



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

ANDREZA MELO DE ARAUJO

**NARINGINA ATENUA A INJÚRIA DE ISQUEMIA –
REPERFUSÃO CARDÍACA POR MECANISMOS
QUE ENVOLVEM A VIA ANTI-APOPTÓTICA E
AÇÃO DO K_{ATP}**

SÃO CRISTÓVÃO

2022

ANDREZA MELO DE ARAUJO

**NARINGINA ATENUA A INJÚRIA DE ISQUEMIA –
REPERFUSÃO CARDÍACA POR MECANISMOS
QUE ENVOLVEM A VIA ANTI-APOPTÓTICA E
AÇÃO DO K_{ATP}**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor
em Ciências Fisiológicas.

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

SÃO CRISTÓVÃO

2022

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

Araujo, Andreza Melo de
A663n Naringina atenua a injúria de isquemia-reperfusão cardíaca
por mecanismos que envolvem a via anti-apoptótica e ação
do K_{ATP}/ Andreza Melo de Araujo; orientadora Carla Maria
Lins de Vasconcelos.– São Cristóvão, SE, 2022.
58 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Isquemia. 2. Reperfusão miocárdica. 3.
Antioxidantes. 4. Flavonóides. I. Vasconcelos, Carla Maria
Lins de, orient. II. Título.

CDU 616.12:615.22

ANDREZA MELO DE ARAUJO

**NARINGINA ATENUA A INJÚRIA DE ISQUEMIA –
REPERFUSÃO CARDÍACA POR MECANISMOS
QUE ENVOLVEM A VIA ANTI-APOPTÓTICA E
AÇÃO DO K_{ATP}**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor
em Ciências Fisiológicas.

Presidente da banca: Prof^a Dr^a. Carla Maria Lins de Vasconcelos

1º Examinador: Prof^a Dr^a. Patrícia Rodrigues Marques de Souza

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Brancilene Santos Araujo

3º Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

4º Examinador: Prof. Dr. Michael Nadson Santos Santana

Dedico esta tese a Deus que ilumina sempre os meus passos. À minha mãe Rosélia por sempre apoiar meus sonhos, ao meu pai Alberto (*in memoriam*) e aos meus irmãos Aislan e Alana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente **a Deus**, onipresente, sempre me dando forças para não desistir dessa longa jornada, só ele sabe o quão difícil foi concluir essa etapa em minha vida. Nos momentos mais difíceis, em minhas orações, sempre fui escutada e prontamente recebia conforto espiritual, à ele toda minha honra, glória e gratidão.

A **minha mãe Rosélia**, por todo carinho, amor e apoio em meus estudos. Suas orações e súplicas me ajudaram a nunca desistir e continuar acreditando que este sonho seria alcançado. Aos meus irmãos, Aislan e Alana por me apoiarem em meus objetivos. Ao meu companheiro João Batista por entender os momentos mais difíceis, me escutar e auxiliar nos problemas que até nem conhecia. Ao meu avô Antônio Guimarães e ao meu tio Felipe Matheus por acreditarem e apoiarem sempre em meus propósitos.

A minha orientadora **Profª Drª Carla Vasconcelos**, agradeço-lhe a alegria de me orientar desde o mestrado, me recebeu de braços abertos mesmo sem me conhecer. Obrigada por toda confiança depositada em mim, apesar da minha jornada de trabalho, nunca questionou minhas atitudes ou duvidou de minha capacidade. Gratidão por todo o acolhimento prestado, apoio nas horas mais conturbadas, tenho muita admiração por ti, nunca irei esquecer de sua assistência mesmo aos sábados e domingo, dias em que eu tinha mais disponibilidade para estudar.

Aos **meus amigos do Laboratório de Biofísica do Coração (LBC)**, em especial a Valéria Cerqueira, amiga nossa jornada foi longa, mas conseguimos! Obrigada por todo o apoio, conversas, choros e experimentos. Deus nos proporcionou uma grande amizade que não havíamos percebido desde a turma da Biologia de 2005. Quero que saiba que nunca esquecerei dessa etapa tão difícil de nossas vidas! A Karina Mota, obrigada por contribuir em minha rede de apoio, fizemos uma amizade não só científica, mas pessoal e também esportiva. Gratidão pelas conversas profundas, experimentos e discussões científicas. Quero levar sua amizade pra vida! A Evaldo Filho pelas orientações, amizade e colaboração experimental. Obrigada a Joyce e Cácia nos aproximamos neste ano, mas foi tempo suficiente para dividirmos boas risadas, frustrações e experimentos.

Ao **professor Dr. Ricardo Albuquerque** pelas orientações na parte de Histologia e disponibilidade em prontamente sanar minhas dúvidas. A **banca de Qualificação** composta por prof. Dr. Américo, Prof. Dr. Antônio Godim, Prof. Dr. Fabrício Macedo e Profª Drª Patrícia e a

banca de defesa, obrigada pelas contribuições e considerações para melhoria de minha tese.

Ao **Luiz César**, pela paciência, disponibilidade e acolhimento a fim de solucionar todos os problemas que ocorreram até a finalização dessa etapa, e não foram poucos! Muito Obrigada por tudo!

Ao **PROCFIS**, programa de pós graduação em Ciências Fisiológicas por ter permitido o aperfeiçoamento de minha carreira acadêmica, aos professores e direção.

