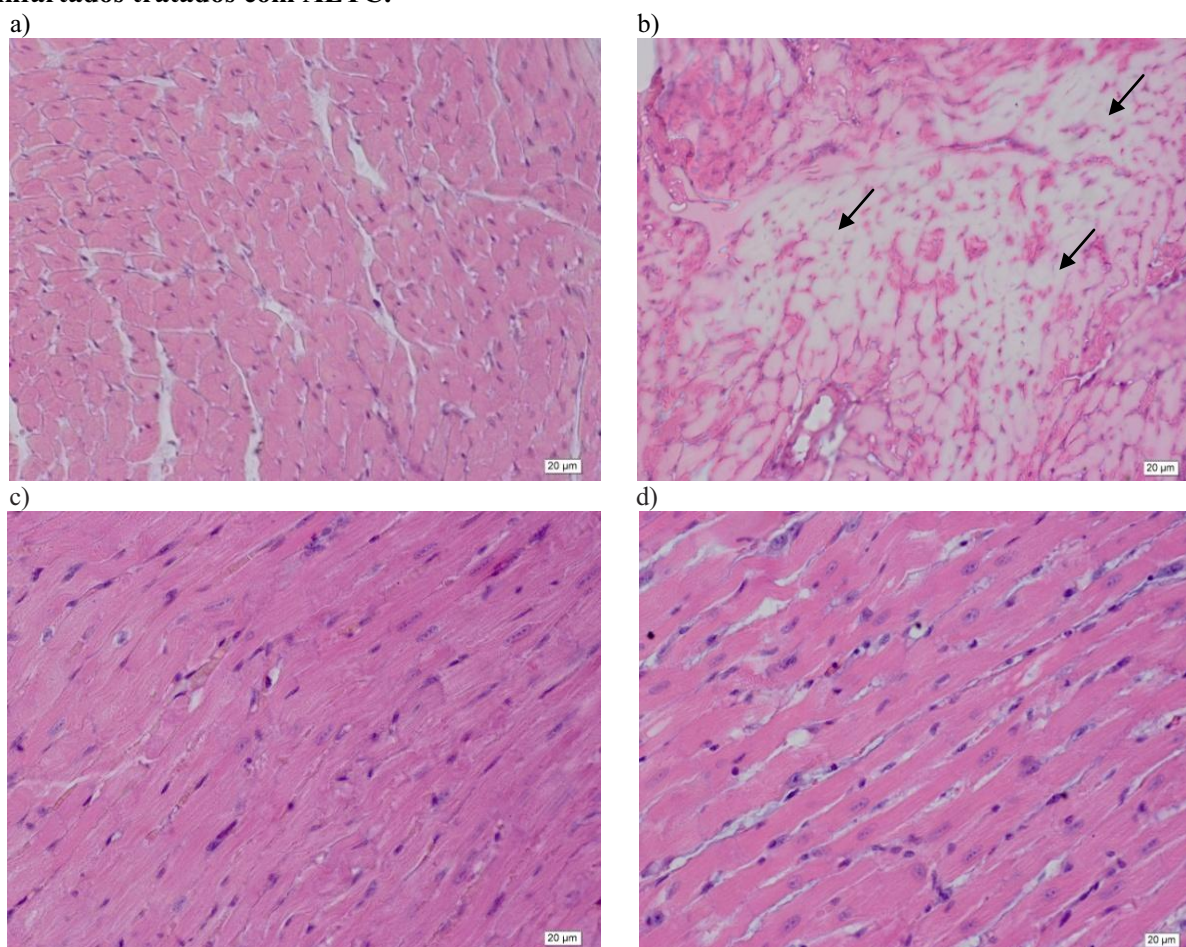
Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, ^{a''} $p < 0,001$ ^a $p < 0,05$ vs. SALINA; ^{b''} $p < 0,001$ vs. ISO. Fonte: AUTORA, 2017.

6.1.4 Efeito de AETC sobre a histologia do miocárdio

A análise qualitativa da histologia do miocárdio, após coloração com Hematoxilina-Eosina, revelou amplas áreas de necrose coagulativa no grupo ISO (Figura 18b), caracterizada por dissolução do citoplasma, manutenção da forma celular e alterações nucleares em diferentes estágios como picnose nuclear, cariólise, mas especialmente cariorexe. Essas alterações não foram observadas no grupo SALINA (Figura 18a).

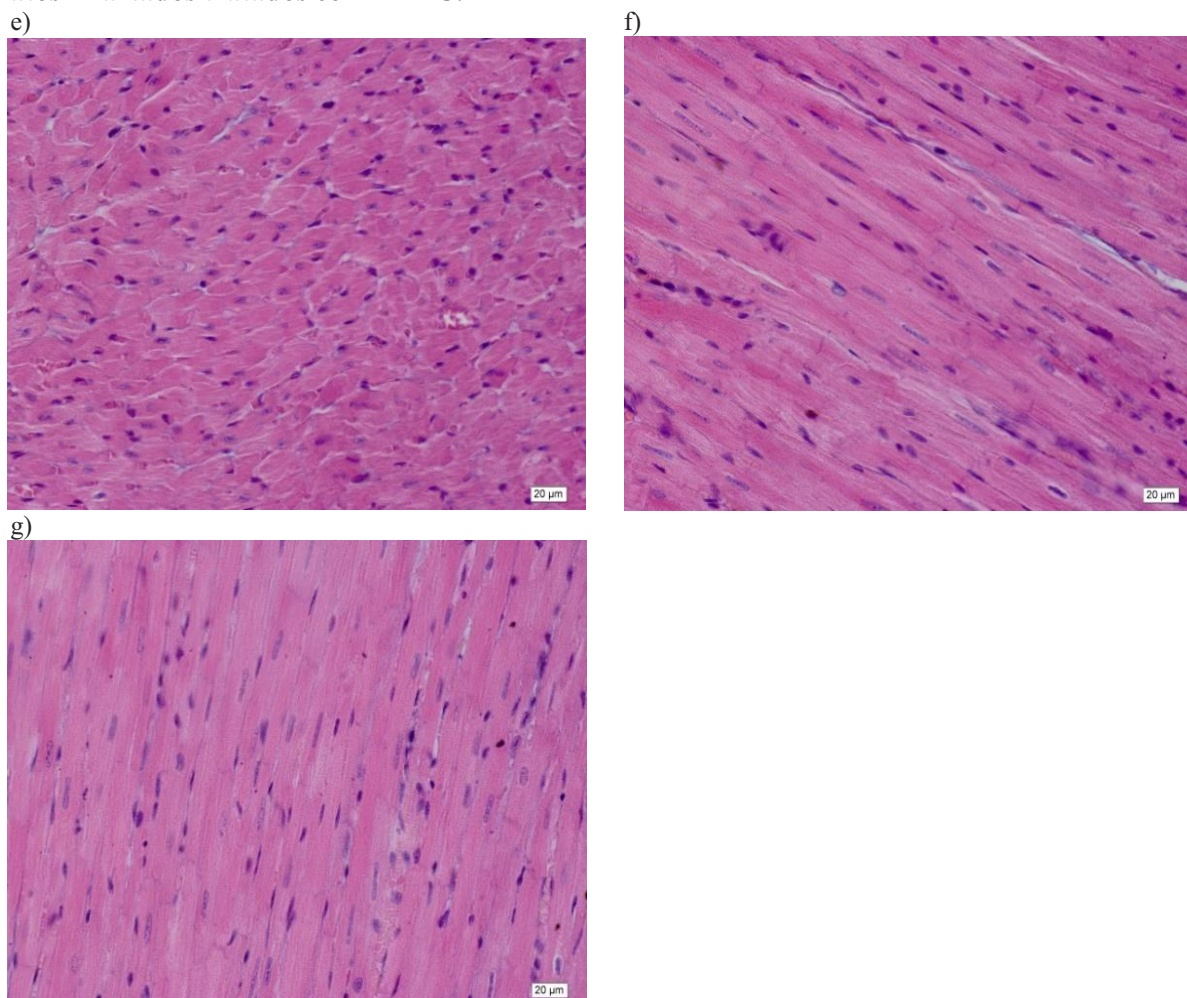
O pré-tratamento com AETC por 30 dias diminuiu as alterações histológicas observadas em ratos infartados de forma não dependente de dose. Nos grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) houve redução das áreas de necrose coagulativa, além disso, estavam presentes áreas de infiltrado leucocitário (Figura 18c, 18d, 18e, 18f e 18g).

Figura 18 – Fotomicrografias de miocárdio em coloração Hematoxilina-Eosina de ratos infartados tratados com AETC.



Aumento 40x. a) SALINA; b) ISO; c) AETC 10 mg/Kg; d) AETC 20 mg/Kg; e) AETC 50 mg/Kg; f) AETC 100 mg/Kg; g) AETC 200 mg/Kg. As setas indicam extensas áreas de necrose coagulativa. Fonte: AUTORA, 2017.

Figura 18 – Continuação. Fotomicrografias de miocárdio em coloração Hematoxilina-Eosina de ratos infartados tratados com AETC.



Aumento 40x. a) SALINA; b) ISO; c) AETC 10 mg/Kg; d) AETC 20 mg/Kg; e) AETC 50 mg/Kg; f) AETC 100 mg/Kg; g) AETC 200 mg/Kg. As setas indicam extensas áreas de necrose coagulativa. Fonte: AUTORA, 2017.

6.1.5 Efeito de AETC sobre a estereologia do miocárdio

Na estereologia, análise quantitativa da histologia do VE, o pré-tratamento com AETC por 30 dias atenuou a diminuição das variáveis relacionadas à integridade de cardiomiócitos ventriculares em ratos infartados de forma não dependente de dose. O grupo ISO reduziu 56,15% ($p < 0,001$) o V_v [miócitos], quando comparado ao grupo SALINA. Os grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) aumentaram 113,83%, 103,42%, 127,05%, 122,53% e 121,36% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 19a.

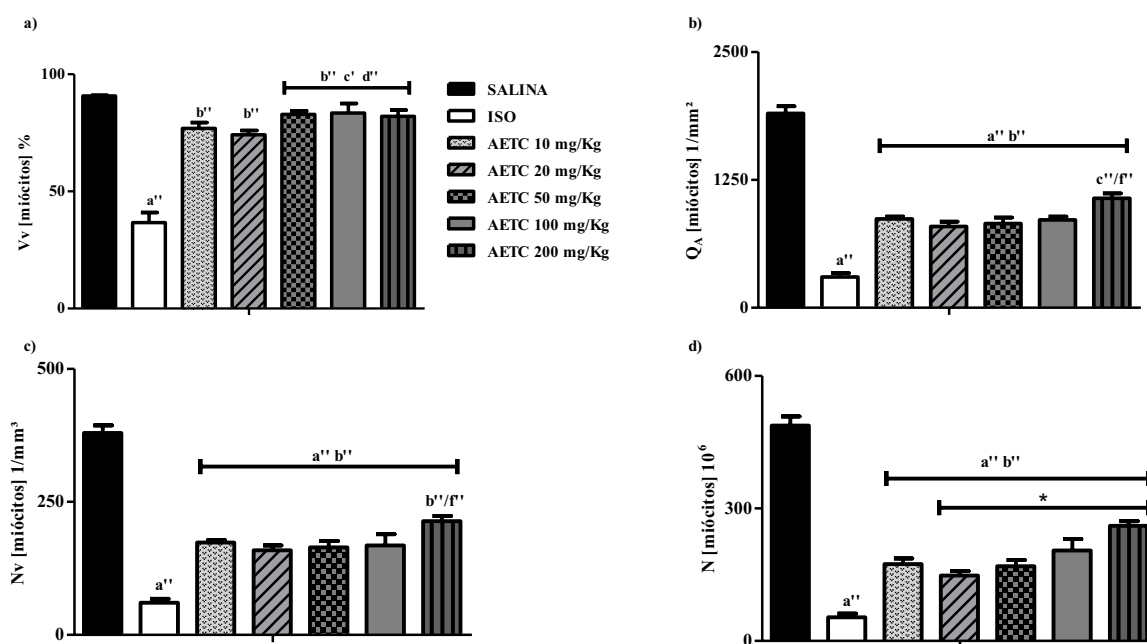
O Q_a [miócitos] do grupo ISO reduziu 83,91% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupos SALINA. Os grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) aumentaram 179,65%, 164,06%,

170,08%, 191,57% e 258,09% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 19b.

O Nv[miócitos] do grupo ISO reduziu 83,89% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupos SALINA. Os grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) aumentaram 179,56%, 163,92%, 169,89%, 171,30% e 257,86% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO, Figura 19c.

O N[miócitos] do grupo ISO reduziu $88,65 \pm 1,06\%$ ($p < 0,001$) quando comparado ao grupos SALINA. Os grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) aumentaram 252,67%, 185,53%, 224,29%, 282,71% e 411,84% ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo ISO, Figura 19d.

Figura 19 – Efeito de AETC sobre variáveis relacionadas à integridade de cardiomiócitos ventriculares.



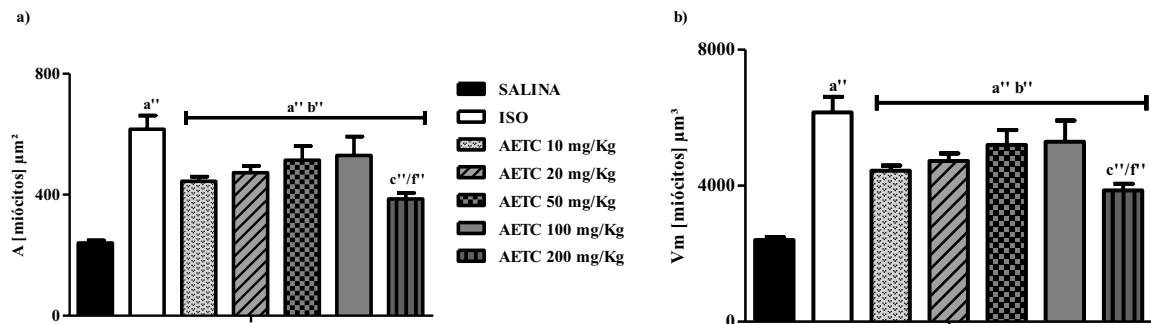
Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, $a'' p < 0,001$ $a' p < 0,01$ $a p < 0,05$ vs. SALINA; $b'' p < 0,001$ $b' p < 0,01$ $b p < 0,05$ vs. ISO; $c'' p < 0,001$ $c' p < 0,01$ $c p < 0,05$ vs. AETC 10 mg/Kg; $d'' p < 0,001$ $d' p < 0,01$ $d p < 0,05$ vs. AETC 20 mg/Kg; $e'' p < 0,001$ $e' p < 0,01$ $e p < 0,05$ vs. AETC 50 mg/Kg; $f'' p < 0,001$ $f' p < 0,01$ $f p < 0,05$ vs. AETC 100 mg/Kg. / (até). *(dose-dependente). a) Vv (densidade de volume de cardiomiócitos íntegros); b) Qa (densidade de perfis de cardiomiócitos íntegros por área); c) Nv (densidade de número de cardiomiócitos íntegros); d) N (número de cardiomiócitos íntegros). Fonte: AUTORA, 2017.

O pré-tratamento com AETC por 30 dias atenuou o aumento das variáveis relacionadas ao volume de cardiomiócitos ventriculares: área de cardiomiócitos; e volume médio de cardiomiócitos em ratos infartados de forma não dependente de dose.

O grupo ISO aumentou 165,99% ($p < 0,001$) a área de cardiomiócitos ventriculares, A[miócitos], quando comparado ao grupo SALINA. Nos grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) houve redução de 24,79%, 25,45%, 20,17%, 18,51% e 39,07% ($p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo ISO. Figura 20a.

No volume médio de cardiomiócitos ventriculares, Vm[miócitos], o grupo ISO aumentou 166,12% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SALINA. Nos grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) houve redução de 24,84%, 25,46%, 19,17%, 18,52% e 39,10% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao grupo ISO. Figura 20b.

Figura 20 – Efeito de AETC sobre variáveis relacionadas ao volume de cardiomiócitos.



Resultados expressos em média \pm EPM, ($n=5$). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, a'' $p < 0,001$ vs. SALINA; b'' $p < 0,001$ vs. ISO; c'' $p < 0,001$ vs. AETC 10 mg/Kg; d'' $p < 0,001$ vs. AETC 20 mg/Kg; e'' $p < 0,001$ vs. AETC 50 mg/Kg; f'' $p < 0,01$ vs. AETC 100 mg/Kg. / (até). a) A (área de cardiomiócitos); b) Vm (volume médio de cardiomiócitos). Fonte: AUTORA, 2017.

6.2 Vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor de AETC

6.2.1 Estudos farmacológicos com AETC *in vivo*

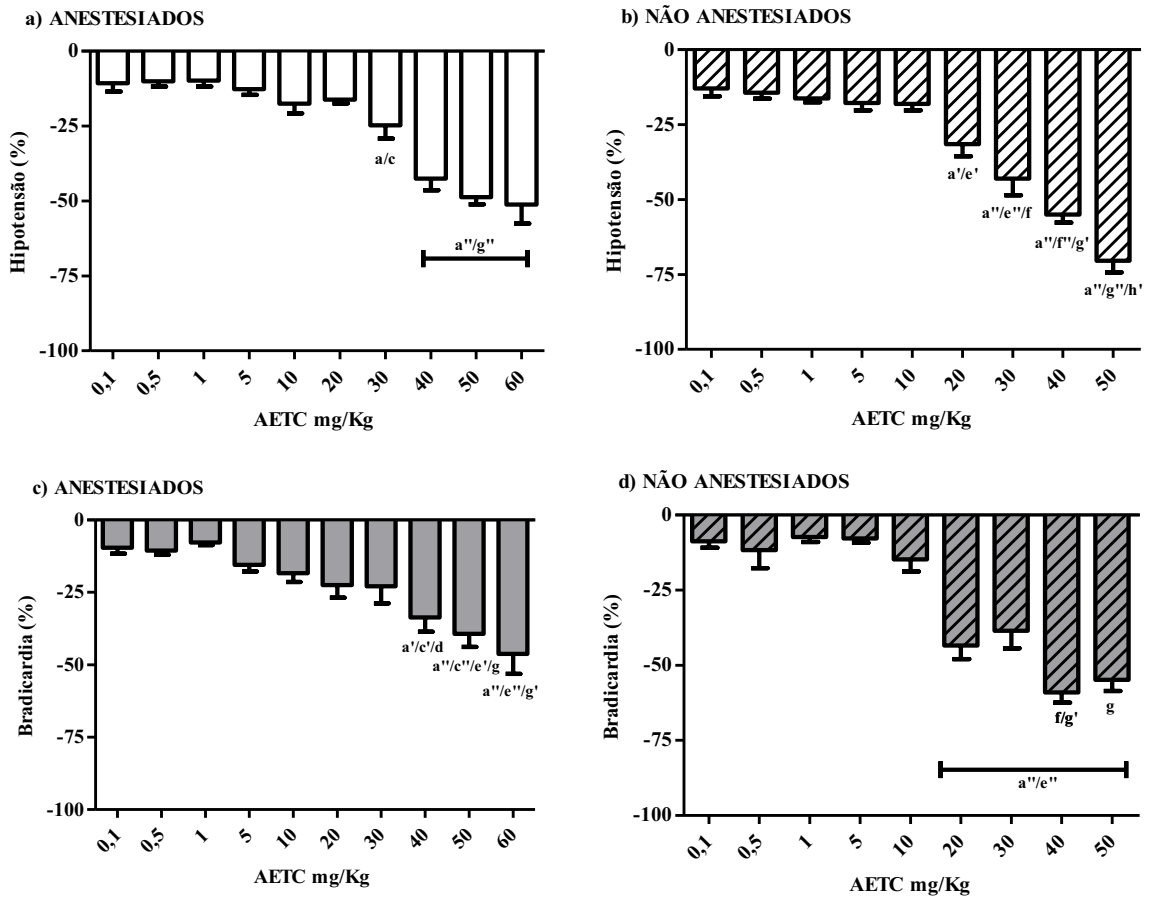
6.2.1.1 Efeito de AETC sobre a PAM e a FC de ratos Wistar

Em ratos anestesiados, os valores basais de PAM e FC foram $133,06 \pm 5,59$ mmHg e $371,68 \pm 24,40$ bpm. A administração de AETC (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50 e 60 mg/Kg, i.v.) induziu uma resposta não dependente de dose e caracterizada por hipotensão significativa ($-10,06 \pm 2,75$; $-10,01 \pm 1,76$; $-9,8 \pm 1,98$; $-12,61 \pm 1,89$; $-17,58 \pm 3,21$; $-16,11 \pm 1,36$; $-24,69 \pm 4,5$; $-42,51 \pm 3,85$; $-48,73 \pm 2,43$ e $-51,22 \pm 6,29$ %), Figura 21a, e bradicardia significativa ($-9,61 \pm 2,03$; $-10,59 \pm 1,42$; $-7,76 \pm 0,96$; $-15,57 \pm 2,19$; $-18,37 \pm 3,13$; $-22,45 \pm 4,43$; $-22,84 \pm 5,94$; $-33,65 \pm 4,98$; $-39,27 \pm 4,61$ e $-46,23 \pm 6,98$ %), Figura 21c.

