



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ANDREZA MELO DE ARAUJO

NARINGINA EXERCE EFEITO CARDIOPROTETOR NA
INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CORAÇÃO DE
RATO ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

SÃO CRISTÓVÃO

2019

ANDREZA MELO DE ARAUJO

**NARINGINA EXERCE EFEITO CARDIOPROTETOR NA
INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CORAÇÃO DE
RATO ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao núcleo de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dra^a Carla Maria Lins de Vasconcelos

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Araujo, Andreza Melo de
A663n Naringina exerce efeito cardioprotetor na injúria de isquemia-reperusão em coração de rato através da redução do estresse oxidativo / Andreza Melo de Araujo; orientadora Carla Maria Lins de Vasconcelos. – São Cristóvão, SE, 2019.
77 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Coração. 2. Stress oxidativo. 3. Isquemia. 4. Reperusão miocárdica. 5. Flavonoides. I. Vasconcelos, Carla Maria Lins de, orient. II. Título.

CDU 612.17:615.22

ANDREZA MELO DE ARAUJO

**NARINGINA EXERCE EFEITO CARDIOPROTETOR NA
INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CORAÇÃO DE
RATO ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao núcleo de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Presidente: Prof^ª Dra^a Carla Maria Lins de Vasconcelos

1º Examinador: Prof Dra^a Raquel Moreira de Britto

2º Examinador: Prof Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

Dedico este mestrado aos meus pais, Carlos Alberto Barbosa de Araujo (*in memoriam*) e Rosélia Melo de Araujo, e aos meus irmãos, Aislan Barbosa de Araujo e Alana Melo de Araujo, pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, **a Deus** por sempre guiar meus passos e fortalecer espiritualmente nos momentos de dificuldade.

A **meus pais**, Carlos Alberto Barbosa de Araujo (*in memoriam*) e Rosélia Melo de Araujo, e aos **meus irmãos**, por me incentivarem na vida acadêmica, pelo amor e carinho, por acreditarem sempre em meu potencial. Enfim, por mostrar a importância da família e apresentando a mim o caminho da honestidade e da persistência. Amo vocês!

Aos **familiares** pelo apoio durante essa jornada, principalmente aos meus avós e a Felipe.

A **minha orientadora**, Carla Vasconcelos, por ter me recebido tão bem, mesmo sem me conhecer, e ter acreditado em meu potencial, ter me confortado em momentos de angústia, pela transmissão do conhecimento e paciência ao ensinar, pelo companheirismo, pelos momentos de diversão, pela amizade, mas também pelos puxões de orelha nos momentos necessários. Meu muito obrigada por ter contribuído nessa fase tão especial da minha vida.

Aos **amigos** que compartilharam comigo os momentos de angústia no início do mestrado e por ter me acolhido tão bem e terem me dado forças para continuar. Obrigada Cristiani, Paula, Dani, Júnior, Mércia, Neildes, Ilza, Vivi, Jéssica, Maiara, Eline, Ivana, João, Dani, Roberta, Vinícius, Felipe, Annanda, Luis André, Dário, Carol. E aos outros amigos que me ajudaram de alguma forma, Thiago Henrique, Jymmis, Luana, Maraisa e Talita. Agradeço também aos amigos de Nossa Senhora do Socorro por terem me apoiado durante esses 2 anos.

Aos **companheiros de laboratório**, Diego, Guilherme, Bia, Carol, Julio e Vinícius, pelo compartilhamento de saberes, divertimento e parceria em experimentos e, principalmente, a Katharina, Evaldo e Michael. Gosto muito de vocês!

Aos meus **chefes**, Hugo Xavier e Maria do Carmo, pelo incentivo e continuidade no seguimento do mestrado.

Aos **professores** pelo constante conhecimento repassado contribuindo para formação profissional.

Aos **meus alunos da UNIT** por sempre terem compreendido a correria no desenvolvimento do mestrado.

A **Renivan**, melhor secretário que o PROCFIS poderia ter, pela paciência e disponibilidade sempre em me ajudar e também a me acalmar nos momentos de estresse e incertezas.

Agradeço ao apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** com código de financiamento 001.

Aos **servidores** pelo trabalho e companheirismo, educação e sempre tentando me animar nos momentos de cansaço.

Aos **animais** que puderam contribuir para o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

NARINGINA EXERCE EFEITO CARDIOPROTETOR NA INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CORAÇÃO DE RATO ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO. ARAUJO, A.M., Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.

A injúria de isquemia-reperfusão (IR) leva a uma diminuição do suprimento de oxigênio causando danos irreversíveis ao coração. A reperfusão da artéria é necessária para restabelecer o fluxo sanguíneo, entretanto, pode amplificar a injúria miocárdica. Estudos têm mostrado que compostos naturais com atividades antioxidantes pode minimizar a lesão da IR. A naringina (NGR), um flavonoide com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias possui capacidade de reduzir a aterosclerose. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos cardioprotetores do pré-tratamento com a NGR em corações submetidos à injúria de IR. Foram utilizados ratos Wistar machos (n=60), divididos em 4 grupos, e pré-tratados por via oral durante 7 dias: 1. Controle (solução salina 0,9% + DMSO 25%) sem injúria de IR, 2. Veículo + IR (solução salina 0,9% + DMSO 25%) submetidos a IR, 3. NGR + IR (solução salina 0,9% + DMSO 25% + NGR 25 mg/kg) e 4. NAC + IR (solução salina 0,9% + DMSO 25% + N-acetilcisteína-NAC) 100 mg/kg). Após os tratamentos, os corações foram montados em sistema de Langendorff e submetidos a isquemia global (30 min) seguido de 60 min de reperfusão. Foram avaliados os parâmetros eletrocardiográficos (PRi, QTc, QRS e frequência cardíaca) (n=7) e contráteis (pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE), derivadas da contração (+dP/dt) e do relaxamento (-dP/dt) (n=10). Também foram avaliados pressão coronariana (PC) (n=10), escore de arritmias e lactato desidrogenase (LDH) no perfusato (n=5). A avaliação do estresse oxidativo foi feita com base na determinação da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica (TBARS), atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), grupamentos sulfidrilas totais (SH) e carbonilação de proteínas (n=5). O pré-tratamento com NRG aumentou a PDVE, +dP/dt e -dP/dt induzida pela IR (p<0,05), resultado similar ao grupo tratado com NAC. A frequência cardíaca apresentou-se aumentada nos animais tratados com NGR quando comparado ao grupo veículo+IR (p<0,05). Não houve diferença significativa em relação à PC entre os grupos experimentais. Além disso, no eletrocardiograma, não foi possível detectar inversão da onda T e supradesnivelamento do segmento ST no grupo tratado com NGR. Não foi observada alteração nos intervalos PRi, QTc e duração do complexo QRS entre os grupos experimentais. O pré-tratamento com NGR diminuiu o escore de arritmias de 21,4 ± 2,48 u.a (veículo+IR) para 5,5 ± 0,72 u.a. (NRG+IR) associado à redução de arritmias mais graves tais como fibrilação ventricular (p<0,05). Os resultados mostraram redução de 78% do LDH no perfusato dos animais pré-tratados com NGR, associada à redução da área de infarto para 10% quando comparado ao grupo veículo+IR (47%) (p<0,05). Os resultados mostraram aumento na produção de EROs no grupo veículo+IR (1,61 ± 0,30 u.a., p<0,05) quando comparado ao grupo controle (1,0 ± 0,14 u.a. p<0,05) e redução no grupo NRG+IR (1,11 ± 0,10 u.a. p<0,05). O pré-tratamento dos animais com NRG foi capaz de restabelecer as atividades da CAT e SOD em 61% e 50%, respectivamente. Os resultados mostraram diminuição da peroxidação lipídica no grupo NRG+IR (1,48 ± 0,47 nmol MDA/mg de proteína) em relação ao veículo+IR (3,38 ± 0,47 nmol MDA/mg de proteína) (p<0,05). Não houve alteração na determinação dos grupamentos sulfidrilas totais (SH) e carbonilação de proteínas nos grupos experimentais avaliados. Concluímos que a NRG exerce efeito cardioprotetor na injúria da IR por diminuir dano oxidativo e restaurar a atividade das enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: naringina, isquemia-reperfusão, coração, estresse oxidativo, rato.

SUMMARY

NARINGIN PROMOTES CARDIOPROTECTIVE EFFECT IN THE INJURY OF ISCHEMIA-REPERFUSION IN RAT HEART THROUGH DECREASE OXIDATIVE STRESS. ARAUJO, A.M., Master's Dissertation in Physiological Sciences, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, 2019.

Cardiac ischemia-reperfusion (IR) injury leads to a decrease in myocardial oxygen supply and irreversible damage of heart. Reperfusion of artery is necessary to restore blood flow of heart, however, it may amplify myocardial injury. Studies have shown that natural compounds with antioxidant activity can minimize injury caused by IR injury. Then, naringin (NGR) is a flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory activities and that reduces the risk of atherosclerosis. The aim of the study was to evaluate the cardioprotective effects of pre-treatment with NGR in hearts submitted to IR lesion. For this, male Wistar rats (N=60) were divided into 4 groups and pre-treated orally for 7 days: 1) Control (0.9% saline solution + 25% DMSO) without IR injury; 2) Vehicle + IR (0.9% saline + 25% DMSO) submitted to IR, 3) NGR + IR (0.9% saline + 25% DMSO + 25 mg/kg NGR) and 4) NAC + 9% + DMSO 25% + N-acetyl cysteine (NAC) 100 mg/kg). After the treatments, the hearts were mounted in Langendorff type retrograde perfusion system (constant flow 8 ml/min, 37°C) and subjected to global ischemia (30 min) followed by 60 min reperfusion. In all experimental groups, the electrocardiographic parameters (PRi, QTc, QRS and heart rate) (n=7) and contractile (left ventricular pressure developed), derived of contraction (+ dP/dt) and relaxation (-dP/dt) (n=10). Coronary pressure (CP), arrhythmia score, and lactate dehydrogenase (LDH) in the perfusate (n=5) were also evaluated. The evaluation of the oxidative stress of hearts was made based on the determination of the production of reactive oxygen species, lipid peroxidation (TBARS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), total sulfhydryl groups (SH) and protein carbonylation. The results showed that pre-treatment of the animals with NGR was able to restore the reduction of PDVE, + dP/dt and -dP/dt induced by IR. Similar result to NGR was also observed in the group treated with NAC. The heart rate was increased in NGR-treated animals when compared to vehicle+IR group. There was no significant difference in relation to CP between the experimental groups studied. Furthermore, on the electrocardiogram, it was not possible to detect T wave inversion and ST segment elevation in the hearts of animals treated with NGR. No change was observed in the PRi, QTc intervals and duration of the QRS complex between the experimental groups (n=7). Pretreatment of the animals with NGR attenuated the severity of the arrhythmias, decreasing the arrhythmia score from 21.4 ± 2.48 a.u. (vehicle + IR) to 5.5 ± 0.72 a.u. (NGR) associated to a decrease in the occurrence of more severe arrhythmias such as ventricular fibrillation. The results showed a reduction of 78% of LDH in the perfusate of animals pretreated with NGR, associated with a reduction of the infarct area to 10% when compared to vehicle+IR group (47%) ($p < 0.05$). The results show an increase in ROS production in the vehicle + IR group (1.61 ± 0.30 a.u, $p < 0.05$) when compared to the control group (1.0 ± 0.14 a.u.) and reduction in the NRG+IR (1.11 ± 0.10 a.u, $p < 0.05$). Treatment of animals with NRG was able to restore CAT and SOD activities by 61% and 50%, respectively. The results showed a decrease in lipid peroxidation in the NRG + IR group (1.48 ± 0.47 nmol MDA/mg protein) in relation to vehicle + IR (3.38 ± 0.47 mmol MDA/mg protein) ($p < 0.05$). There was no change in the determination of total sulfhydryl groups (SH) and protein carbonylation in the experimental groups evaluated. We conclude that NRG exerts cardioprotective effect against IR injury by reducing oxidative damage and restoring the activity of antioxidant enzymes.

Key words: naringin, ischemia-reperfusion, heart, oxidative stress, rat.

LISTA DE QUADROS

Quadro1- Classificação do escore de arritmias.	23
Quadro 2- Composição dos tampões utilizados nas preparações dos tecidos cardíacos para os ensaios bioquímicos.	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro de um eletrocardiograma normal.....	6
Figura 2 - ECG demonstrando IAM com supradesnivelamento do segmento ST.....	6
Figura 3 - Alterações no metabolismo celular presentes no período de isquemia/reperfusão.....	9
Figura 4 - Formação de Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	11
Figura 5 – Reação de Fenton.....	11
Figura 6 - Reação de Haber-Weiss.....	12
Figura 7 -Formação do oxigênio singlet.....	12
Figura 8 - Esquema do sistema de defesa antioxidante.....	13
Figura 9 - Estrutura básica de um flavonoide.....	15
Figura 10 - Estrutura química das classes de flavonoides.....	15
Figura 11 - Estrutura química da naringina.....	16
Figura 12 - Delineamento experimental do tratamento dos animais.....	20
Figura 13 - Imagem representativa do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff usado para registrar simultaneamente o ECG e a pressão intraventricular.....	21
Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental de IR.....	22
Figura 15 - Medida do Malonaldeído (MDA) em coração de ratos submetidos à isquemia reperfusão (IR).....	28
Figura 16 -Naringina preveniu a redução da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) induzida pela isquemia reperfusão (IR).....	30
Figura 17 - Naringina preveniu a alteração no segmento ST e inversão da onda T induzida pela isquemia reperfusão (IR).....	32
Figura 18 -Naringina reduziu a ocorrência de arritmias induzida pela isquemia reperfusão (IR).	33
Figura 19 - Naringina reduziu a área de infarto e o extravasamento da enzima Lactato desidrogenase (LDH) nos corações submetidos a isquemia reperfusão (IR).....	35
Figura 20 -Naringina reduziu a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) gerado pela injúria da isquemia reperfusão (IR).....	36
Figura 21 - Naringina reduziu o estresse oxidativo gerado pela injúria da IR ao aumentar a atividade das enzimas endógenas.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- dP/dt –	Derivada temporal de pressão ventricular mínima
+dP/dt –	Derivada temporal de pressão ventricular máxima
¹ O ₂ –	Oxigênio singlet
AAS –	Ácido acetilsalicílico
ANT –	Adenina nucleotídeo translocase
ATP –	Adenosina trifosfato
AVC –	Acidente vascular cerebral
BPA –	Bisfenol A
Bpm –	Batimentos por minuto
BVP –	Batimento ventricular prematuro
CAC –	Calcificação arterial coronariana
CAM KII –	Proteína quinase II
CAT –	Catalase
CK –	Creatinoquinase
CK-MB –	Creatinoquinase MB
CTE –	Cadeia transportadora de elétrons
Cu –	Cobre
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DNPH –	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DVCs –	Doenças Cardiovasculares
ECG –	Eletrocardiograma
EROs –	Espécies reativas de oxigênio
FADH –	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
FC –	Frequência cardíaca
Fe ²⁺ –	Ferro reduzido
Fe ³⁺ –	Ferro oxidado
FV –	Fibrilação ventricular
GP _x –	Glutationaperoxidase
GR –	Glutationaredutase
GSH –	Glutationa reduzida

GSSG –	Glutationa oxidada
H ₂ O –	Água
H ₂ O ₂ –	Peróxido de hidrogênio
IAM –	Infarto Agudo do Miocárdio
IR –	Isquemia e reperfusão
LDH –	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCU –	Uniportador de cálcio
MDA –	Malondealdeído
MGP –	Mercaptopropionilglicina
Min –	Minutos
Mn –	Manganês
NAC –	N-aceticisteína
NADH –	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NO –	Óxido Nítrico
NOS –	Óxido nítrico sintase
NRG –	Naringina
O ₂ –	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-} –	Ânion superóxido
OH ⁻ –	Radical hidroxila
OH [•] –	Radical hidroxila
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PBS –	Tampão fosfato salino
PCR –	Proteína C - reativa
PDVE –	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PRi –	Intervalo PR
PTPM –	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
QRS –	Despolarização ventricular
QT –	Intervalo QT
QTc –	Intervalo QT corrigido
RL –	Radicais Livres
RNA –	Ácido ribonucleico
RR –	Intervalo RR

RyR ₂ –	Rianodina 2
RyRO _x –	Rianodina 2 oxidada
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SERCA –	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SH –	Sulfidril
SNC –	Sistema nervoso central
SNO –	S-nitrosotiol
SOD –	Superóxido dismutase
SUS –	Sistema Único de Saúde
TCA –	Ácido tricloroacético
TTC –	2,3,5-Trifeniltetrazólio
TV –	Taquicardia ventricular
u.a. –	Unidades arbitrárias
Zn –	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Infarto Agudo do Miocárdio.....	4
2.2 Eletrocardiograma.....	5
2.3 Injúria de isquemia-reperfusão cardíaca.....	7
2.4 Estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante.....	11
2.4.1 Flavonoides.....	14
2.4.2 Naringina (NRG).....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Aspectos éticos.....	19
3.2 Animais, grupos experimentais, tratamento e dose.....	19
3.3 Montagem experimental do coração em sistema de perfusão aórtica para determinação dos parâmetros cardíacos.....	20
3.3.1 Determinação dos parâmetros contráteis e eletrocardiográficos (ECG).....	22
3.3.2 Determinação da pressão coronariana.....	22
3.3.3 Determinação do score e ocorrência de arritmias.....	23
3.4 Ensaio bioquímico.....	23
3.4.1 Preparação da Amostra.....	23
3.4.2 Dosagem de proteínas.....	24
3.4.3 Determinação da atividade da catalase.....	24
3.4.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	24
3.4.5 Medições da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	25
3.4.6 Mensuração de produtos da peroxidação lipídica.....	25

3.4.7 Determinação das proteínas carboniladas.....	26
3.4.8 Determinação de grupamentos sulfidrila.....	26
3.4.9 Determinação da área de infarto.....	27
3.4.10 Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH).....	27
3.5 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Determinação da dose de naringina a ser utilizada no pré-tratamento dos animais	28
4.2 Efeito da naringina na contratilidade cardíaca.....	28
4.3 O pré-tratamento com naringina reduziu a gravidade das arritmias cardíacas induzidas pela IR	31
4.4 O pré-tratamento com a NRG reduziu a área de infarto induzido pela IR	34
4.5 Naringina diminuiu a produção de EROs nos corações submetidos à IR	36
4.6 Naringina diminuiu o estresse oxidativo nos corações submetidos à IR	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO A – FORMULÁRIO CEPA	58

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) permanecem como uma das principais causas de óbitos no mundo, causando mortalidade de 30% no Brasil nos últimos anos (BAPTISTA; QUEIROZ; RIGOTTI, 2018). A falta de suprimento de oxigênio contribui para o desenvolvimento da doença isquêmica levando ao acidente vascular cerebral (AVC) e/ou infarto agudo do miocárdio (IAM).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (2017), a doença isquêmica do coração e o AVC são as principais causas de morte no mundo há 15 anos, representando 15 milhões de óbitos em 2015. Dentre as DCVs, o IAM é a doença com a principal causa de mortes no país, com registro de 183,3 casos para cada 100.000 óbitos anuais (DATASUS, 2014). Em estudo realizado por Santos et al. (2018), foi evidenciado aumento das taxas de mortalidade por IAM nas regiões Norte e Nordeste no Brasil o que pode ser decorrente de disparidades socioeconômicas entre as regiões e ao acesso aos serviços de saúde existentes no país. Em Sergipe foram registrados 3.262 óbitos ocasionados pelas DCVs, e dentre essas doenças, 750 óbitos ocorreram por IAM (BRASIL, 2015).