Aos **meus chefes** Maria do Carmo Paiva (Nossa Senhora do Socorro), Michelly Marry (Nossa Senhora do Socorro), e Hugo Xavier (UNIT-Aracaju) por todo apoio prestado. Aos amigos da Secretaria de Assistência Social: Paula, Mércia, Neildes, Vivi, Ilza, Lucélia. Obrigada por sempre me ajudarem, mesmo em meio a correria. Gratidão pela rede de apoio e torcida!

Obrigada **aos amigos externos** que sempre estavam na torcida por mim!

Obrigada **aos animais** que puderam contribuir para a realização desse trabalho.

A **Universidade Federal de Sergipe** por ter me acolhido durante 14 anos (3 anos da Biologia), 4 anos da Nutrição, 2 anos da Residência Multiprofissional, 2 anos do Mestrado e 3 anos do Doutorado! Tenho muito orgulho de toda a minha carreira acadêmica ter sido nesta universidade. Gratidão!

Muito Obrigada!

“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo.[...]. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto final.” (CHRIS GARDNER)

RESUMO

NARINGINA ATENUA A INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO CARDÍACA POR MECANISMOS QUE ENVOLVEM A VIA ANTI-APOPTÓTICA E AÇÃO DO K_{ATP} .
Andreza Melo de Araujo, São Cristóvão, 2022.

Introdução: o infarto agudo do miocárdio (IAM) permanece com altas taxas de morbimortalidade e ocorre, principalmente, por redução do fluxo sanguíneo em virtude de placa de atheroma levando à isquemia. Embora a reperfusão seja a principal intervenção na clínica, ela exacerba os danos iniciados durante a isquemia. Sendo assim, produtos naturais tem sido alvo de estudo para prevenção e tratamento do IAM. A naringina (NRG) é um flavonoide encontrado em frutas cítricas com reconhecida cardioproteção contra aterosclerose, doença coronariana, hipertensão, hipertrofia cardíaca, IAM e acidente vascular cerebral isquêmico. **Objetivo:** elucidar os mecanismos da NRG na cardioproteção frente à injúria de IR. **Métodos:** em coração isolado de ratos Wistar foram avaliados os efeitos da NRG (5 e 10 μ M) sobre variáveis contráteis e eletrocardiográficas. Corações isolados foram perfundidos com NRG (5 μ M) ou NRG com glibenclamida (GLI, 10 μ M, um bloqueador não-específico dos canais K_{ATP}) e submetidos a isquemia global (30 min) e reperfusão (60 min). Foram avaliados área de infarto, lesão tecidual por meio da liberação da lactato desidrogenase (LDH), índice e ocorrência de arritmias e variáveis contráteis. Em animais pré-tratados por 7 dias (NRG 25 mg/kg ou N-acetil cisteína 100 mg/kg) e, submetidos ao protocolo de IR, foram avaliados a expressão da Bax, Bcl-2, SOD CuZn e SOD Mn. Além disso, analisou-se a atividade da citrato sintase e alterações histológicas. **Resultados:** A NRG quando perfundida nas concentrações de 5 e 10 μ M não alterou as variáveis contráteis e eletrocardiográficas em coração isolado. O efeito cardioprotetor da NRG (5 μ M) foi abolido na presença de GLI, uma vez que houve diminuição da PDVE, aumento da injúria tecidual (LDH) e área de infarto, aumento do índice de arritmias e da ocorrência de arritmias mais graves (taquicardia e fibrilação ventricular). Nos animais tratados com a NRG e submetidos a IR, houve diminuição da expressão da Bax e da razão Bax/Bcl-2 em comparação ao grupo veículo + IR. Não houve alteração da expressão da SOD CuZn e SOD Mn entre os quatro grupos estudados, além disso, nos corações dos animais pré-tratados com a NRG houve um aumento da atividade da citrato sintase. A análise histopatológica mostrou que a NRG diminuiu o edema intracelular e intersticial e preveniu alterações no diâmetro nuclear e citoplasmático. **Conclusão:** este estudo demonstra que a NRG possui efeito cardioprotetor contra a injúria de IR cardíaca mediada por sua ação anti-apoptótica, antiarrítmica e provável ativação de K_{ATP} . Além disso, fornece subsídios para futuros estudos que possam assegurar o uso de plantas medicinais, produtos naturais e alimentos ricos em NRG na cardioproteção contra o IAM.

Palavras-chave: naringina; isquemia miocárdica; antioxidante, antiapoptótica; K_{ATP} .

ABSTRACT

NARINGIN ATTENUATED CARDIAC ISCHEMIA–REPERFUSION INJURY BY MECHANISMS INVOLVING THE ANTI-APOPTOTIC PATHWAY AND K_{ATP} ACTION . Andreza Melo de Araujo, São Cristóvão, 2022.