Em ratos não anestesiados, os valores basais de PAM e FC foram $133,43 \pm 2,96$ mmHg e $417,80 \pm 13,86$ bpm. A administração de AETC (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 mg/Kg, i.v.) induziu uma resposta dependente de dose (após a dose de 10 mg/Kg) e caracterizada por hipotensão significativa ($-12,91 \pm 2,66$; $-14,25 \pm 2,02$; $-16,17 \pm 1,39$; $-17,71 \pm 2,5$; $-18,04 \pm 2,15$; $-31,19 \pm 7,72$; $-43,20 \pm 7,5$; $-55,02 \pm 6,43$ e $-70,36 \pm 3,97$ %), Figura 21b, e bradicardia significativa ($-8,83 \pm 2,03$; $-11,71 \pm 5,98$; $-7,31 \pm 1,64$; $-7,8 \pm 1,45$; $-14,75 \pm 4,03$; $-42,48 \pm 14,49$; $-39,19 \pm 11,83$; $-59,46 \pm 9,67$ e $-54,75 \pm 3,76$ %), Figura 21d.

A determinação da DE_{50} (dose que promove 50% do efeito) foi calculada utilizando os resultados da curva dose-resposta de PAM em animais anestesiados. Sendo assim, a DE_{50} de AETC é de 24,45 mg/Kg.

Figura 21 – Efeito hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos Wistar.

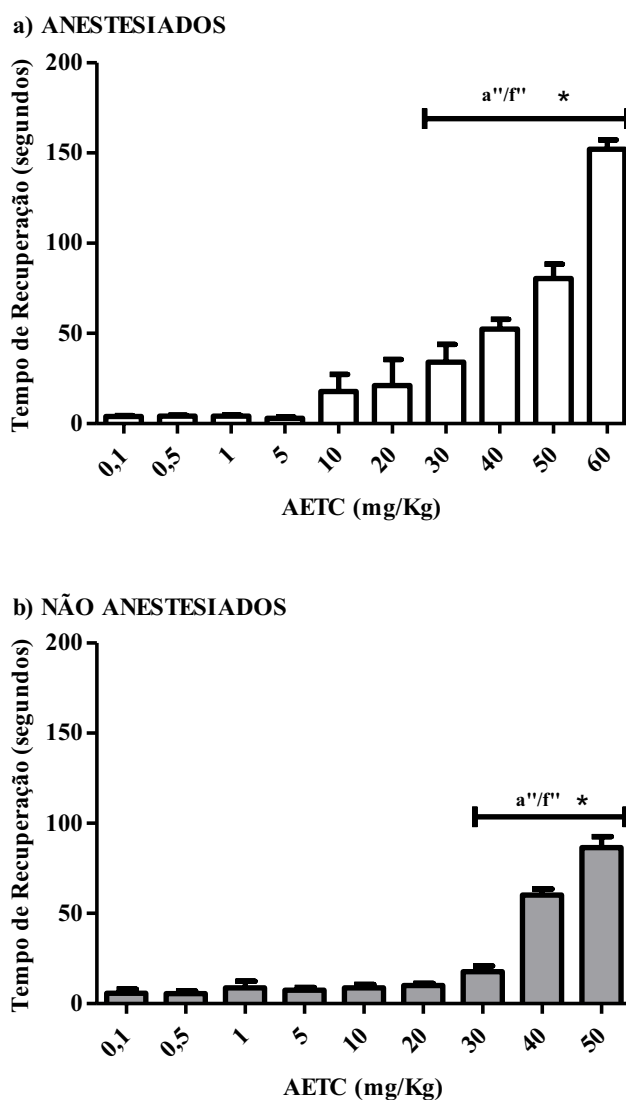


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, a'' $p < 0,001$ a' $p < 0,01$ a $p < 0,05$ vs. 0,1 mg/Kg; b'' $p < 0,001$ b' $p < 0,01$ b $p < 0,05$ vs. 0,5 mg/Kg; c'' $p < 0,001$ c' $p < 0,01$ c $p < 0,05$ vs. 1 mg/Kg; d'' $p < 0,001$ d' $p < 0,01$ d $p < 0,05$ vs. 5 mg/Kg; e'' $p < 0,001$ e' $p < 0,01$ e $p < 0,05$ vs. 10 mg/Kg; f'' $p < 0,001$ f' $p < 0,01$ f $p < 0,05$ vs. 20 mg/Kg; g'' $p < 0,001$ g' $p < 0,01$ g $p < 0,05$ vs. 30 mg/Kg; h'' $p < 0,01$ vs. 40 mg/Kg. [/ (até)]. Fonte: AUTORA, 2017.

Em animais anestesiados tempo de recuperação após cada dose de AETC foi superior ($p < 0,001$) e dose dependente nas doses 30; 40; 50 e 60 mg/Kg ($p < 0,001$), Figura 22a. Enquanto, em animais não anestesiados o tempo de recuperação após cada dose de AETC foi superior ($p < 0,001$) e dose dependente nas doses 30; 40 e 50 mg/Kg ($p < 0,001$), Figura 22b.

A avaliação do registro original, mostra ainda que ratos anestesiados levaram cerca de $534,71 \pm 9,33$ segundos para a morte após administrada a última dose (60 mg/Kg), enquanto, ratos não anestesiados levaram cerca de $2464,46 \pm 56,82$ segundos ($p < 0,001$) para a morte após administrada a última dose (50 mg/Kg).

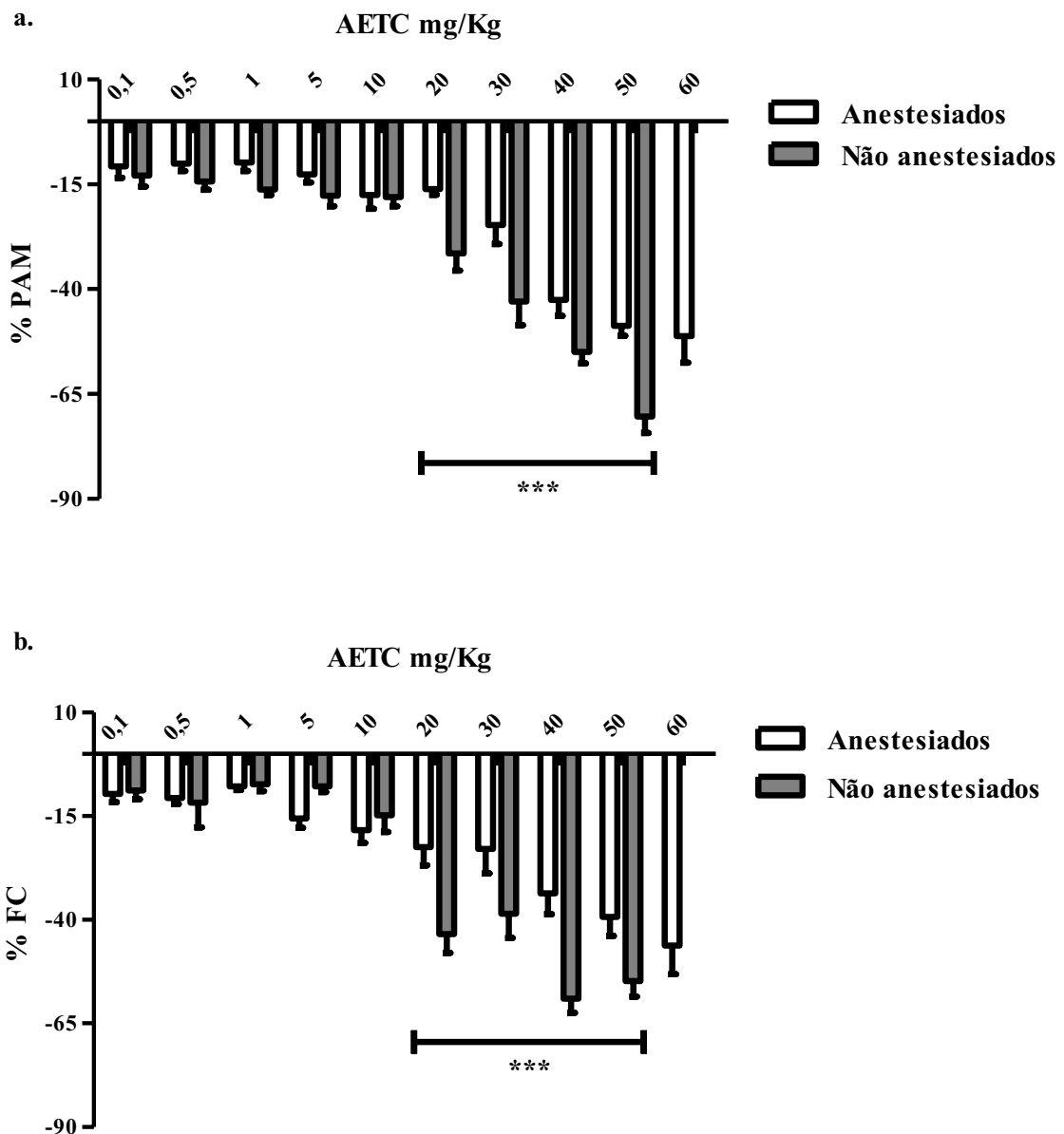
Figura 22 – Tempo de recuperação após doses de AETC *in vivo* em ratos Wistar.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, a'' $p < 0,001$ vs. 0,1 mg/Kg; b'' $p < 0,001$ vs. 0,5 mg/Kg; c'' $p < 0,001$ vs. 1 mg/Kg; d'' $p < 0,001$ vs. 5 mg/Kg; e'' $p < 0,001$ vs. 10 mg/Kg; f'' $p < 0,001$ vs. 20 mg/Kg. [/ (até)]. * Dose-dependente. Fonte: AUTORA, 2017.

Ao comparar os efeitos hipotensor e bradicárdico, ratos não anestesiados apresentaram efeitos hipotensor e bradicárdico superiores ($p < 0,001$) a partir da dose 20 mg/Kg e necessitaram de um tempo de recuperação inferior ($p < 0,001$) a partir da dose 30 mg/Kg, quando comparados a ratos anestesiados Figura 23.

Figura 23 – Comparação do efeito hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos anestesiados e não anestesiados.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise por Teste t não pareado. Onde, *** $p < 0,001$ vs. não anestesiados. Fonte: AUTORA, 2017.

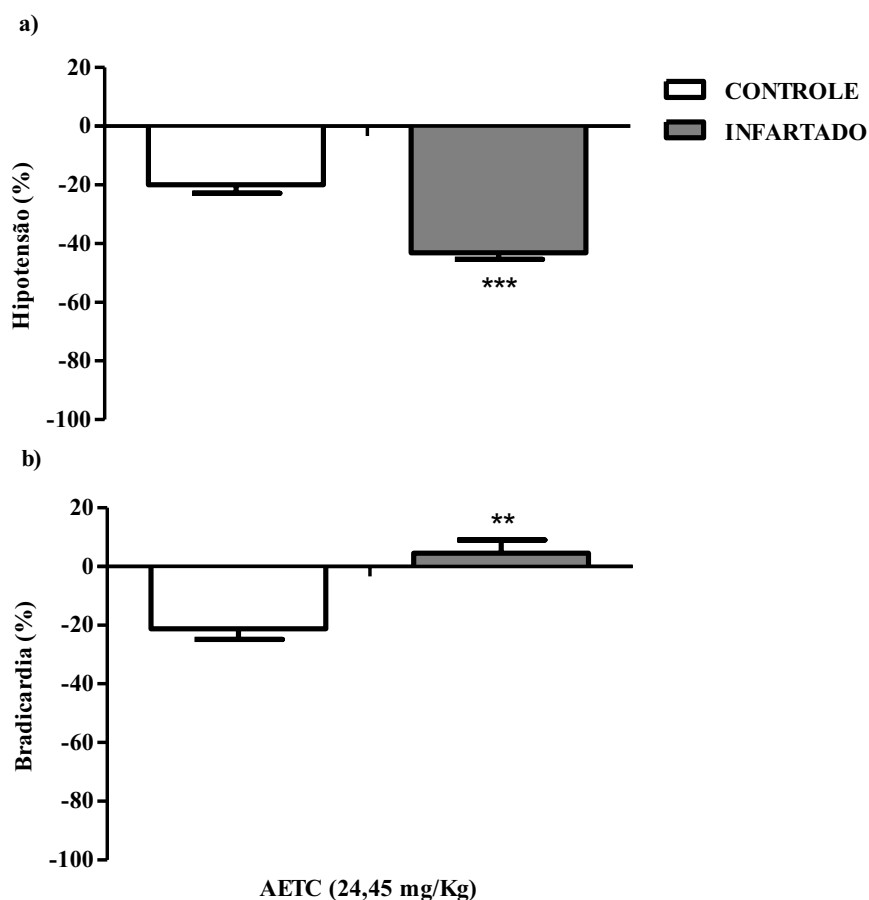
6.2.1.2 Efeito agudo de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados

Em ratos infartados, os valores basais de PAM e FC foram $120,02 \pm 0,98$ mmHg e $358,73 \pm 18,17$ bpm. A administração de AETC (24,45 mg/Kg, i.v.) promoveu ($p < 0,001$) hipotensão $-43,19 \pm 8,23$ % e taquicardia $+4,5 \pm 4,57$ %.

Em ratos controle, os valores basais de PAM e FC foram $133,06 \pm 5,59$ mmHg e $371,68 \pm 24,40$ bpm. A administração de AETC (24,45 mg/Kg, i.v.) promoveu ($p < 0,001$) hipotensão $-20 \pm 8,23$ % e ($p < 0,001$) bradicardia $-21,24 \pm 3,64$ %.

Ratos infartados apresentaram uma potencialização da hipotensão ($p < 0,001$), Figura 24a, e reversão da bradicardia ($p < 0,01$), Figura 24b, quando comparados a ratos controle não infartados.

Figura 24 – Efeito agudo hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos infartados.



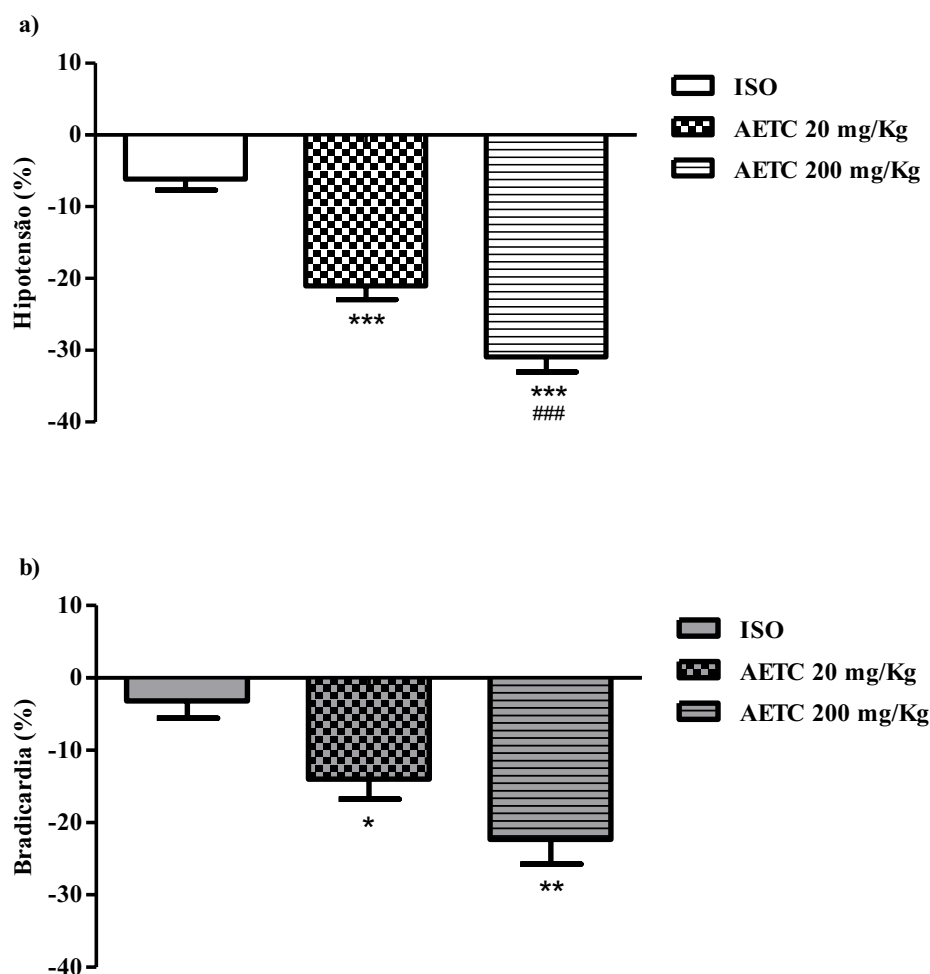
Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise por Teste t Student não pareado. Onde, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs. Controle. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.1.3 Efeito crônico de AETC sobre a PAM e a FC de ratos infartados

Em ratos controle tratados com salina, os valores basais de PAM e FC foram $130,33 \pm 0,91$ mmHg e $346,81 \pm 14,24$ bpm. Em ratos infartados tratados com salina, grupo ISO, os valores basais de PAM e FC foram $122,37 \pm 2,77$ mmHg e $334,11 \pm 6,54$ bpm. A indução do infarto promoveu diminuição $-6,15 \pm 1,52$ % da PAM e diminuição $-3,2 \pm 2,36$ % da FC não significantes.

Ratos infartados após tratamento crônico com AETC (20 e 200 mg/Kg, v.o.) apresentaram hipotensão ($-21,01 \pm 1,94$ % e $-30,94 \pm 2,08$ % $p < 0,001$), Figura 25a, e bradicardia ($-13,99 \pm 2,79$ % $p < 0,05$ e $-22,33 \pm 3,39$ % $p < 0,01$), Figura 25b, quando comparados ao grupo ISO.

Figura 25 – Efeito crônico hipotensor e bradicárdico de AETC em ratos infartados.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ vs. ISO; ### $p < 0,001$ vs. AETC 20 mg/Kg. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.1.4 Efeito de bloqueadores sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por AETC em ratos

A administração de atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos, não produziu alterações na PAM ($115,35 \pm 2,31$ para $114,93 \pm 2,29$ mmHg) e na FC ($315,35 \pm 5,32$ para $314,79 \pm 5,68$ bpm).

A hipotensão $-20 \pm 8,23$ % promovida por AETC (24,45 mg/Kg, i.v.) foi atenuada na presença de atropina $-9,53 \pm 1,09$ % ($p < 0,01$), Figura 26a. A bradicardia $-21,24 \pm 3,64$ % induzida por AETC na mesma dose, foi abolida na presença de atropina $-0,09 \pm 3,27$ % ($p < 0,01$), Figura 26b.

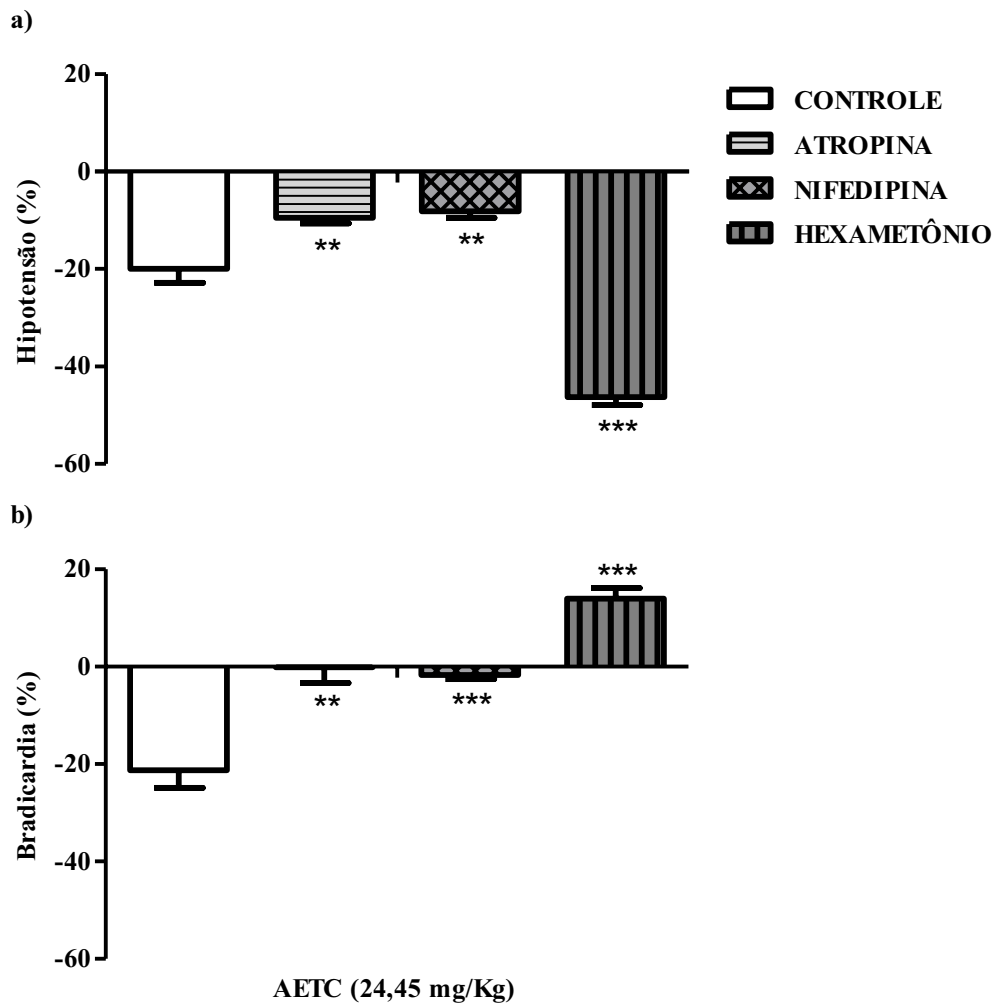
A administração de nifedipina (1,5 mg/kg, i.v.), um bloqueador de canais de cálcio sensíveis à voltagem, produziu uma redução significativa e sustentada na PAM ($114,56 \pm 5,05$ para $85,47 \pm 4,82$ mmHg, $p < 0,01$). Não houve alteração significativa na FC ($307,66 \pm 7,94$ para $290,13 \pm 7,51$ bpm).