A fim de reduzir a morbimortalidade no Brasil relacionada às doenças do aparelho circulatório, foi implementada, em 2001, a Política Nacional de Promoção à Saúde e o Programa de Prevenção e Controle da Hipertensão e do Diabetes (HIPERDIA) para cadastramento e acompanhamento de portadores de hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus atendidos na rede ambulatorial do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2019). Além disso, o Ministério da Saúde, através da portaria nº2 2.994/2011, aprovou a “Linha de Cuidado do Infarto Agudo do Miocárdio e o Protocolo de Síndromes Coronarianas Agudas, que cria e altera procedimentos na Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS” (BRASIL, 2011).

A principal causa do IAM se dá pela morte celular em virtude de isquemia causada por obstrução do fluxo coronariano, que pode ser transitório ou permanente, geralmente ocasionada por trombose de uma artéria coronariana em uma placa ateromatosa (MAIA, 2014). A aterosclerose é caracterizada por ser uma doença inflamatória que causa lesões na túnica íntima, camada mais interna das artérias, causando o seu enrijecimento e surgimento de placas de ateroma ou fibrogordurosas e consequente obstrução do lúmen (MARTELLI, 2014). De acordo com Piegas (2015), a restauração do fluxo sanguíneo com o retorno da reperfusão diminui

significativamente a mortalidade hospitalar do IAM. Dentre as medidas emergenciais utilizadas logo na chegada do paciente ao ambiente hospitalar, têm-se o uso de: (a) terapêutica fibrinolítica, pois abrevia o tempo de isquemia e reduz a área de infarto; (b) oxigênio (O₂) em pacientes com saturação de O₂ < 94%, congestão pulmonar ou na presença de desconforto respiratório; (c) analgesia com o uso de sulfato de morfina endovenosa, pois a dor provocada pela ativação do sistema nervoso simpático aumenta o consumo de O₂ pelo miocárdio isquêmico; (d) nitratos na forma sublingual de rápida ação, tais como: nitroglicerina, mononitrato de isossorbida ou dinitrato de isossorbida, pois reverte eventual espasmo, provoca alívio da dor, controla a hipertensão arterial e a congestão pulmonar, se presentes; (e) antiplaquetários, principalmente o ácido acetilsalicílico (AAS) que reduz a mortalidade em 23%; (f) anticoagulantes para evitar morte por sangramentos; (g) betabloqueadores em pacientes hipertensos e taquicárdicos; (h) antiarrítmicos; (i) hipotermia terapêutica, pois estudos comprovaram que pacientes acometidos por IAM que tiveram parada cardiorrespiratória causada por fibrilação ventricular (FV) que foram submetidos à hipotermia mostraram melhora neurológica e redução da mortalidade hospitalar.

Dessa forma, considerando que a morbimortalidade das DCVs permanece elevada mesmo com programas estratégicos para sua redução e com o uso de fármacos já existentes, torna-se essencial compreender os mecanismos de injúria reperfusão (IR) a fim de identificar novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos danos cardíacos ocasionados pela IR (LV et al., 2017).

Diversos estudos têm mostrado a importância dos flavonoides na cardioproteção da IR (CHENG et al., 2018; LIU et al., 2016; LV et al., 2017; QU et al., 2016; ZENG et al., 2018). A propriedade antioxidante dos flavonóides é a que desempenha papel fundamental na prevenção das DCVs (PIETTA, 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Considerando que na fisiopatologia do IAM a formação das EROs desempenha papel decisivo no mecanismo de injúria da IR (HAKIM, 1993; PODEROSO et al., 1996; THOMAS et al., 2008), o estresse oxidativo ocorrerá como resultado do desequilíbrio entre as EROs e o sistema de defesa antioxidante (endógeno ou exógeno). O dano oxidativo e processo antioxidante estão associados à transferência de elétrons influenciando o estado redox das células e do organismo. O estado redox alterado estimula ou inibe a via de sinalização das proteínas influenciando a síntese de enzimas antioxidantes, processos de reparação, inflamação, apoptose e proliferação celular (DURACKOVÁ, 2010). Além disso, as EROs podem provocar peroxidação lipídica o que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984).

Dentre os flavonoides, a naringina (NRG) tem apresentado diversos efeitos farmacológicos e terapêuticos, tais como: anti-inflamatório, anti-apoptótico e anti-autofágico (KANDEMIR et al., 2017) contribuindo para a melhora nefropatia diabética (ZHANG et al., 2017) e retinopatia diabética (LIU et al., 2017). Além disso, apresentou efeito antioxidante na IR em músculo esquelético de ratos (GÜRSUL et al., 2016) e efeito cardioprotetor na cardiomiopatia induzida pelo tratamento com doxorubicina utilizada no tratamento do câncer (KWATRA et al., 2016).

Em estudo realizado por Rajadurai; Prince (2009), a NRG promoveu cardioproteção no IAM induzido pelo isoproterenol e na prevenção do AVC em ratos hipertensivos. Rani et al. (2013) constatou cardioproteção da NRG em modelo de IR por oclusão da coronária descendente. O pré-tratamento com NRG na cardiotoxicidade induzida pelo bisfenol A (BPA) apresentou efeito cardioprotetor em virtude da capacidade antioxidante desse flavonoide e pela supressão da peroxidação lipídica (KHODAYAR et al., 2018).

Apesar dos diversos efeitos já descritos na literatura, estudos que envolvam a cardioproteção da NRG em modelo de IR são limitados. Assim, levando-se em consideração o potencial terapêutico da NRG já evidenciado e a limitação terapêutica do IAM, o presente trabalho se propôs elucidar a hipótese de que esse flavonoide possa contribuir para prevenir lesões decorrentes da IR cardíaca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infarto Agudo do Miocárdio

Pesquisas relacionadas à prevenção ou tratamento do IAM é de fundamental importância em virtude da alta prevalência, mortalidade e morbidade da doença. Em um levantamento realizado por 10 anos (2010-2014), o IAM, angina e outras doenças isquêmicas do coração ocasionaram 1.069.683 (8,80%) de óbitos quando comparados às outras doenças. Até o mês de junho de 2019, 183.452 pessoas foram a óbito por doenças cardiovasculares no Brasil (BRASIL, 2015). Além disso, a maioria das mortes por IAM ocorre nas primeiras horas de manifestação da doença, sendo 40% a 65% na primeira hora e, aproximadamente, 80% nas primeiras 24 horas (PIEGAS, 2015).

O IAM reflete a morte dos cardiomiócitos que é causada por um desequilíbrio entre a oferta e demanda de nutrientes no tecido cardíaco em virtude de uma interrupção do fluxo sanguíneo que pode ser transitório ou permanente (SIERVULI et al., 2014). Com essa interrupção, ocorrem às primeiras alterações de ordem estrutural com diminuição do glicogênio celular e as miofibrilas são relaxadas com a ruptura do sarcolema, tais modificações são observadas após 10 a 15 min do início da isquemia (JENNINGS; GANOTE, 1974). Assim, a medida que as células são privadas de oxigênio, a isquemia vai acontecendo e a morte celular ocorre em questão de minutos a horas (CHEEVER; HINKLE, 2015).

Alguns fatores podem ocasionar o IAM, tais como: ruptura de placa aterosclerótica com trombose; condições cardíacas (ex. miocardite, cardiomiopatia, procedimento de revascularização coronariana; síndrome do Takotsubo; ablação por cateter) e condições sistêmicas (ex. sepse, doença renal crônica, hemorragia subaracnoide, embolismo pulmonar e hipertensão pulmonar) (THYGESEN et al., 2018).

Os fatores de risco para o IAM são divididos em três categorias: 1) fatores de risco não modificáveis (idade, sexo e história familiar), 2) fatores de risco modificáveis (tabagismo, ingestão alcoólica, inatividade física, alimentação inadequada, hipertensão, diabetes, dislipidemias e síndrome metabólica) e 3) fatores de risco emergentes (proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio, calcificação arterial coronariana (CAC), homocisteína, LDL) (BOATENG; SANBORN, 2013).

Dentre dos sintomas apresentados, tem-se a mais predominante, a dor torácica de forte intensidade presente em cerca de 75-85% dos pacientes, podendo ter duração maior que 20 min.

Os sintomas clássicos são: dor no peito, dor que irradia para os ombros, braço esquerdo, pescoço e maxilar, dor abdominal, falta de ar, perda temporária da consciência e sensação de morte iminente (PIEGAS, 2015).

O diagnóstico do IAM pode ser estabelecido por alterações no eletrocardiograma (supra ou infradesnivelamento do segmento ST e inversão da onda T) e/ou elevação dos marcadores de necrose, tais como: creatinoquinase (CK), creatinoquinase-MB (CK-MB), mioglobina e troponina I (THYGESEN et al., 2018).

2.2 Eletrocardiograma

O eletrocardiograma (ECG) é um dos exames mais precisos para o diagnóstico do IAM, é simples, barato e não invasivo. Além disso, permite identificar situações de risco de morte súbita (PASTORE et al., 2016). Assim, por meio de um aparelho que mede impulsos elétricos do músculo cardíaco fornece um traçado característico que permite a identificação de eventuais cardiopatias (MANSUR et al., 2006).

Com a ocorrência do batimento cardíaco, surge uma progressão ordenada de despolarização com início nas células marca-passo do nodo sinusal. Em seguida, o impulso é transportado pelas vias internodais nos átrios gerando o traçado representado pela onda P (Fig. 1) que corresponde, portanto à despolarização dos átrios (SUBRAMANIAN, 2017). O intervalo PRi corresponde do início da onda P ao início do complexo QRS e varia conforme frequência cardíaca (FC) e a idade (PASTORE et al., 2016). O complexo QRS representa a despolarização dos ventrículos (SUBRAMANIAN, 2017). O intervalo QT é a representação do tempo gerado do início da despolarização (início do QRS) e final da repolarização ventricular (final da onda T) (LUX, 2017).

O intervalo RR corresponde à frequência cardíaca mensurada pela distância entre duas ondas R sucessivas. A frequência cardíaca (RR) pode alterar o intervalo QT, por isso o QT pode ser corrigido pela frequência cardíaca (QTc) pela fórmula de Bazett: $QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$ em segundos (POSTEMA; WILDE, 2014).

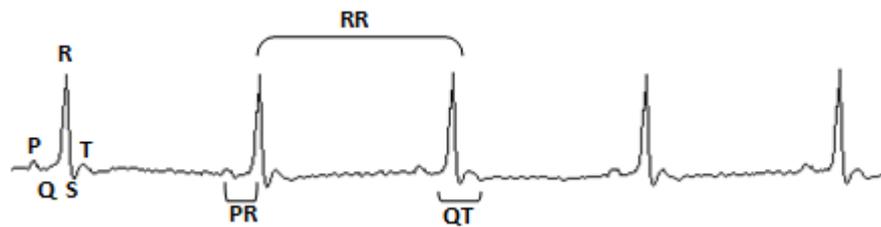


Figura 1- Registro de um eletrocardiograma normal. A onda P representa a despolarização dos átrios, o complexo QRS a despolarização dos ventrículos, a onda T a repolarização ventricular, o intervalo RR a frequência cardíaca.

Na presença do IAM o sinal mais comum é a perda discreta da concavidade do segmento ST geralmente com supradesnivelamento e aumento na amplitude da onda T, como pode ser observado na Fig. 2 (MANSUR et al., 2006). A isquemia miocárdica altera a resistência da membrana celular. Assim, permite a saída de pequena quantidade de K^+ do meio intracelular para o extracelular fazendo com que haja uma modificação no equilíbrio elétrico da repolarização entre o epicárdio e o endocárdio. Em virtude disso, a repolarização na zona das células isquêmicas ocorre de maneira mais lenta sendo identificado no ECG pela inversão da onda T deixando ela negativa. Da mesma forma, o desnível do segmento ST é explicado pela maior saída de K^+ intracelular, quanto mais K^+ no meio extracelular mais positivo fica o potencial transmembrana de repouso no final da despolarização. O desnível de ST (em relação à linha isoeletrica) ocorrerá, portanto pelo potencial positivo na zona lesada que poderá ser no endocárdio ou epicárdio. Se a lesão ocorre na região subendocárdica ocorre infradesnivelamento do segmento ST em virtude da orientação do vetor ser do epicárdio para o endocárdio. Se a lesão é subepicárdica o vetor se orienta do endocárdio para o epicárdio gerando um supradesnivelamento do segmento ST (AZEVEDO, 1999).

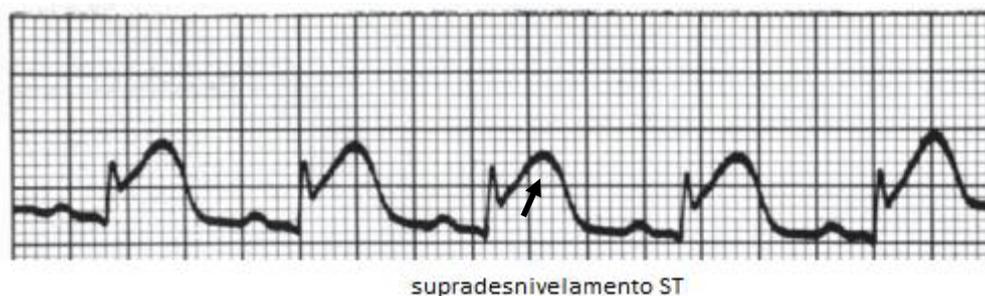


Figura 2- ECG demonstrando IAM com supradesnivelamento do segmento ST. Adaptado de Mansur et al. (2006).

De acordo com Gizzi e Moreira (1997) as arritmias cardíacas são a complicação mais frequente no IAM. As arritmias são caracterizadas por alterações na formação e/ou condução do impulso elétrico pelo tecido cardíaco, podendo modificar a origem e/ou a difusão fisiológica do estímulo elétrico do coração. Dessa forma, ocorre uma mudança no potencial de ação gerando despolarização rápida ou lenta ou modificações na recuperação da excitabilidade celular. As arritmias podem surgir também devido a alterações genéticas na síntese de proteínas que compõem os canais iônicos, responsáveis por gerar correntes elétricas através da membrana celular (TSE, 2016).

Dentre as causas das arritmias cardíacas podemos citar: alteração da eletrofisiologia das células miocárdicas (modificação da composição do líquido extracelular com hiperpotassemia, redução do pH, aumento da atividade das catecolaminas e liberação de substâncias arritmogênicas); modificações patológicas relacionadas à própria isquemia das fibras (redução da velocidade de condução) e alteração da geometria do ventrículo esquerdo. As arritmias mais comumente observadas são as extrassistólicas ventriculares isoladas ou complexas, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular (GIZZI; MOREIRA, 1997)

A extra-sístole ventricular ou batimento ventricular prematuro (BVP) apresenta-se como um batimento precoce originado no ventrículo, com pausa pós-extrasistólica (GUIMARÃES, 2003). As taquicardias ventriculares (TV) são a de maior morbimortalidade em virtude de poder ocasionar degeneração para fibrilação ventricular e assistolia (GOLDMAN; SCHAFER, 2012). A fibrilação ventricular (FV) é caracterizada por uma complicação grave do quadro isquêmico agudo do IAM, decorrente de distúrbios metabólicos com o desequilíbrio eletrolítico principalmente do potássio e magnésio. Sua ocorrência está presente geralmente após as 24 a 48 horas de evolução, sendo causada por um substrato composto pela fibrose e pela isquemia, e, frequentemente, vem precedida de TV rápida. Essa associação resulta em prognóstico do paciente mais grave em virtude da disfunção ventricular (PIEGAS, 2015).

2.3 Injúria de isquemia-reperfusão cardíaca

A IR é um mecanismo complexo que resulta em danos ao miocárdio que podem ser leves ou graves dependendo da duração da hipóxia (YIN et al., 2012). A falta de oxigênio no coração, geralmente ocorre como resultado de uma obstrução das artérias coronárias (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016).

Estudos mostram que o miocárdio pode tolerar uma breve exposição à isquemia, pois ativa mecanismos adaptativos para prevenir lesões. No entanto, em longos períodos de hipóxia ocorrerão danos irreversíveis culminando com necrose e apoptose celular. A reperfusão do miocárdio é um pré-requisito para preservação celular, pois quanto maior a duração da isquemia, aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando danos celulares que são disseminadas entre as células através das junções via gap (BUDAS; CHURCHILL; MOCHLY-ROSEN, 2007).

De acordo com Walters; Porter; Brookes (2012), a oclusão permanente resulta em remodelamento cardíaco e hipertrofia, enquanto que a oclusão transitória além de prejudicar a função cardíaca, no período de reperfusão ocorrem danos mitocondriais. A injúria que ocorre após a IR pode ser explicada por dois mecanismos principais: pelo aumento do cálcio intracelular e/ou pelo acúmulo de EROs (MARÍN-GARCÍA; GOLDENTHAL, 2004a, 2004b). O acúmulo de EROs provoca dano oxidativo tecidual alterando a permeabilidade das membranas celulares e provocando alterações que podem proporcionar lise celular com ativação lisossomal. A alteração da permeabilidade é comprovada pela geração de peróxidos lipídicos principalmente o malondialdeído (MDA) (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016). Em condições normais de perfusão cardíaca, o coração recebe oxigênio e substratos para gerar a adenosina trifosfato (ATP) necessário para funções cardíacas, sendo o substrato primário o lipídio com o restante fornecido por glicose (e lactato) e oxidação de substratos a fim de maximizar a redução da produção equivalente de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), e também de dinucleótido de flavina e adenina reduzido (FADH₂), que permitem a formação do ATP pela fosforilação oxidativa (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016).

Durante a isquemia, com a hipóxia há inibição da fosforilação oxidativa. Dessa forma, é ativada a via fermentativa que converte o piruvato em lactato, resultando na diminuição do pH. Em resposta ao pH ácido, o cardiomiócito tentará remover o H⁺ que estará em excesso através do trocador Na⁺/H⁺, o que acarretará no aumento do Na⁺ intracelular. Neste momento, o trocador Na⁺/Ca²⁺ começará a remover o Na⁺ e, em contrapartida, o Ca²⁺ irá acumular-se no citosol. A redução do ATP irá inibir a atividade da SERCA (Ca²⁺ATPase do retículo sarcoplasmático), o transportador ANT (adenina nucleotídeo translocase) e o transporte de Ca²⁺ dependente de ATP sarcolemal, contribuindo para o aumento do Ca²⁺ intracelular. Dessa forma, a inibição da fosforilação oxidativa será a primeira causa de diminuição de ATP e aumento do NADH os quais manterão o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM) fechado (WALTERS; PORTER; BROOKES, 2012) (Fig. 3). É importante ressaltar que, a ativação da

via fermentativa produz muito menos ATP por molécula de glicose gerando apenas 2 ATP em comparação aos 34 ATP na fosforilação oxidativa (JASWAL et al., 2011). Diversos estudos demonstraram efluxo de potássio associado à sobrecarga de cálcio intracelular no período de isquemia que resulta em arritmia e parada cardíaca (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016). Essa desregulação de íons deveria ser corrigida na reperfusão, no entanto, como será discutido a seguir, o retorno do O₂ induz mais danos ao miocárdio.

Com o início da reperfusão, o acúmulo de cálcio intracelular e o restabelecimento do pH induzem à abertura do PTPM (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016) (Fig. 3). A estrutura molecular do PTPM não está bem elucidada, no entanto, sabe-se que ele é um poro de alta condutividade e desempenha papel crucial na morte celular. O MCU (uniportador de cálcio) está localizado na membrana interna da mitocôndria e é responsável pela entrada de Ca²⁺ na matriz mitocôndrial (TULLIO et al., 2016).