Introduction: acute myocardial infarction (AMI) remains with high morbidity and mortality rates and occurs mainly due to reduced blood flow due to atherosclerotic plaque leading to ischemia. Although reperfusion is the main clinical intervention, it exacerbates damage initiated during ischemia. Therefore, natural products have been studied for the prevention and treatment of AMI. Naringin (NRG) is a flavonoid found in citrus fruits with recognized cardioprotection against atherosclerosis, coronary disease, hypertension, cardiac hypertrophy, AMI and ischemic stroke. **Objective:** to elucidate the mechanism of NRG in cardioprotection against IR injury. **Methods:** in isolated hearts of Wistar rats, the effects of NRG (5 and 10 μ M) on contractile and electrocardiographic variables were evaluated. Isolated hearts were perfused with NRG (5 μ M) or NRG with glibenclamide (GLI, 10 μ M, a non-specific blocker of K_{ATP} channels) and subjected to global ischemia (30 min) and reperfusion (60 min). The area of infarction, tissue injury through the release of lactate dehydrogenase (LDH), index and occurrence of arrhythmias and contractile variables were evaluated. In animals pre-treated for 7 days (NRG 25 mg/kg or N-acetyl cysteine 100 mg/kg) and submitted to the IR protocol, the expression of Bax, Bcl-2, SOD CuZn and SOD Mn were evaluated. In addition, citrate synthase activity and histological changes were analyzed. **Results:** When NRG was perfused at 5 or 10 μ M concentrations, it did not change contractile and electrocardiographic variables in isolated hearts. The cardioprotective effect of NRG (5 μ M) was abolished in the presence of GLI, since there was a decrease in LVDP, an increase in tissue injury (LDH) and infarcted area, an increase in the rate of arrhythmias and in the occurrence of more severe arrhythmias (tachycardia and ventricular fibrillation). In animals treated with NRG and submitted to IR, there was a decrease in Bax expression and in the Bax/Bcl-2 ratio compared to the vehicle + IR group. There was no alteration in the expression of SOD CuZn and SOD Mn among the four groups studied, in addition, in the hearts of animals pre-treated with NRG there was an increase in citrate synthase activity. Histopathological analysis showed that NRG decreased intracellular and interstitial edema and prevented changes in nuclear and cytoplasmic diameter. **Conclusion:** this study demonstrates that NRG has a cardioprotective effect against cardiac IR injury mediated by its anti-apoptotic, antiarrhythmic action and probable activation of K_{ATP} . In addition, it provides subsidies for future studies that can ensure the use of medicinal plants, natural products and foods rich in NRG in cardioprotection against AMI.

Keywords: naringin; myocardial ischemia; antioxidant, anti-apoptotic; K_{ATP} .

RESUMO PARA A SOCIEDADE

NARINGINA MELHORA OS DANOS DE CORAÇÕES INFARTADOS. Andreza Melo de Araujo, São Cristóvão, 2022.

O infarto do coração apresenta altas taxas de morte e pode ser ocasionada por meio da obstrução de um vaso por uma placa de gordura, causado por exemplo por uma alimentação rica em gordura e/ou falta de atividade física. Isso leva a uma diminuição do oxigênio no coração e consequentemente ao infarto. Embora existam tratamentos para reverter/retomar a função do coração, mesmo assim, ele não volta com a mesma força. Por isso, é importante estudar produtos encontrados na natureza que consigam diminuir as complicações do infarto. A naringina (NRG) é uma substância natural encontrada em frutas cítricas e na uva com reconhecida proteção contra doenças do coração como: aterosclerose, doença coronariana, hipertensão, hipertrofia cardíaca, infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral isquêmico. Nesse sentido, Sergipe é considerado o quarto maior produtor de frutas cítricas do Brasil. As regiões do centro-sul e sul Sergipano são as que possuem maior produção de laranja com destaque para os seguintes municípios: Cristinápolis, Itabaininha, Umbaúba, Lagarto, Arauá, Indiaroba, Salgado, Tomar do Geru, Boquim, Santa Luzia do Itanhy, Riachão do Dantas, Estância, Pedrinhas. Nosso trabalho estudou como a NRG protege o coração de um infarto. Para esta pesquisa, foram utilizados ratos machos adultos. Nossos achados demonstraram que a NRG pode proteger o coração contra: 1) a perda da força de contração e a presença de arritmias graves, 2) lesão tecidual por meio da redução da liberação da lactato desidrogenase (LDH) uma enzima prejudicial ao coração, 3) o aumento da área de infarto, 4) a formação de espécies reativas de oxigênio e 5) a morte de células do coração. Além disso, foi visto que nos corações dos animais que foram pré-tratados com a NRG e passaram por infarto, as suas células apresentaram menos edema (inchaço) e menos alterações. Assim, este estudo demonstrou que o uso da NRG antes do infarto protege o coração de complicações maiores nos ratos, podendo ser usado em pesquisas futuras com humanos para ser utilizada na prática clínica como suplemento ou no dia a dia através de fontes alimentares.

Palavras-chave: naringina; frutas cítricas; uva; infarto do coração.

ABSTRACT FOR SOCIETY

NARINGIN IMPROVES THE DAMAGE OF INFARCTED HEARTS. Andreza Melo de Araujo, São Cristóvão, 2022.

Heart infarction has high death rates and can be caused by obstruction of a vessel by a fatty plaque, caused for example by a diet rich in fat and/or lack of physical activity. This leads to a decrease in oxygen in the heart and consequently to a heart attack. Although there are treatments to reverse/restore heart function, even so, it does not come back with the same strength. Therefore, it is important to study products found in nature that can reduce the complications of infarction. Naringin (NRG) is a natural substance found in citrus fruits and grapes with recognized protection against heart diseases such as: atherosclerosis, coronary disease, hypertension, cardiac hypertrophy, acute myocardial infarction (AMI) and ischemic stroke. In this sense, Sergipe is considered the fourth largest citrus fruit producer in Brazil. The regions of the center-south and south of Sergipe are those with the highest orange production, with emphasis on the following municipalities: Cristinápolis, Itabaininha, Umbaúba, Lagarto, Arauá, Indiaroba, Salgado, Tomar do Geru, Boquim, Santa Luzia do Itanhy, Riachão do Dantas, Estancia, Pedrinhas. Our work studied how NRG protects the heart from infarction. For this research, adult male rats were used. Our findings demonstrated that NRG can protect the heart against: 1) loss of contraction force and the presence of severe arrhythmias, 2) tissue damage by reducing the release of lactate dehydrogenase (LDH) an enzyme harmful to the heart, 3) the increase in the area of infarction, 4) the formation of reactive oxygen species and 5) the death of heart cells. In addition, it was seen that in the hearts of animals that were pretreated with NRG and underwent infarction, their cells showed less edema (swelling) and fewer changes. Thus, this study demonstrated that the use of NRG before infarction protects the heart from major complications in rats, and can be used in future research with humans to be used in clinical practice as a supplement or in everyday life through dietary sources.