A hipotensão e a bradicardia promovidas por AETC foram atenuadas na presença de nifedipina $-8,18 \pm 1,32$ % ($p < 0,01$), Figura 26a e $-1,68 \pm 0,91$ % ($p < 0,001$), Figura 26b, respectivamente.

A administração de hexametônio (20 mg/kg, i.v.), um bloqueador ganglionar, produziu uma redução significativa e sustentada na PAM ($129,47 \pm 3,71$ para $115,54 \pm 2,6$ mmHg, $p < 0,05$) e na FC ($338,08 \pm 5,98$ para $282,18 \pm 4,38$ bpm, $p < 0,001$).

A hipotensão promovida por AETC foi potencializada na presença de hexametônio $-46,31 \pm 1,62$ % ($p < 0,001$), Figura 26a. A bradicardia induzida por AETC foi abolida e revertida em taquicardia na presença de hexametônio $+13,98 \pm 2,21$ % ($p < 0,001$), Figura 26b.

Figura 26 – Efeito de bloqueadores sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por AETC em ratos.



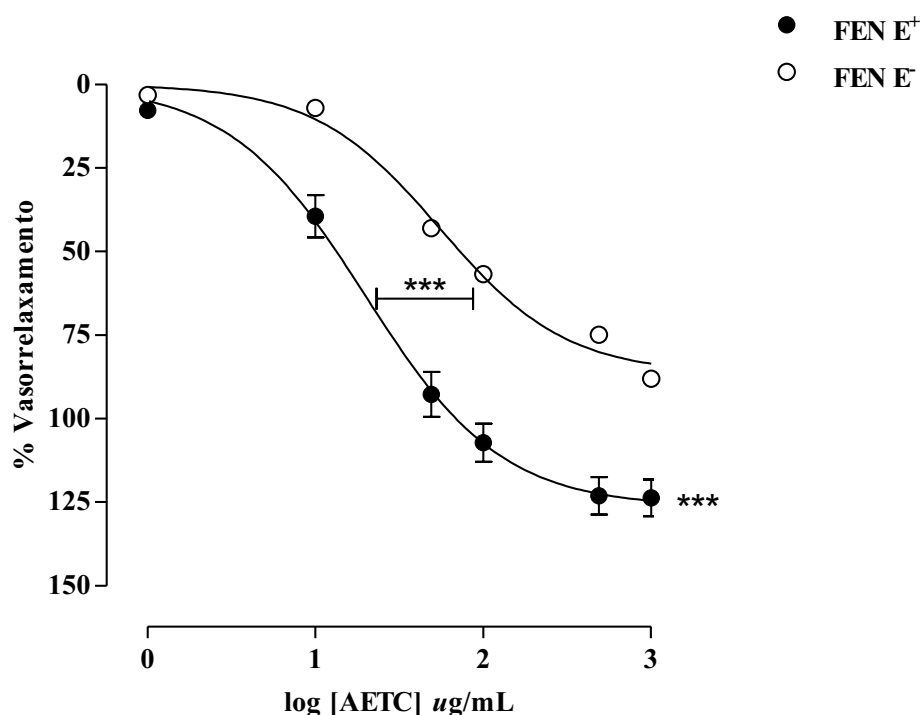
Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise por Teste t Student não pareado. Onde, ***p<0,001 e **p<0,01 vs. Controle. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.2 Estudos farmacológicos com AETC *in vitro*

6.2.2.1 Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de ratos Wistar

AETC (10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) relaxou os anéis pré-contraídos com 10 μM de FEN, um acoplamento farmacomecânico, de maneira dependente de concentração, tanto na presença ($\text{pD}_2 = 1,29 \pm 0,061 \mu\text{g/mL}$) como na ausência ($\text{pD}_2 = 1,774 \pm 0,035 \mu\text{g/mL}$) do endotélio funcional, apresentando E_{max} de $123,79 \pm 5,48 \%$ para anéis com endotélio e E_{max} de $88,11 \pm 1,36 \%$ para anéis sem endotélio, Figura 27. Analisando os valores de pD_2 e do E_{max} de AETC, percebe-se que o relaxamento foi significativamente deslocado para a direita com redução do efeito máximo na ausência do endotélio ($p < 0,001$).

Figura 27 – Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio isolada de ratos Wistar.

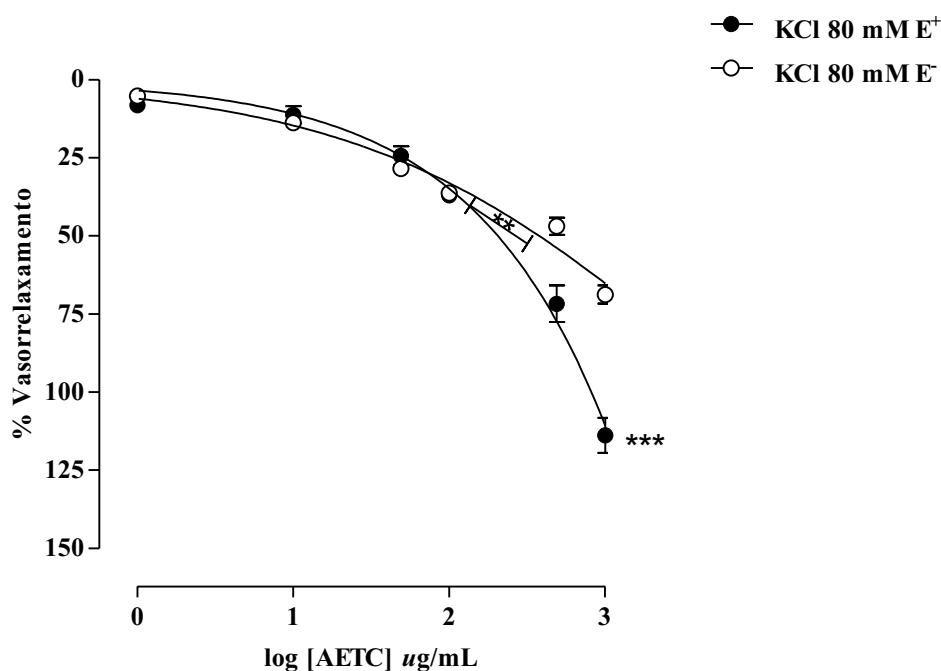


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, *** $p < 0,001$ vs. sem endotélio. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.2.2 Efeito de KCl 80 mM sobre a resposta relaxante induzida por AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de ratos Wistar

AETC (10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) relaxou os anéis pré-contraídos com KCl 80 mM, um acoplamento eletromecânico, de maneira dependente de concentração, tanto na presença ($pD_2 = 2,307 \pm 0,053 \mu\text{g/mL}$) como na ausência ($pD_2 = 1,949 \pm 0,052 \mu\text{g/mL}$) do endotélio funcional, apresentando E_{max} de $113,88 \pm 5,61 \%$ para anéis com endotélio e E_{max} de $68,81 \pm 2,92 \%$ para anéis sem endotélio, Figura 28. Analisando os valores de pD_2 e do E_{max} de AETC, percebe-se que o relaxamento foi significativamente deslocado para a direita com redução do efeito máximo na ausência do endotélio ($p < 0,01$).

Figura 28 – Efeito de KCl 80 mM sobre a resposta relaxante induzida por AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de ratos Wistar.

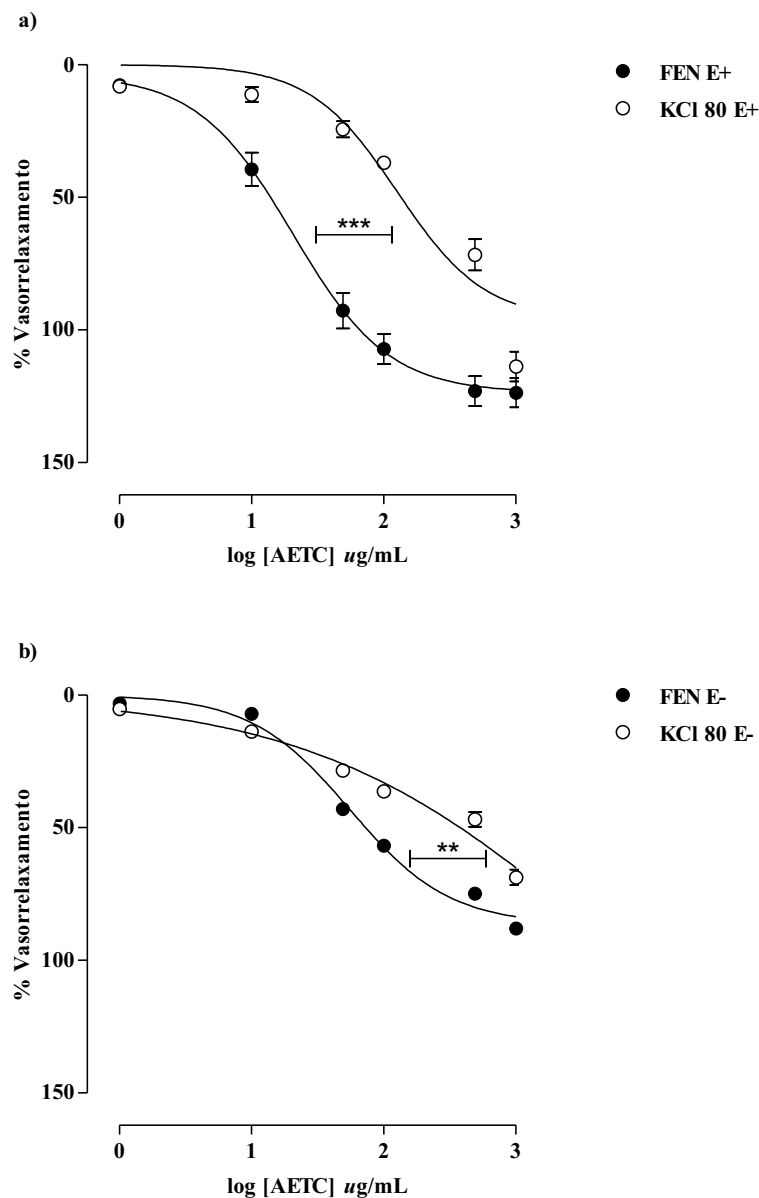


Resultados expressos em média \pm EPM, ($n=5$). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ vs. sem endotélio. Fonte: AUTORA, 2017.

O relaxamento promovido por AETC em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na presença do endotélio funcional ($pD_2 = 1,29 \pm 0,061 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 123,79 \pm 5,48 \%$, respectivamente) foi significativamente ($p < 0,001$) alterado na presença de KCl 80mM ($pD_2 = 2,307 \pm 0,053 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 113,88 \pm 5,61 \%$), Figura 29a.

Na ausência de endotélio funcional ($pD_2 = 1,774 \pm 0,035 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 88,11 \pm 1,36 \%$) foi significativamente ($p < 0,01$) alterado na presença de KCl 80mM ($pD_2 = 1,949 \pm 0,052 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 68,81 \pm 2,92\%$), Figura 29b.

Figura 29 – Comparação entre os efeitos de AETC em anéis pré-contraídos com FEN e KCl 80 com e sem endotélio funcional.

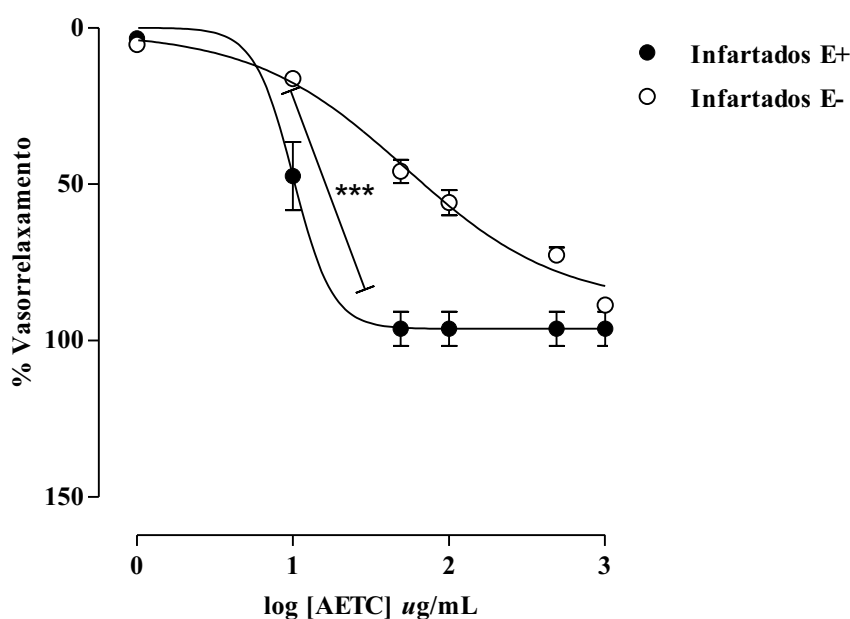


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. FEN. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.2.3 Efeito de AETC em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio funcional isolada de ratos infartados

AETC (10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) relaxou os anéis pré-contraídos com 10 μM de FEN, de maneira dependente de concentração, tanto na presença ($\text{pD}_2 = 1,004 \pm 0,025 \mu\text{g/mL}$) como na ausência ($\text{pD}_2 = 1,725 \pm 0,041 \mu\text{g/mL}$) do endotélio funcional, apresentando $E_{\text{max}} = 96,29 \pm 5,45 \%$ para anéis com endotélio e $E_{\text{max}} = 88,67 \pm 1,89 \%$ para anéis sem endotélio, Figura 30. Analisando os valores de pD_2 e do E_{max} de AETC, percebe-se que o relaxamento foi significativamente deslocado para a direita sem redução do efeito máximo na ausência do endotélio ($p < 0,001$).

Figura 30 – Efeito de AETC em anéis com e sem endotélio funcional de artéria mesentérica de ratos infartados.

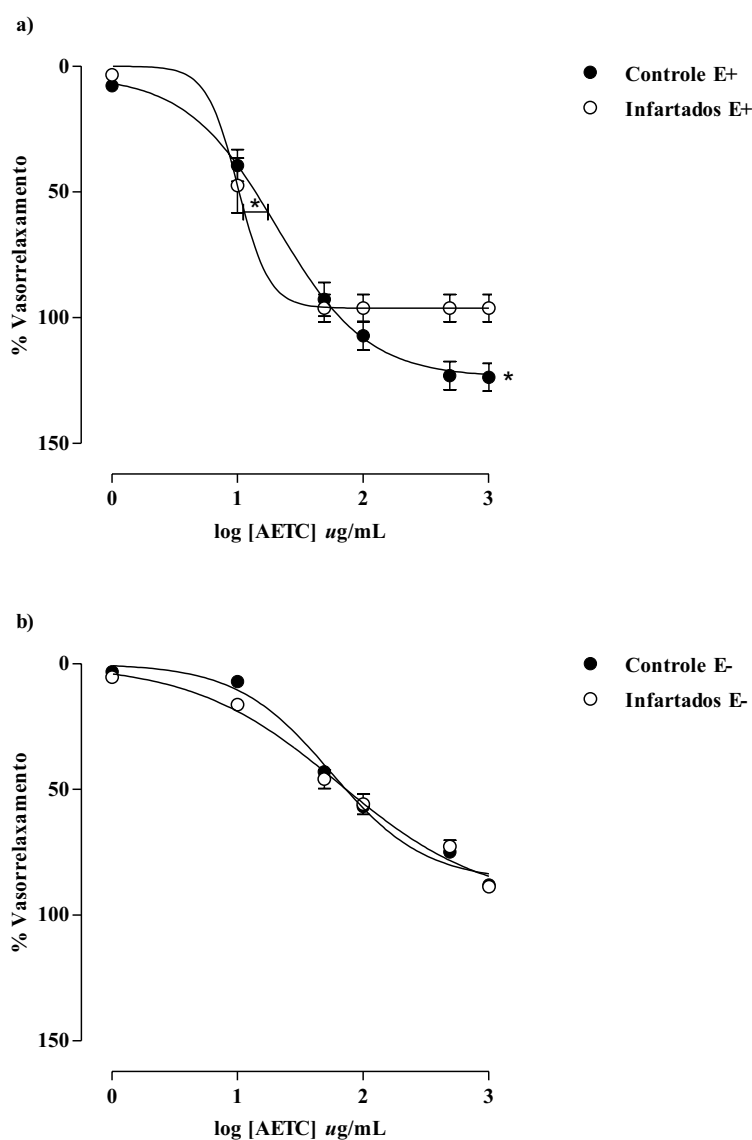


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Onde, *** $p < 0,001$ vs. Infartado sem endotélio. Fonte: AUTORA, 2017.

O relaxamento promovido por AETC em anéis mesentéricos de ratos não infartados na **presença** do endotélio funcional ($pD_2 = 1,31 \pm 0,046 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 123,79 \pm 5,48 \%$, respectivamente) foi significativamente ($p < 0,001$) superior a de ratos infartados ($pD_2 = 1,004 \pm 0,025 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 96,29 \pm 5,45 \%$), Figura 31a.

O relaxamento promovido por AETC em anéis mesentéricos de ratos não infartados na **ausência** do endotélio funcional ($pD_2 = 1,74 \pm 0,035 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 88,11 \pm 1,36 \%$) não foi significativamente alterado quando comparado ao de ratos infartados ($pD_2 = 1,81 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 88,67 \pm 1,89 \%$), Figura 31b.

Figura 31 – Efeito de AETC em anéis com e sem endotélio funcional de artéria mesentérica de ratos infartados e não infartados.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise por Teste t não pareado. Onde, * $p < 0,05$ vs. controle.
Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3 Efeito de AETC sobre ensaios antioxidantes *in vitro*

6.2.3.1 Quantificação de compostos fenólicos em AETC através de teste de Folin-Ciocalteu

O conteúdo de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g/mL}$) em AETC foi determinado utilizando regressão da equação da curva de calibração, dados apresentados na Tabela 3, e expresso em equivalentes de ácido gálico 94,3 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes de quercetina 84,5 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes de ácido caféico 70,3 $\mu\text{g/mL}$ e equivalentes de Trolox 218,3 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3 – Determinação da concentração total de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu de AETC.