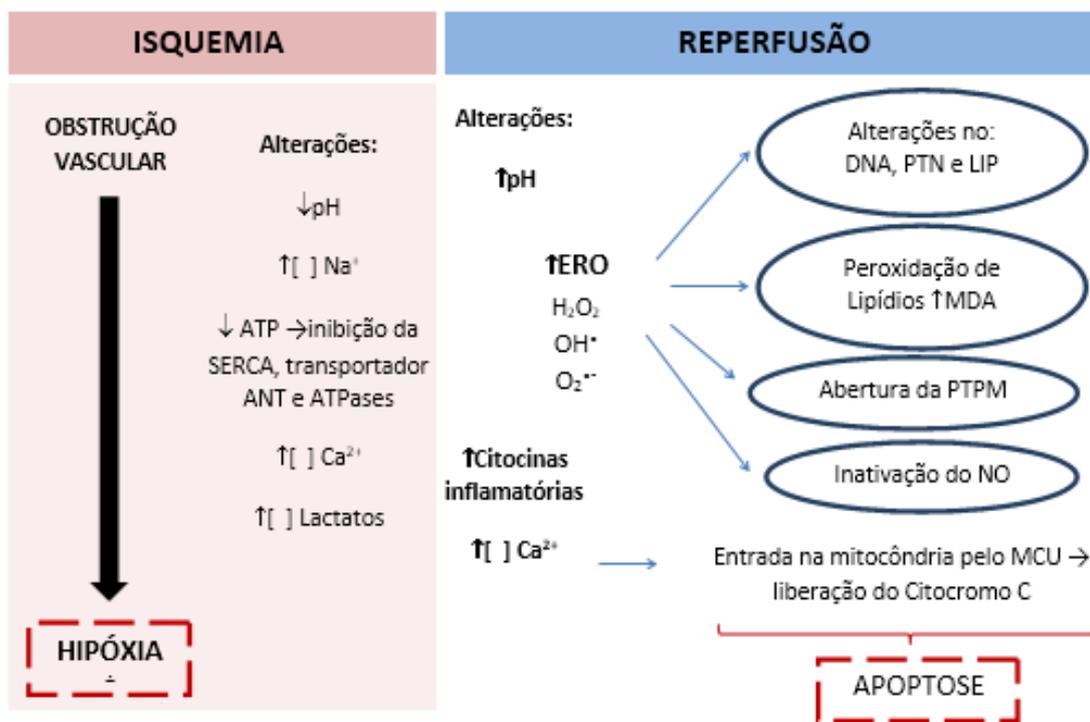


Figura 3 -Alterações no metabolismo celular presentes no período de isquemia/reperfusão. MDA - malondaldeído; PTPM - poro de transição de permeabilidade mitocondrial; MCU - uniportador de cálcio; NO - óxido nítrico; ANT - adenina nucleotídeo translocase).

A abertura do PTPM determina a apoptose e a necrose liberando citocinas inflamatórias que ativam os leucócitos exacerbando a inflamação e levando ao surgimento de áreas isquêmicas com morte celular. As áreas infartadas reduzem a contratilidade cardíaca em virtude da perda funcional do miocárdio, remodelação progressiva e fibrose no tecido (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016). A apoptose irá ocorrer através da liberação do citocromo c

(LOOR et al., 2011). A intensidade elevada do estresse oxidativo e a reação inflamatória no tecido perfundido irá ocasionar danos estruturais e metabólicos, tais como: a oxidação dos lipídios da membrana, que pode ser comprovada pelo aumento da produção de MDA um específico biomarcador de peroxidação lipídica (TSIKAS, 2017); a carbonilação de proteínas, oxidação de aminoácidos e danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Ainda durante o período da reperfusão, com a ativação da cadeia transportadora de elétrons (CTE) são formadas as EROs. Isso ocorre porque com o retorno do O_2 , com a ativação da fosforilação oxidativa e CTE, há formação de pequena quantidade de EROs na forma de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no complexo I e III que são convertidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) podendo ser na matriz mitocondrial dependente de Mn^{2+} (Mn-SOD) ou de Cu e Zn no espaço intertransmembranar (Cu/Zn-SOD) (BROWN; WILLIS; BERTHIAUME, 2016; TULLIO et al., 2016). Além desses EROs anteriormente falado, há a produção do radical hidroxila (OH^{\bullet}) através da reação de Fenton dependente de Fe^{2+} ou a reação de Haber-Weiss dependente de Fe^{3+} em que o peróxido (H_2O_2) é convertido em OH^{\bullet} , sendo esta altamente reativa (OLSZEWER; FLAM; ELLOVITCH, 2017). Vale ressaltar que, o H_2O_2 reage reversivelmente com tióis proteicos em baixos resíduos de cisteína e metionina para modular a função da proteína. Assim, há modificação de uma infinidade de sinalização celular, incluindo a homeostase de íons, contração, hipertrofia, autofagia, morte celular e produção de energia (BROWN; GRIENDLING, 2015).

A formação de EROs também pode remover as ações cardioprotetoras do óxido nítrico (NO). Na fase inicial de reperfusão os níveis de NO diminuem e sua função de eliminação de RL, reestabelecimento de fluxo sanguíneo e melhora da função do ventrículo esquerdo ficam comprometidos (PENNA et al., 2009; RASSAF et al., 2006; ZWEIER; TALUKDER, 2006). Em condições de hipóxia o NO se liga ao citocromo oxidase situado no complexo IV na mitocôndria inibindo a respiração. Isso ocorre como mecanismo de defesa, pois há redução da produção energética resultando em atenuação do consumo de O_2 . Quando a reperfusão se inicia, a formação do NO diminui e conseqüentemente não consegue mais bloquear a CTE restaurando a produção de energia (TOTZECK; HENDGEN-COTTA; RASSAF, 2017). Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ produzido na fase de reperfusão reage com o NO gerando peróxidonitrito que é capaz de nitrar aminoácidos aromáticos causando danos às proteínas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os radicais livres (RL) podem ser formados pela perda de um único elétron (e^-) ou pelo ganho de um e^- de uma substância não radicalar ou pela quebra de uma ligação covalente

quando um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo. Grande parte dos RL possui meia-vida curta sendo capazes, portanto, de reagir rapidamente com vários compostos atingindo as membranas celulares (TESTON; NARDINO; PIVATO, 2017).

2.4 Estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante

Em condições fisiológicas há uma baixa produção de RL no organismo, sua produção é inevitável, pois são necessários para o processo de respiração celular nas mitocôndrias (CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012; SILVA, 2010). Dessa forma, a produção endógena é obtida a partir da CTE na mitocôndria por meio da redução do O_2 . Assim, o O_2 é reduzido pelo citocromo c oxidase à duas moléculas de água e o NADH é oxidado a NAD^+ , para que haja a produção de ATP. A completa redução da molécula de oxigênio gera duas moléculas de água e quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna (SANTOS, 2013).

O estresse oxidativo é uma condição metabólica onde ocorre a perda do equilíbrio entre a produção de EROs e dos agentes antioxidantes endógenos podendo ocorrer lesões ao DNA e ao RNA, assim como ocorrer a lipoperoxidação da membrana, evento que prejudica o transporte através da bicamada lipídica e oxidação das proteínas. As EROs são formadas durante o transporte de elétrons na mitocôndria por meio da redução parcial do oxigênio formando espécies reativas, tais como: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^{\bullet} (Fig.4) (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

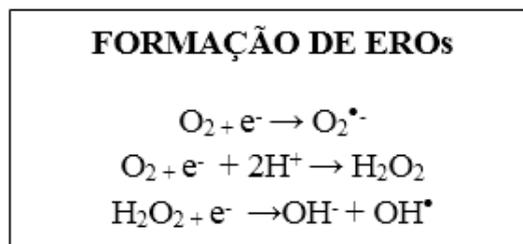


Figura 4 - Formação de Espécies reativas de oxigênio (EROs). Adaptado de Flam et al. (1997).

O $O_2^{\bullet-}$ é produzido por redução monovalente quando o O_2 recebe um elétron. Possui grande instabilidade com vida-média muito curta, sendo considerado um oxidante fraco e precursor de outros RL mais reativos que ele. O H_2O_2 , embora não apresente um elétron desemparelhado na sua última órbita, por atravessar membranas orgânicas com muita facilidade, formam novos RL. Além disso, pode produzir alterações cromossômicas e oxidar compostos sulfidrilas. O H_2O_2 é importante na formação de compostos instáveis, pois na

presença do íon ferroso produz OH^\bullet por meio da reação de Fenton (Fig.5) (OLSZEWER; FLAM; ELLOVITCH, 2017).

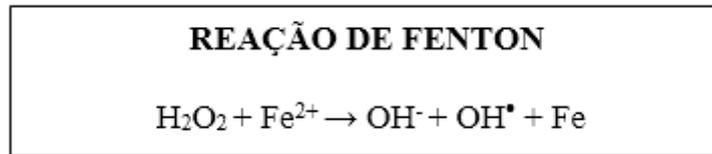


Figura 5 - Reação de Fenton. Adaptado de Olszewer; Flam; Ellovitch (2017).

O OH^\bullet além de ser formado pela reação de Fenton pode ser gerado pela reação de Haber-Weiss (Fig. 6). É considerado o RL de oxigênio mais instável e reativo do corpo humano. Possui vida média muito curta e não se conhece um sistema enzimático para sua neutralização a fim de evitar danos aos sistemas corporais (OLSZEWER; FLAM; ELLOVITCH, 2017).

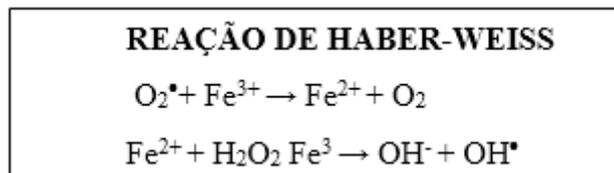


Figura 6 - Reação de Haber-Weiss. Adaptado de Olszewer; Flam; Ellovitch (2017).

O oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) é formado por meio da energização do O_2 alterando o *spin* de um elétron gerando uma molécula muito instável e com vida média curta (Fig. 7) (OLSZEWER; FLAM; ELLOVITCH, 2017).

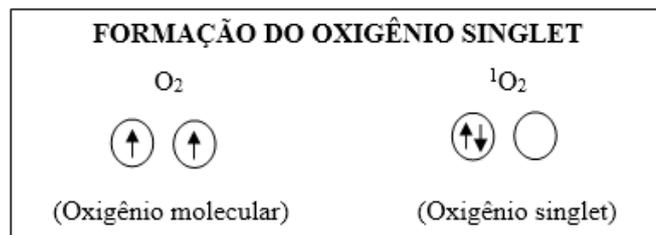


Figura 7. Formação do oxigênio singlet. Adaptado de Olszewer; Flam; Ellovitch (2017).

Diversos estudos têm demonstrado a produção de EROs na injúria da IR (BRITTO et al., 2018; GRANGER; KVIETYS, 2015; RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012). Assim, durante o IAM, ocorrem danos de ordem estrutural e metabólico no coração resultando em oxidação de lipídios da membrana, carbonilação de proteínas, oxidação de aminoácidos,

danos ao DNA e RNA e atenuação da atividade enzimática (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O tecido cardíaco demanda alto consumo de O_2 e, conseqüentemente, produz grande quantidade de RL sofrendo maior exposição ao risco do estresse oxidativo. Para evitar essa produção exacerbada, existem alguns mecanismos de defesa fisiológico a fim de evitar danos cardíacos (SANTOS et al., 2011). A primeira linha de defesa contra os RL inclui as enzimas antioxidantes: SOD, catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A SOD converte $O_2^{\bullet-}$ ou 1O_2 em H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 , produzido em excesso, quando não vai para a via da reação de Fenton é convertido a água (H_2O) e O_2 pela CAT (abundante nos peroxissomos). Já que a CAT não está presente nas mitocôndrias, a redução do H_2O_2 nessa organela é realizada pela GPx (Fig. 8) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

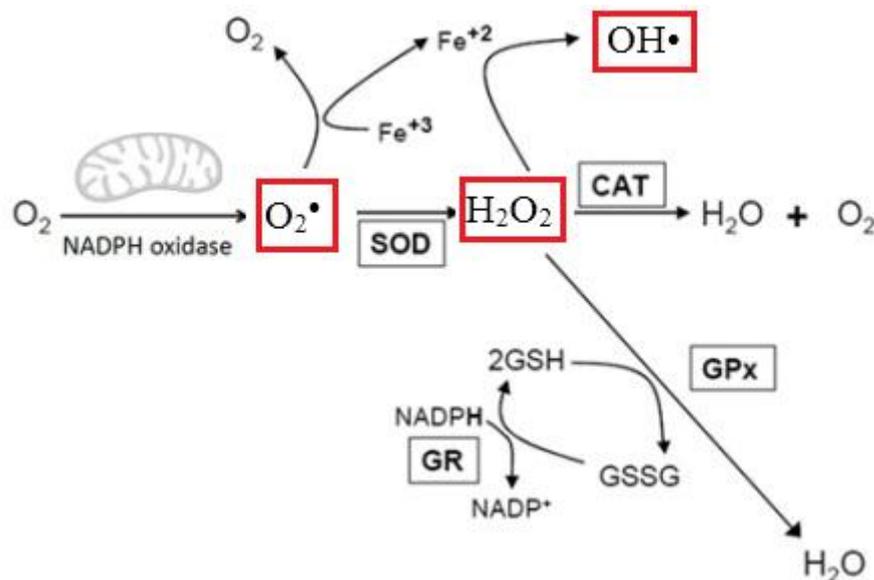


Figura 8 - Esquema do sistema de defesa antioxidante. A enzima NADPH oxidase converte o O_2 (oxigênio) em $O_2^{\bullet-}$ (superóxido) transformado em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) pela SOD (superóxido dismutase). Pela reação de Fenton o H_2O_2 forma o radical OH^{\bullet} (hidroxila) ao reagir com o Fe^{2+} . A CAT (catalase) converte o H_2O_2 em H_2O (água) e O_2 e a GPx (glutaciona peroxidase) mantém o equilíbrio entre a glutaciona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH). Adaptado de: Griendling e Fitzgerald (2003).

Já a segunda linha de defesa inclui antioxidantes hidrofílicos, tais como: vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albumina e os lipofílicos, tais como: a vitamina E e a coenzima Q ou ubiquinol (LOBO et al., 2010). A vitamina C consegue neutralizar o $O_2^{\bullet-}$ e radicais sulfúricos e destrói o radical hidroxila e o oxigênio singlet. A vitamina E é o principal antioxidante presente no interior das membranas celulares, por ser lipossolúvel consegue se mover entre as camadas

da membrana impedindo a peroxidação lipídica. O ubiquinol participa da prevenção de produção de RL por inibir a peroxidação lipídica, sua forma reduzida ubiquinol elimina os RL de peroxil lipídico (BENTINGER; BRISMAR; DALLNER, 2007). Outro composto formado pelo ubiquinol é a alfa-tocoferol eliminando dessa forma os RL e regenerando a forma ativa da vitamina E (MARTINS; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2004). Além disso, atua aumentando a ativação e expressão de proteínas mitocondriais desacopladas contribuindo para que não ocorra apoptose (MARCOFF; THOMPSON, 2007).

Segundo a OMS (2019), em relatório denominado “World Health Statistics 2019”, países em desenvolvimento apresentam disponibilidade deficiente de medicamentos em unidades de saúde pública. Já no setor privado a disponibilidade torna-se um pouco melhor embora ainda esteja abaixo do ideal. Em pesquisa realizada, no setor público de países de baixa e média renda, a disponibilidade de medicamentos genéricos foi de 37,7% e 46%, respectivamente. Além disso, foi observado que os medicamentos genéricos com preços mais baixos possuem valores maiores que o dobro do preço de referência internacional, principalmente quando se refere a doenças crônicas não transmissíveis.

A utilização de plantas para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana. Com o advento da tecnologia moderna, estima-se que pelo menos 25% dos medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais. Estas, por sua vez, são importantes fitoterápicos que possuem a maior contribuição na descoberta de novos fármacos (AMARAL et al., 2012). De acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006), o Brasil é o país de maior biodiversidade quando comparado a outros países do mundo. Além disso, por conter um conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, possui grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas com tecnologias terapêuticas aplicadas (BRASIL, 2006).

Dentro desse contexto, nota-se a importância da medicina popular na descoberta de novos fármacos, bem como a comprovação de sua eficácia, segurança, potencial terapêutico, determinação da posologia, indicação e contraindicação e efeitos adversos. Assim, é de suma importância a investigação científica de produtos naturais dado a escassez de estudos nessa área.

2.4.1 Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas derivados de benzo-pirona constituídos por anéis fenólicos e pirano (Fig. 9). São classificados de acordo com suas

substituições formando seis classes, a saber: flavanol, flavonas, flavonol, antocianinas, isoflavonas e diidroflavonois (Fig. 10) (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

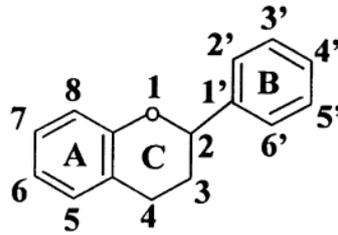


Figura 9- Estrutura básica de um flavonoide.
Possui dois anéis benzênicos (A e B), unidos a um anel pirano heterocíclico (C).

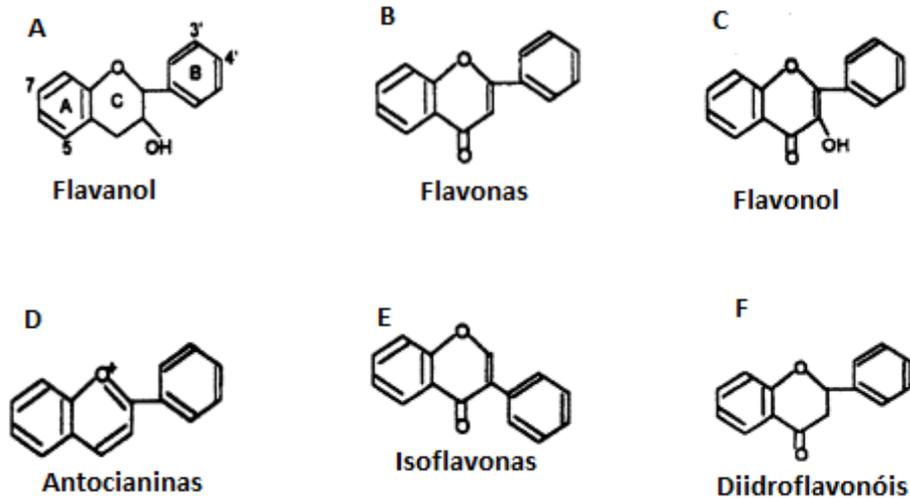
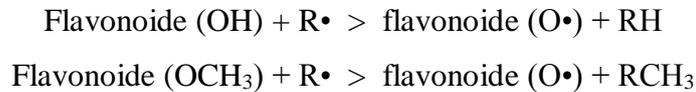


Figura 10 -Estrutura química das classes de flavonoides.