Keywords: naringin; citrus fruits; grape; heart attack.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais componentes envolvidos na injúria de isquemia-reperfusão.....	5
Figura 2 - Via proposta para oxidação da CaMKII (ox-CaMKII) após injúria de IR e internalização de canais K_{ATP}.....	9
Figura 3 - Estrutura da naringina NRG.....	10
Figura 4 - Esquema gráfico da montagem experimental	15
Figura 5 - Delineamento experimental da injúria de isquemia-reperfusão (IR) ex vivo...	16
Figura 6 - Delineamento experimental (ex vivo) da influência da GLI em corações perfundidos com NRG.....	19
Figura 7 - Efeitos da NRG sobre variáveis contráteis em coração isolado de rato.....	23
Figura 8 - Efeitos da NRG sobre as variáveis eletrocardiográficas em coração isolado de rato.....	24
Figura 9 - Influência do K_{ATP} na cardioproteção mediada pela naringina (NRG) em modelo de isquemia-reperfusão (IR) em rato.....	26
Figura 10 - A naringina (NRG) reduziu o índice e a ocorrência de arritmias induzida pela isquemia reperfusão (IR).....	27
Figura 11 - Imunoconteúdo de proteínas associadas à apoptose nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais.....	28
Figura 12 - Imunoconteúdo de isoformas da superóxido dismutase (SOD) nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais.....	28
Figura 13 - Atividade da enzima citrato sintase (CS) nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais.....	30
Figura 14 - Fotomicrografia de cortes histológicas coradas em HE (400 x) exibindo secções transversais de fibras musculares estriadas cardíacas de ratos.....	31
Figura 15 - Fotomicrografia de cortes histológicas coradas em HE (400 x) exibindo secções longitudinais de fibras musculares estriadas cardíacas de ratos.....	32
Figura 16 - Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos ratos submetidos a isquemia-reperfusão (IR).....	33
Figura 15 -Resumo Gráfico dos mecanismos de cardioproteção da naringina (NRG) frente à injúria de isquemia-reperfusão.	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação do índice de arritmias	20
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
Apaf-1	Fator de ativação da protease-1
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BVP	Batimento ventricular prematuro
CAT	Catalase
CaMKII	Cálcio-calmodulina quinase II
Cit c	Citrocromo c
CS	Citrato sintase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CTR	Controle
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsilfóxido
ECG	Eletrocardiograma
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídio hidroquinona
FC	Frequência cardíaca
FV	Fibrilação ventricular
g.o.	Gavagem
GP	Gypenosides
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IK _{ATP}	Corrente de canal para potássio sensível ao ATP
IR	Isquemia-reperfusão
K _{ATP}	Canal para potássio sensível ao ATP
LAD	Ligadura da coronária descendente anterior

LDH	Lactato desidrogenase
PTPm	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAC	N-acetilcisteína
NCX –	Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$
NRG	Naringina
$\text{O}_2\bullet^-$	Superóxido
$\text{OH}\bullet$	Radical hidroxila
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PDVF	Fluoreto de polivinilideno
QRS	Complexo QRS do eletrocardiograma
QT _i	Intervalo QT do eletrocardiograma
RL	Radicais Livres
SERCA	ATPase de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
SOD CuZn	Superóxido dismutase cobre e zinco
SOD Mn	Superóxido manganês
TTC	2,3,5 –trimetil-tetrazólio
TV	Taquicardia ventricular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Fisiopatologia da IR cardíaca	4
2.2 Participação da via antioxidante na IR	5
2.3 Participação da via apoptótica na IR	7
2.4 Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na cardioproteção da injúria de IR...8	
2.5 Naringina e seus efeitos nas doenças e cardioproteção	10
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Animais e reagentes.....	13
4.2 Avaliação dos efeitos da NRG sobre variáveis contráteis e eletrocardiográficas em coração isolado	13
4.3 Avaliação do efeito da NRG administrada via oral sobre a injúria de IR.....	15
4.3.1 Efeito da NRG sobre a expressão de proteínas relacionadas à IR.....	17
4.3.2 Envolvimento dos canais da K_{ATP} na cardioproteção mediada por NRG	18
4.3.3 Determinação da área de infarto	19
4.3.4 Determinação da lesão tecidual	20
4.3.5 Análise do índice e ocorrência de arritmias	20
4.3.6 Atividade de citrato sintase	20
4.3.7 Análises histopatológicas	21
4.3.7.1 Análise morfométrica	21
4.3.8 Análise estatística	21
5 RESULTADOS.....	23
5.1 Efeito da NRG sobre as variáveis contráteis e eletrocardiográficas em corações isolados.....	23
5.2 Influência do K_{ATP} na cardioproteção mediada pela NRG.....	24
5.3 NRG preveniu a apoptose cardíaca induzida pela IR.....	28
5.4 Avaliação do potencial antioxidante da NRG na expressão de isoformas da SOD	29
5.5 Avaliação da citrato sintase	29
5.6 Análise histopatológica	30
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	42