Compostos	FOLIN – CIOCALTEAU				
	Faixa Linear, mg L^{-1}	Nº de pontos	Curva analítica $A_{770\text{nm}} = a C_{\text{FT}} + b$	r	C_{FT} , $\mu\text{g mL}^{-1}$
Ác. Cafeico	0,5 – 15,0	8	$A_{770\text{nm}} = 0,039 (\pm 0,001) C_{\text{FT}} + 0,0039 (\pm 0,002)$	0,9998	70,3
Quercetina	0,5 – 30,0	10	$A_{770\text{nm}} = 0,029 (\pm 0,001) C_{\text{FT}} + 0,033 (\pm 0,01)$	0,9982	84,5
Ác. Gálico	0,5 – 20,0	8	$A_{770\text{nm}} = 0,028 (\pm 0,002) C_{\text{FT}} + 0,014 (\pm 0,003)$	0,9999	94,3
Trolox	0,2 – 40,0	8	$A_{770\text{nm}} = 0,012 (\pm 0,001) C_{\text{FT}} + 0,016 (\pm 0,004)$	0,9978	218,3

Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3.2 Efeito de AETC sobre o teste DPPH

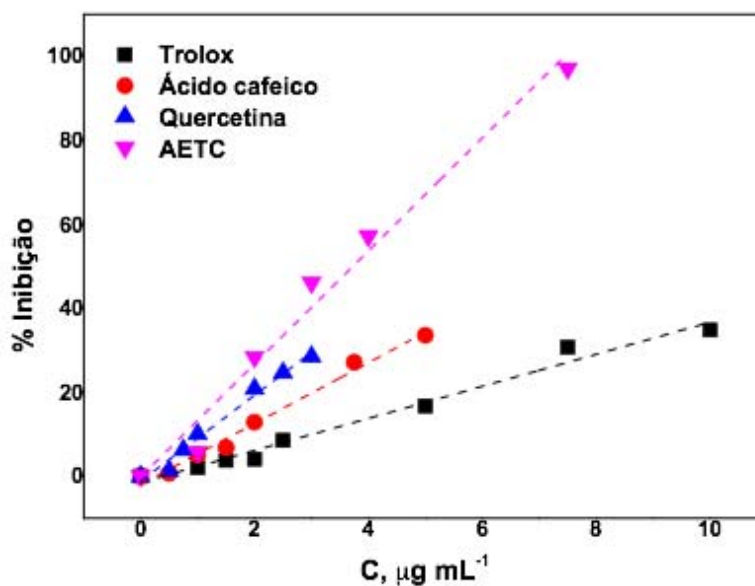
A Figura 32 e Tabela 4 ilustram a diminuição na concentração de DPPH radical devido à sua capacidade de eliminação por AETC e pelos compostos de referência. O menor valor de IC_{50} indica maior atividade seqüestradora do radical DPPH livre. Nessas condições, AETC apresentou a melhor atividade sobre o radical DPPH. A capacidade de eliminação de radicais diminuiu pela ordem seguinte: AETC > Quercertina > Ácido Caféico > Trolox.

Tabela 4 – Ensaio da capacidade de sequestro frente ao radical DPPH* (50% metanol/água, m/v) de AETC.

Compostos	DPPH* – Metanol 50% (v/v)				
	Faixa Linear, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Nº de pontos	Curva analítica $\%I = aC_{AO} + b$	r	IC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$
AETC	0,5 – 7,5	6	$\%I = 13,45 (\pm 0,92) C_{AO} - 0,15 (\pm 3,50)$	0,9907	3,7
Quercertina	0,5 – 3,0	6	$\%I = 9,81 (\pm 0,37) C_{AO} - 0,082 (\pm 0,70)$	0,9971	5,1
Ác. Cafeico	0,5 – 5,0	7	$\%I = 7,25 (\pm 0,37) C_{AO} - 1,93 (\pm 0,96)$	0,9934	7,2
Trolox	0,5 – 10,0	8	$\%I = 3,82 (\pm 0,22) C_{AO} - 1,49 (\pm 1,06)$	0,9905	13,5

Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

Figura 32 – Ensaio da capacidade de sequestro frente ao radical DPPH* (50% metanol/água, m/v) de AETC.



Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3.3 Efeito de AETC sobre o teste ABTS

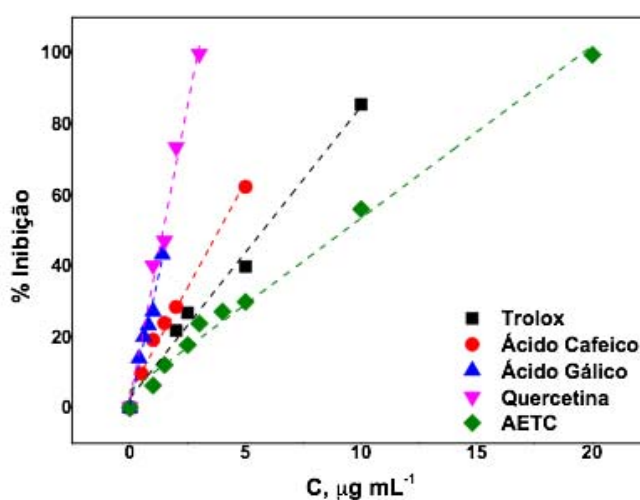
Como pode ser visto na Figura 33 e Tabela 5, AETC capta radicais ABTS de forma dependente da concentração. Valor de IC_{50} para AETC neste ensaio foi 9,3 $\mu\text{g/mL}$. Ocorreu diminuição na concentração de ABTS, devido à capacidade de eliminação em todas as concentrações de AETC. No entanto, os valores da IC_{50} dos padrões foram inferiores ao AETC. Dessa forma, a eliminação do radical ABTS por AETC e pelos padrões obedece a seguinte ordem: Quercertina > Ácido Gálico > Ácido Caféico > Trolox > AETC.

Tabela 5 – Ensaio de capacidade antioxidante frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ de AETC.

Compostos	$ABTS^{\bullet+}$				
	Faixa Linear, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Nº de pontos	Curva analítica $\%I = aC_{AO} + b$	r	IC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$
Quercertina	0,5 – 3,0	5	$\%I = 33,25 (\pm 2,30) C_{AO} + 2,20 (\pm 4,14)$	0,9929	1,4
Ác. Gálico	0,2 – 1,4	6	$\%I = 29,30 (\pm 1,88) C_{AO} + 0,74 (\pm 1,56)$	0,9918	1,7
Ác. Cafeico	0,5 – 5,0	6	$\%I = 11,94 (\pm 0,71) C_{AO} + 3,98 (\pm 1,66)$	0,9929	3,8
Trolox	0,5 – 10	5	$\%I = 8,41 (\pm 0,49) C_{AO} + 2,70 (\pm 2,54)$	0,9947	5,6
AETC	0,5 – 20,0	9	$\%I = 4,86 (\pm 0,19) C_{AO} + 4,88 (\pm 1,47)$	0,9949	9,3

Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

Figura 33 – Ensaio de capacidade antioxidante frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ de AETC.



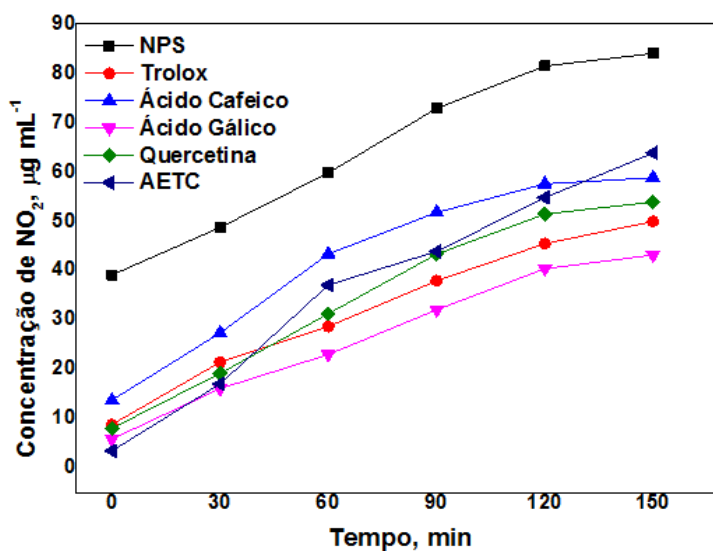
Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3.4 Efeito de AETC sobre o sequestro de óxido nítrico

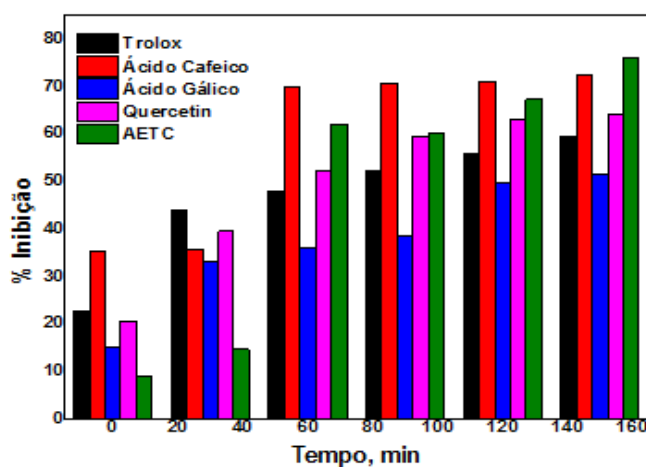
Os dados expressos na Figura 34a e 34b mostram que todas as concentrações testadas de AETC foram capazes de diminuir a formação de nitrito a partir de uma solução de NPS 5 mM, com um percentual de inibição de 75 %. Os resultados sugerem que o AETC esteja sequestrando o radical NO liberado no meio aquoso pelo nitroprussiato, impedindo com isso a formação do cromóforo detectado por espectrofotometria, através da diazotação do nitrito com sulfanilamida e posterior complexação com naftiletlenodiamino.

Figura 34 – Ensaio da capacidade de sequestro de óxido nítrico de AETC.

a.



b.

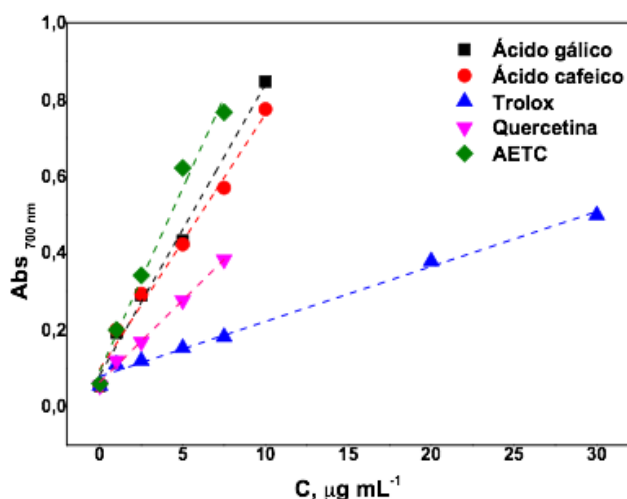


Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25°C . Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3.5 Efeito de AETC sobre a redução de ferro (III)

Ao avaliar a capacidade de redução do complexo férrico TPTZ de Fe^{3+} a Fe^{2+} , como pode ser visto na Figura 35 e na Tabela 6, AETC apresentou poderosa capacidade de reduzir Fe^{3+} . O poder redutor do AETC e dos compostos padrões aumentou de forma constante com o aumento da concentração das amostras. O poder redutor do AETC e dos compostos padrão foram como se segue: AETC > Ácido Gálico > Ácido Caféico > Quercetina > Trolox. Os resultados demonstraram que AETC tem a capacidade de reduzir espécies doadoras de elétrons, neutralizando radicais livres, assim produzindo produtos estáveis. Vale-se ressaltar que este poder redutor foi maior do que compostos antioxidantes padrão utilizados.

Figura 35 – Ensaio do poder antioxidante por redução de Ferro (FRAP) de AETC.



Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25°C . Fonte: AUTORA, 2017.

Tabela 6 – Ensaio do poder antioxidante por redução de Ferro (FRAP) de AETC.

Redução de Ferro (III)					
Compostos	Faixa Linear, mg L^{-1}	Nº de pontos	Curva analítica $A_{700\text{nm}} = aC_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + b$	r	$A_{700\text{nm}}$, ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)
Trolox	1 – 50,0	9	$A_{700\text{nm}} = 0,014 (\pm 0,003) C_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + 0,076 (\pm 0,007)$	0,9986	0,216
Quercetina	1 – 7,5	5	$A_{700\text{nm}} = 0,042 (\pm 0,001) C_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + 0,064 (\pm 0,006)$	0,9980	0,484
Ác. Cafeico	1 – 10,0	6	$A_{700\text{nm}} = 0,066 (\pm 0,004) C_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + 0,098 (\pm 0,02)$	0,9927	0,758
Ác. Gálico	1 – 10,0	6	$A_{700\text{nm}} = 0,075 (\pm 0,004) C_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + 0,083 (\pm 0,02)$	0,9956	0,833
AETC	1 – 7,5	5	$A_{700\text{nm}} = 0,095 (\pm 0,007) C_{\text{Fe}^{3+}(\text{red})} + 0,094 (\pm 0,03)$	0,9916	1,044

Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25°C . Fonte: AUTORA, 2017.

6.2.3.6 Efeito de AETC sobre a capacidade de complexação de ferro (II)

AETC apresenta efeito quelante forte em íons ferrosos (Fe^{2+}), semelhante ao EDTA. No entanto, com valor de IC_{50} bastante superior ao AETC, dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Ensaio do poder antioxidante por complexação de Fe (II).

Compostos	Capacidade de complexação de Fe (II)				
	Faixa Linear, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Nº de pontos	Curva analítica $\%I = aC_{\text{Fe}^{2+}} C_{\text{Fe}^{2+}(\text{cp})}^2 + b$	r	IC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$
EDTA	1,0 – 5,0	4	$\%I = 17,12 (\pm 0,74) C_{\text{Fe}^{2+}(\text{cp})}^2 + 5,98 (\pm 2,12)$	0,9981	2,6
AETC	2,5 – 7,5	4	$\%I = 0,052 (\pm 0,005) C_{\text{Fe}^{2+}(\text{cp})}^2 + 0,41 (\pm 0,29)$	0,9948	953,6

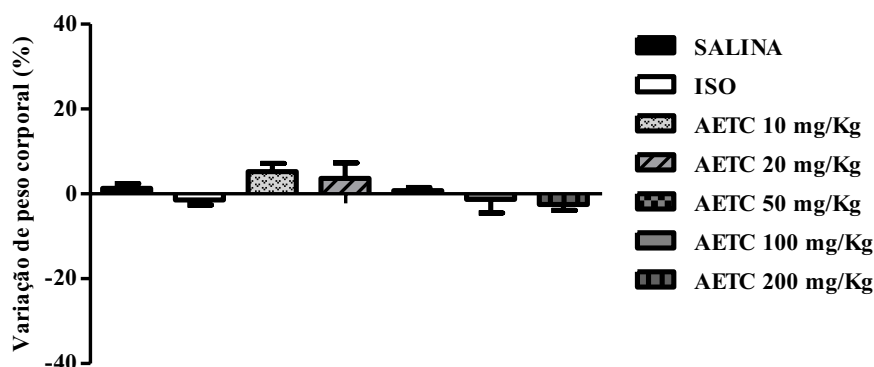
Os valores foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Incubação a 25° C. Fonte: AUTORA, 2017.

6.3 Outros parâmetros alterados por ISO após tratamento crônico com AETC

6.3.1 Efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados

A indução do infarto com ISO e o tratamento crônico com AETC não alteraram de forma significativa o peso corporal de ratos infartados, Figura 36.

Figura 36 – Efeito de AETC sobre o peso corporal de ratos infartados.

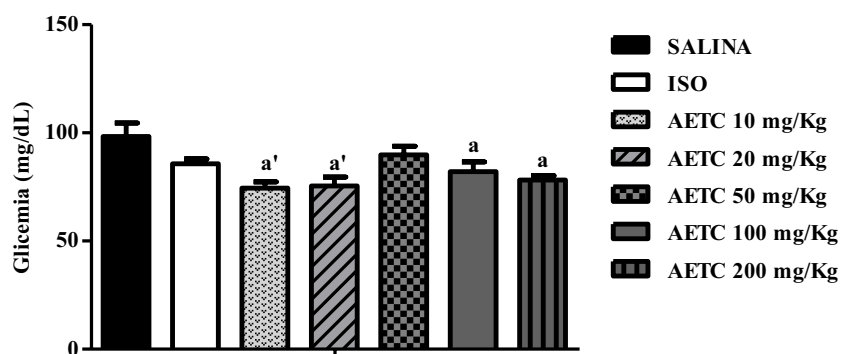


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Fonte: AUTORA, 2017.

6.3.2 Efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados

O tratamento crônico com AETC promoveu redução da glicemia $p < 0,01$ de 23,34% e 22,73% nos grupos AETC (10 e 20 mg/Kg, v.o.) e $p < 0,05$ de 16,26% e 19,09% nos grupos AETC (100 e 200 mg/Kg, v.o.) quando comparados ao grupo salina, Figura 37.

Figura 37 – Efeito de AETC sobre a glicemia de ratos infartados.



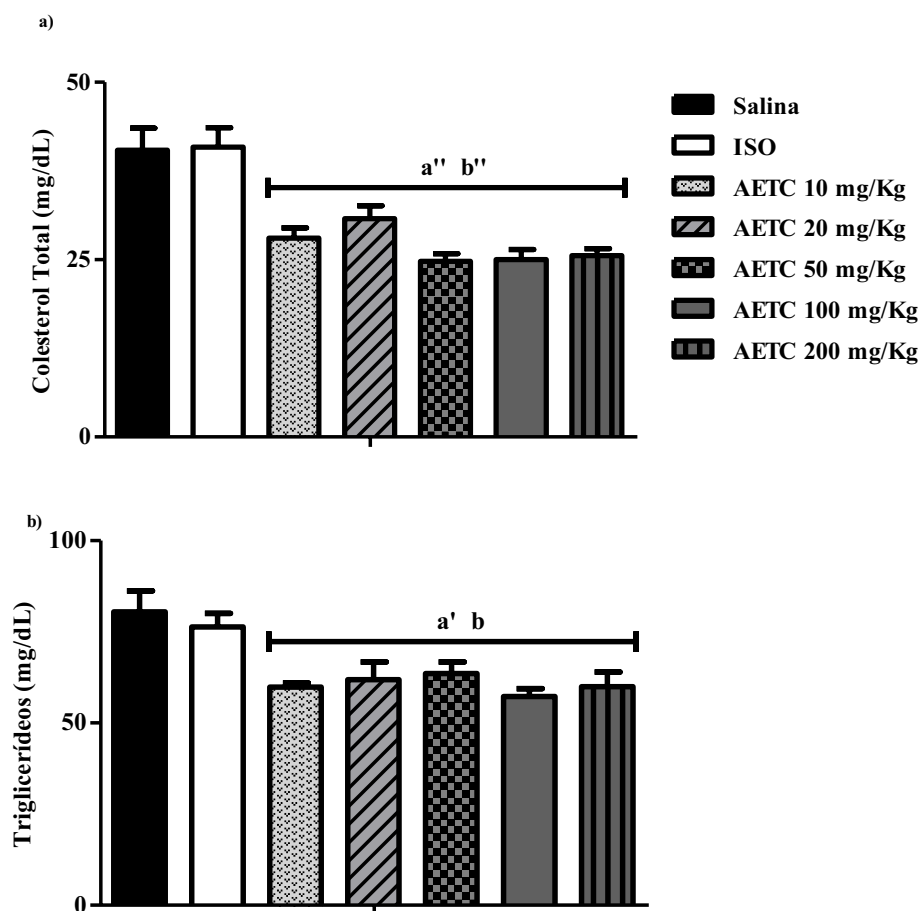
Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. ^a $p < 0,05$ ^{a'} $p < 0,01$ vs. SALINA. Fonte: AUTORA, 2017.

6.3.3 Efeito de AETC sobre lipídeos séricos de ratos infartados

O tratamento crônico com AETC promoveu redução dos níveis séricos de colesterol ($p < 0,001$) nos grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) quando comparados tanto ao grupo SALINA, como ao grupo ISO, Figura 28a.

O tratamento crônico com AETC promoveu redução dos níveis séricos de triglicerídeos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) nos grupos AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.) quando comparados tanto ao grupo SALINA e ao grupo ISO, respectivamente, Figura 38b.

Figura 38 – Efeito de AETC sobre os níveis séricos lipídicos de ratos infartados.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. $a'' p < 0,001$ $a' p < 0,01$ vs. SALINA; $b'' p < 0,001$ $b' p < 0,01$ vs. ISO. Fonte: AUTORA, 2017.

6.3.4 Efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados

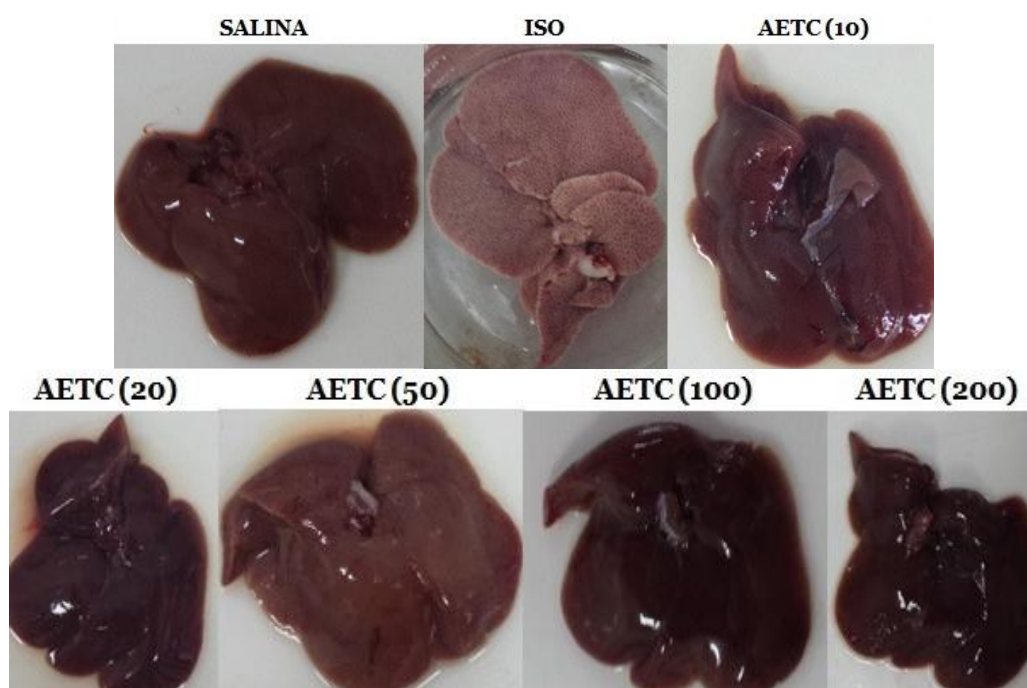
Macroscopicamente os fígados do grupo ISO apresentaram extensa e isotrópica, esteatose hepática, identificada através da coloração esbranquiçada do tecido, quando comparado ao grupo SALINA, tal alteração não foi observada nos grupos tratados com as doses de AETC, Figura 39.