Os flavonoides são encontrados em frutas, vegetais, grãos, casca, raízes, caules, flores, chá e vinho. Esse composto natural possui uma variedade de aplicações nutracêuticas, farmacêuticas, medicinais e cosméticas por sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-mutagênica e anticancerígenas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). A propriedade antioxidante presente nos alimentos tem sido amplamente estudada nos últimos anos em virtude de sua importância na intervenção e profilaxia das doenças cardiovasculares (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Em estudo de revisão realizado por Cook; Samman (1996), os flavonoides agem como antioxidantes por serem doadores de elétrons. Assim, reagem e inativam $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizam RL envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes. Além disso, a habilidade que os

flavonoides possuem em sequestrar íons metálicos contribui para a capacidade antiperoxidativa por prevenir a formação de RL pela reação de Fenton. A reação dos flavonoides com as EROs podem ocorrer das seguintes duas formas, a seguir (MACHADO et al., 2008):



De acordo com Kokkou et al.(2017) há uma forte evidência da ação cardioprotetora dos flavonoides por influenciar os fatores de risco para doenças cardiovasculares como: hipertensão, diabetes, dislipidemias, fumo e estresse. Os efeitos cardioprotetores advêm também da habilidade em inibir a peroxidação lipídica e atenuar as EROs (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

2.4.2 Naringina (NRG)

A NRG (4,5,7-trihidroxil flavona 7-rhamnoglicosídeo) é um glicosídeo flavonoide isolado, encontrada em uvas e frutas cítricas (CORDENONSI et al., 2016), com forma molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ (Fig. 11).

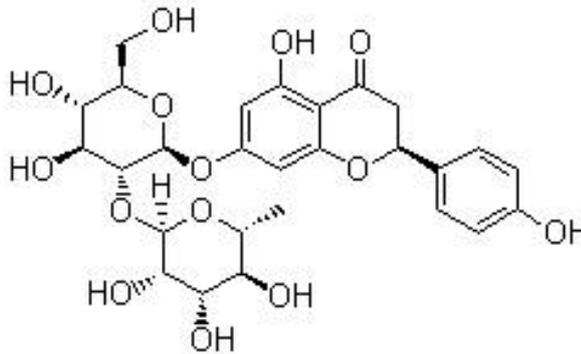


Figura 11- Estrutura química da naringina.

Em estudo de revisão da NRG realizado por Chen et al. (2016) foi observado que este flavonoide possui diversas propriedades biológicas e farmacológicas, apresentando diversos efeitos tais como: anti-inflamatório, antioxidante e anticâncer; participa na regeneração óssea com proliferação celular; reduz o risco da síndrome metabólica; reduz o dano ao DNA por modular a expressão de mediadores oxidativos e geração de radicais livres e promove efeitos

benéficos em doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) como o Alzheimer, Parkinson e Epilepsia.

Existem poucos estudos que relacionam a NRG com a cardioproteção. Santos (2016) observou que a NRG promoveu em coração de rato, efeito cronotrópico e inotrópico positivo associado à melhora do relaxamento diastólico, tal mecanismo foi evidenciado por ativação indireta de receptores β -adrenérgicos por meio da liberação de catecolaminas pré-sinápticas o qual induziu a ativação de canais de cálcio tipo-L e receptores de rianodina.

De acordo com Frances et al. (2003) a liberação de catecolaminas durante a I/R ocorre por meio da estimulação da via α_1 -adrenérgica ou β -adrenérgica o que induz ao pré-condicionamento. Este, por sua vez, é caracterizado por períodos curtos de isquemia alternados com períodos de reperfusão que protegem o coração, levando à diminuição da área de infarto, da disfunção ventricular esquerda, de episódios de arritmias e da apoptose (GOTTLIEB et al., 1996).

A atividade via liberação de catecolaminas tem sido observada em outros compostos naturais a exemplo da simalarina. Gabrielova (2015) demonstraram efeito inotrópico positivo em coração de rato isolado através da liberação endógena de catecolaminas mediada pela *Silybummarianum* (Silimarina). Clinicamente, efeito inotrópico positivo pode trazer efeitos benéficos pela estimulação da via adrenérgica ao melhorar a função cardíaca como na insuficiência cardíaca aguda com hipoperfusão e no choque (TRIPOSKIADIS et al., 2009).

Khodayar et al. (2018) estudaram o efeito protetor da NRG na cardiotoxicidade induzida pelo bisfenol A (BPA) e observou que as doses de 80 e 160 mg/kg apresentaram cardioproteção em virtude da capacidade antioxidante da NRG e pela supressão da peroxidação lipídica.

Rani et al. (2013) ao estudar a NRG em IR por oclusão da coronária descendente esquerda observaram que esse flavonoide restaurou a injúria da IR ao preservar a integridade da estrutura do miocárdio apresentando antioxidante.

Estudar o potencial efeito cardioprotetor no pré-tratamento com a NRG em coração de ratos com a injúria de IR poderá contribuir para aplicação prática como suplemento dietético ou como um modelo para desenvolver agentes terapêuticos para doenças em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito cardioprotetor do pré-tratamento com naringina em coração isolado de rato submetido à injúria de isquemia e reperfusão.

2.2 Específicos

Avaliar em corações submetidos à injúria de isquemia-reperfusão os efeitos da naringina sobre:

- as alterações elétricas do coração;
- as alterações contráteis do músculo cardíaco;
- as arritmias desenvolvidas durante o período a reperfusão cardíaca;
- o dano oxidativo (peroxidação lipídica e carbonilação e sulfidrilada das proteínas);
- as defesas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase);
- a produção de espécies reativas de oxigênio dos corações;
- o dano tecidual (área de infarto e LDH).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob o número 31/18 (Anexo I). A execução dos experimentos seguiu as normas de manipulação propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/MCT).

3.2 Animais, grupos experimentais, tratamento e dose

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar (250–300g), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe e mantidos no Laboratório de Biofísica do Coração. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas com no máximo cinco ratos por unidade, em condições de livre acesso para água e ração, acondicionadas em sala climatizada com controle de temperatura e umidade ($\pm 20,3^{\circ}\text{C}$ - $23,1^{\circ}\text{C}$ e 40-50%), sob ciclo de luz/escuro (12/12h).

Para a execução do protocolo experimental, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos da seguinte forma:

1. Controle: animais pré-tratados por 7 dias com solução salina (NaCl 0,9% + dimetilsulfóxido - DMSO 25%) sem injúria de IR;

2. Veículo + IR: animais pré-tratados por 7 dias com solução salina (NaCl 0,9% + DMSO 25%) submetidos a injúria de IR;

3. Naringina + IR (NRG+IR): animais pré-tratados por 7 dias com naringina (25mg/kg) + NaCl 0,9% e DMSO 25% submetidos a injúria de IR;

4. NAC + IR (NAC+IR): animais pré-tratados por 7 dias com N-acetil cisteína (NAC, 100 mg/kg) + NaCl 0,9% e DMSO 25% submetidos a injúria de IR.

A dose da NRG foi determinada com base em teste piloto, no qual foram testadas as doses de 25, 50 e 100 mg/kg. A dose escolhida para utilização no presente trabalho foi determinada por meio da mensuração da peroxidação lipídica baseada no teste do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), o qual mostrou que a dose de 25 mg/kg apresentou melhor ação antioxidante.

A diluição da NRG foi realizada em DMSO 25% + solução salina NaCl 0,9%. Os animais controles e veículos foram tratados com DMSO e salina (NaCl 0,9% 0,20 mL + DMSO

25%), a fim de evitar qualquer viés. O NAC foi utilizado como controle positivo na dose de 100 mg/kg. A dose de NAC foi estabelecida de acordo com estudos de isquemia renal (SEHIRLI et al. 2003), isquemia de pata traseira (TAKHTFOOLADI et al. 2006) e isquemia intestinal (KALIMERIS et al. 2016) já que estudos de IR em coração de rato que utilizem o NAC como controle positivo são escassos. O NAC é comumente utilizado como antioxidante por inativar EROs, principalmente H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ (ZHITKOVICH, 2019).

Os animais foram submetidos ao tratamento, via gavagem oral (vo), sempre no mesmo horário, durante um período de sete dias consecutivos, mimetizando assim, um pré-condicionamento cardíaco, visando prevenir a injúria induzida no protocolo IR (Fig. 12).

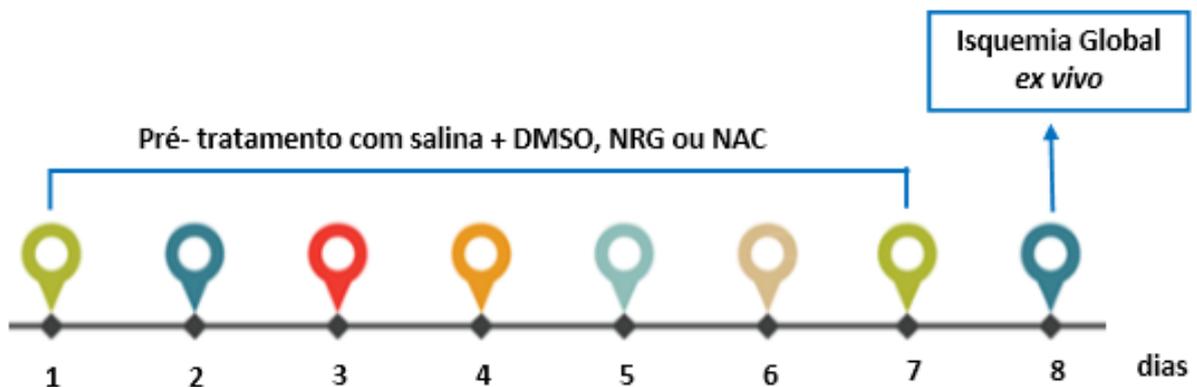


Figura 12- Delineamento experimental do tratamento dos animais. A administração de salina + DMSO (dimetilsulfóxido), NRG (naringina) ou NAC (n-acetilcisteína) foi feita por gavagem oral durante 7 dias. No oitavo dia após o tratamento, foi realizado o protocolo de isquemia global ex vivo.

3.3 Montagem experimental do coração em sistema de perfusão aórtica para determinação dos parâmetros cardíacos

No oitavo dia, os animais foram heparinizados (1000 UI, i.p) e, após 15 min, eutanasiados por decapitação, conforme orientação das Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. Em seguida, realizou-se a toracotomia, o coração foi rapidamente removido e mantido em solução de Krebs-Ringer (em mM: NaCl 120, KCl 5,4, MgCl₂ 1,2, NaHCO₃ 27, CaCl₂ 1,25, Glicose 11, NaH₂PO₄ 2,0) previamente filtrada em millipore (0,45µm), a fim de prevenir microembolia coronariana (HARRISON; RAYMOND, 1951) para procedimento de canulação da aorta.

O coração isolado foi montado em sistema de reperfusão retrógrada do tipo Langendorff de fluxo constante (8 mL/min), (Bomba Peristáltica, Milan®, Paraná, Brasil) e perfundido com solução de Krebs-Ringer aerado por mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e aquecido a 37±0,1°C (Bomba HAAKE® C/F3, Berlim, Alemanha). Em seguida, o átrio esquerdo foi removido para inserção de um balonete (inflado com água a uma pressão de 15 cmHg) no ventrículo esquerdo conectado a ao transdutor de pressão (MTL0699/A®) e seus sinais foram enviados a um amplificador (BRIDGE Amp FE221, ADInstrument®), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument®) e armazenados em computador (Fig.13).

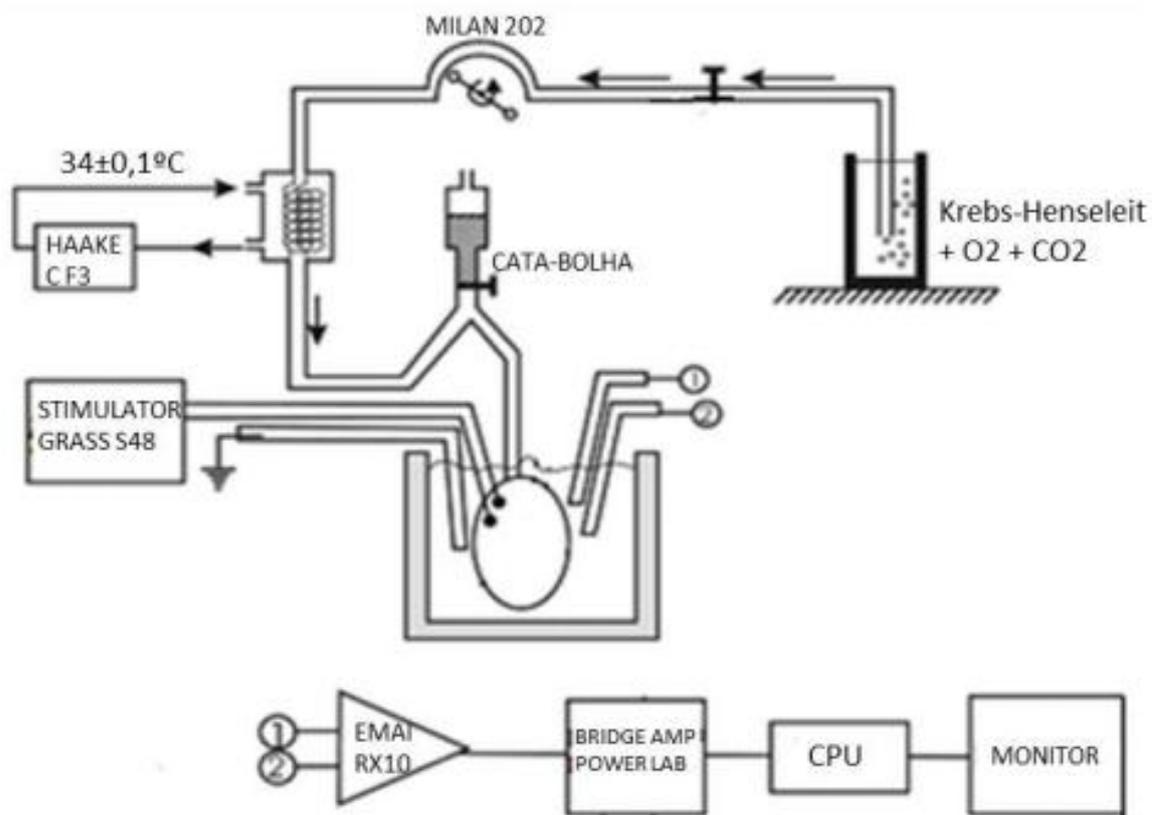


Figura 13- Imagem representativa do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff usado para registrar simultaneamente o ECG e a pressão intraventricular. Fonte: Vasconcelos (2005).

Após a montagem do sistema, foi aguardado um período de 30 a 40 min para estabilização. Ao finalizar este tempo, o fluxo foi interrompido de forma global durante 30 min (isquemia). O fluxo foi reestabelecido após este período e o coração foi perfundido por 60 min sob monitoramento da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE). Os corações do grupo controle não foram submetidos à isquemia, sendo perfundidos por um período de 120 min (Fig.14).

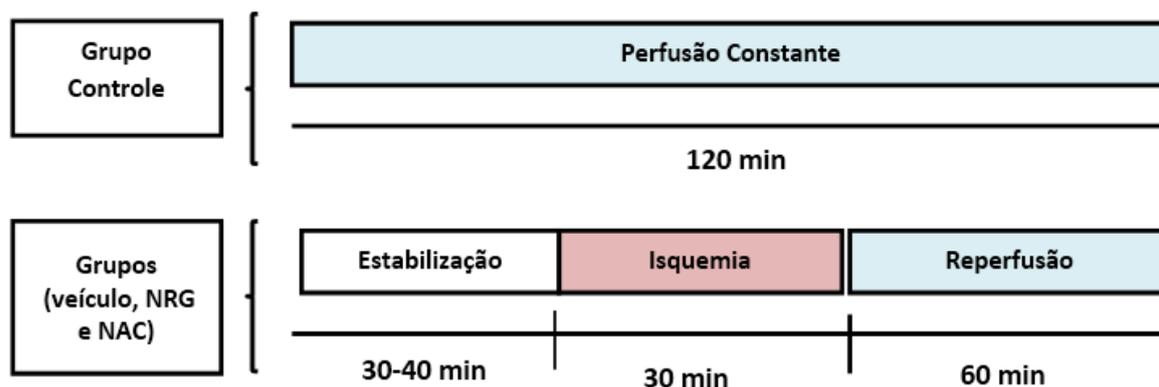


Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental de IR. Grupo controle: animais pré-tratados com solução salina (NaCl 0,9%) + DMSO – dimetilsulfóxido (25%) que não passaram por isquemia; Grupos: veículo + IR; NRG (naringina) + IR e NAC (n – acetilcisteína) +IR que passaram por 30 min de isquemia e 60 min de reperfução.

3.3.1 Determinação dos parâmetros contráteis e eletrocardiográficos (ECG)

A partir do registro da PDVE, foram determinadas as derivadas de pressão ventricular máxima (+dP/dt) e mínima (-dP/dt) e frequência cardíaca. Esses parâmetros foram determinados no final da estabilização, durante a isquemia (10, 20 e 30 min) e durante a reperfução a cada 10 min.

Os sinais elétricos do ECG foram captados por meio de três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl, 1 M) imersos no Krebs e amplificados (BRIDGE Amp FE221, ADInstrument®). O sinal eletrocardiográfico foi monitorado em tela de um cardioscópio (EMAI RX10), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument®) e armazenados em computador para processamento off-line. Em todos os grupos experimentais, foram avaliados: frequência cardíaca (FC), intervalo QT (QT_i), duração do complexo QRS e intervalo PR_i. O QT_i foi corrigido pela frequência cardíaca usando a equação de Bazett corrigida ($QTc-B = QT_i / \sqrt{RR/f}$; $f = 270$ ms (KMECOVA et al., 2010), em que RR se refere ao intervalo RR do ECG.

3.3.2 Determinação da pressão coronariana

A pressão coronariana foi registrada nos tempos 10 min antes da isquemia; 10, 20, 30 durante a isquemia e 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min durante a reperfução por meio de coleta via acesso anterior a cânula da aorta sendo monitorada com o auxílio de uma coluna de água

(capilar de vidro) acoplada a uma régua. Sua medição foi feita na escala de centímetros de água (cmH₂O).

3.3.3 Determinação do escore e ocorrência de arritmias

Para determinação da ocorrência de arritmias o ECG foi continuamente monitorado em todo o experimento, mas foi quantificado a partir do início da reperfusão que teve duração 60 min. A fim de se obter uma boa comparação quantitativa, os 60 min de experimento foram divididos em intervalos de 5 min e os escores de arritmia foram adicionados no final. Os escores de arritmia (Quadro 1) foram avaliados conforme estabelecido por Walker et al. (1988). As arritmias cardíacas foram classificadas como batimento ventricular prematuro (BVP), taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV).

Quadro 1- Classificação do escore de arritmias.

Escore de arritmias	Número de arritmias por evento
0	< 10 BVP
1	> 10 BVP
2	1 - 5 episódios de TV
3	> 5 episódios de TV ou 1 episódio de FV com duração < 40 s
4	2 - 5 episódios de FV, TV e/ou FV com duração < 80 s
5	> 5 episódios de FV, TV e/ou FV com duração < 160 s
6	TV e/ou FV com duração < 300 s
7	TV e/ou FV com duração > 300 s

BVP: batimento ventricular prematuro; TV: taquicardia ventricular; FV: fibrilação ventricular. Adaptado de Curtis e Walker (1998)

3.4 Ensaios bioquímicos

3.4.1 Preparação da Amostra

Após o término do protocolo de IR, os corações foram pesados e em seguida homogeneizados na proporção de 100 mg de tecido/ml diluído em tampão fosfato 50mM pH

7,4. O tampão utilizado para cada amostra está descrito no Quadro 2. As amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

3.4.2 Dosagem de proteínas

A dosagem das amostras de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (KRUGER, 2009) utilizando o BSA (albumina do soro bovino) para fazer a curva padrão.

Quadro2- Composição dos tampões utilizados nas preparações dos tecidos cardíacos para os ensaios bioquímicos.