8 PERSPECTIVAS.....	43
9 RESUMO GRÁFICO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO - Certificado da comissão de ética no uso de animais.....	58

1 INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) permanece com altas taxas de morbidade e mortalidade dentre as doenças cardiovasculares (DCV) e pode ocasionar lesões irreversíveis no miocárdio (ROUT et al., 2020; WU; LIU; WANG, 2021). Em estudo global realizado em 2017, cerca de 126 milhões de pessoas foram diagnosticadas com IAM, o qual resultou em uma mortalidade de 8,9 milhões de pessoas (DAI et al., 2022). No Brasil, em 2020, 109.5 mil pessoas foram a óbito em decorrência das doenças isquêmicas do coração e dentre essas, 90.465 mil pessoas haviam sido diagnosticadas com IAM (DATASUS, 2020).

Convencionalmente, a principal causa do IAM se dá pela redução do fluxo de sangue coronariano parcial ou total em virtude de uma placa de ateroma ocasionando, portanto, a isquemia miocárdica (SEVERINO et al., 2020). Na isquemia cardíaca, a falta de suprimento de oxigênio ao miocárdio e o acúmulo de metabólitos ácidos resulta na redução do pH intracelular e extracelular levando à exarcebação da lesão isquêmica prejudicando a função cardíaca (REDD et al., 2021). A isquemia cardíaca pode ocasionar o ataque cardíaco, arritmias e insuficiência cardíaca (WEI; TOLKACHEVA, 2022).

A aterosclerose é uma doença inflamatória vascular crônica que está associada ao desbalanço entre fatores oxidantes e antioxidantes e disfunção endotelial na túnica íntima (camada mais interna das artérias). A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um dos fatores-chave para o desenvolvimento da doença. Assim, ocorre a liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), proliferação de células musculares lisas, fatores de crescimento e, conseqüentemente, inflamação e fibrose (MARCHIO et al., 2019).

A restauração do fluxo sanguíneo, por meio da reperfusão logo após o IAM, é fundamental para limitar o tamanho do infarto e restaurar a função miocárdica. No entanto, a reperfusão pode exacerbar a lesão tecidual (WU; LIU; WANG, 2021) e ocasionar apoptose e fibrose nos cardiomiócitos (LEE et al., 2021). A mortalidade causada pelo IAM se dá principalmente pelo desenvolvimento do choque cardiogênico que ocorre em cerca de 81% dos casos (KAPUR; THAYER; ZWECK, 2020). Nessa situação, ocorre redução significativa do débito cardíaco, resultando em hipoperfusão em diversos órgãos (SHAH; PURI; KALRA, 2019).

Na prática clínica, uma vez constatado o IAM, são adotadas algumas condutas na emergência, tais como: uso de oxigênio suplementar quando o paciente apresentar hipóxia com saturação de $O_2 < 90\%$ ou sinais clínicos de desconforto respiratório; analgesia e sedação; controle glicêmico nos pacientes com hiperglicemia; terapia anti-isquêmica que tem por objetivo reduzir o consumo de oxigênio ou aumentar a oferta do mesmo a depender da necessidade; uso de nitratos que possuem efeito vasodilatador e reduzem o consumo de oxigênio pelo miocárdio; uso de beta-bloqueadores que reduzem a frequência cardíaca, pressão arterial e contratilidade do miocárdio, diminuindo o consumo de oxigênio pelo miocárdio e o uso de anticoagulantes (NICOLAU et al., 2021). No entanto, pacientes que recebem a terapia de reperfusão ainda passam por remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca após IAM (SU et al., 2022).

Embora alguns avanços tenham acontecido na terapêutica do IAM, como a reperfusão farmacológica, pacientes ainda apresentam grandes áreas de infarto e aqueles que não recebem vascularização em tempo hábil, permanecem com risco de complicações mecânicas, tais como: insuficiência mitral aguda secundária à ruptura do músculo papilar, comunicação interventricular, pseudoaneurisma e ruptura da parede livre. Além disso, as taxas de mortalidade intra-hospitalar permanecem inalteradas (DAMLUJI et al., 2021; NICCOLI et al., 2019).

Assim, compreender mecanismos celulares e moleculares desde o evento isquêmico até a formação crônica da cicatriz cardíaca é fundamental para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento do IAM (KUPPE et al., 2022). Nos últimos anos, os produtos naturais têm sido alvo de estudo para prevenção e tratamento das DCV (SU et al., 2022). Dessa forma, estudar os produtos naturais e os seus efeitos por serem uma fonte rica de compostos, pode favorecer a descoberta de medicamentos, contribuindo economicamente quando comparado ao desenvolvimento de produtos químicos e sintéticos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Por este motivo, decidimos estudar o mecanismo do efeito cardioprotetor da naringina (NRG) em modelo de IAM por isquemia e reperfusão (IR). A NRG é um flavonoide presente em produtos naturais e frutas cítricas e possui diversas propriedades terapêuticas nas doenças cardiovasculares, metabólicas, neurológicas, pulmonares e câncer (RIVOIRA et al., 2021). O suco de laranja é um dos mais consumidos no mundo e a NRG é uma das flavonas mais predominantes nesse suco (JUSTESEN, 1998). Além das frutas cítricas, ela está presente em

vários alimentos que compõe a dieta humana, como: feijão, cereja, cacau, orégano e tomate (BHARTI et al., 2014).