O grupo ISO apresentou aumento ($p < 0,001$) de 68,53% na razão peso fígado/peso corporal quando comparado ao grupo SALINA. Os grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) apresentaram diminuição ($p < 0,001$) de 23,87%, 19,81%, 24,82%, 28,12% e 30,25% quando comparados ao grupo ISO, Figura 40a.

Não houve diferença estatística nos níveis de albumina e de TGP entre os grupos, Figura 40b e 40d, respectivamente. Os grupos tratados com AETC (10, 20 e 50 mg/Kg) apresentaram diminuição ($p < 0,05$) de 40,88%, 40,58% e 40,58% quando comparados ao grupo ISO, Figura 40c.

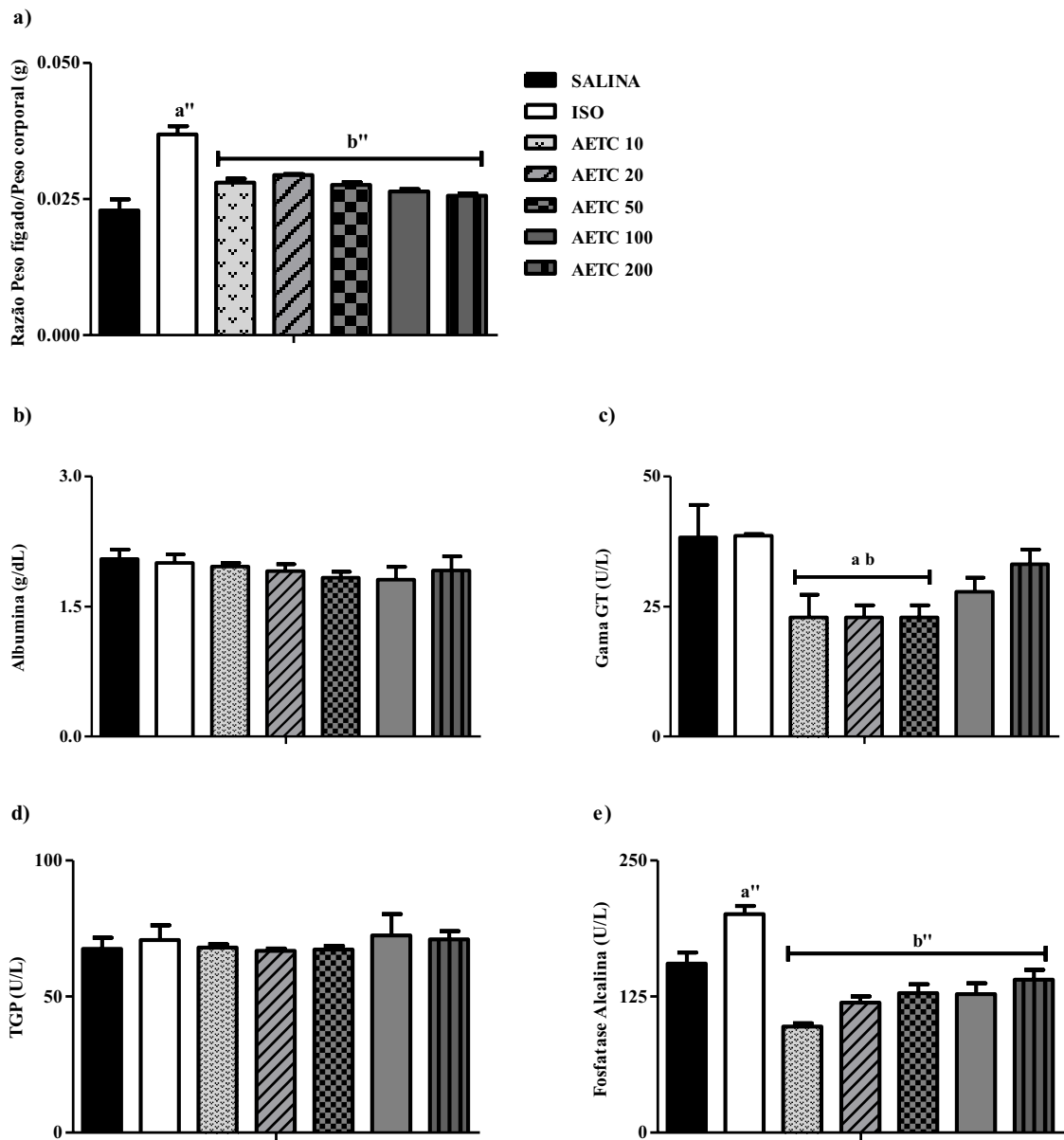
O grupo ISO apresentou aumento ($p < 0,001$) de 34,76% na fosfatase alcalina quando comparado ao grupo SALINA. Os grupos tratados com AETC (10, 20, 50, 100 e 200 mg/Kg) apresentaram diminuição ($p < 0,001$) de 53,21%, 48,78%, 38,48%, 30,08% e 32,56% quando comparados ao grupo ISO, Figura 40e.

Figura 39 – Morfometria do fígado de ratos infartados após tratamento crônico com AETC.



Áreas brancas indicam esteatose hepática. Fonte: AUTORA, 2017.

Figura 40 – Efeito de AETC sobre parâmetros hepáticos de ratos infartados.

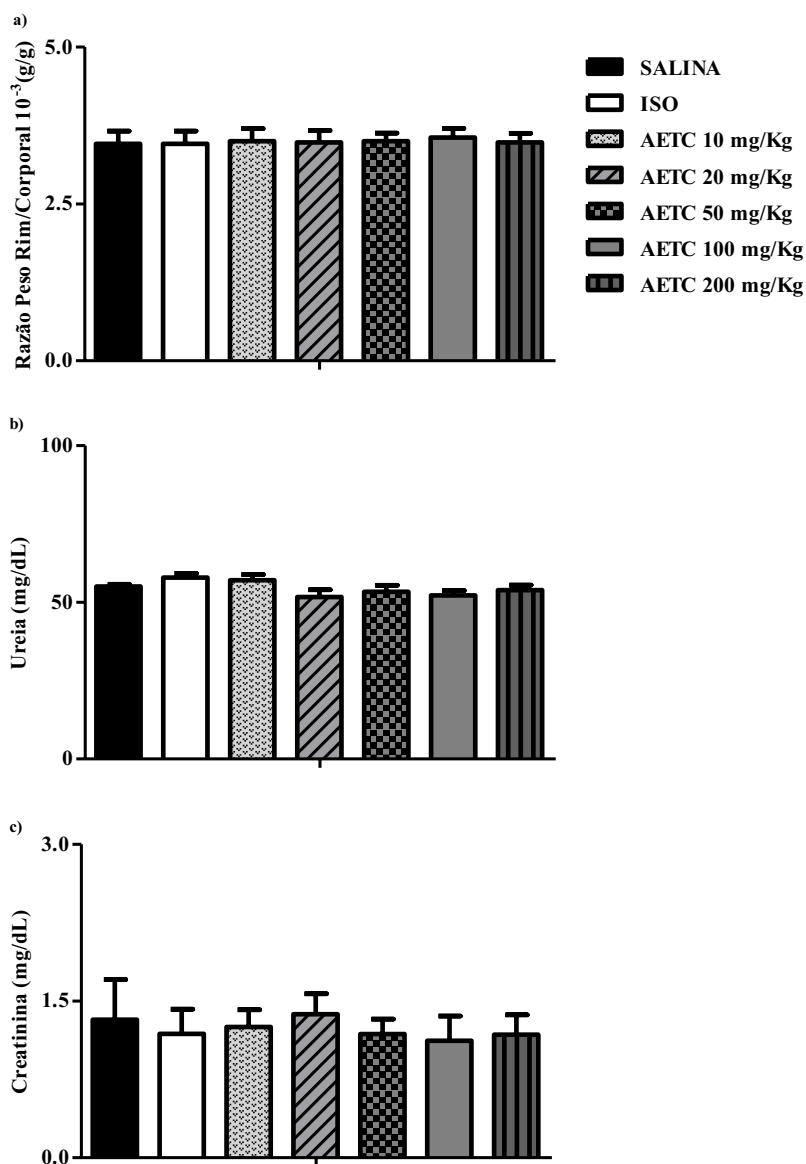


Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. ^{a''}p<0,001 ^ap<0,05 vs. SALINA. ^{b''}p<0,001 ^bp<0,05 vs. ISO. a) Razão Peso Fígado/Peso Corporal; b) Albumina; c) Gama-Glutamiltransferase; d) Fosfatase Alcalina; e) Transaminase Glutâmico Pirúvica. AUTORA, 2017.

6.3.5 Efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados

A indução do infarto com ISO e do tratamento cardioprotetor com AETC não alteraram de forma significativa os parâmetros renais razão do peso do rim esquerdo/peso corporal (Figura 41a), uréia (Figura 41b) e creatinina séricos (Figura 41c).

Figura 41 – Efeito de AETC sobre parâmetros renais de ratos infartados.



Resultados expressos em média \pm EPM, (n=5). Análise variância One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Fonte: AUTORA, 2017.

6.4 Docking molecular

Após a execução de todos os experimentos de *docking*, os resultados para as energias de afinidade ligantes/alvos foram agrupados na Tabela 8. É possível observar que os ligantes apresentam alta afinidade por alguns dos alvos analisados, pode-se destacar 4DAJ (receptor muscarínico do tipo M3), 1QQW (enzima catalase), 3NOS (enzima óxido nítrico sintase), 4DEY (canal de cálcio tipo L, sensível à voltagem) e 3NAF (canal de potássio sensível a cálcio, BkCa).

Tabela 8 – Relação entre os isômeros da Cinchonáina Ia, Ib, IIa, IIb e os alvos moleculares.

COMPOSTOS				
PDB ID	Cinchonáina Ia	Cinchonáina Ib	Cinchonáina IIa	Cinchonáina IIb
4MQS	-7.6	-6.9	-7.8	-6.9
4DAJ	-8.6	-9.2	-8.3	-11.2
1J95	-7.0	-6.9	-7.2	-6.9
3NAF	-8.0	-7.8	-9.4	-7.5
4GPO	-8.4	-7.7	-8.7	-7.2
2BE6	-6.7	-6.4	-6.4	-6.1
3NOS	-8.0	-7.9	-8.5	-10.0
4BKE	-7.3	-6.8	-8.1	-6.9
2LQC	-6.3	-5.7	-6.2	-6.0
2LQP	-6.4	-6.5	-6.7	-5.5
4DEY	-9.1	-8.0	-7.8	-8.1
2RH1	-8.4	-7.0	-8.4	-8.4
1QQW	-9.6	-7.9	-9.6	-9.3
2SOD	-7.4	-8.3	-8.1	-7.4
1GP1	-6.9	-7.2	-8.1	-7.5
1XOS	-8.7	-7.1	-7.1	-7.5

Valores estimados em kcal/mol. 4MQS (Receptor M2); 4DAJ (Receptor M3); 1J95 (Canal de Potássio KCSA); 3NAF (Canal de BkCa); 4GPO (Receptor β 1); 3NOS (Enzima Óxido Nítrico Sintase); 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); 2RH1 (Receptor β Adrenérgico tipo 2); 1QQW (Enzima Catalase); 2SOD (Enzima Superóxido Dismutase); 1GP1 (Enzima Glutaciona Peroxidase); 1XOS (Enzima fosfodiasterase 4).

Fonte: AUTORA, 2017.

Os alvos de interesse para os efeitos hipotensor, bradicárdico e vasodilatador selecionados 4DAJ, 4DEY e 3NAF foram comparados com seus respectivos padrões, dados apresentados na Tabela 9. Os resultados revelam que os isômeros da Cinchonáina apresentam afinidades maiores do que as observadas nos ligantes padrões complexados com seus respectivos alvos moleculares. Basicamente, a função desses padrões é funcionar como controle positivo para os experimentos virtuais.

Tabela 9 – Relação entre os isômeros da Cinchonáina Ia, Ib, IIa, IIb, os alvos moleculares de maior afinidade e seus principais agonistas e/ou antagonistas.

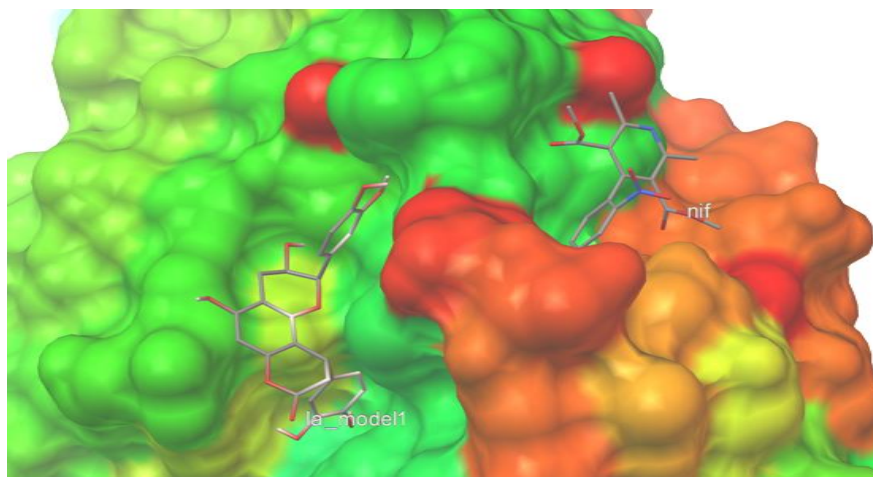
AFINIDADE COM RECEPTOR (kcal mol ⁻¹)			
PDB ID	4DAJ	4DEY	3NAF
Cinchonáina Ia	-8.6	-9.1	-8.0
Cinchonáina Ib	-9.2	-8.0	-7.8
Cinchonáina IIa	-8.3	-7.8	-9.4
Cinchonáina IIb	-11.2	-8.1	-7.5
Agonista ^a	-3.4	*	-3.5
Antagonista ^b	-5.2	-5.8	*

^a: Acetilcolina 4DAJ; Ácido araquidônico 3NAF; ^b: Atropina 4DAJ; Nifedipina 4DEY; Atenolol 4GPO; *: não analisado. Coordenadas: 4DAJ = 126; 126; 126; -10.768; 5.981; -1.427. 4DEY = 126; 126; 126; 12.364; 47.289; 21.646. 3NAF = 126; 126; 126; -45.093; 35.981; 84.81. Fonte: AUTORA, 2017.

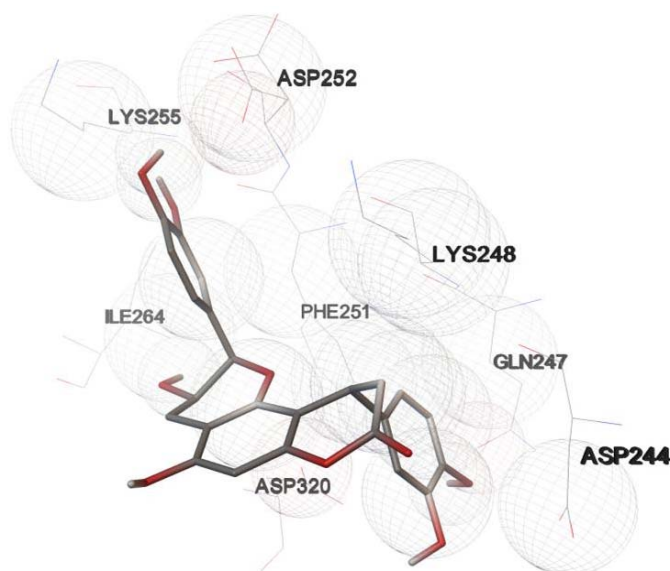
A avaliação da interação tridimensional do isômero específico com maior afinidade por seu receptor revelou a proximidade do sítio de ligação da cinchonáina Ia e da nifedipina ao canal de cálcio, sensível à voltagem, do tipo L, Figura 42a. Além disso, nas Figuras 42b e 42c, pode-se observar que os tipos de ligações químicas entre os ligantes, cinchonáina Ia e nifedipina, são especialmente interações do tipo hidrofóbicas e pontes de hidrogênio aos resíduos de aminoácidos do receptor.

Figura 42 – Canal de cálcio, sensível a voltagem, tipo L e suas interações químicas com Cinchonaína Ia e Nifedipina.

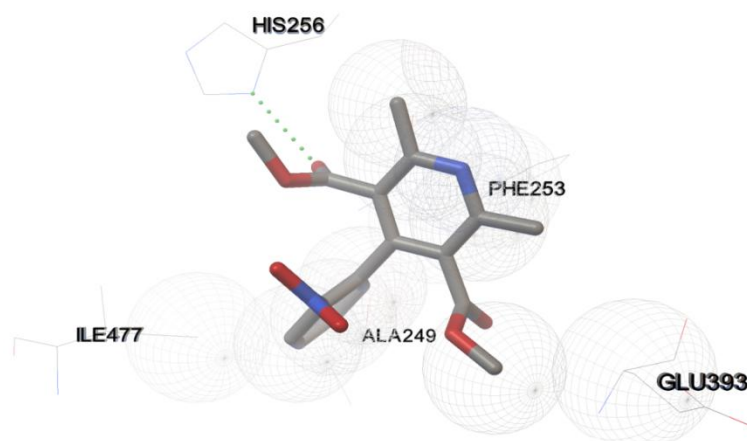
a)



b)



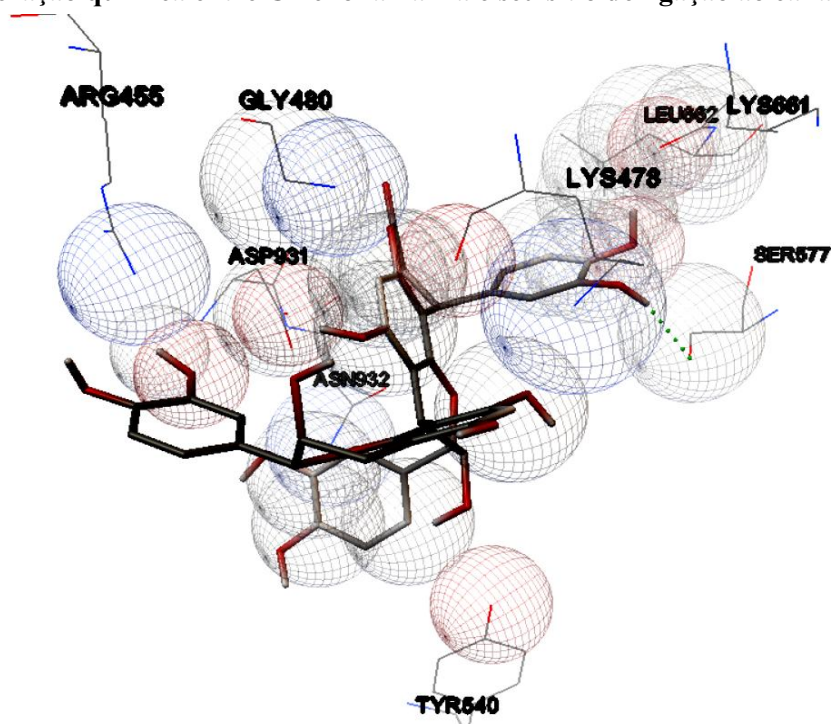
c)



Imagens tridimensionais do Cav e os sítios de ligação da cinchonaína Ia e da nifedipina (a), interação química entre cinchonaína Ia e seu sítio de ligação (b) e interação química entre nifedipina e seu sítio de ligação (c). Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio). Fonte: AUTORA, 2017.