TAMPÃO	ENSAIO	SUBSTÂNCIAS
Glicina (pH 10,2)	SOD	Glicina (50 mM) NaOH (1 N)
CAT (pH 7,0)	CAT	KH ₂ PO ₄ (1,40 g/l) Na ₂ PO ₄ (2 H ₂ O) (2,9 g/l) Na ₂ PO ₄ (7 H ₂ O) (4,3 g/l)
Ácido Tricloroacético (TCA)	TBARS	TCA (15%)
Ácido Tiobarbitúrico (TBA)		TBA (0,67%)
Fosfato (pH 7,4)		Na ₂ HPO ₄ (20 mM)

3.4.3 Determinação da atividade da catalase

Para determinação da catalase foi adicionado H₂O₂ 1 molar (5 µL) às alíquotas dos sobrenadantes (5 µg) em todas as amostras e a leitura foi feita em intervalos de 15 segundos totalizando 5 min. A leitura foi realizada durante 1 min em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade da catalase foi expressa em ΔE/min/mg de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade da enzima durante 1 min (AEBI, 1984).

3.4.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para quantificação da SOD foi utilizado o método baseado na inibição da auto oxidação da adrenalina. Assim, as amostras foram diluídas em soro fisiológico, na proporção 1:10 (v/v), e quantidades crescentes do diluído (10,20, 30 e 60 µL) foram acrescidos de tampão glicina pH 10,2 a 32°C para completar as seguintes quantidades respectivamente, 185, 180, 175, 170 µL.

Em seguida foram acrescentados a solução de CAT (5 μ L) em cada poço e solução ácida de adrenalina (5 μ L). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm a 32°C e a atividade foi expressa em U SOD/mg proteína (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

3.4.5 Medições da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os corações foram rapidamente removidos e congelados em um meio para criosecção (composto Tissue-Tek, O.C.T.). Os tecidos congelados foram cortados transversalmente em secções e fatias de 30 μ m de espessura e transferidas para uma câmara de gravação. As lâminas foram pré-incubadas em uma solução pré-aquecida de krebs com pH de 7.4 durante 15 min. Depois foram carregadas, durante 40 min, em uma câmara protegida contra luz a 37°C com 10 μ M de dihidroetídio (DHE; Molecular Probes®), um corante fluorescente de permeabilidade celular (MACEDO et al., 2016). As imagens foram gravadas usando um microscópio de fluorescência (Ci-E®, Nikon, Japão) com o tempo de exposição igual para todos os grupos experimentais. A intensidade de fluorescência do DHE foi medida usando o software ImageJ® 1.38x (NIH, EUA).

3.4.6 Mensuração de produtos da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi mensurada nos tecidos por meio do ensaio bioquímico denominado TBARS (substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico). Neste teste, o ácido tiobarbitúrico reage com o MDA que é o principal produto da peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram mensurados de acordo com o método descrito por Esterbauer e Cheeseman, (1990) Assim, as amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato para TBARS e em seguida centrifugadas a 3000 g por 10 min. Em seguida, foi retirado 100 μ L da amostra e adicionado em 200 μ L de TCA 15% e agitado em vórtex por 30 segundos. Após, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro à 532 nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

3.4.7 Determinação das proteínas carboniladas

A quantificação das proteínas carboniladas foi realizada através dos grupos carbonilas. Dessa forma, ocorre uma oxidação proteica que forma aldeídos reativos que podem reagir com a 2,4-dinitrofenilhidrazina formando as hidrozonas que serão lidas em espectrofotômetro numa absorvância entre 360-385 nm. Foi preparada uma amostra que continha 1mg de proteína por ponto no experimento. Após, separou-se dois eppendorfs sendo 1 tubo branco e 1 com DNPH. Em seguida foi adicionado 1mg de proteína em cada um e completado ambos com 200 μ L de PBS e 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 20% e procedeu-se utilizando o vórtex e gelo por 5 min. Foi centrifugado a 4000xg por 5 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, ressuspendeu-se o pellet em 100 μ L de NaOH 0,2N com Vortex. Para reação do carbonil foi utilizado 100 μ L de HCl 2M no tubo Branco e 100 μ L de DNPH 10 mM na amostra. Após esse procedimento, cada amostra foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente utilizando o vortex a cada 15 min. Após o término da incubação, adicionou-se 100 μ L de TCA 20% e levou para centrifugação a 16000g por 5min. O pellet foi lavado por três vezes com 500 μ L de etanol/acetato de etila (1:1), suspender o pellet e centrifugado a 16000 xg por 5 min. Ao final das lavagens o pellet foi ressuspensão com 1ml de uréia 8M (pH 2,3) e centrifugado por 3min a 16000xg para remoção de qualquer material insolúvel. As amostras foram analisadas em triplicada e a leitura foi feita a 370nm e expressas em carbonilação/mg proteína (LEVINE et al., 1990).

3.4.8 Determinação de grupamentos sulfidrilas

A determinação dos grupamentos sulfidrilas foi realizada de acordo com a metodologia de Ellman (1959). O princípio da reação se dá pela reação do 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) com grupamentos SH (tiol) de proteínas e outros compostos tiólicos como GSH. Os corações foram homogeneizados em PBS e centrifugados a 3000 g por 10 min a 4° C. Em seguida, retirou-se o sobrenadante para determinação dos grupamentos SH totais. Assim, foi adicionado TCA 10% para precipitação das proteínas a mistura então foi centrifugada e os sobrenadantes separados. Após essa etapa, ao sobrenadante (80 μ g) foi adicionado DTNB (5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico) para a ocorrência de reação colorimétrica. O resultado foi expresso com relação à concentração de grupamentos tíois presentes na amostra em mol SH/mg proteína.

3.4.9 Determinação da área de infarto

A área de infarto foi determinada pela coloração com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) de acordo com Fishbein et al. (1981). Após o término da reperfusão, foram realizadas três secções transversais no coração. Para mensuração da área de infarto foi utilizada o terço médio do coração com aproximadamente 0,5 cm de espessura. O segmento do coração foi mantido a 37°C em solução de TTC 1% (diluído em solução de Krebs-Ringer) por 20 min, sendo posteriormente fixado em formalina tamponada por 30 min. A coloração vermelho é adquirida pelas células viáveis enquanto que as células não viáveis aparecem pálidas. Após este procedimento, as imagens dos cortes foram escaneadas (HP® J4660) e posteriormente analisadas com o auxílio do programa ImageJ®1.38x. Os resultados foram apresentados como o percentual da área do ventrículo esquerdo ocupado pelo infarto, o qual determinou a extensão da lesão do miocárdio.

3.4.10 Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)

Para a determinação da atividade da LDH, amostras de solução cardíaca foram coletadas do efluente coronário ao final do período de reperfusão. A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. A dosagem da atividade da LDH foi realizada em triplicata através do kit de dosagem da LabTeste® conforme instruções do fabricante. A análise das amostras foi feita pelo aparelho LABMAX® 240 PREMIUM e lida em espectrofotômetro a 340 nm.

3.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel 2016, em seguida, exportados para o software Prisma 6.0 (GraphPad®, San Diego, CA, EUA). A normalidade e a igualdade de variância foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para determinar se houve diferença de médias foi utilizado o teste ANOVA de uma ou duas vias seguido do teste do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como

significativos. Neste trabalho os dados quantitativos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da dose de naringina a ser utilizada no pré-tratamento dos animais

Os animais foram tratados nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, durante 7 dias, e no oitavo dia foram submetidos ao protocolo de IR. De acordo com a mensuração da peroxidação lipídica, baseado no teste do TBARS, a dose de 25mg/kg reduziu a formação de MDA ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo veículo (Fig. 15). Por outro lado, as doses de 10 e 50 mg/kg induziram aumento de MDA quando comparado ao grupo veículo + IR. Dessa forma, nesse estudo foi utilizada a NRG na dose de 25 mg/kg.

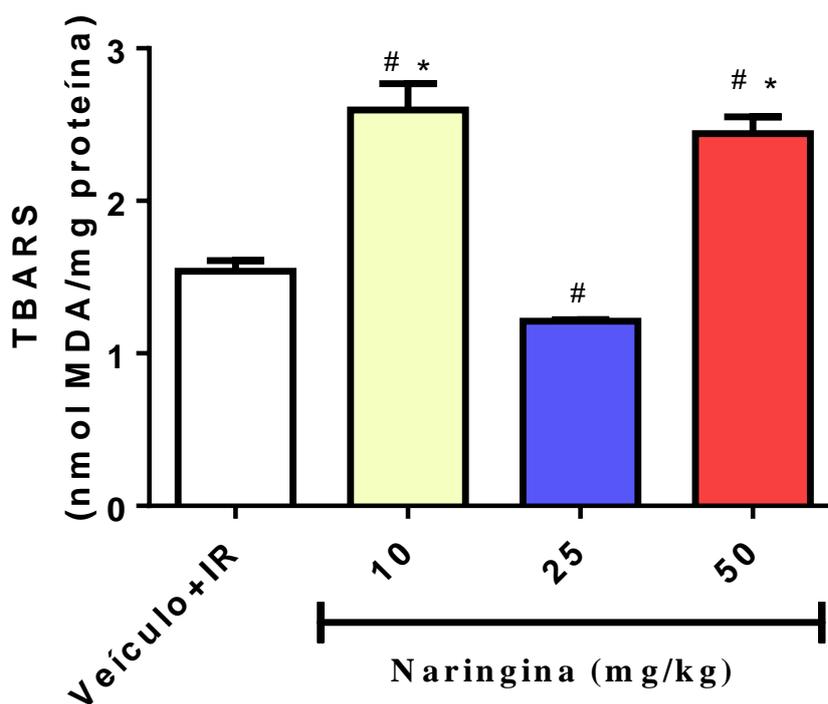


Figura 15 - Medida do Malondealdeído (MDA) em coração de ratos submetidos à isquemia reperfusion (IR) e pré-tratados com naringina (10, 25 e 50 mg/kg/dia) (n=5, por grupo) # $p < 0,05$ vs veículo; * $p < 0,05$ vs 25 mg/kg). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferoni.

4.2 Efeito da naringina na contratilidade cardíaca

A Fig. 16A mostra os registros representativos da PDVE em todos os grupos experimentais. Observa-se nesses registros, a PDVE 10 min antes do início da isquemia (- 10 min), durante a isquemia (0 a 30 min) e durante a reperfusão (30 a 90 min). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na PDVE entre os grupos estudados no período de estabilização, anterior a isquemia ($p > 0,05$, Fig. 16B). Após os primeiros 10 min do início da IR observou-se, em todos os grupos submetidos à IR, uma redução acentuada da PDVE, quando comparado ao grupo controle, que não foi submetido à isquemia ($p < 0,05$, Fig. 16B). No período de reperfusão, observou-se que os animais do grupo veículo+IR apresentaram comprometimento da PDVE de 60% (Fig. 16B, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Contrariamente, observou-se que o pré-tratamento dos animais com a NRG restaurou a perda da função contrátil induzida pela IR apresentando recuperação logo nos primeiros 10 minutos da reperfusão ($p < 0,05$). Os animais tratados com NAC (NAC+IR) também apresentaram aumento da PDVE em relação ao grupo veículo+IR.

Ao avaliar as derivadas da contração (+dP/dt) e do relaxamento (-dP/dt), observou-se que os animais do grupo veículo+IR apresentaram diminuição da +dP/dt ($312,46 \pm 84,68$ mmHg/s, Fig.16C) e da -dP/dt ($-240,31 \pm 89,13$ mmHg/s, Fig. 16D) quando comparado ao grupo controle (+dP/dt: $951,44 \pm 135,29$ mmHg/s e -dP/dt: $-538,04 \pm 142,21$ mmHg/s) ($p < 0,05$). Essas alterações foram prevenidas com o pré-tratamento da NRG (+dP/dt: $1140,80 \pm 66,34$ mmHg/s e -dP/dt: $-657,11 \pm 79,09$ mmHg/s) quando comparado ao grupo veículo + IR ($p < 0,05$). Resultado similar à NRG, também foi observado no grupo tratado com NAC.

Os resultados mostraram que no período de estabilização, os animais pré-tratados com NRG apresentaram aumento da FC ($259,50 \pm 23,16$ bpm) em relação aos grupos veículo+IR ($199,31 \pm 37,18$ bpm) e NAC+IR ($240,25 \pm 4,00$ bpm) (Fig. 16E). Durante todo o período da reperfusão, a frequência cardíaca apresentou-se aumentada nos animais pré-tratados com NRG quando comparado ao grupo veículo + IR ($p < 0,05$). Nos tempos de 10 e 20 min de reperfusão houve diferença significativa da frequência cardíaca entre os grupos NRG+IR e NAC+IR ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa em relação à pressão coronariana entre os grupos experimentais estudados (Fig. 16F).

Em relação às propriedades elétricas do coração, a Fig. 17A apresenta os traçados representativos dos diferentes grupos estudados. Observa-se que o pré-tratamento com NRG preveniu o aparecimento da inversão da onda T (isquemia miocárdica) e supradesnivelamento do segmento ST (infarto do miocárdio), os quais foram apresentados no grupo veículo + IR. No

que concerne aos parâmetros do ECG (PRi, QTc e duração do complexo QRS) não foi observado alteração significativa entre os grupos experimentais (Fig.17B-D).

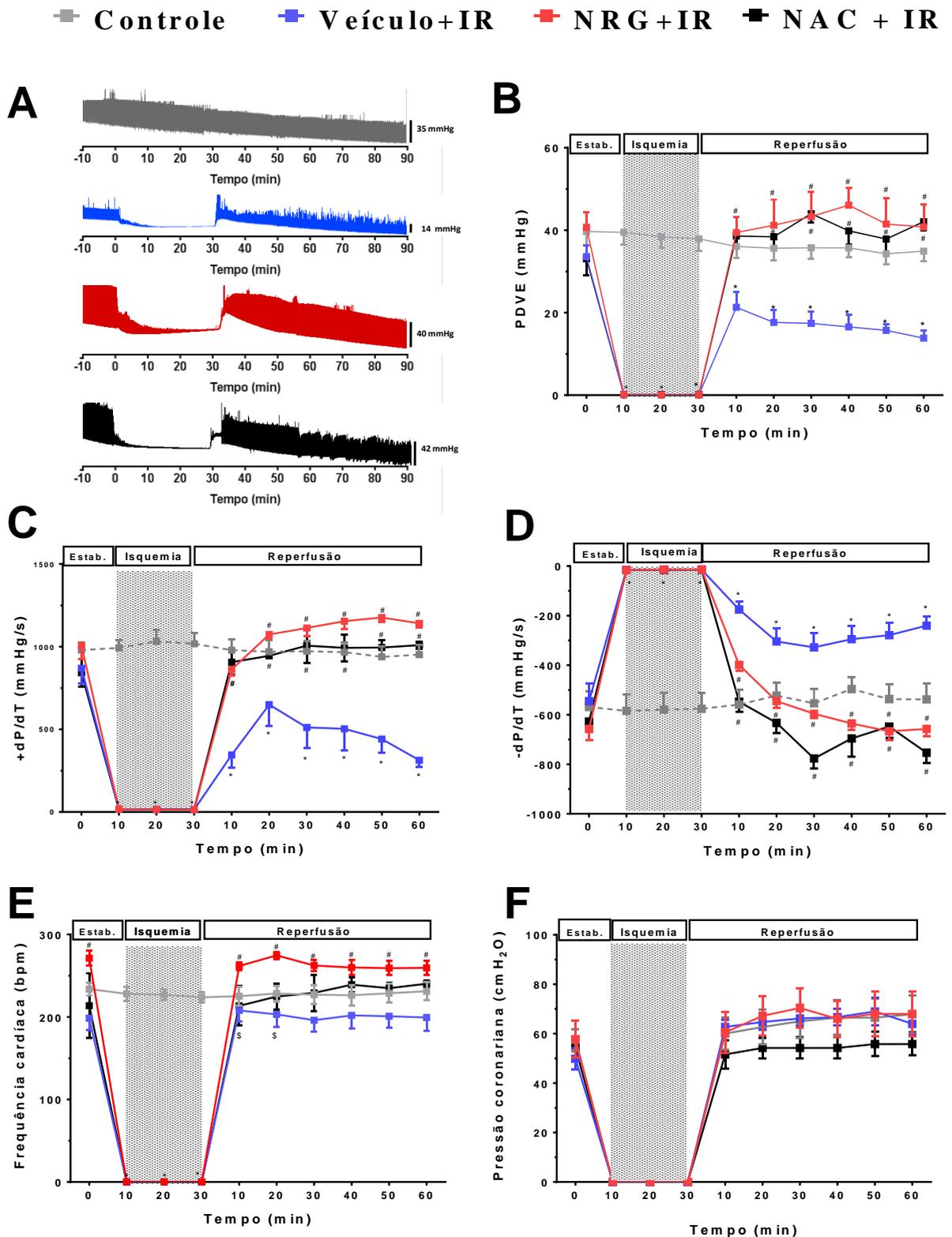


Figura 16- Naringina preveniu a redução da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) induzida pela isquemia reperusão (IR). (A) Registro representativo da PDVE nos grupos experimentais, (B) PDVE, (C) Derivada da contração (+dP/dt), (D) Derivada do relaxamento (-dP/dt), (E) Frequência cardíaca e (F) Pressão coronariana (n=10). ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs veículo + IR, \$ $p < 0,05$ NRG vs n-acetilcisteína- NAC).

4.3 O pré-tratamento com naringina reduziu a gravidade das arritmias cardíacas induzidas pela IR

A quantificação das arritmias foi realizada no período de reperfusão (60 min) por meio do ECG. Foi possível classificar três tipos de arritmias: BVP, TV, FV. Os traçados eletrocardiográficos representativos das arritmias apresentadas pelos grupos experimentais estão mostrados na Fig. 18A. Observou-se que apenas o grupo veículo + IR apresentou os 3 tipos de arritmias, sendo a FV considerada a mais grave, assim como apresentou um maior escore de arritmias ($21,40 \pm 2,48$ u.a., $p < 0,05$) quando comparado ao controle ($5,0 \pm 1,26$ u.a.) ($p < 0,05$) (Fig. 18B). Além disso, os grupos tratados com NRG e NAC submetidos à IR tiveram os episódios de arritmias reduzidos apresentando escores semelhantes ao grupo controle ($5,5 \pm 0,72$ u.a. e $4,8 \pm 1,11$ u.a.), respectivamente (Fig. 18B).