No ano de 2021, Sergipe foi o quarto maior produtor de citros do Brasil (PANTA e SANTOS, 2019). O Brasil produziu 16.214.982 toneladas de laranja e Sergipe 392.551 toneladas. As regiões do centro-sul e sul sergipano foram as que possuíram maior produção de laranja com destaque para os seguintes municípios em ordem decrescente de produção: Cristinápolis, Itabaininha, Umbaúba, Lagarto, Arauá, Indiaroba, Salgado, Tomar do Geru, Boquim, Santa Luzia do Itanhhy, Riachão do Dantas, Estância, Pedrinhas (IBGE, 2021).

Considerando a grande produção de citros do Brasil e em Sergipe e a diversidade de fontes dietéticas da NRG, esta se constitui como fonte biológica promissora para estudos futuros *in vivo* a fim de garantir recomendações seguras para ingestão diária através de fontes alimentares ou uso clínico mediante desenvolvimento de formulações de liberação controlada. Para tal, estudos detalhados sobre os mecanismos de ação da NRG são necessários.

Com isso, a hipótese do nosso estudo é que o efeito cardioprotetor da NRG é mediado pelos seguintes fatores: redução do estresse oxidativo; apoptose celular e ativação dos canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fisiopatologia da IR cardíaca

Na injúria cardíaca de origem isquêmica, a redução do fluxo sanguíneo coronariano é a principal causa da disfunção contrátil cardíaca. Isso pode acontecer pela ruptura da placa de ateroma e/ou insuficiência cardíaca (HEUSCH, 2022). Quando ocorre um bloqueio total do fluxo sanguíneo, os cardiomiócitos ficam restritos em oxigênio e nutrientes resultando em morte celular (RAMACHANDRA et al., 2020).

No período de isquemia, a falta de suprimento de oxigênio promove mudança no metabolismo celular que altera a fosforilação oxidativa mitocondrial para a glicólise anaeróbica, resultando em acúmulo intracelular de íons H^+ (prótons) e redução do pH intracelular para menos que 7,0 (RAMACHANDRA et al., 2020). Além disso, ocorre um acúmulo de glicose-6-fostato e lactato (UTHMAN et al., 2019). A elevação dos níveis de H^+ ativa o trocador Na^+/H^+ , exteriorizando prótons e em troca ocorre a entrada de íons Na^+ . A atividade da Na^+/K^+ ATPase é reduzida devido à depleção de ATP, e por este motivo ocorre um aumento na concentração intracelular de Na^+ . Nesse momento, o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) é ativado e atua no modo reverso retirando íons Na^+ em excesso, mas ao mesmo tempo ocasiona uma sobrecarga intracelular e subsequente de Ca^{2+} mitocondrial (HERNANDEZ-RESENDIZ et al., 2020).

Após a ocorrência de um IAM, a revascularização ou reperfusão (retorno do fluxo sanguíneo) precoce ainda é considerada como a principal intervenção clínica reconhecida para limitar a gravidade do dano cardíaco e reduzir a mortalidade (CURRAN; BURKHOF; KLONER, 2019). Paradoxalmente, embora a reperfusão previna a lesão irreversível, desencadeia outros eventos que levam à lesão acelerada no miocárdio, sendo inclusive maior e mais prejudicial quando comparado ao período de isquemia (FISCHESSER et al., 2021; ROUT et al., 2020). A rápida reoxigenação aumenta o pH do líquido extracelular, gradiente de H^+ , atividade da NCX e atividade do receptor de rianodina causando maior sobrecarga de cálcio intracelular (AGHAEI et al., 2019). O acúmulo de cálcio leva a arritmias (VAN DER WEG; PRINZEN; GORGELS, 2019), ativação do complexo troponina-tropomiosina ocasionando hipercontratura com a ligação entre a miosina e actina, proteólise e falência mitocondrial que pode levar à morte celular (BOMPOTIS et al., 2016) através da abertura do

poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPm) (HERNANDEZ-RESENDIZ et al., 2020). Esta por sua vez também pode ser ocasionada pela exarcebação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAIBER et al., 2021). A abertura do PTPm contribui para a perda de trifosfato de adenosina (ATP), edema mitocondrial e liberação de citocromo c (cit c) levando à apoptose (CHANG et al., 2019) (Fig. 1).

Em relação à ocorrência de arritmias, no período da reperfusão ocorre uma elevada prevalência de arritmias ventriculares, principalmente batimentos ventriculares prematuros (BVP) nos primeiros 20 min da reperfusão. Além disso, existe uma correlação entre a ocorrência de arritmias e aumento da área de infarto (VAN DER WEG; PRINZEN; GORGELS, 2019). A incidência de arritmias mais graves como taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV) também pode ocorrer durante o período de reperfusão e é considerada uma das principais causas de mortes no internamento hospitalar (ADAMEOVA; SHAH; DHALLA, 2020; WATANABE; USUI, 2021).