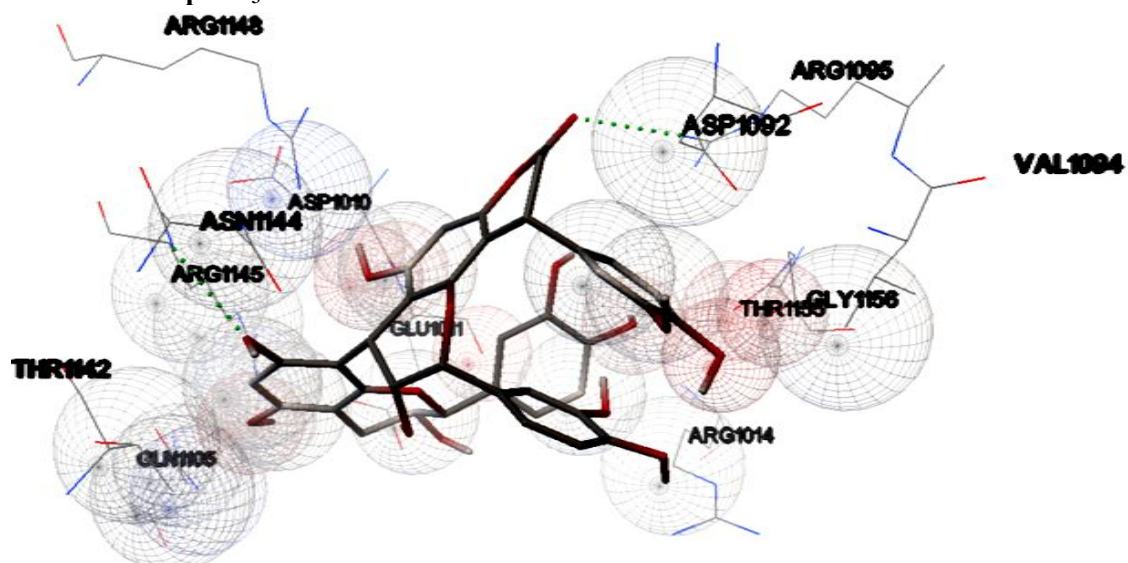
De forma semelhante as Figuras 43 e 44 apresentam os tipos de ligações químicas entre os ligantes, cinchonina IIa e cinchonina IIb, e os receptores com maior afinidade, canal BK_{Ca} e muscarínico do tipo M₃, respectivamente. Trata-se, especialmente, de interações do tipo hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre as moléculas e os resíduos de aminoácidos dos receptores.

Figura 43 – Interação química entre Cinchonina IIa e seu sítio de ligação ao canal BK_{Ca}.



Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio). Fonte: AUTORA, 2017.

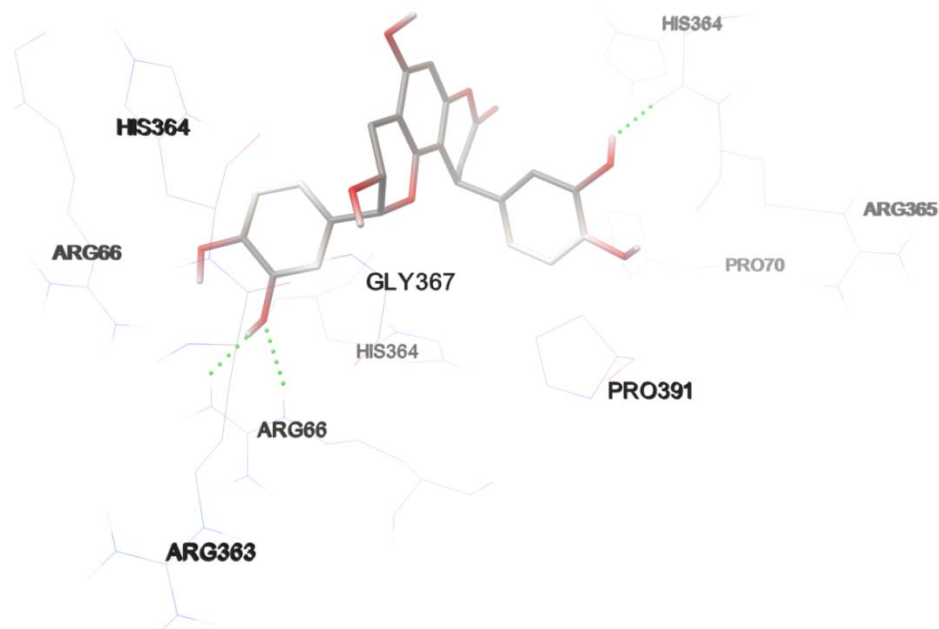
Figura 44 – Interação química entre Cinchonina IIb e seu sítio de ligação no receptor muscarínico do tipo M₃.



Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio). Fonte: AUTORA, 2017.

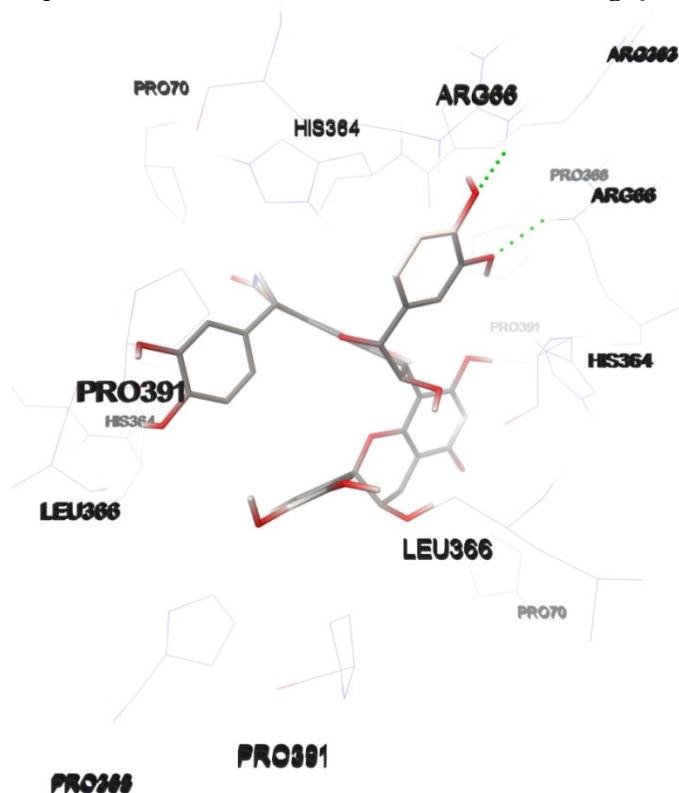
Com relação as enzimas antioxidantes, as Figuras 45 e 46 apresentam as interações químicas entre os ligantes, cinchonaína Ia e cinchonaína IIa, e a enzima catalase. Trata-se, especialmente, de ligações do tipo pontes de hidrogênio.

Figura 45 – Interação química entre Cinchonaína Ia e seu sítio de ligação na enzima catalase.



Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio). Fonte: AUTORA, 2017.

Figura 46 – Interação química entre Cinchonaína IIa e seu sítio de ligação à enzima catalase.

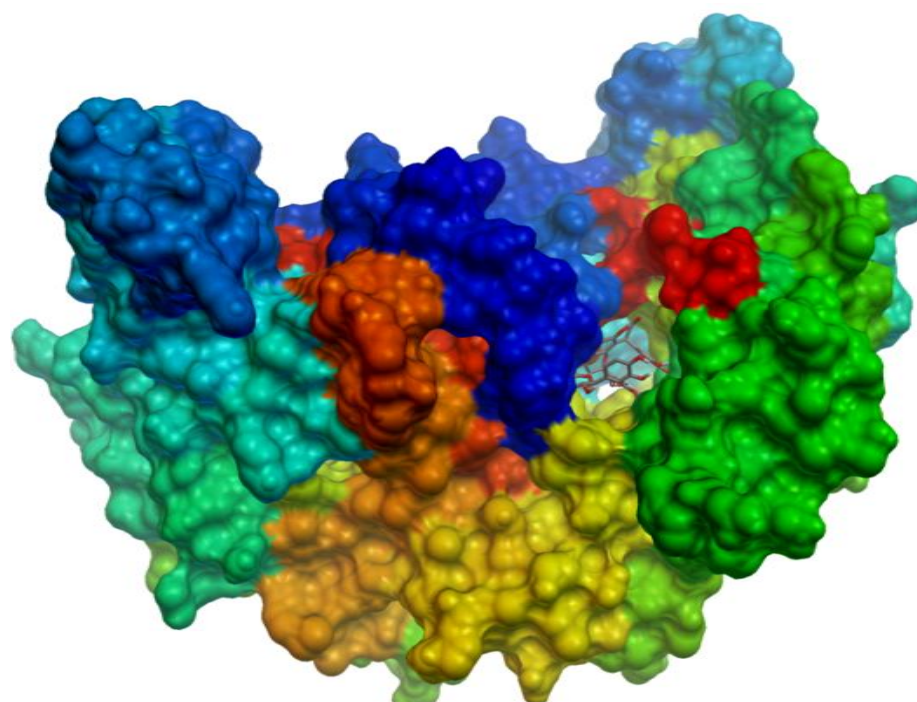


Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio). Fonte: AUTORA, 2017.

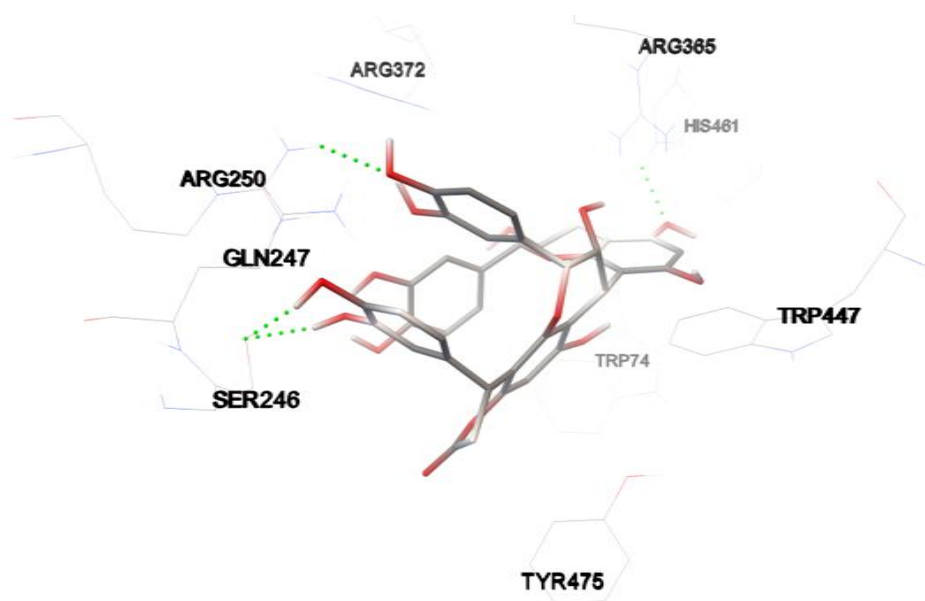
Quanto à enzima óxido nítrico sintase (NOS), a Figura 47a apresenta imagens tridimensionais da interação entre NOS e a Cinchonáina IIb, onde pode-se observar o “bolsão” formado pelo sítio de ligação na enzima. A Figura 47b apresenta as ligações químicas do tipo ponte de hidrogênio formadas.

Figura 47 – Interação química entre Cinchonáina IIb e seu sítio de ligação à enzima óxido nítrico sintetase.

a)



b)



Imagens tridimensionais da NOS e os sítios de ligação da cinchonáina IIb (a) e interação química entre cinchonáina IIb a e seu sítio de ligação (b). Esferas (interação hidrofóbica). Pontilhado (ponte de hidrogênio).
Fonte: AUTORA, 2017.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do pré tratamento com a fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua* (AETC) em ratos infartados com isoproterenol e tentar elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, utilizando para isto três formas de abordagem: *in vivo* com medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normais e infartados, *in vitro* com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normais e infartados, *in vitro* em ensaios de antioxidação e *in silico* com *docking* molecular. Um resumo dos resultados está apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Resumo dos efeitos farmacológicos de AETC.

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE AETC	
<i>In vivo</i>	<p>Cardioproteção para o infarto</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ ↓ hipertrofia cardíaca ✓ ↓ necrose cardíaca <hr/> <p>Hipotensor e bradicárdico</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Anestesiados e não anestesiados ✓ Normais e infartados ✓ Participação da via muscarínica, do bloqueio ganglionar e de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem
<i>In vitro</i>	<p>Vasodilatador</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Anéis mesentéricos de ratos normais e infartados ✓ Participação de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem <hr/> <p>Antioxidante</p>
<i>In silico</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Receptores muscarínicos do tipo M₃ ✓ Canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L (Cav-L) ✓ Canais de K⁺ sensíveis à Ca²⁺ (BK_{Ca}) <ul style="list-style-type: none"> ✓ Enzima Catalase ✓ Enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Fonte: AUTORA, 2017.

O principal achado desse trabalho foi que a administração crônica de AETC produziu um efeito cardioprotetor para o infarto produzido por isoproterenol, provavelmente em consequência da ativação de vias moleculares de cardioproteção que tornam o miocárdio resistente a eventos isquêmicos e ao antagonismo aos efeitos patológicos promovidos por isoproterenol.

Já estão descritos na literatura moléculas de sinalização e mecanismos de condicionamento cardíaco que atuam de modo a tornar o miocárdio mais resistente a lesão isquêmica. Gatilhos de condicionamento cardíaco de diferentes origens (física, química, autacóides, neuro-hormônios, peptídeos hormonais, moléculas lipídicas, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) ativam mediadores intracelulares de condicionamento (proteína quinase C, proteína quinase ativada por mitógeno, proteína quinase G – óxido nítrico, via da quinase estimulada por breves processos de isquemia e reperfusão, proteína de expressão tardia) modulando vias de sinalização celular que culminam na ativação de efetores de condicionamento cardíaco (mitocôndria, permeabilidade do poro de transição mitocondrial, canais de potássio sensíveis à ATP, conexina 43, fator de transcrição STAT3, hexoquinase, aldeído desidrogenase, proteína de nitrosilação e retículo sarcoplasmático) (PERRICONE; HEIDE, 2014; HEUSCH, 2016; FORINI; NICOLINI; IERVASI, 2015; AIMO et al., 2015).

Sabendo da inexistência de estudos farmacológicos relatando o efeito da referida fração sobre a cardioproteção, começaram-se os estudos com ensaios farmacológicos *in vivo*, a fim de caracterizar a resposta de AETC.

Grupos de ratos foram tratados cronicamente com a fração em 5 doses apresentaram diminuição significativa nas variáveis que avaliavam a hipertrofia cardíaca (razão peso coração/ peso corporal, razão peso do ventrículo esquerdo/ peso corporal, espessura do ventrículo esquerdo, área de cardiomiócitos e volume médio de cardiomiócitos) de ratos tratados com AETC. Estes resultados indicam que o tratamento crônico com AETC foi capaz de impedir a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

A hipertrofia cardíaca ocorre em resposta adaptativa à sobrecarga de trabalho. Quando o crescimento hipertrófico do coração leva à disfunção ventricular esquerda e insuficiência cardíaca, a resposta é considerada uma hipertrofia patológica. Alterações funcionais e estruturais têm sido observadas em ratos com hipertensão arterial e com IM causado por indução com ISO, assim como, em pacientes com hipertensão arterial, estenose aórtica ou cardiomiopatia hipertrófica. Em acréscimo, estudos mostram que a hipertrofia reduz a capacidade de gerar força e aumenta a capacidade de variar a pressão devido ao aumento da relação massa/volume. Além disso, há o comprometimento da complacência ventricular, provavelmente, devido à rigidez da câmara cardíaca em resposta a acentuada deposição de colágeno. A hipertrofia miocárdica induzida por ISO nas doses de 85, 170 e 340 mg/kg, s.c., administrado duas vezes com intervalo de 24 horas, durante 2, 6 e 16 semanas é dose

dependente, apresentando, concomitantemente, aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, bem como, a dilatação deste (ESCUDERO; PINILLA, 2007).

Ainda nesse protocolo, foram estudadas variáveis que avaliavam se o tratamento crônico com AETC era capaz de proteger o miocárdio de lesão necrótica. Os resultados obtidos mostram uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de marcadores bioquímicos de necrose cardíaca (CK_{MB} , CK_{NAC} , LDH e TGO) e na área de necrose após reação colorimétrica com TTZ. Enquanto que as variáveis estereológicas (densidade de volume de cardiomiócitos íntegros, na densidade de perfis de cardiomiócitos íntegros, densidade de volume de cardiomiócitos íntegros e número de cardiomiócitos íntegros) houve um significativo aumento de cardiomiócitos íntegros.

Tais resultados revelam que o efeito cardioprotetor de AETC foi capaz de impedir a extensão da lesão necrótica causada por isoproterenol que provocou lise de miócitos liberando conteúdo enzimático no sangue, extensas áreas macroscópicas de necrose após reação com TTZ e predominância de necrose coagulativa na avaliação histológica-estereológica em ratos infartados.

Estes achados corroboram com dados da literatura de Peer e colaboradores (2008) onde foi estudado o efeito cardioprotetor do extrato aquoso das folhas de *Azadirachta indica* espécie que também é pertencente à família *Meliaceae*. Moreira e colaboradores (2012) que observaram o potencial cardioprotetor para isquemia e reperfusão de CATUAMA (produto farmacêutico a base de plantas, incluindo *T. catigua*) em músculo cardíaco isolado de ratos.

A fim de tentar elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na cardioproteção de AETC e baseados no perfil fitoquímico da fração, nesta predominam os compostos fenólicos. Destacam-se os componentes majoritários cinchonainas Ia, Ib, IIa e IIb que representam 70% do conteúdo da fração. Então, usando uma abordagem *in silico* foi empregado *docking* molecular das cinchonainas e alvos receptores de interesse que poderiam estar relacionados ao efeito cardioprotetor de AETC.

Os resultados revelaram que os alvos de maior afinidade das cinchonainas são os receptores muscarínicos, principalmente do tipo M3, canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis à voltagem (Cav-L), canais de K^+ sensíveis à Ca^{2+} (BkCa), enzima catalase (CAT) e enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS).

Seguindo uma abordagem *in vivo*, a administração aguda de AETC produziu hipotensão provavelmente em consequência de uma diminuição da resistência vascular periférica, em função da ativação de receptores muscarínicos endoteliais e de canais BkCa e

bradicardia provavelmente devido a uma ativação direta de receptores muscarínicos cardíacos e do bloqueio de Cav-L.

Estes efeitos, hipotensor e bradicárdico, de maneira não dependente de concentração foram observados em animais normais acordados e anestesiados, no entanto são significativamente superiores em animais acordados, provavelmente devido à participação central nos efeitos de AETC.

Já é bem descrito na literatura, que a anestesia produz vários efeitos sobre o sistema cardiovascular, alterando os principais sistemas de regulação da pressão arterial, induzindo depressão das sinapses do sistema nervoso central e promovendo alterações das respostas autonômicas (RIBEIRO, 2005). No entanto, apesar de conhecer a influência da anestesia e do estresse cirúrgico nos parâmetros cardiovasculares, utilizaram-se animais anestesiados nos demais protocolos experimentais *in vivo* por se tratarem de animais infartados.

Em ratos infartados, AETC administrado agudamente após o infarto promoveu efeito hipotensor. Este efeito foi superior ao de ratos normais, no entanto o efeito bradicárdico foi significativamente abolido. Estes resultados revelam que pós-infarto AETC é capaz de promover diminuição na resistência vascular periférica, no entanto, seus efeitos cardíacos parecem estar relacionados à ativação de vias de condicionamento cardíaco (vias de cardioproteção), conforme mencionado acima.

Em ratos infartados, pré tratados de forma crônica o tratamento com AETC promoveu efeito hipotensor e bradicárdico, de maneira dependente de dose. Estes resultados reforçam a ação de AETC em diminuir a resistência vascular periférica e confirmam que a bradicardia está relacionada à ativação de vias de condicionamento cardíaco no tratamento crônico com AETC.

Sabe-se que a regulação autonômica primária da função do nodo sinoatrial é por ação parassimpática vagal via estimulação de receptores muscarínicos cardíacos, estes receptores são predominantemente do subtipo M₂. Um importante mecanismo já identificado para cardioproteção é a ativação do reflexo vagal. Estudos têm demonstrado a possibilidade de pré-condicionar o coração por infusão de acetilcolina (ACh) ou estimulação vagal, bem como tal efeito cardioprotetor foi suprimido por secção da medula espinal, vagotomia bilateral ou a administração sistêmica de atropina, uma antagonista de receptores muscarínicos. Em animais onde foram silenciados os neurônios do núcleo motor dorsal do nervo vago foi abolido o efeito cardioprotetor em um protocolo de breves períodos de isquemia e reperfusão (YAO; GROSS, 1993; RICHARD et al., 1995; QIAN et al., 1996; YAMAGUCHI e al., 1997;

KATARE et al., 1997; GOURINE et al., 2010; MASTITSKAYA et al., 2012; BASALAY et al., 2012; AIMO et al., 2015).