A ocorrência das arritmias e a classificação em seus subtipos estão mostradas na Fig. 18C. Os resultados mostraram que o grupo veículo+IR apresentou a arritmia considerada mais grave, FV ($11 \pm 3,6\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Interessantemente, os grupos pré-tratados com NRG e NAC não apresentaram episódios de FV. Em relação a TV e BVP não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

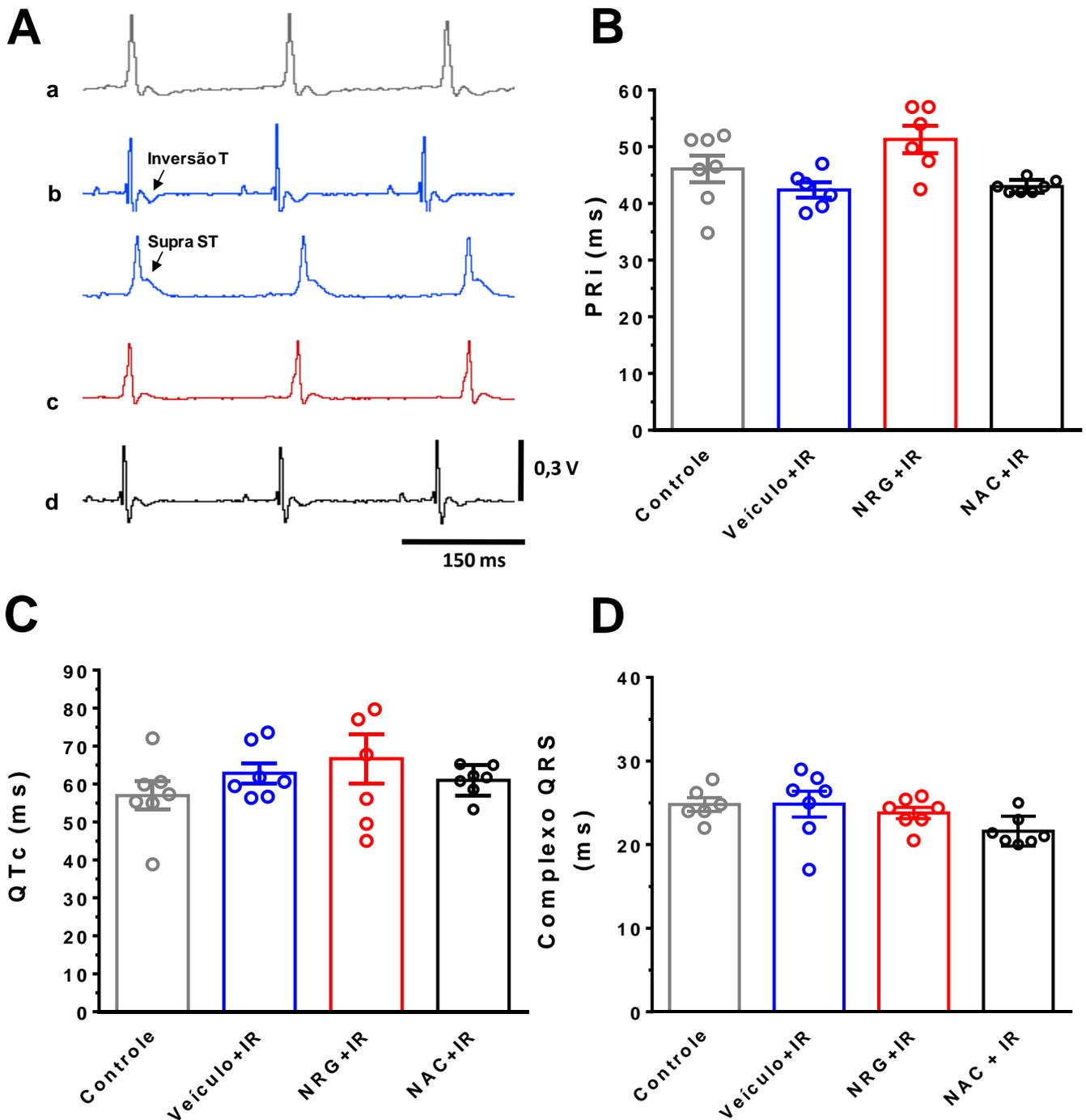


Figura 17 – Naringina preveniu a alteração no segmento ST e inversão da onda T induzida pela isquemia reperfusão (IR). (A) Registro representativo do ECG no (a) controle, (b) veículo + IR, (c) NRG + IR e (d) NAC + IR; (B) Intervalo PR (PRi); (C) QTc e (D) Duração do complexo QRS (n=7). Os parâmetros do ECC foram mensurados no final da reperfusão. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

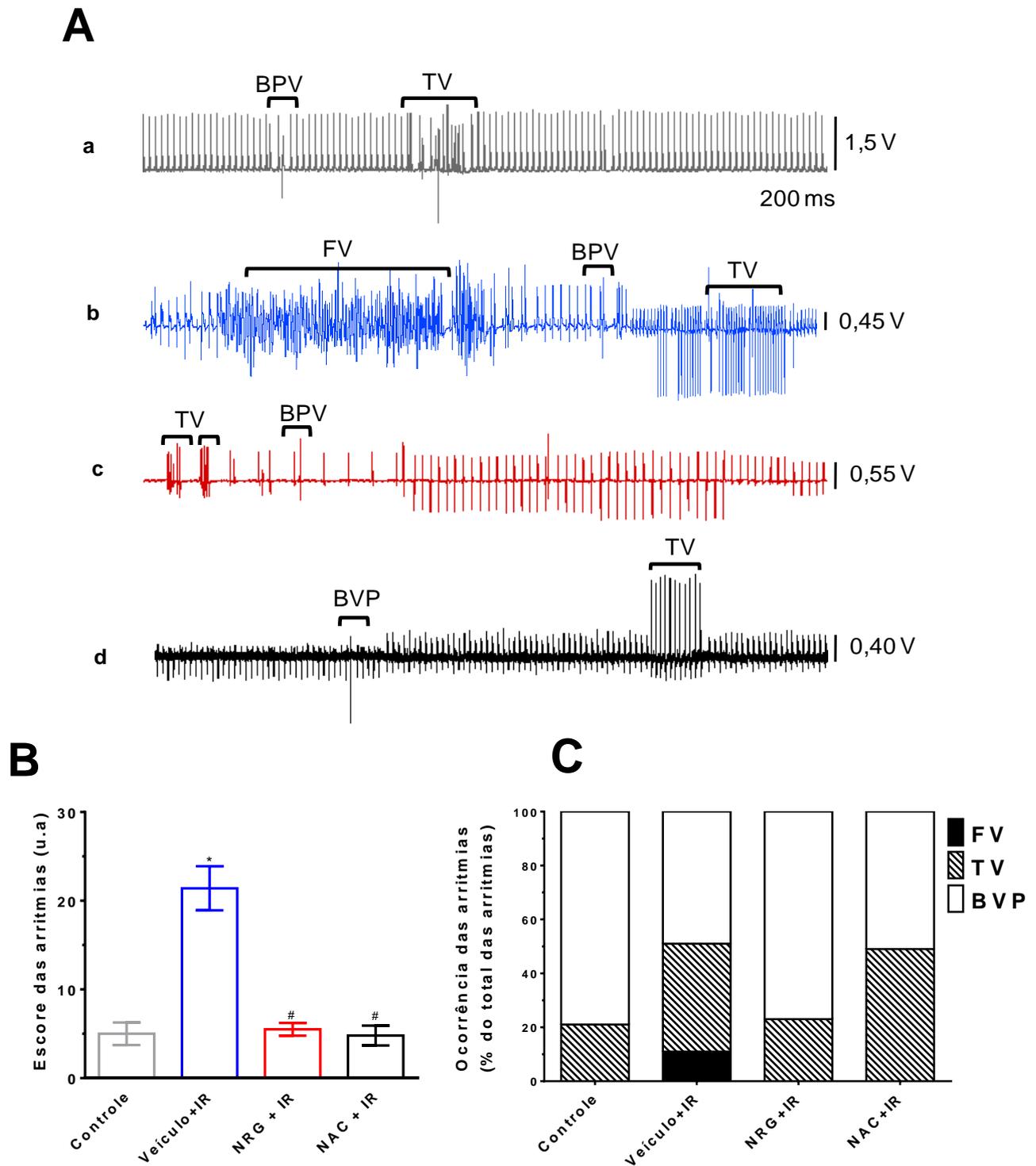


Figura 18- Naringina reduziu a ocorrência de arritmias induzida pela isquemia reperusão (IR). (A) Registro representativo dos tipos de arritmias apresentadas nos grupos (a) controle (b) veículo + IR, (c) NRG + IR e (d) NAC (N – acetilcisteína) +IR; (B) escore de arritmias e (C) ocorrência das arritmias (n=5). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05 vs controle, #p < 0,05 vs veículo + IR).

4.4 O pré-tratamento com a NRG reduziu a área de infarto induzido pela IR

A Fig. 19A mostra imagens dos corações em corte transverso e corados com TTC que dá a coloração avermelhada nas áreas com células viáveis. Em contrapartida as áreas com coloração mais clara representam áreas de infarto. Pode-se observar nas imagens o aumento da área de infarto nos corações submetidos à isquemia e que não foram pré-tratados (veículo + IR).

A injúria da IR promoveu dano celular evidenciado pelo aumento da área de infarto no grupo veículo + IR (47%) quando comparado ao grupo controle (9%) ($p < 0,05$, Fig. 19A). O pré-tratamento com NRG e NAC promoveu cardioproteção caracterizada pela diminuição significativa da área de infarto quando comparados ao grupo controle, 10% e 14%, respectivamente (Fig. 19A).

O extravasamento da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) apresentou-se aumentado no grupo veículo + IR quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e aos grupos tratados com NRG e NAC ($p < 0,05$). Foi observada uma redução de LDH de 78% (NRG+IR) e 79% (NAC+IR) quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$).

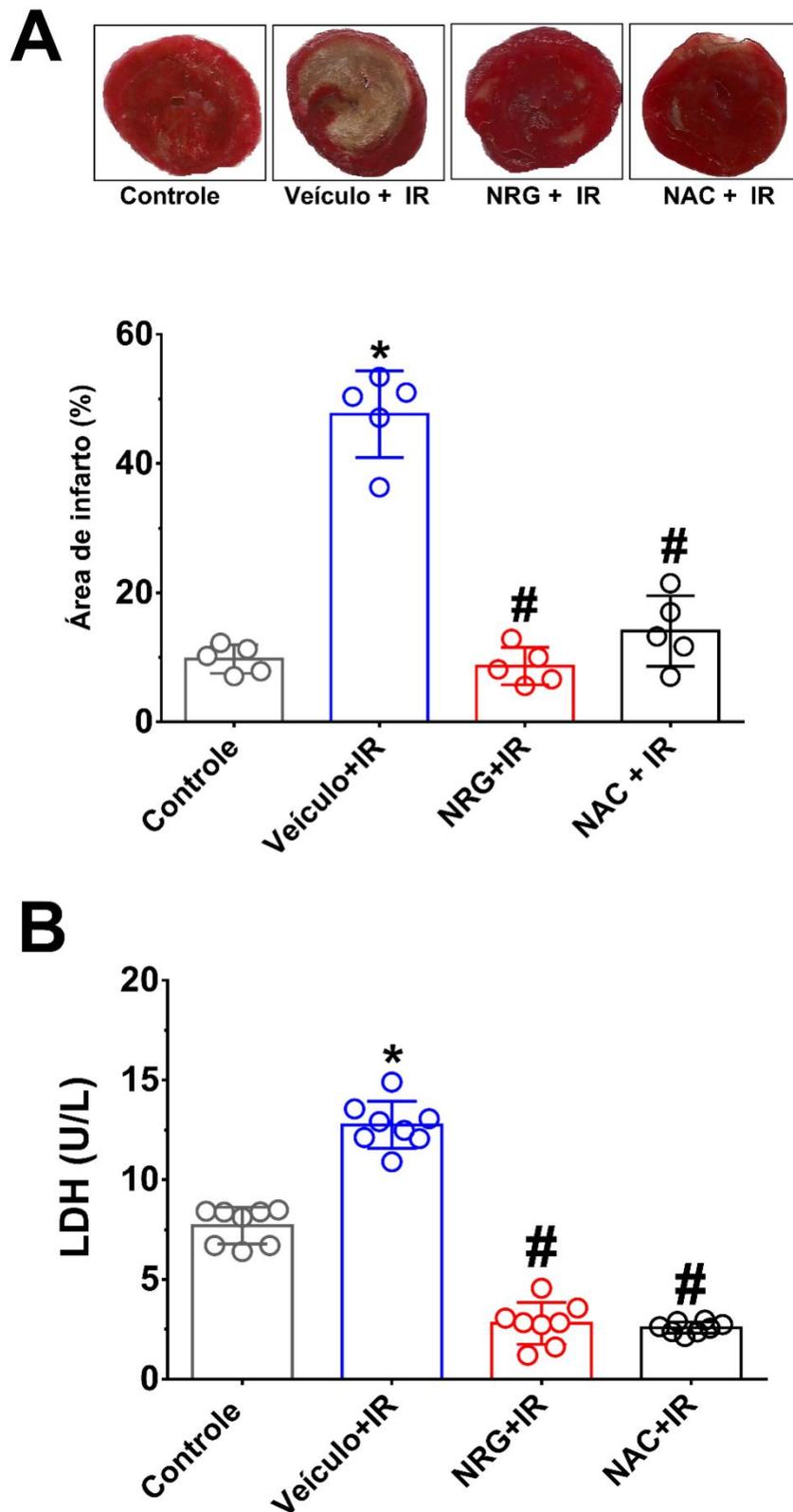


Figura 19 – Naringina reduziu a área de infarto e o extravasamento da enzima Lactato desidrogenase (LDH) nos corações submetidos a isquemia reperfusão (IR). (A) Imagens representativas dos corações nos grupos estudados (painel superior) e área de infarto em percentual da área total do coração (painel inferior). **(B)** Concentração de LDH nos diferentes grupos experimentais. A coleta de LDH foi realizada ao final da Reperfusão. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni (n=5, *p<0,05 vs controle, #p<0,05 vs veículo+IR).

4.5 Naringina diminuiu a produção de EROs nos corações submetidos à IR

Como o processo de injúria de IR ocorre por aumento na produção de EROs, investigamos se o pré-tratamento com a NRG diminuiu geração de EROs. A Fig.20A mostra as imagens representativas da fluorescência do DHE nos tecidos cardíacos nos grupos: controle, veículo + IR e NRG + IR. Como pode ser observado, a fluorescência no grupo tratado com NRG reduziu sua intensidade quando comparado ao grupo veículo+IR, assemelhando-se ao grupo que não passou pela injúria cardíaca (controle). Da mesma forma, quando avaliado quantitativamente, observou-se um aumento da fluorescência indicando aumento na produção de EROs, principalmente de ânion superóxido, no grupo veículo+IR ($1,61 \pm 0,30$ u.a., $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($1,0 \pm 0,14$ u.a.) e redução no grupo NRG+IR ($1,11 \pm 0,10$ u.a. $p < 0,05$) (Fig. 20B).

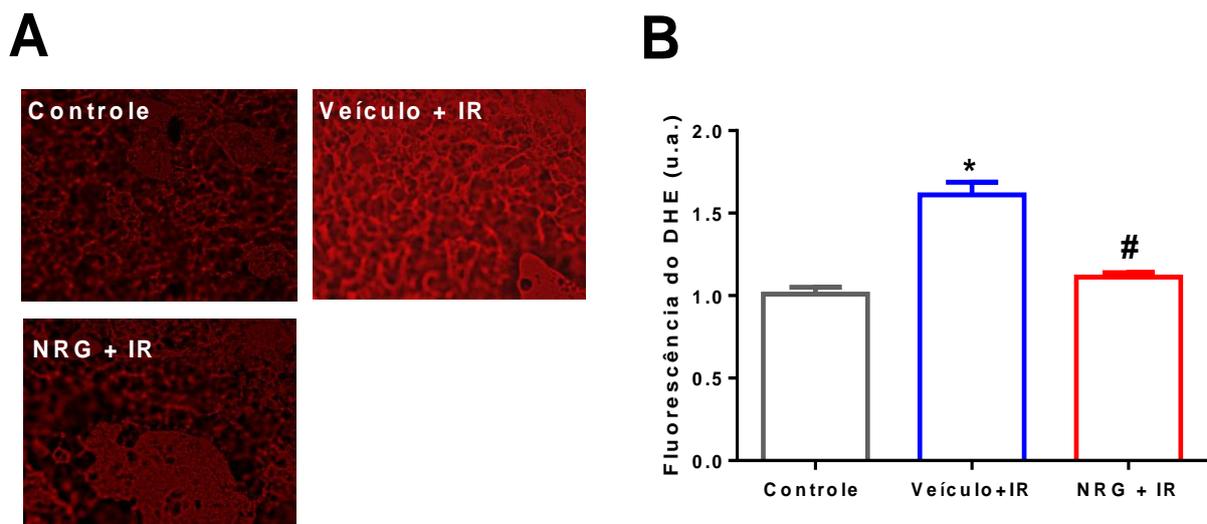


Figura 20- Naringina reduziu a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) gerado pela injúria da isquemia reperfusão (IR).(A)Imagens representativas da fluorescência do DHE (dihidroetídio) nos tecidos cardíacos nos diferentes grupos experimentais. Escala de 25 μ m e objetiva de 40x.(B) Análise quantitativa da fluorescência do DHE (n=5). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs veículo+IR).

4.6 Naringina diminuiu o estresse oxidativo nos corações submetidos à IR

Foi avaliado se o pré-tratamento com NRG reduziria o estresse oxidativo característico da injúria de IR. Como pode ser observado nas Fig. 21A e B, o grupo veículo + IR apresentou diminuição significativa da CAT e SOD quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), em 61% e 50%, respectivamente. Interessantemente, os grupos tratados com NRG e NAC foram capazes de restabelecer as atividades dessas enzimas à situação controle. Não houve diferença estatística significativa na concentração de grupos sulfidrilas e carbonilação de proteínas mostrando que não houve dano proteico (Fig. 21C e E).