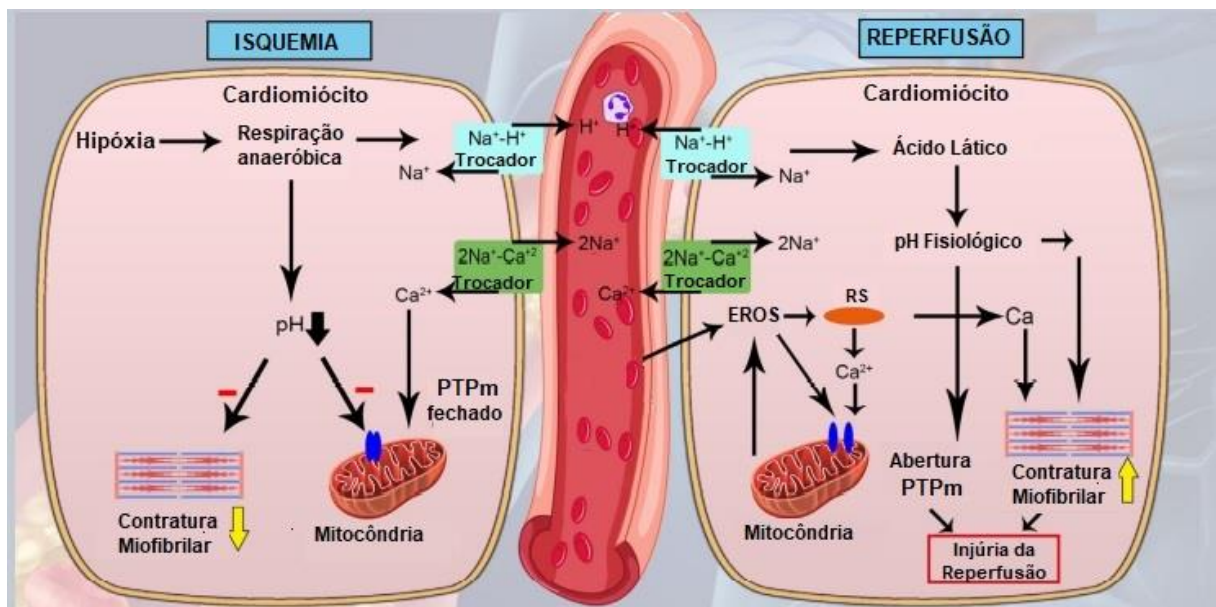


Figura 1 - Principais componentes envolvidos na injúria de isquemia-reperfusão. Poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPm), retículo sarcoplasmático (RS), espécies reativas de oxigênio (EROs). Adaptado de Gunata e Parlakpinar (2021).

2.2 Participação da via antioxidante na IR

Radicais Livres (RL) são considerados espécies altamente reativas, transitórias e nocivas (JAKUBCZYK et al., 2020). EROs são moléculas que contêm pelo menos um átomo

de oxigênio e um ou mais elétrons desemparelhados que também são caracterizadas por serem reativas. Fazem parte deste grupo os radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH\bullet$), oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como radicais livres de nitrogênio (WANG et al., 2021).

A formação de EROs na IR pode ocorrer por diversos mecanismos e, dentre eles, a que inclui a respiração mitocondrial (FORTE et al., 2019; HERNANDEZ-RESENDIZ et al., 2020). Em condições normais, por meio da fosforilação oxidativa, elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida ($NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^- \leftrightarrow NADH$) e da flavina adenina dinucleotídeo hidroquinona ($FADH_2; FAD + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow FADH_2$) são transferidos através da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na membrana interna mitocondrial para reduzir o oxigênio (O_2) em água e ATP impulsionado pela força próton-motriz (MARIN et al., 2020).

A falta de O_2 celular leva a uma disfunção mitocondrial, já que esse é oceptor final de elétrons (DAMBROVA et al., 2021). Ocorre um aumento da permeabilidade mitocondrial, desregulação do cálcio mitocondrial e liberação do $O_2^{\bullet-}$ (KANG et al., 2017; LESNEFSKY et al., 2017). A alteração da funcionalidade da mitocôndria promove um acúmulo de succinato (produto intermediário do ciclo de Krebs), sendo considerado principal metabólito responsável pela geração de EROs durante a reperfusão (CHOUCHANI et al., 2014). O acúmulo de succinato leva à formação de $O_2^{\bullet-}$ através do complexo I por transporte reverso da CTE (ANDRIENKO et al., 2017; CHOUCHANI et al., 2014). O transporte reverso pela CTE ocorre quando os elétrons do ubiquinol são transferidos de volta para o complexo respiratório I, reduzindo NAD^+ a $NADH$. Este processo gera uma quantidade significativa de EROs (SCIALÒ; FERNÁNDEZ-AYALA; SANZ, 2017). No caso do succinato, sua oxidação leva ao transporte reverso da CTE doando um elétron para o O_2 gerando $O_2^{\bullet-}$ (CHOUCHANI et al., 2014, 2016). Além disso, também é descrito na literatura a formação do $O_2^{\bullet-}$ através da inibição da CTE no complexo II, III e IV (BRAND, 2016).

O $O_2^{\bullet-}$ é um radical muito reativo que pode produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode reagir com íons metálicos produzindo $OH\bullet$ que também é extremamente reativo (BUTTERFIELD; MATTSON, 2020). O $OH\bullet$ também pode ser formado por meio da reação de Fenton que oxida o Fe^{2+} à Fe^{3+} (DUBOIS-DERUY et al., 2020). É importante ressaltar que a toxicidade do radical livre depende da capacidade que ele tem em produzir outros RL, por isso, o $OH\bullet$ se caracteriza como sendo o radical mais reativos de todos.