A ativação dos receptores M_2 induz bradicardia intensa seguida de hipotensão decorrente da queda do débito cardíaco. Assim decidiu-se confirmar que as respostas hipotensoras e bradicárdicas eram devidas a uma ativação destes receptores no coração. Para isto, utilizou-se atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos. Constatou-se que após a administração de atropina, tanto a resposta hipotensora quanto a bradicárdica induzidas por AETC foram significativamente atenuadas. Estes resultados sugerem que existe uma participação efetiva dos receptores muscarínicos nos efeitos produzidos por AETC, seja por ação direta nestes receptores, através de uma estimulação muscarínica, que levaria a uma diminuição da FC, da contratilidade e do débito cardíaco, e conseqüentemente uma diminuição da PA, ou por ação indireta via ativação vagal, liberação de acetilcolina no nodo sinoatrial, conseqüente ativação muscarínica e de vias de condicionamento miocárdico.

Na ativação parassimpática, a acetilcolina liberada em terminações vagais age em receptor $AchR\alpha_7$, localizado em macrófagos no coração inibindo a liberação de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e outras citocinas pró-inflamatórias, sendo assim, intervenções que aumentam a atividade do nervo vago ou que aumentam a atividade da acetilcolina podem exercer um efeito imunossupressor havendo a participação da neuromodulação sobre o remodelamento cardiovascular (ROCHA, 2013).

Com a finalidade de verificar se a ação de AETC poderia ser indireta, via ativação neuronal colinérgica, utilizou-se o hexametônio, um bloqueador ganglionar (antagonista dos receptores nicotínicos). Após a administração do bloqueador, a resposta hipotensora foi potencializada e a resposta bradicárdica abolida e convertida em taquicardia. Isto sugere que o efeito bradicárdico induzido por AETC parece envolver uma ativação indireta de receptores muscarínicos cardíacos, possivelmente via ativação do nervo vago. Uma possível via indireta pela qual AETC poderia estar promovendo seu efeito bradicárdico seria através da ativação de fibras nervosas amielinizadas que se projetam para o átrio a partir do núcleo do trato solitário, no tronco cerebral, as fibras C. A ativação destas fibras induz bradicardia através da estimulação colinérgica e liberação de substância P nas terminações nervosas cardíacas, e este efeito pode ser abolido pela atropina, mas não pelo hexametônio (RIBEIRO, 2005).

Com a finalidade de confirmar a participação do bloqueio de canais de cálcio, do tipo L, sensíveis a voltagem nos efeitos de AETC, foi utilizada a nifedipina, um bloqueador não específico desses canais. Dessa forma, após a administração da nifedipina o efeito hipotensor

e o efeito bradicárdico de AETC foram praticamente abolidos, confirmando que o bloqueio desses canais faz parte do mecanismo de ação de AETC. Estes resultados também podem estar relacionados com o efeito cardioprotetor, uma vez que a hipermobilização de Ca^{2+} para o citoplasma oriundo do meio extracelular e do retículo citoplasmático é um dos mais importantes mecanismos de lesão dos cardiomiócitos após o processo isquêmico (GROOT; RAUEN, 2007).

A mortalidade dos animais foi observada na administração *in bolus* de AETC, com parada cardiorespiratória após a última dose na curva dose resposta, por isso foi determinada a dose que promoveu 50% do efeito máximo e esta foi utilizada nos protocolos em animais infartados. Vale-se ressaltar que AETC não apresentou mortalidade quando administrado por via oral, mesmo nas maiores doses administradas cronicamente. Tais achados podem estar relacionados aos resultados de Pontieri e colaboradores (2007) onde Catuama foi capaz de prolongar a condução intraventricular durante o ritmo sinusal, assim reduzindo a velocidade de condução do estímulo através do miocárdio.

Para compreender melhor e confirmar a natureza do efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*, foi utilizado o modelo experimental *in vitro* de artéria mesentérica superior isolada de rato. Escolheu-se este modelo, por considerar que um vaso de pequeno calibre apresenta maior resistência e está mais amplamente implicado na regulação do débito e da pressão capilar, refletindo melhor as evoluções da resistência periférica global.

No modelo com anéis de artéria mesentérica superior AETC induziu vasorrelaxamento dependente de concentração que foi atenuado com a retirada do endotélio, sugerindo que a manutenção do endotélio intacto é importante para o efeito vasorrelaxante.

Segundo os resultados do *docking* molecular provavelmente estão envolvidas no efeito vascular de AETC o agonismo de receptores muscarínicos do tipo M_3 , ativação de canais BK_{Ca} , ativação eNOS e bloqueio Cav-L.

Os receptores muscarínicos do tipo M_3 vasculares estão associados a uma proteína Gq que ativa uma cascata de sinalização intracelular via fosfolipase C (PLC), esta age sobre o fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2), hidrolizando-o em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 se liga ao receptor de IP_3 no retículo sarcoplasmático e favorece a liberação de Ca^{2+} para o meio intracelular, isto permite a formação do complexo cálcio/calmodulina, necessário para a síntese de NO pela eNOS. O NO se difunde através da membrana plasmática para as células do músculo liso vascular, nestas, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Os níveis elevados de GMPc favorecem a ativação de proteína quinase G

(PKG) que reduz a afinidade dos filamentos contráteis sensíveis ao Ca^{2+} , aumenta a extrusão de Ca^{2+} do músculo liso vascular e aumenta a recaptção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, reduzindo a concentração de Ca^{2+} intracelular (MATOBA; SHIMOKAWA, 2003).

Esses achados corroboram com os resultados de Calixto e Cabrini (1997) que afirmam os efeitos vasorrelaxantes de Catuama em vasos de diferentes espécies animais, estes autores atribuem o efeito à liberação de NO. Além disso, Antunes e colaboradores (2001) observaram que Catuama causa relaxamento de curta duração em corpos cavernosos de coelhos por ativação de canais de K^+ sensíveis a ATP, mas sem envolver liberação de óxido nítrico.

No entanto, os efeitos de AETC através de M_3 , BK_{Ca} e eNOS, estão todos relacionados a presença de endotélio funcional. Uma vez identificado o efeito vasorrelaxante também em anéis sem endotélio funcional e tendo conhecimento que o aumento da concentração de potássio extracelular induz contração do músculo liso através de uma despolarização da membrana com ativação de canais de cálcio, do tipo L, dependentes de voltagem (Cav-L) e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, enquanto que a vasoconstrição induzida por FEN é resultante de um acoplamento farmacomecânico. Os efeitos vasorrelaxantes de AETC foram avaliados tanto em contrações induzidas por FEN, quanto em contrações induzidas por KCl 80, uma agente contracturante que induz contração através de despolarização da membrana e abertura dos Cav-L, um acoplamento eletromecânico (RIBEIRO, 2005).

Sendo assim, AETC produz vasorrelaxamento tanto em contrações induzidas por FEN, quanto em contrações induzidas por KCl 80, confirmando sua atuação também através do bloqueio de Cav-L por AETC e a importância do endotélio em seus efeitos vasculares.

Seguindo esta abordagem *in vitro* foi avaliado o efeito vasorrelaxante de AETC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos infartados. Os resultados confirmam a importância do endotélio nos efeitos vasculares de AETC. Observa-se também que o efeito vasorrelaxante na presença de endotélio funcional é menor em ratos infartados, mas é semelhante em anéis sem endotélio funcional. Estes resultados corroboram com dados da literatura sobre a disfunção endotelial induzida por isoproterenol (DAVEL, BRUM; ROSSONI, 2014). E revelam a importância de um estudo com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos infartados após um tratamento crônico com AETC.

No IAM a interrupção do fluxo sanguíneo para o miocárdio gera a necessidade de estratégias para restaurar o fluxo sanguíneo, que por sua vez, origina o recrutamento de células inflamatórias e a ativação de respostas de lesão celular que podem produzir danos adicionais e complicações cardíacas, um processo conhecido como reperfusão da lesão. Esta

lesão pode ser manifestar como disfunção e/ou morte do tecido do miocárdio e vascular. Além disso, danos ao miocárdio também podem produzir disfunção do sistema elétrico cardíaco levando a arritmias. A fisiopatologia da lesão de reperfusão tem sido associada a alterações no balanço energético, arquitetura celular e a atividade dos leucócitos, plaquetas e do sistema complemento. Uma das principais características da lesão de reperfusão é uma explosão na formação de radicais livres, que pode continuar por horas após o evento isquêmico, e tem sido atribuída a múltiplas fontes, incluindo xantina oxidase, neutrófilos ativados, perdas de elétrons das mitocôndrias, a oxidação de catecolaminas, ciclooxigenase, e lipoxigenase. Este aumento de EROs danifica miócitos, prejudica a função contrátil e contribui para o extravazamento vascular (GOYAL et al., 2015).

O estresse oxidativo e as diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) são características importantes, pois apresentam um papel na fisiologia, bem como fisiopatologia das doenças cardiovasculares. A "teoria dos radicais livres" em que radicais de oxigênio endógenos resulta em dano celular cumulativo de DNA, proteínas, lipídios, e outros componentes da célula. No entanto, a relação entre doenças cardiovasculares e o estresse oxidativo causado por radicais livres ainda é difícil de elucidar (SUGAMURA; KEANEY, 2011).

Vários processos enzimáticos e não enzimáticos podem gerar EROs, sendo as fontes mais importantes de EROs nas doenças cardiovasculares a cadeia respiratória mitocondrial, a dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato oxidase (NADPH), xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LO), óxido nítrico sintase (NOS), e a mieloperoxidase (MPO). Na tentativa de quantificar o estresse oxidativo e obter uma perspectiva de dano alguns biomarcadores do estresse oxidativo têm sido desenvolvidos como: lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), indicador de peroxidação lipídica, F₂-isoprostanóides plasmáticos, indicador de peroxidação lipídica; mieloperoxidase de células inflamatórias, indicador do potencial oxidante de MPO; indicador de metabólitos oxidantes de bilirrubina; glutatona peroxidase 1, indicador da capacidade detoxificante de EROs; 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, indicador do dano oxidativo ao DNA; ácido ascórbico (vitamina C), indicador dos níveis plasmáticos de antioxidante solúvel em água; e o estado antioxidante total, indicador da capacidade antioxidante sistêmica (SUGAMURA; KEANEY, 2011).

Em paralelo ao desenvolvimento dos biomarcadores para o estresse oxidativo, são amplamente utilizados e pesquisados os testes antioxidantes *in vitro*, uma vez que são menos onerosos, têm boa reprodutibilidade e possuem determinada capacidade de mimetizar situações oxidativas em meio fisiológico.

Diante disso, nesse trabalho a atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada a partir de diferentes protocolos *in vitro*, revelando o importante potencial antioxidante de AETC, uma vez que este apresentou potente efeito sequestrador de radicais DPPH, ABTS e NO, além do efeito quelante de Fe^{2+} e de inibir a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Em acréscimo, os resultados do *docking* molecular mostram que os principais componentes de AETC apresentam alta afinidade pela CAT e eNOS, ainda afinidade intermediária pela superóxido dismutase (SOD) e Gpx.

Os efeitos antioxidantes de AETC corroboram com dados da literatura sobre a quantificação de compostos fenólicos (KAMDEM et al., 2013; KAMDEM et al., 2012; CHASSOT et al., 2011; LONNI et al., 2012), o sequestro de radicais DPPH (KAMDEM et al., 2012; CHASSOT et al., 2011; LONNI et al., 2012) e redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} (KAMDEM et al., 2012) com resultados semelhantes para AETC e resultados superiores comparados ao extrato bruto das cascas de *T. catigua*. Em acréscimo, compostos isolados das cascas de *T. catigua* catiguanin *a*, catiguanin *b* (TANG et al., 2007), flavan-3-ol, epicatequina, procianidina B2, procianidina B4, procianidina C1, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib, cinchonaína Iib e cinchonaína Iia (RESENDE et al., 2011) também apresentaram importante atividade antioxidante frente ao radical DPPH e na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Alguns autores têm atribuído os efeitos biológicos de *T. catigua* a sua atividade antioxidante sobre o estresse oxidativo. Kamdem e colaboradores (2013 e 2012) atribuíram ao efeito antioxidante a ação protetora hipocampal após lesão de isquemia e reperfusão devido a melhora na peroxidação lipídica, ao sequestro de radical NO, ao aumento da viabilidade celular e ao aumento da viabilidade mitocondrial. Já Bonassoli e colaboradores (2012) atribuíram ao efeito antioxidante a ação antidepressivo e a ativação da proliferação celular hipocampal, enquanto Chassot e colaboradores (2011) associam o este efeito à melhora cognitiva.

Existe a evidência de que a produção de EROs, após oclusão coronariana contribui importante para patologia cardíaca, dessa forma, tornou-se uma estratégia para diminuir a lesão de reperfusão por diminuição de EROs através de compostos antioxidantes naturais, a exemplo de compostos fenólicos, que têm a capacidade de sequestrar EROs neutralizando os elétrons desemparelhados reativos, formando assim, moléculas neutras. Em acréscimo, é uma importante estratégia a diminuição da liberação de ferro livre, este elemento é lançado pelos tecidos durante a isquemia e reperfusão, uma vez livre, o ferro permite a oxidação de lipídios, em particular na presença de EROs. Além disso, reações de oxidação são catalisadas por metais e têm sido associados à disfunção cardíaca durante a isquemia e reperfusão. Assim,

agentes quelantes de ferro e que impedem a redução de Fe^{2+} a Fe^{3+} , limitam a lesão de reperfusão no ambiente clínico, apoiando a noção de que as EROs são importantes para a lesão de reperfusão cardíaca (SUGAMURA; KEANEY, 2011).

Terapias antioxidantes em modelos animais sugerem também um benefício da redução da geração EROs que: limita danos aos miócitos; melhora a função cardíaca após a reperfusão, atenua a remodelação e a cardiomiopatia. Diante da importância do estresse oxidativo e de EROs na fisiologia e fisiopatologia das doenças cardiovasculares é primordial um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação destas espécies, dos seus mecanismos de lesão, e especialmente, uma melhor elucidação dos mecanismos antioxidantes de AETC (SUGAMURA; KEANEY, 2011).

Seguiu-se com a avaliação de variáveis relacionada aos efeitos de isoproterenol em outros tecidos e se AETC seria capaz de atuar atenuando estes danos.

O tratamento crônico com AETC potencializou o efeito hipoglicemiante causado pelo tratamento com ISO. Este efeito pode ser atribuído à ação da cinchonaína Ib que estimula a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas (FADI et al., 2009).

Com relação ao perfil lipídico, o tratamento crônico com AETC apresentou efeito hipocolesterolêmico e hipotriacilglicerolêmico, tais resultados reforçam os efeitos benéficos do controle das alterações lipídicas para a prevenção do infarto. Rosuvastatina e pravastatina têm atividade cardioprotetora contra a necrose do miocárdio induzida por ISO (VARIYA et al., 2015). Além disso, estudos recentes mostram que a sinvastatina previne a hipertrofia cardíaca por modulação da via Jak/stat (AL-RASHEED et al., 2015; GRESHA; AZIZ; GREISH, 2014).

Quanto à função hepática, animais do grupo ISO apresentaram aumento significativo da relação peso fígado/peso corporal e foi observada macroscopicamente esteatose hepática. Esses resultados podem ser atribuídos a biotransformação hepática e a lipólise causada por ISO, que viabiliza o acúmulo de ácidos graxos no fígado. ISO também causou aumento de γ -GT e FA plasmáticos. O tratamento crônico com AETC promoveu uma significativa diminuição do peso do fígado, esteatose, γ -GT e FA. Estes resultados sugerem um efeito protetor hepático de AETC, provavelmente por indução de enzimas antioxidantes e da neutralização direta de EROs.

γ -GT catalisa a transferência de um grupo gama-glutamil de um peptídeo para outro peptídeo ou para um aminoácido, participa do transporte de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatona tecidual. É encontrada em vários tecidos, especialmente no fígado e vias biliares (MOTTA, 2009).

Estudos mostram que γ -GT desempenha um papel chave na síntese e metabolismo da glutatona extracelular, um antioxidante importante em diversos mecanismos de defesa do corpo. É afetada por fatores ambientais e genéticos, além de ter sua síntese induzida quando há depleção da glutatona. Por isso, é um importante marcador de estresse oxidativo. Existem fortes evidências de que γ -GT, mesmo quando os valores dos níveis séricos, estão dentro do intervalo de referência, está associada ao aumento de mortalidade por causa cardiovascular em ambos os sexos, na presença ou ausência de doença arterial coronariana, na meia idade e em idosos. Dessa forma, γ -GT, mesmo dentro do intervalo de referência é associado com o desenvolvimento de diabetes tipo 2, ao aumento de fatores de risco para a síndrome metabólica e a mortalidade cardiovascular. Sendo assim, γ -GT tem valor preditivo de IM e pode ser um indicador de resultados adversos em síndromes coronarianas agudas e outras perturbações cardíacas crônicas. Por sua vez, o γ -glutamil está presente nas lesões ateroscleróticas de artérias coronárias e carótidas, possui um papel pró-oxidante, conduzindo à produção de espécies de oxigênio reativas e a aterosclerose (BULUSU; SHARMA, 2015).

A ausência de alteração nos níveis de albumina, principal marcador de função hepática, indica que nem a indução do IM com ISO, nem o tratamento com AETC comprometeram de forma importante a função hepática. A albumina representa cerca de 60% das proteínas presentes no plasma humano. É sintetizada nas células do parênquima hepático, cerca de 15 g/dia (em humanos), em velocidade dependente da pressão osmótica coloidal e pela ingestão protéica. A velocidade de síntese aumenta em até 300% quando ocorre uma perda, como na síndrome nefrótica. Tem tempo de meia-vida de 15 a 19 dias. Por outro lado, a síntese é reduzida por citocinas inflamatórias. Possui função na regulação osmótica, no transporte e no armazenamento de compostos pouco solúveis em água. Após transcrição, tradução e síntese, a albumina entra no espaço intravascular via sistema linfático, hepático ou diretamente por capilares sinusóides, após atravessar o espaço de Disse (MOTTA, 2009).

Por sua vez, a FA pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Está amplamente distribuída nos tecidos, no entanto a forma predominante no sangue origina-se especialmente do fígado, nesse órgão se localiza na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares (MOTTA, 2009).

Na avaliação de parâmetros renais, os resultados desse trabalho revelam que AETC, mesmo em tratamento crônico, não causa agravos à função renal. É sabido que os aminoácidos provenientes do catabolismo protéico são desaminados com a produção de amônia que potencialmente tóxica e convertida em uréia no fígado e excretada pela filtração

glomerular, dessa forma o nível de uréia serve como preditivo na insuficiência renal sintomática e no estabelecimento de diagnóstico na distinção entre várias causas de insuficiência renal. Além disso, a creatinina é produzida na desidratação não enzimática da creatina muscular, se difunde do músculo para o plasma, de onde é removida quase que inteiramente e em velocidade relativamente constante por filtração glomerular, além disso, sua produção não é influenciada pelo metabolismo protéico ou outros fatores externos, sendo assim, a concentração de creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal (MOTTA, 2009).

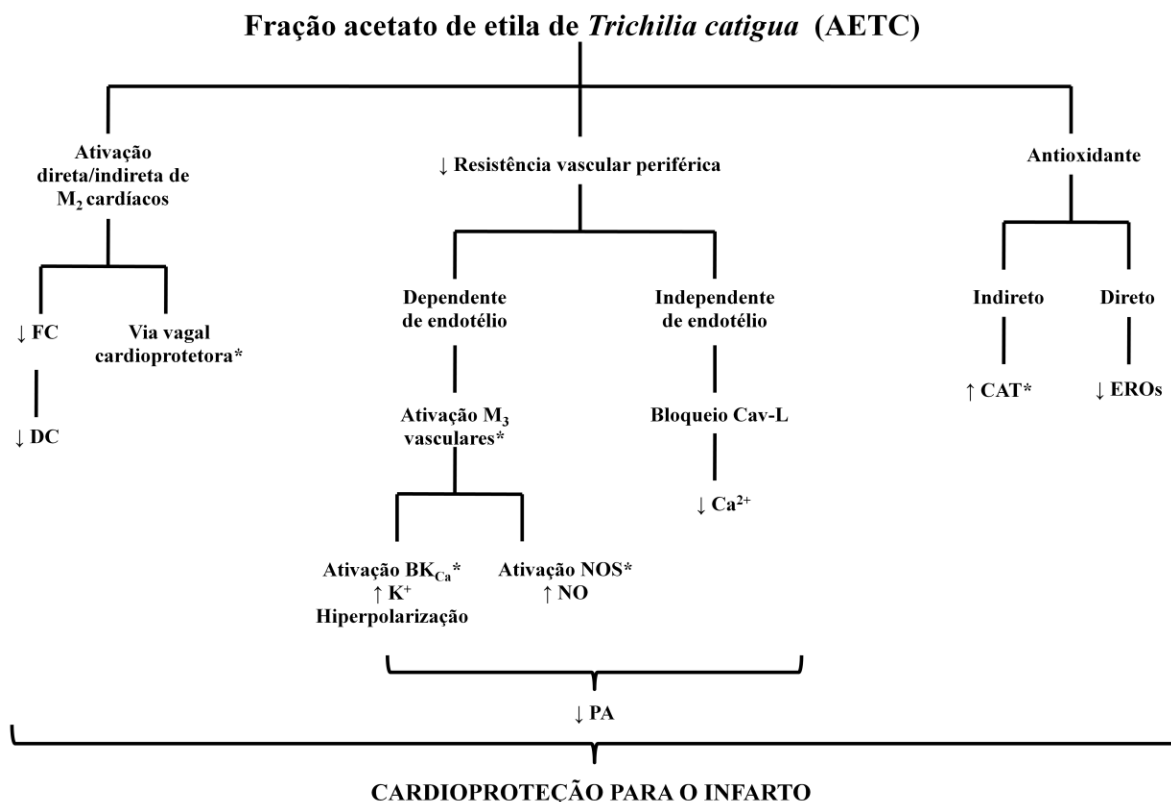
Diante do exposto, uso de plantas medicinais baseadas no conhecimento popular nas diferentes culturas, a fim de aliviar sintomas e prevenir algumas doenças ou distúrbios fisiológicos tem sido um ponto de início para o desenvolvimento de pesquisas etnofarmacológicas. Por meio de estudos semelhantes ao apresentado, pode-se contribuir para o emprego correto de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos, através da comprovação da eficácia e segurança terapêuticas das plantas. Além disso, tais resultados contribuem para a descoberta e desenvolvimento de novos prototipos de fármacos. Dessa forma, as cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb se mostram promissoras ferramentas para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos.