A fim de avaliar se NRG apresentaria efeito protetor contra a lesão tecidual pós-isquêmica foi realizado o teste de TBARS. De acordo com a Fig. 21D, observa-se aumento do MDA no grupo veículo + IR ($3,38 \pm 0,47$ nmol MDA/mg proteína) em relação ao controle ($1,82 \pm 0,24$ nmol MDA/mg proteína) ($p < 0,05$) e redução significativa da peroxidação lipídica nos grupos tratados com NRG ($1,48 \pm 0,06$ nmol MDA/mg proteína) e NAC ($2,03 \pm 0,24$ nmol MDA/mg proteína) em relação ao veículo + IR ($p < 0,05$)

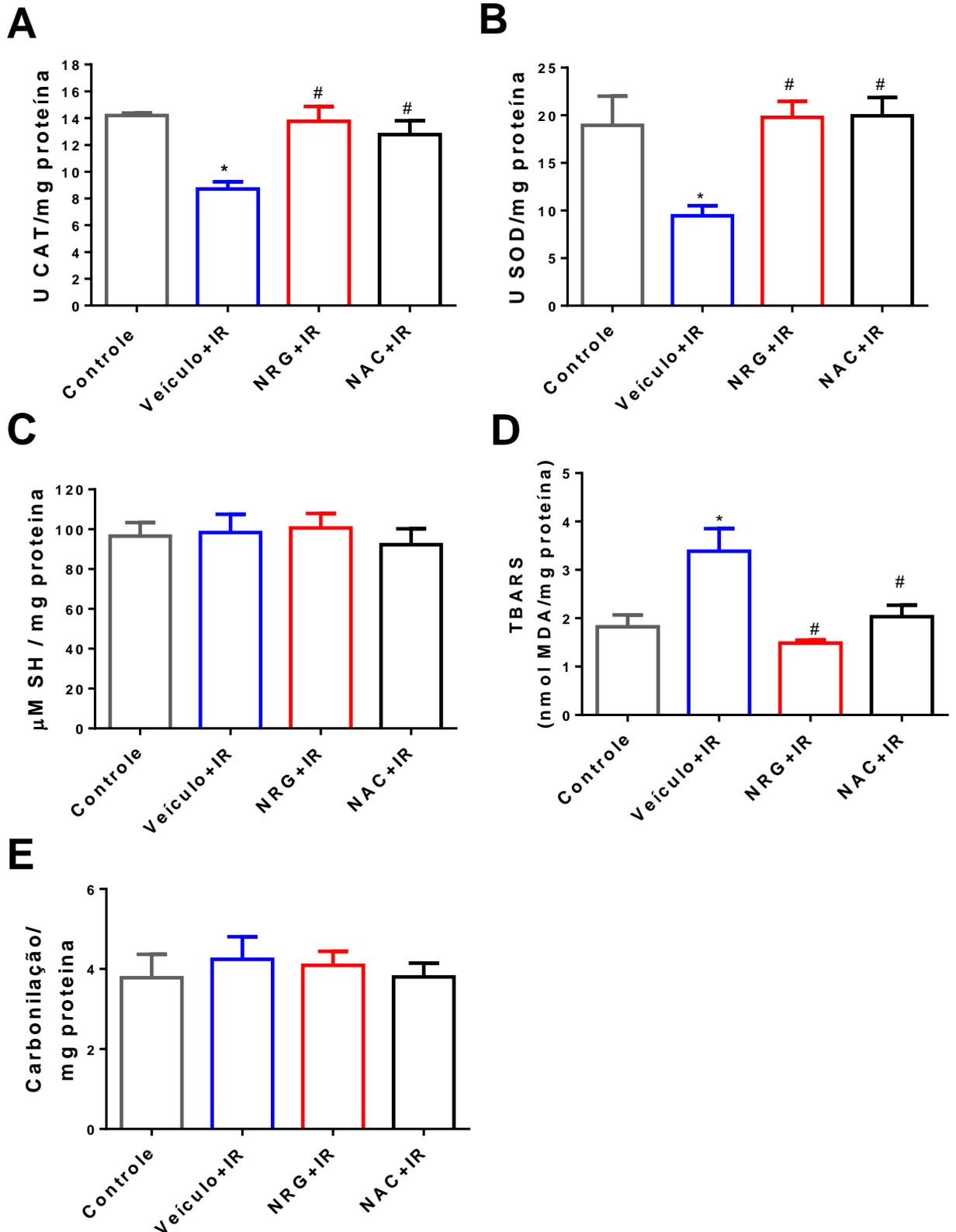


Figura 21-Naringina reduziu o estresse oxidativo gerado pela injúria da IR ao aumentar a atividade das enzimas endógenas. (A) atividade da catalase (CAT). (B) atividade da superóxido dismutase (SOD). (C) concentração de grupos sulfidrilas livres. (D) concentração da carbonilação de proteínas. (E) Teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). (n=5). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni (*p<0,05 vs controle, #p< 0,05 vs veículo+IR).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o pré-tratamento dos ratos com a NRG, um flavonoide encontrado em uvas e frutas cítricas, na dose de 25 mg/kg, durante 7 dias, promoveu efeito cardioprotetor promissor frente a injúria da IR em coração isolado de rato por: (1) melhorar a função cardíaca; (2) prevenir as alterações eletrocardiográficas típicas do IAM e a isquemia; (3) diminuir a gravidade das arritmias cardíacas, (4) reduzir o dano oxidativo, (5) melhorar os sistemas de defesa antioxidante e (6) reduzir o dano cardíaco comprovados pela diminuição da área de infarto e concentrações de LDH.

Na IR do coração, ocorre aumento da produção de EROs no período da reperfusão (BROWN; GRIENGLING, 2015). Sabe-se que as EROs são capazes de se ligar aos ácidos graxos poli-insaturados iniciando, dessa forma, o processo de peroxidação lipídica que leva ao dano celular. O MDA é o principal composto orgânico produzido na peroxidação lipídica, no qual uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico) e forma uma cor avermelhada que pode ser lida, posteriormente, em um espectrofotômetro. Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo é considerado um tema desafiador e ao mesmo tempo relevante para a vida humana moderna, sendo associado ao desenvolvimento de diversas patologias, envelhecimento e até ao aumento da mortalidade (TSIKAS, 2017).

No teste piloto para determinação da dose de NRG, resolvemos investigar o possível efeito cardioprotetor desse flavonoide sobre a IR avaliando a peroxidação lipídica. O teste de TBARS, além de simples e barato, é amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante na presença de substratos lipídicos (GHANI et al., 2017). Foi constatado, por meio dos ensaios do TBARS, que o pré-tratamento com a dose de 25mg/kg reduziu a peroxidação lipídica derivada da injúria de IR. Assim, sugere-se que a cardioproteção da NRG ocorre por meio da proteção contra processos oxidativos, principalmente no que concerne à permeabilidade da membrana.

Estudos anteriores mostraram que a NRG inibiu a peroxidação lipídica e o metabolismo do ácido araquidônico (ISIK et al., 2015). As doses de NRG usadas em estudos *in vivo* são bastante variadas. Rani et al. (2013) usaram as doses de 20, 40 e 80 mg/kg de NRG, por via oral, por um período de 14 dias, para avaliar o seu efeito na IR local por oclusão da coronária descendente. Em um estudo de IR renal a dose de NRG utilizada foi 100 mg/kg por via oral (AMINI et al., 2019); 50 mg/kg para avaliar o seu efeito sobre a isquemia intestinal (BAKAR

et al., 2019); 400 mg/kg em um estudo de isquemia em pata traseira de rato (GÜRSUL et al., 2016).

Levando-se em consideração o intervalo de doses da NRG adotado nos estudos de IR, a dose de 25 mg/kg que foi utilizada no nosso estudo, apresenta-se como promissora, pois mesmo sendo uma dose baixa apresentou efeito significativo em comparação às doses maiores. O NAC foi utilizado como controle positivo em virtude de ser um agente antioxidante conhecido (ALDINI et al., 2018). Dentre os efeitos do NAC no IAM têm-se: a redução das EROs e RL, inibição da cascata inflamatória, efeito antiplaquetário e inibição da conversão da enzima conversora de angiotensina (ECA)(MARENCO; FRYE, 2018).

Em virtude da baixa solubilidade da NRG em água, a diluição desse flavonoide ocorreu em meio com DMSO a 25%, o qual é considerado um solvente com baixa toxicidade. Jabbari et al. (2017), usando modelo computacional, mostraram um número maior de moléculas de DMSO (porcentagem acima de 20%) na vizinhança da NRG quando comparado ao número de moléculas de água, tornando a NRG mais solúvel.

A injúria da IR leva à perda da função cardíaca evidenciada pela redução da PDVE e da velocidade de recuperação das derivadas máxima de contração e do relaxamento como mostrados em diversos estudos (QIU et al., 2017; SHANMUGAM et al., 2018; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Os nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com a NRG melhorou a recuperação dos parâmetros contráteis do ventrículo esquerdo durante a IR caracterizando um efeito cardioprotetor. Resultados semelhantes foram encontrados com outros compostos naturais, a exemplo do mirtenol (BRITTO et al., 2018) e da naringenina (NARI) (MENG et al., 2016) em que houve também recuperação da PDVE e das derivadas máxima de contração e relaxamento na reperfusão.

A NARI é uma flavona que junto com o dissacarídeo neohesperidose dá origem a NRG, conferindo sabor amargo às frutas (YIN; XIAO; ZHANG, 2015; ZHANG et al., 2014). Outro trabalho, realizado por Shanmugam et al. (2018), mostrou que a fisetina, um flavonoide encontrado em frutas e vegetais, melhorou a função cardíaca restaurando a pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE) e pressão diastólica ventricular esquerda (PDVE).

Os animais pré-tratados com NRG e NAC não apresentaram a inversão da onda T e o supradesnivelamento do segmento ST nos registros eletrocardiográficos, alterações essas observadas no grupo veículo + IR, demonstrando efeito cardioprotetor da NRG por prevenir as alterações elétricas sugestivas de IAM. O sinal mais precoce do IAM é a perda discreta da concavidade do segmento ST. Assim, na fase aguda do IAM ocorre supradesnivelamento de

ST e aumento da amplitude da onda T representando um sinal de piora da evolução da doença com elevado risco para ocorrer FV (MANSUR et al., 2006).

Na prática clínica, com a evolução do IAM, as alterações eletrofisiológicas como a inversão da onda T começam a aparecer em cerca de 24 h. Com o tratamento na reperfusão, alguns critérios são utilizados para indicar melhora no prognóstico, tais como: normalização do supradesnívelamento do ST com regressão de 70% após 90 minutos (FRIEDMAM, 2016). Além dessas alterações, o IAM pode ocasionar infradesnívelamento do ST, elevação por curto período de tempo do ST, ou mesmo sem alterações na repolarização, sendo todas essas condições associadas à elevação de marcadores de necrose miocárdica (FILHO; FEITOSA, 2010).

A liberação de enzimas, tais como a LDH e a medida do tamanho da área de infarto são parâmetros importantes para avaliar a injúria cardíaca. Os nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com NRG reduziu tanto a concentração de LDH no perfusato quanto à área de infarto dos corações mostrando proteção ao diminuir o dano tecidual cardíaco. A coloração com TTC é um teste preciso para avaliação da área de infarto, onde este corante em contato com células viáveis sofre redução por desidrogenases assumindo a cor vermelho escura, o que não ocorre com células não viáveis, as quais permanecem com coloração mais clara. Assim, o TTC possibilita a caracterização da necrose imediatamente após a morte celular (TUCCI, 2011). A LDH é uma enzima intracelular citosólica que é liberada para o meio extracelular após lesão da membrana sarcolemal e por este motivo é utilizada como biomarcador de dano cardíaco (POVLSEN et al., 2014).

Diversos autores constataram que a redução da área de infarto, após tratamento com compostos flavonoides, está associada aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiarrítmicos (ENAYATI et al., 2018; PASHAI et al., 2016; SELVARAJ; PUGALENDI, 2010). Rani et al.(2013) avaliaram o efeito cardioprotetor da NRG em isquemia local de ratos e observou diminuição da área de infarto e atenuação do estresse oxidativo por sua atividade antioxidante. A NRG também apresentou efeito antioxidante em injúria de IR no rim (SINGH; CHOPRA, 2004), atenuou o dano oxidativo e alterações histopatológicas em IR no cérebro (GAUR; AGGARWAL; KUMAR, 2009), atenuou o estresse oxidativo com redução de radicais livres em lesão ao músculo esquelético (GÜRSUL et al., 2016). A NARI apresentou efeito cardioprotetor em protocolo de IR global com diminuição da área de infarto e LDH, por apresentar atividade antioxidante no miocárdio (MENG et al., 2016). A área de infarto também foi diminuída pela NARI em estudo de IR miocárdica por oclusão da coronária (TESTAI et al., 2013).

Sabe-se que no período da reperfusão ocorre lesão tecidual e vários eventos prejudiciais e dentre eles podemos destacar as arritmias cardíacas (FEYZIZADE e BADALZADEH, 2017). No nosso estudo, três tipos de arritmias foram observadas no período da reperfusão (TV, FV e BVP). É importante ressaltar que o grupo controle apresentou BVP e TV mesmo sem passar pela injúria de IR, pois após a toracotomia e canulação da aorta o coração passa por um pequeno período (até 5 minutos) em isquemia até ser ligado ao sistema de Langendorff. O pré-tratamento dos animais com a NRG ou NAC preveniu o aparecimento da arritmia mais severa, a FV. Estudos apontam que a ocorrência de arritmias, durante o período de reperfusão, esteve presente em 80% dos pacientes que apresentaram IAM (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012), sendo a TV a complicação mais frequente (MITRANI; MYERBURG, 2017). A FV frequentemente traz complicações severas aos pacientes com IAM com uma incidência de 6 a 21%. Além disso, batimentos rápidos e irregulares do ventrículo podem causar maior comprometimento da circulação coronariana e da função ventricular esquerda implicando em um prognóstico ruim para pacientes hospitalizados (REHMAN et al., 2017).

Outros estudos que avaliaram substâncias antioxidantes apresentaram resultados que corroboram com nossos achados, redução da gravidade das arritmias (BRITTO et al., 2018; YANG et al., 2018). Estudos mostram que o aumento das EROs e de citocinas inflamatórias, decorrentes da IR, está diretamente ligado à ocorrência das arritmias (BADALZADEH et al., 2014; MITRANI; MYERBURG, 2017). Além disso, a sobrecarga de Ca^{2+} e a abertura do PTPM ainda são caracterizadas como os principais desencadeadores das arritmias cardíacas (ARRIAGADA; TREWER; GONZÁLEZ, 2018; BADALZADEH et al., 2014; LESNEFSKY et al., 2017).

A arritmogênese ocasionada pela IR foi avaliada por Becerra et al. (2016) que mostraram que o receptor de rianodina 2 (RyR2), contribuiu para o aparecimento de arritmias na reperfusão. Nesse estudo, foi observado que quando a oxidação do grupamento tiol do RyR2 foi inibida com a mercaptopropionilglicina (MPG), um inibidor da conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, houve uma inibição da produção de RL havendo uma redução no número de arritmias.

A sobrecarga de cálcio e produção excessiva de EROs são causas importantes na injúria de IR e cada um representa um alvo potencial para flavonoides a fim de proteger o tecido isquêmico e reperfundido (QIN; WILLIAMS; WOODMAN, 2011). Em estudo de revisão realizado por Testai (2015), foi constatado que a ingestão de alimentos ricos em flavonoides reduziu os fatores de risco cardiovascular e a mortalidade. Além disso, foram estudados diversos efeitos cardioprotetores dos flavonoides em vários modelos animais de isquemia e

observou-se, que dentre os mecanismos de defesa encontrava-se o efeito antioxidante crucial para cardioproteção.

Akhlaghi e Bandy (2009) estudaram os mecanismos de proteção dos flavonoides contra injúria de IR miocárdica e observaram que os flavonoides podem agir diretamente, impedindo a geração de EROs, agindo como sequestrador de EROs, exercendo seus efeitos antioxidantes com o aumento de enzimas antioxidantes celulares e inibição da xantina oxidase e NADPH oxidases. Observaram também que os flavonoides possuíam a capacidade de provocar vasorelaxamento, diminuindo a injúria da IR e reestabelecendo o fluxo sanguíneo.

Dentro desse contexto, a NRG sendo um flavonoide pode apresentar também esses efeitos cardioprotetores. No nosso estudo, o pré-tratamento com NRG diminuiu o estresse oxidativo por restaurar as enzimas antioxidantes a exemplo da SOD e CAT. Resultado semelhante foi encontrado no controle positivo NAC + IR. Além disso, a recuperação das enzimas foi acompanhada pela redução do MDA no grupo pré-tratado com NRG indicando que a cardioproteção da NRG está associada a sua ação antioxidante. O estresse oxidativo surge com o desequilíbrio entre a defesa antioxidante (CAT, SOD, GP_x e glutatona redutase) e o dano oxidativo (RL, peroxidação lipídica e carbonilação das proteínas) (BARBOSA et al., 2010). Dessa forma, a redução do estresse oxidativo é caracterizada como sendo uma estratégia para prevenir os danos causados pela injúria da IR.

Em estudo realizado por Khodayar et al. (2018) que avaliou o efeito da NRG na cardiotoxicidade induzida pelo bisfenol A (BPA), uma substância química utilizado na indústria de epóxi resinas e plásticos de policarbonato, foi observada que a cardioproteção do pré-tratamento com a NRG foi decorrente da supressão da peroxidação lipídica (redução do MDA) e aumento da atividade antioxidante da SOD e CAT. Outros estudos com flavonoides corroboram com os achados da presente pesquisa. A NARI aumentou a atividade da SOD e diminuiu o MDA melhorando a capacidade antioxidante em corações de ratos submetidos a IR (MENG et al., 2016). Ao estudar a tilianina, um flavonoide antioxidante, foi observado recuperação da atividade da SOD e diminuição do MDA quando comparados ao grupo controle na IR miocárdica (ZENG et al., 2018). A fisetina, outro flavonoide antioxidante, igualmente atenuou o estresse oxidativo ao ampliar o sistema de defesa antioxidante endógeno com a recuperação da SOD e CAT, bem como redução da peroxidação lipídica (SHANMUGAM et al., 2018).

Sabe-se que as EROs podem modificar aminoácidos fragmentando as cadeias polipeptídicas levando à sua degradação. Assim, tanto o dano oxidativo às proteínas quanto aos lipídios está relacionado ao processo de envelhecimento e surgimento de mutações, doenças e

câncer (WANG et al., 2014). O grupo SH (sulfidril) pode ser oxidado por RL comprometendo o funcionamento das proteínas (TROMM et al., 2012). Assim, a oxidação desses grupamentos SH é responsável por causar alteração na conformação das proteínas levando à perda da atividade ou função proteica (BIRBEN et al., 2012), sendo os seus produtos considerados marcadores do estresse oxidativo celular (PÉREZ et al., 2012).

No nosso estudo não houve diferença estatística entre os grupos quando relacionados à degradação proteica demonstrando que provavelmente o efeito da injúria se deu na permeabilidade e excitabilidade da membrana. Estudos que avaliem a sulfidrilção e carbonilação das proteínas em protocolo de IR são escassos. No entanto, Britto et al. (2018) observaram uma carbonilação aumentada de proteínas e a diminuição do teor de sulfidrilas nas proteínas cardíacas durante a injúria por IR que foram recuperadas pelo tratamento com o mirtenol, resultado este contrário aos achados do nosso estudo.

A S-nitrosilação é definida como sendo uma reação reversível entre o NO e a sulfidril (tiol) de um resíduo de cisteína que leva à formação de SNO (S-nitrosotiol) (BECERRA et al., 2016). Estudos reportam que a ocorrência de arritmias na reperfusão foi ocasionada pelo aumento espontâneo do cálcio sarcoplasmático, resultado da diminuição da S-nitrosilação da RyR2 pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que forma o composto RyR2-NO, quanto pelo aumento da oxidação da RyR2 (RyRSOx). O desequilíbrio nitroso-redox, ocasionado pela diminuição da atividade da NOS, leva a um fenótipo arritmico grave ocasionado pelo estresse oxidativo que pode ser restaurado por meio de terapias que atenuem esse desbalanço prevenindo a morte súbita por arritmias (CUTLER et al., 2012).

Os resultados apresentados no nosso estudo, no que concerne à recuperação da SOD e CAT, confirmam os achados da redução na intensidade da fluorescência do DHE nos grupos pré-tratados com NRG. O DHE é uma sonda fluorescente utilizado para detectar principalmente o $O_2^{\bullet-}$ intracelular. Quando o $O_2^{\bullet-}$ é oxidado pelo DHE gera um composto denominado 2-hidroxi-etídio (2-E + OH) que confere especificidade à avaliação do $O_2^{\bullet-}$ dentre outras EROs. No entanto, essa oxidação também gera a formação de outros produtos fluorescentes como o etídio sendo que a quantificação tanto deste quanto do $O_2^{\bullet-}$ só pode ser realizada por meio de sua separação física pelo HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Portanto, o DHE não é específico para identificar apenas um tipo de EROs (FERNANDES; GONÇALVES; LAURINDO, 2017).

Com base nos resultados apresentados pelo pré-tratamento com a NRG foi constatado que a atenuação do estresse oxidativo é o principal mecanismo para sua cardioproteção. Vale

ressaltar que, estudos têm evidenciado o papel dos canais para K^+ sensíveis ao ATP localizados no sarcolema ($sarcoK_{ATP}$) e na mitocôndria ($mitoK_{ATP}$) como importantes reguladores no pré-condicionamento da IR (GARLID et al., 1996). Testai et al. (2013) e Meng et al. (2016) avaliaram o efeito cardioprotetor da NARI contra IR por ativação dos K_{ATP} e constataram que a cardioproteção anti-isquêmica desse composto se deu pela ativação desses canais. O mecanismo de proteção se dá pela ativação das correntes de potássio que leva a repolarização mais rápida da célula diminuindo o influxo de íons cálcio. Dessa forma, há uma redução da absorção de cálcio durante a isquemia protegendo contra a morte celular durante a reperfusão (KANG et al., 2007).