8 CONCLUSÕES

No estudo do efeito cardioprotetor da fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua* em ratos chegou-se às seguintes conclusões:

- ✓ O tratamento crônico com AETC produz efeito cardioprotetor para o infarto induzido por isoproterenol por minimizar os danos de hipertrofia e necrose no miocárdio, provavelmente através da ativação da via vagal de condicionamento cardíaco;
- ✓ Apresenta efeito hipotensor e bradicárdico em estudos farmacológicos *in vivo* em ratos Wistar normais e infartados;
- ✓ Apresenta efeito vasorrelaxante em estudos farmacológicos *in vitro* de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar normais e infartados;
- ✓ Apresenta efeito antioxidante *in vitro* e provavelmente efeito indutor das enzimas antioxidantes catalase e óxido nítrico sintase endotelial;
- ✓ Apresenta efeito hipocolesterolêmico e hipotriacilglicerolêmico;
- ✓ Apresenta efeito protetor hepático.

Figura 48 – Vias de ação envolvidas no efeito cardioprotetor do infarto de AETC.



*Dados *in silico*. AUTORA, 2017.

REFERÊNCIAS

AIMO et al., Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences. *World J Cardiol.* v. 26, n. 7, p. 621-632, 2015. doi:10.4330/wjc.v7.i10.621

AMORATI; VALGIMIGLI, Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Just Accepted by Free Radical Research. Free Radic Res.* v. 49, n. 5, p. 633-649, 2015. doi: 10.3109/10715762.2014.996146.

ANDERSON et al., ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation.* n. 116, p. 148-304, 2007.

ANTUNES et al., The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine CatuamaR and its constituents. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 416-421, 2001.

AL-RASHEED et al., Preventive Effects of Selenium Yeast, Chromium Picolinate, Zinc Sulfate and their Combination on Oxidative Stress, Inflammation, Impaired Angiogenesis and Atherogenesis in Myocardial Infarction in Rats. *J Pharm Pharm Sci.* v. 16, n. 5, p. 848 - 867, 2013.

ALTURA; ALTURA, Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. *Am J Physiol.* v. 219, p. 1698-1705, 1970.

ANTMAN et al., focused update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the Canadian Cardiovascular Society Endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, writing on behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation.* n. 117, p. 296-329, 2007.

AZEVEDO et al., Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* v. 106, n. 1, p. 62-69, 2016.

BABY et al., UV-spectrophotometric determination of bioflavonoids from semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, v. 89, n. 6, p.1532-1537, 2006.

BABY et al., Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.

BARBOSA et al., Inhibition of Platelet Phospholipase A2 Activity by Catuaba Extract Suggests Antiinflammatory Properties. *Phytother. Res.*, v. 18, p. 942–944, 2004.

BASALAY et al., Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Exp Physiol*, n. 97, p. 908-917, 2012.

BEDARD; KRAUSE. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* v. 87, p. 245–313, 2007.

BELTRAME et al., A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography*. v. 1119, n. 1, p. 257-263, 2006.

BHATNAGAR et al., The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. *Heart*. v.101, p. 1182–1189, 2015. doi:10.1136/heartjnl-2015-307516

BONASSOLI et al., Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 143, p. 179–184, 2012.

BRIGHENTE et al., Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharm. bio.*, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.

BUJAK et al., The Prognostic Role of Red Blood Cell Distribution Width in Coronary Artery Disease: A Review of the Pathophysiology. *Dis Markers*. 2015. doi: 10.1155/2015/824624.

BULUSU; SHARMA. What does serum γ -glutamyltransferase tell us as a cardiometabolic risk marker? *Ann Clin Biochem*. 2015. pii: 0004563215597010.

CALIXTO; CABRINI, Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and –independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytother. Res.*, v.11, p. 32-38, 1997.

CAMPOS et al., Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology*. v. 182, n. 1, p. 45-53, 2005.

CARLL et al., Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure. *Cardiovasc Toxicol*. v. 11, n. 2, p. 91-112, 2011. doi: 10.1007/s12012-011-9103-5

CHASSOT et al., Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 137, n. 3, p. 1143-1148, 2011.

CHAKRABORTY; PUJANI; HAQUE. Combinational effect of resveratrol and atorvastatin on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Pharm Bioallied Sci*. v. 7, n. 3, p. 233-238, 2015. doi: 10.4103/0975-7406.160037.

CHATTOPADHYAY. Effect of *Azadirachta indica* hydroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. *General Pharmacology*. v. 28, n. 3, p. 449-451, 1997.

CHINDA et al., Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia–reperfusion rat heart. *Diabetes & Vascular Disease Research*. v. xx, n. x, p. 1-92014. doi: 10.1177/1479164113516134.

COSCONATI et al., Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert Opinion Drug Discovery*, v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.

COUTINHO, Efeito de Catuama sobre a função ventricular, a mecânica do músculo cardíaco e os parâmetros hemodinâmicos de ratos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CRUZ-ORIVE; WEIBEL. Lung Cellular and Molecular Physiology. *American Journal of Physiology*. v. 258, n. 4, p. 148-156, 1990.

CULLEN et al., Validation of High-Sensitivity Troponin I in a 2-Hour Diagnostic Strategy to Assess 30-Day Outcomes in Emergency Department Patients With Possible Acute Coronary Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. v. 62, n. 14, p. 1242-1249, 2013. doi: 10.1016 / j.jacc.2013.02.078

CZIBIK et al., Citric acid cycle intermediates in cardioprotection. *Metabolomics. Circ Cardiovasc Genet.* v. 7, p. 711-719, 2014. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000220

DANAEI et al., The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Med.* v. 6, n. 58, 2009.

DAVEL et al., Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol.* v.148, n. 5, p. 629-39, 2006.

DAVEL; BRUM; ROSSONI, Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a G-protein-coupled β_2 -adrenoceptor signaling pathway. *Plos One.* v. 9, n. 3, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091877

DOS-SANTOS et al., The exposure to *Trichilia catigua* (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. *Journal of Ethnopharmacology.*

DU et al, Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther.* v. 162, p. 23-34, 2016. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.008

ESCUADERO; PINILLA. Paradigms and paradoxes of left ventricular hypertrophy: from the research laboratory to the clinical consultation. *Arch Cardiol Mex.* v. 77, n. 3, p. 237-248, 2007.

ESPADA et al., Antiviral Activity of *Trichilia catigua* Bark Extracts for Herpesvirus and Poliovirus. *Curr Pharm Biotechnol.* v. 16, n. 8, p. 724-32, 2015.

ETTINGER et al., The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes.* v.5, n. 6, p. 719-728, 2014. doi:10.4161/19490976.2014.983775

FADI et al., Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology.* v.124, n. 2, p.224-227, 2009.

FORINI; NICOLINI; IERVASI, 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. doi:10.3390/ijms160363122015

FOY; FILIPPONE. Chest pain evaluation in the emergency department. *Med Clin North Am.* v. 99, n. 4, p. 835-847, 2015. doi: 10.1016/j.mcna.2015.02.010.

FURCHGOTT; ZAWADZKI, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. v. 288, p. 373-376, 1980.

GOURINE et al., "Remote preconditioning reflex"- a neural pathway of cardioprotection during myocardial ischaemia and reperfusion induced by remote ischaemic preconditioning. *Eur Heart J*. n. 31, p. 319, 2010.

GOYAL et al., Protective Effects of Cardamom in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, v.16, p. 27457–27469, 2015.

GRESHA; AZIZ; GREISH, Evening primrose oil ameliorates platelet aggregation and improves cardiac recovery in myocardial-infarct hypercholesterolemic rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. v. 6, n. 1, p. 23-36, 2014.

GROOT; RAUEN, Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc*. v. 39, n. 2, p. 481-484, 2007.

HEUSCH, Molecular Basis of Cardioprotection Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circulation Research*. v. 116, p. 674-699, 2015.
doi:10.1161/circresaha.116.305348

JOLY, *Botânica. Introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. Sao Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. p.408-410.

KAMADYAAPA et al., Cardiovascular effects of *Ekebergia capensis* Sparrm (*Meliaceae*) ethanolic leaf extract in experimental animal paradigms. *Cardiovasc J Afr*. v. 20, n. 3, p. 162-169, 2009.

KAMDDEM et al., a. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. *Acta pharmaceutica*. v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

KAMDDEM et al., b. Catuaba (*Trichilia catigua*) Prevents Against Oxidative Damage Induced by In Vitro Ischemia–Reperfusion in Rat Hippocampal Slices. *Neurochemical Research*. v. 37, n. 12, p. 2826-2835, 2012.

KATARE et al., Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg*, n. 137, p. 223-231, 2009.

KHOSLA; GUPTA; SINGH. Um estudo da cardiovasculares efeitos de *Azadirachta indica* sobre isoladas coração perfundido preparações. *Indian J. Physiol Pharmacol.* v. 46, n. 2, p. 241-244, 2002.

KIM et al., Toll-like receptor 4 deficiency: Smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol.* v. 7, n. 5, p. 1-10, 2007.

KLETTER et al., Morphological, Chemical and Functional Analysis of Catuaba Preparations. *Planta médica.* v. 70, n. 10, p. 993-1000, 2004.

KOLEY; LAL. Pharmacological effects of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract on the ECG and blood pressure of rat. *Indian J Physiol Pharmacol.* v. 38, n. 3, p. 223-225, 1994. Erratum in: *Indian J Physiol Pharmacol.* v. 38, n. 4, p. 239, 1994.

KONATÉ et al., Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia emetica* and *Opilia amentacea* in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014. doi:10.1155/2014/867075.

LAGOS et al., Contribution to the Study of Phytosterols and Phenolics from the Barks and Leaves of the *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation.* v. 2, n. 1, p. 37, 2012.

LIAO et al., Danhong Injection (a Traditional Chinese Patent Medicine) for Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2015. ID 646530. doi: 10.1155/2015/646530

LOCHNER et al., Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning. *Cardiovascular Journal of Africa.* v. 20, n. 1, 2009.

LONGHINI et al., Propriedades biológicas e fitoquímica de algumas espécies conhecidas como Catuaba, com ênfase na espécie *Trichilia catigua* 2011.

LONGHINI et al., Development and validation studies for determination of phenylpropanoid- substituted flavan- 3- ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high- performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Separation Science.* v. 36, n. 7, p.1247-1254, 2013.

LONNI et al., Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta.* v. 719, p. 57-60, 2012.

LUCIA et al., Adrenal adrenoceptors in heart failure. *Front Physiol.* v. 7, n. 5, p. 246, 2014. doi: 10.3389/fphys.2014.00246.

NICHOLSON et al., Patient-level costs of major cardiovascular conditions: a review of the international literature. *ClinicoEconomics and Outcomes Research.* v. 8 495–506, 2016.

MANDARIM-LACERDA. Métodos quantitativos em Morfologia. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995.

MARINO et al., Perinatal hypoxia enhances cyclic adenosine monophosphate-mediated BKCa channel activation in adult murine pulmonary artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 57, n. 2, p. 154-165. 2011. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182016adf.

MASTITSKAYA et al., Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res,* n. 95, p. 487-494, 2012.

MATOBA; SHIMOKAWA. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci.* v. 92, n. 1, p. 1-3, 2003.

MATOS-SOUZA; FRANCHINI; NADRUZ, Left ventricular hypertrophy: pathway to heart failure. *Rev Bras Hipertens.* v. 15, n. 2, p. 71-74, 2008.

MCNALLY et al., Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v. 285, p. 2290–2297, 2003.

MISHRA; TIWARI, Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry.* v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.057.

MITCHELSON, Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* v. 5, p. 12–16, 1984.

MOREIRA, Efeitos cardioprotetores da Catuama e seus componentes sobre o coração isolado de ratos submetidos a isquemia e reperfusão. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

MOTTA, Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações / 5ª Ed. – Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MUSSO; PEREIRA. Alterações da circulação. Bogliolo, patologia geral/ [editado por] Geraldo Brasileiro Filho. – 5º Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

NOJIRI et al., Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* v. 281, p. 33789–33801, 2006.

OLIVEIRA et al., Clinical toxicology study of na herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (CatuamaR) in healthy volunteers. *Phytother. Res.*, v. 19, p. 54-57, 2005.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes. 2007. Hemograma. Como fazer e interpretar. Editora LPM. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007. Capítulo 1, página 54.

OLIVEIRA; PEDROSO. Blackbook – Clínica Médica. Belo Horizonte: Blackbook Editora, 2014.

PARATI; ESLER. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J.* v. 33, n. 9, p. 1058-1066, 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehs041.

PEER et al., Efeito cardioprotetor de Azadirachta indica A. Juss. em isoprenalina induzido infarto do miocárdio em ratos. *Int J Cardiol.* v. 12, n. 1, p. 123-126, 2008.

PERRICONE; HEIDE, Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease. *Pharmacol Res.* v. 36, n. 45, p. 1-22, 2014. doi:10.1016/j.phrs.2014.08.004.

PIZZOLATTI et al., Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z.Naturforsch. C*, v.57, p.483-488, 2002a.

PIZZOLATTI et al., Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, v. 9, p. 422-426, 2002b.

PONTIERI et al., The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *Journal of Electrocardiology.* v. 40, p. 534–534, 2007. doi:10.1016/j.jelectrocard.2007.06.002

QIAN et al., KATP channels in rat heart: blockade of ischemic and acetylcholine-mediated preconditioning by glibenclamide. *Am J Physiol.* n. 271, p. 23-28, 1996.

RABELO; PAULA; BARA. Quantification of total phenols present in the bark of *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* v. 15, n. 2, p. 230, 2013.

RAJADURAI; PRINCE, Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an *in vivo* and *in vitro* study. *Toxicology.* v. 232 p. 216–225, 2007.

RATES, Plants as source of drugs. *Toxicon.* v. 39, p. 603–613, 2001.

REMIÃO et al., Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovasc Toxicol.* v. 1, n. 3, p. 195-204. 2001.

REMIÃO et al., Synthesis and analysis of aminochromes by HPLC-photodiode array. Adrenochrome evaluation in rat blood. *Biomed Chromatogr.* v. 17, n. 1, p. 6-13. 2003.

REMIÃO et al., Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol.* v. 17, n. 12, p. 1584-90, 2004.

RESENDE et al., Antioxidant activity of polyphenolic compounds isolated from the bark of *Trichilia catigua*. *Planta Médica.* v.73, n. 9, 2007.

RESENDE et al., Phenylpropanoid Substituted Flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *In Vitro* Antioxidative Activity. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.

RIBEIRO, Estudo das ações cardiovasculares de dois compostos (ácido ent-15 α -acetoxicaur-16-en-19-óico - CA-acetoxi e 4-Nitro-N-fenilmaleimida - 4-NO₂NFM) em ratos. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2005.

RICHARD et al., Myocardial and coronary endothelial protective effects of acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in rats: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol,* n. 115, p. 1532-1538, 1995.

ROCHA. Interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora na fase aguda do infarto do miocárdio experimental. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Juraci Aparecida Rocha. 2013.

ROGER, Epidemiology of myocardial infarction. *Med Clin North Am.* v. 91, p. 537-552, 2007.

SANCHIS-GOMAR et al., Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med.* v. 4, n. 13 , p. 256, 2016.

SHAH et al., High-sensitivity cardiac troponin I at presentation in patients with suspected acute coronary syndrome: a cohort study. *High-STEACS investigators.* 2015. pii: S0140-6736(15)00391-8. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00391-8.

SOUZA; LORENZI, *Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.* Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 428-429.

SUGAMURA; KEANEY, Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine.* v. 51, p. 978–992, 2011.

SUN et al., Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta Pharmacol Sin.* v. 23, n. 12, p. 1142-51, 2002.

SRIVASTAVA et al., Superóxido regulação negativa do CuZn-superóxido contribui para a beta-adrenérgico estresse oxidativo mediado por receptores no coração. *Cardiovasc Res.* v. 74, p. 445-455, 2007.

STEVENSON, William J. *Estatística aplicada à administração*, São Paulo: Harbra, 1981.

STROMME; ROLSTAD; MANGSCHAU. Troponins and other biochemical cardiac markers-time for a change. *Tidsskr Nor Laegeforen.* v. 120, n. 16, p. 1863-1869, 2000.

TAKAHASHI; OWYANG, Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. *J Physiol.* v. 504, n. 2, p. 479-488, 1997.

TANG et al., Antioxidant Phenylpropanoid-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Natural Products.* v. 70, n. 12, p. 2010-2013, 2007.

TANG et al., Cardioprotective effect of total Saponins from three medicinal species of *Dioscorea* againstisoprenaline-induced myocardial ischemia. *J Ethnopharmacol.* n. 15, p. 165-173, 2015. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.004.

THOMPSON; ANDERSON. Cardiovascular effects of *Azadirachta indica* extract. *J Pharm Sci.* v. 67, n. 10, p. 1476-1478, 1978.

Thichilia catigua, imagens, 19 de outubro de 2015. Disponível em:
http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9709

TROTT; OLSON, Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2009.

TRUITI et al., *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction protects against cognitive impairments and hippocampal cell death induced by bilateral common carotid occlusion in mice. *J Ethnopharmacol.* v. 25, n. 172, p. 232-237, 2015. doi:10.1016/j.jep.2015.05.060.

VASISHT; SHARMA; KARAN, Current perspective in the international trade of medicinal plants material: An Update. *Curr Pharm Des.* v. 22, n. 27, p. 4288-336, 2016.

VIANA et al., Antinociceptive Activity of *Trichilia catigua* Hydroalcoholic Extract: New Evidence on Its Dopaminergic Effects. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.* 2011.

WANG et al., Effects of ischemic postconditioning in patients with acute myocardial infarction undergoing primary PCI: a review and meta-analysis. v. 94, n. 37, p. 2914-2918, 2014.

WORLD BANK, *Toward a Healthy and Harmonious Life in China: Stemming the Rising Tide of Non-Communicable Diseases*, World Bank, Washington, DC, USA, 2011.

YAO; GROSS. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol*, n. 264, p. 2221-2225, 1993.

YAMAGUCHI et al., Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in in situ rat heart. *Heart Vessels*, n. 12, p. 74-83, 1997.

YANG et al., *Toona sinensis* inhibits LPS-induced inflammation and migration in vascular smooth muscle cells via suppression of reactive oxygen species and NF- κ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2014. doi: 10.1155/2014/901315.

ZWEIER; TALUKDER, The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* v. 70, n. 2, p. 181-90, 2006.

ZHANG et al., National assessment of early β -blocker therapy in patients with acute myocardial infarction in China, 2001-2011: The China Patient-centered Evaluative Assessment of Cardiac Events (PEACE)–Retrospective AMI Study, *American Heart Journal.* v. 170, n. 3, 2015.

ANEXO A – ASPECTOS ÉTICOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 50/2014

TÍTULO: Investigação do potencial cardioprotetor da fração acetato de Etila do extrato de *Trichilia catigua* em ratos infartados.

RESPONSÁVEL: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro (Esenfar- Ufal)

OBJETIVO: Investigar o potencial cardioprotetor da fração acetato de etila do extrato de *Trichilia catigua* (AETC) em ratos infartados.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 27/11/2014 a 27/11/2016

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Ratos heterogênicos	Wistar	84

Maceió, 26 de novembro de 2014

Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no uso de Animais
 SIAPE 1120858