Considerando que ainda existem grandes desafios no processo de prevenção das DCVs e que estas possuem origem multifatorial, controlar os fatores de risco modificáveis contribuem para diminuição da morbimortalidade. O estudo de produtos naturais que possam ser incluídos na alimentação diária ou em forma de suplemento, torna-se importante para prevenção do IAM e associa-se a uma melhora a qualidade de vida, estimulando mudanças de comportamentos e reforçando o autocuidado para promoção da saúde.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a NRG exerce efeito cardioprotetor contra a injúria da IR, visto que, o pré-tratamento dos animais, por via oral, durante 7 dias, preservou a função contrátil do coração evitando alterações elétricas típicas de isquemia e infarto miocárdico (inversão da onda T e supradesnivelamento do segmento - ST). Além disso, a NRG diminuiu a gravidade das arritmias cardíacas observadas na reperfusão, diminuindo a área do infarto do miocárdio e o extravasamento do LDH. Também foi observado que a NRG foi capaz de diminuir a produção de EROs durante o processo de IR, diminuir o dano oxidativo (peroxidação lipídica), restaurar as enzimas antioxidantes (catalase e SOD). Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a NRG é um flavonoide promissor na prevenção de injúria cardíaca ocasionada por isquemia e reperfusão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological Systems. [s.l.] Academic Press, 1984. v. 105p. 121–126.

AKHLAGHI, M.; BANDY, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 3, p. 309–317, mar. 2009.

ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free Radical Research**, v. 52, n. 7, p. 751–762, 3 jul. 2018.

AMARAL, A. C. F. et al. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. v. **Cadernos de Atenção Básica**; n. 31, p. 1–156, 2012.

AMINI, N. et al. Protective effects of naringin and trimetazidine on remote effect of acute renal injury on oxidative stress and myocardial injury through Nrf-2 regulation. **Pharmacological Reports**, 14 jun. 2019.

ARRIAGADA, O.; TREWER, A. V.; GONZÁLEZ, D. R. **Free Radicals, antioxidants and diseases**. London: Rizwan Ahmad, 2018.

AZEVEDO, D. F. DE. **Iniciação à Eletrocardiografia**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, 1999.

BADALZADEH, R. et al. Anti-arrhythmic effect of diosgenin in reperfusion-induced myocardial injury in a rat model: activation of nitric oxide system and mitochondrial KATP channel. **The journal of physiological sciences: JPS**, v. 64, n. 6, p. 393–400, nov. 2014.

BAKAR, E. et al. Investigation of the effects of naringin on intestinal ischemia reperfusion model at the ultrastructural and biochemical level. **Biomedicine & Pharmacotherapy - Biomedecine&Pharmacotherapie**, v. 109, p. 345–350, jan. 2019.

BAPTISTA, E. A.; QUEIROZ, B. L.; RIGOTTI, J. I. R. Decomposition of mortality rates from cardiovascular disease in the adult population: a study for Brazilian micro-regions between 1996 and 2015. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 35, n. 2, 2018.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. **Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. 1. ed. [s.l.] Química Nova, 2006. v. 29

BECERRA, R. et al. Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 311, n. 3, p. H713-724, 2016.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v. 7, Suppl, p. S41-50, jun. 2007.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BOATENG, S.; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Disease-a-month: DM**, v. 59, n. 3, p. 83–96, mar. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. **Estatísticas vitais: Mortalidade**, 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 13 mar. 2019

BRASIL. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1 ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006.

BRITTO, R. M. DE et al. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 111, p. 557–566, jan. 2018.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 116, n. 3, p. 531–549, 30 jan. 2015.

BROWN, D. I.; WILLIS, M. S.; BERTHIAUME, J. M. Chapter 11 - **Influence of Ischemia-Reperfusion Injury on Cardiac Metabolism**. p. 13, 2016.

BUDAS, G. R.; CHURCHILL, E. N.; MOCHLY-ROSEN, D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 6, p. 523–536, jun. 2007.

CASTROGIOVANNI, P.; IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Italian Journal of Anatomy and Embryology -ArchivioItaliano Di Anatomia Ed Embriologia**, v. 117, n. 2, p. 107–117, 2012.

CHEEVER, K. H.; HINKLE, J. L. **Brunner & Suddarth - Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

CHEN, R. et al. Therapeutic potential of naringin: an overview. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3203–3210, dez. 2016.

CHENG, Y. et al. Cardioprotective effects of total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy -Biomedecine&Pharmacotherapie**, v. 98, p. 308–317, fev. 2018.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1 fev. 1996.

CORDENONSI, L. M. et al. Simultaneous separation and sensitive detection of naringin and naringenin in nanoparticles by chromatographic method indicating stability and photodegradation kinetics. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 30, n. 2, p. 155–162, fev. 2016.

CURTIS, M. J., WALKER, M. J. A. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. **Cardiovasc. Res.** v.22, p. 656–665. 1988.

CUTLER, M. J. et al. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p. 18186–18191, 30 out. 2012.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p. 459–469, 2010.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.

ENAYATI, A. et al. Cardioprotective and anti-apoptotic effects of *Potentilla reptans* L. root via Nrf2 pathway in an isolated rat heart ischemia/reperfusion model. **Life Sciences**, v. 215, p. 216–226, 15 dez. 2018.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FERNANDES, D. C.; GONÇALVES, R. C.; LAURINDO, F. R. M. Measurement of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1527, p. 233–249, 2017.

FILHO, J. A. P.; FEITOSA, G. S. **Algumas Considerações sobre o Eletrocardiograma no Infarto Agudo do Miocárdio.**2010.

FISHBEIN, M. C. et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. **American Heart Journal**, v. 101, n. 5, p. 593–600, maio 1981.

FRANCES, C. et al. Role of 1- and 2-Adrenoceptor Subtypes in Preconditioning Against Myocardial Dysfunction after Ischemia and Reperfusion. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 41, n. 3, p. 10, 2003.

FRIEDMAM, A. A. **Eletrocardiograma em 7 aulas: Temas avançados e outros métodos.**[s.l.] Manole, 2016. v. 2

GABRIELOVÁ, E. Silymarin Component 2,3-dehydrosilybin Attenuates Cardiomyocyte Damage Following Hypoxia/Reoxygenation by Limiting Oxidative Stress. **Physiological Research**,v. 64, p. 13, 2015.

GARLID, K. D. et al. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8796–8799, 12 abr. 1996.

GAUR, V.; AGGARWAL, A.; KUMAR, A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1–3, p. 147–154, 15 ago. 2009.

GHANI, M. A. et al. Substrate and TBARS variability in a multi-phase oxidation system: TBARS variability in a multi-phase oxidation system. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 4, p. 1500500, abr. 2017.

GIZZI, J. C.; MOREIRA, D. A. R. Arritmias ventriculares no infarto agudo do miocárdio. **Journal of Cardiac Arrhythmias**. v. 10, n. 1, p. 36–45, 1997.

GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Goldman Cecil Medicine**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. v. 24

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524–551, dez. 2015.

GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1912–1916, 21 out. 2003.

GUIMARÃES, J. I. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. **Arq Bras Cardiol**, v. 80, p. 18, 2003.

GÜRSUL, C. et al. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. sup1, p. 56–61, 2016.

HAKIM, J. [Reactive oxygen species and inflammation]. **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales**, v. 187, n. 3, p. 286–295, 1993.

HARRISON, G. E.; RAYMOND, W. H. A. Preparation of Clean Chemical Solutions. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4737, p. 930–932, 20 out. 1951.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018.

ISIK, A. et al. The effect of ozone and naringin on intestinal ischemia/reperfusion injury in an experimental model. **International Journal of Surgery (London, England)**, v. 21, p. 38–44, set. 2015.

JABBARI, M. et al. Solubility temperature and solvent dependence and preferential solvation of citrus flavonoid naringin in aqueous DMSO mixtures: an experimental and molecular dynamics simulation study. **Royal Society of Chemistry**. v. 7, p. 14776–14789, 2017.

JASWAL, J. S. et al. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1333–1350, jul. 2011.

JENNINGS, R. B.; GANOTE, C. E. Structural changes in myocardium during acute ischemia. **Circulation Research**, v. 35 Suppl 3, p. 156–172, set. 1974.

KALIMERIS, et al. N-acetylcysteine ameliorates liver injury in a rat model of intestinal ischemia reperfusion. **J Surg Res.** v. 206, n. 2, p. 263-272, 2016.

KANDEMIR, F. M. et al. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and autophagic properties. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. e12398, out. 2017.

KANG, S. H. et al. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H307-313, jul. 2007.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic & clinical pharmacology**.v.2, New York: Lange, 2012.

KHODAYAR, M. J. et al. Protective effect of naringin against BPA-induced cardiotoxicity through prevention of oxidative stress in male Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1–11, 28 set. 2018.

KOKKOU, E. et al. The cardioprotective effects of flavonoids: a focus on classic cardiovascular risk factors. **Hellenic Journal of Atherosclerosis**, v. 8, n. 2, 12 set. 2017.

KRUGER, N. J. **The Bradford Method for Protein Quantitation**. p. 17–24, 2009.

KWATRA, M. et al. Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 4, p. 637–647, 2016.

LESNEFSKY, E. J. et al. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, p. 535–565, 06 2017.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LIU, L. et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- κ B activation in vivo and in vitro. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 7, p. 813–821, jul. 2017.

LIU, S. et al. The cardioprotective effect of dihydromyricetin prevents ischemia-reperfusion-induced apoptosis in vivo and in vitro via the PI3K/Akt and HIF-1 α signaling pathways. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death**, v. 21, n. 12, p. 1366–1385, 2016.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOOR, G. et al. Mitochondrial Oxidant Stress Triggers Cell Death in Simulated Ischemia-Reperfusion. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, n. 7, p. 1382–1394, jul. 2011.

LUX, R. L. Basis and ECG measurement of global ventricular repolarization. **Journal of Electrocardiology**, v. 50, n. 6, p. 792–797, dez. 2017.

LV, D. et al. The cardioprotective effect of total flavonoids on myocardial ischemia/reperfusion in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 88, p. 277–284, abr. 2017.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do centro de biologia e reprodução**. v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.

MAIA, L. F. DOS S. Infarto Agudo do Miocárdio: o perfil de pacientes atendidos na UTI de um hospital público de São Paulo. **Revista científica de enfermagem**. v. 2, n. 1, p. 41–52, maio 2014.

MANSUR, P. H. G. et al. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 106–114, ago. 2006.

MARCOFF, L.; THOMPSON, P. D. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 23, p. 2231–2237, 12 jun. 2007.

MARENCO, J. P.; FRYE, R. E. **The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine**. Singapore: Adis, 2018.

MARÍN-GARCÍA, J.; GOLDENTHAL, M. J. Mitochondria play a critical role in cardioprotection. **Journal of Cardiac Failure**, v. 10, n. 1, p. 55–66, fev. 2004a.

MARÍN-GARCÍA, J.; GOLDENTHAL, M. J. Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 82, n. 9, p. 565–578, set. 2004b.

MARTELLI, A. Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 2, n. 1, p. 41–52, 27 jun. 2014.

MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, D. M. D.; TEIXEIRA, T. F. S. O Paradoxo do Papel da vitamina E na Iniciação e progressão da aterosclerose e sua correlação com os radicais livres. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v.2, 14, p. 113–116, 2004.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273–275, 15 fev. 1984.

MENG, L.-M. et al. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATP-sensitive potassium channel in rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 9, p. 973–978, set. 2016.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 25 maio 1972.

MITRANI, R. D.; MYERBURG, R. J. Ventricular Tachycardia and Fibrillation in Patients with Structural Heart Disease. In: KOWEY, P. et al. (Eds.). **Cardiac Arrhythmias, Pacing and Sudden Death**. Cardiovascular Medicine. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 191–204.

OLSZEWER, E.; FLAM, S.; ELLOVITCH, S. **Radicais Livres em Cardiologia: Isquemia e Reperfusão**. São Paulo: Tecnopress, 2017.

OMS. **World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: World Health Organization, 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324835/9789241565707-eng.pdf?ua=1>>.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.

PASHAI, M. et al. The Effects of Hesperidin on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in Isolated Rat Heart. **Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 68–75, jun. 2016.

PASTORE, C. et al. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre análise e emissão de laudos eletrocardiográficos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 4, 2016.

PENNA, C. et al. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 7, p. 781–793, jul. 2009.

PÉREZ, Y. G. et al. Malondialdeído e grupo sulfidril como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 4, p. 658–660, ago. 2012.

PIEGAS et al. V Diretriz da sociedade brasileira de cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.2, n.105, p. 1–121, ago. 2015.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, jul. 2000.

PODEROSO, J. J. et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 1, p. 85–92, 1 abr. 1996.

POSTEMA, P. G.; WILDE, A. A. M. The measurement of the QT interval. **Current Cardiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 287–294, ago. 2014.

POVLSEN, J. A. et al. Frequent biomarker analysis in the isolated perfused heart reveals two distinct phases of reperfusion injury. **International Journal of Cardiology**, v. 171, n. 1, p. 9–14, 15 jan. 2014.

QIN, C. X.; WILLIAMS, S. J.; WOODMAN, O. L. Antioxidant activity contributes to flavonol cardioprotection during reperfusion of rat hearts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1437–1444, 1 out. 2011.

QIU, Y. et al. Systems Pharmacology Dissection of the Protective Effect of Myricetin Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart. **Cardiovascular Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 277–286, 2017.

QU, D. et al. Cardioprotective Effects of Astragaloside against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 8194690, 2016.

RAEDSCHELDERS, K.; ANSLEY, D. M.; CHEN, D. D. Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 230–255, fev. 2012.

RAJADURAI, M.; PRINCE, P. S. M. Naringin ameliorates mitochondrial lipid peroxides, antioxidants and lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. **Phytotherapy research: PTR**, v. 23, n. 3, p. 358–362, mar. 2009.

RANI, N. et al. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82577, 2013.

RASSAF, T. et al. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. **European Heart Journal**, v. 27, n. 14, p. 1699–1705, jul. 2006.

REHMAN, H. UR et al. Frequency and in Hospital Complications of Atrial Fibrillation in Patients with Acute ST Segment Elevation Myocardial Infarction. **Current Cardiology Reviews**. v. 28, n. 10, 2017.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

SANTOS. **Exercício físico, radicais livres, espécies reativas de oxigênio, envelhecimento e doenças neurodegenerativas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013.

SANTOS, C. X. C. et al. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 7, p. 777–793, 1 abr. 2011.

SANTOS, L. R. DOS. **Naringina Promove Efeito Inotrópico Positivo Dependente de Catecolaminas Endógenas em Coração Isolado de Rato**. [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2016.

SELVARAJ, P.; PUGALENDI, K. V. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 15, n. 5, p. 217–223, 2010.

SEHIRLI, A. O.; SENER, G.; SATIROGLU, H.; AYANOĞLU-DÜLGER, G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. **Journal of Nephrology**. v.16, n.1, p.75-80, 2013.

SHANMUGAM, K. et al. Fisetin Confers Cardioprotection against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by Suppressing Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction and Inhibiting Glycogen Synthase Kinase 3 β Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 9173436, 2018.

SIERVULI, M. T. F. et al. Infarto do Miocárdio: Alterações Morfológicas e Breve Abordagem da Influência do Exercício Físico. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 27, n. 5, p. 349–355, out. 2014.

SILVA, R. D. **Radicais livres: conceito, fisiopatogênica, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2010.

SINGH, D.; CHOPRA, K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 187–193, ago. 2004.

SUBRAMANIAN, B. ECG signal classification and parameter estimation using multiwavelet transform. **Biomed Res**, v. 28, n. 7, p. 7, 2017.

TAKHTFOOLADI, H. A.; HESARAKI, S.; RAZMARA, F.; TAKHTFOOLADI, M. A.; HAJIZADEH, H. Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hind-limb ischemia/reperfusion injury. **Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicacao Oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. v.42, n.1, p.9-14.

TESTAI, L. et al. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1634–1643, 1 jun. 2013.

TESTAI, L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. **Life Sciences**, v. 135, p. 68–76, 15 ago. 2015.

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento Cutâneo: Teoria Dos Radicais Livres E Tratamentos Visando A Prevenção E O Rejuvenescimento. **Revista Uningá Review**, v. 1, n. 1, 16 out. 2017.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 1 jul. 2008.

THYGESEN, K. et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). **Global Heart**, v. 13, n. 4, p. 305–338, 2018.

TOTZECK, M.; HENDGEN-COTTA, U. B.; RASSAF, T. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and Cardioprotection. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 982, p. 335–346, 2017.

TRIPOSKIADIS, F. et al. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 19, p. 1747–1762, 3 nov. 2009.

TROMM, C. B. et al. Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 14, n. 1, p. 52–60, 2012.

TSE, G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. **Journal of Arrhythmia**, v. 32, n. 2, p. 75–81, abr. 2016.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13–30, 1 maio 2017.

TUCCI, P. J. F. Características fisiopatológicas do modelo de insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio no rato. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 5, p. 420–424, maio 2011.

TULLIO, F. et al. Mitochondrial Sources of ROS in Cardio Protection and Ischemia/Reperfusion Injury. **Ann Cardiovasc Dis**, v.1, n2, p.1006,2016

VASCONCELOS, C. M. L. DE. **Estudo dos efeitos contráteis e eletrofisiológicos de extratos obtidos das folhas de Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae) em coração de cobaixa (Cavia porcellus)**. [s.l.] Universidade Federal de João Pessoa, 2005.

WALKER, M. J. et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. **Cardiovascular Research**, v. 22, n. 7, p. 447–455, jul. 1988.

WALTERS, A. M.; PORTER, G. A.; BROOKES, P. S. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy. **Circulation Research**, v. 111, n. 9, p. 1222–1236, 12 out. 2012.

WANG, M. et al. Reactive Oxygen Species-Responsive Protein Modification and Its Intracellular Delivery for Targeted Cancer Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 49, p. 13444–13448, 2014.

WANG, W. et al. Apocynum venetum leaf attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 1, p. 71–85, 2015.

YANG, J. et al. Arctigenin Attenuates Ischemia/Reperfusion Induced Ventricular Arrhythmias by Decreasing Oxidative Stress in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 728–742, 2018.

YIN, F.; XIAO, L.; ZHANG, Y. [Research progress on *Drynaria fortunei* naringin on inflammation and bone activity]. **Zhongguo Gu Shang = China Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 28, n. 2, p. 182–186, fev. 2015.

YIN, X. et al. Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-mediated myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 198048, 2012.

ZENG, C. et al. Cardioprotection of tilianin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: Role of the apoptotic signaling pathway. **PloS One**, v. 13, n. 3, p. e0193845, 2018.

ZHANG, J. et al. Systematic Analysis of Main Constituents in Rat Biological Samples after Oral Administration of the Methanol Extract of *Fructus Aurantii* by HPLC-ESI-MS/MS. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 13, n. 2, p. 493–503, 2014.

ZHANG, J. et al. Naringin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase 4. **European Journal of Pharmacology**, v. 804, p. 1–6, 5 jun. 2017.

ZHANG, W. et al. Icaritin Attenuates Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury Via Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Stress Effects in Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 6, p. 1083–1097, 2015.

ZHITKOVICH, A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. **Chemical Research in Toxicology**, 2 maio 2019.

ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. H. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 70, n. 2, p. 181–190, 1 maio 2006.

ANEXO A – FORMULÁRIO CEPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

ificamos que a proposta intitulada “ESTUDO DO EFEITO CARDIOPROTETOR DA RINGINA NA INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE CORAÇÃO DE RATO. ”, strada com o nº 31/2018, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Carla Maria Lins de concelos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo rdata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de do com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de o de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação nal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (JA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 09/10/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 08/2017, Término: 07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	120
Peso/Idade	250-270g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.

Josemar Sena Batista
 Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
 Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6606