Nesse contexto, uma enzima antioxidante importante para atenuar a injúria de IR é a superóxido dismutase (SOD) que está localizada internamente na mitocôndria e no citosol. Ela catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (ALTSHULER et al., 2021). A SOD é considerada uma enzima antioxidante mais efetiva em humanos (DUBOIS-DERUY et al., 2020) e em mamíferos existem três subtipos com localizações celulares diferentes, a saber: superóxido dismutase cobre e zinco (SOD CuZn) citoplasmático, superóxido manganês (SOD Mn) mitocondrial e SOD CuZn extracelular (CHOUCHANI et al., 2016). Já a Catalase (CAT) converte H_2O_2 diretamente em H_2O e O_2 (BALLAL et al., 2020). Outra enzima antioxidante é a Glutathione Peroxidase (GPx) que converte H_2O_2 em H_2O . A glutathione redutase (GR), mantém o equilíbrio entre a glutathione reduzida (GSH) e a glutathione oxidada (GSSG) (ISTOMINA et al., 2021).

Dentro desse contexto, o desequilíbrio entre fatores antioxidantes e oxidantes com a produção exacerbada de EROs causa danos nas estruturas internas mitocondriais, aumento da permeabilidade mitocondrial e abertura do PTPm (BUGGER; PFEIL, 2020). Por este motivo, o desenvolvimento de terapêuticas que consigam aumentar a expressão ou atividade da SOD, CAT, GPx são estratégias fundamentais e potenciais para o tratamento de diversas doenças (SAMAL et al., 2021; WANG et al., 2022; ZHANG et al., 2021).

2.3 Participação da via apoptótica na IR

A apoptose é uma forma de morte celular programada que é positivamente ou negativamente regulada pela família do Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (DONG et al., 2019). Assim, membros da família Bcl-2 inibem a apoptose, pois previnem a liberação do cit c. Já a Bax (*Bcl-2-associated X protein*) é uma proteína pró-apoptótica (PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2018). O equilíbrio entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos são fundamentais para a sobrevivência celular.

A injúria de IR miocárdica leva a uma disfunção mitocondrial que é determinante para morte celular (RAMACHANDRA et al., 2020) em virtude da liberação de cit c, formação do apoptossomo e ativação de caspases (KALPAGE et al., 2020).

Na presença de isquemia, ocorre ativação da via intrínseca da apoptose com o aumento da Bax que está localizada na membrana mitocondrial externa. Esta proteína promove a liberação do cit c (KIRAZ et al., 2016) através da abertura do PTPm, um grande canal não-

seletivo que se abre durante a reperfusão e permite o deslocamento de íons através da membrana mitocondrial interna ocasionando edema mitocondrial, despolarização da membrana e necrose (ONG et al., 2015). Com a saída do cit c para o citosol, ocorre uma interação com uma proteína de apoptose denominada fator de ativação da protease-1 (Apaf-1) e pró-caspase 9 resultando na formação do apoptossomo e ativação da via das caspases (KALPAGE et al., 2020). A formação desse complexo resulta na ativação da caspase-9 seguida pela transformação de pró-caspase-3 em caspase 3, que é o último passo para apoptose (KIRAZ et al., 2016).

Prevenir a disfunção mitocondrial induzida pela IR miocárdica aguda é uma importante estratégia terapêutica para a cardioproteção (RAMACHANDRA et al., 2020). Por este motivo, o uso de compostos naturais que promovam ativação de fatores anti-apoptóticos podem minimizar danos cardíacos.

2.4 Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na cardioproteção da injúria de IR

Canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) são amplamente expressos no coração e sensíveis à diminuição do ATP intracelular e aumento da adenosina difosfato (ADP) (AZIZ et al., 2018). Estudos têm evidenciado o papel cardioprotetor dos canais K_{ATP} na IR por suprimir o edema mitocondrial, reduzir a sobrecarga de cálcio e a resposta inflamatória, dentre outros fatores (BAI et al., 2021; LIU et al., 2022b; MENG et al., 2016; NING et al., 2020; TESTAI et al., 2013).

Estes canais são complexos de proteínas de membrana heterooctamérica compostos por subunidades (Kir 6, Kir 6.1 ou Kir 6.2) e receptores de sulfonilureia (SUR, SUR1, SUR 2A e SUR 2B) (LIU et al., 2022a). Os canais K_{ATP} podem ser classificados a depender de sua posição, sendo o sarcolemal ($sarcK_{ATP}$) ou mitocondrial ($MitoK_{ATP}$) (YANG et al., 2016). O $MitoK_{ATP}$ está localizado na membrana interna da mitocôndria e é um canal voltagem dependente regulado pelos níveis de ATP e ADP. Em condições normais, este canal fica fechado e em condições isquêmicas ocorre a sua abertura (ZHAO et al., 2020). O $sarcK_{ATP}$ desempenha papel cardioprotetor durante o estresse (ZHANG et al., 2016). O mecanismo de proteção se dá pela ativação das correntes de K^+ que leva uma repolarização mais rápida com encurtamento do potencial de ação, diminuindo o influxo de íons Ca^{2+} para o citosol através de canais voltagem-dependentes. Dessa forma, há uma redução da absorção de cálcio durante

a isquemia protegendo contra a morte celular durante a reperfusão (LUND et al., 2015). Além disso, a literatura demonstra que após a ativação do K_{ATP} , EROs podem oxidar a cálcio-calmodulina quinase II (ox-CaMKII), que é abundante no coração, aumentando a endocitose do canal K_{ATP} diminuindo, portanto, a corrente de canal para K^+ sensível ao ATP (IK_{ATP}) promovendo morte miocárdica (WU et al., 2019) (Fig.2).

Dentro desse contexto, a glibenclamida (GLI) que é um bloqueador de canais K_{ATP} e promove, portanto o fechamento desses canais (WU et al., 2019) tem sido utilizada para bloquear os canais K_{ATP} presentes em miocárdio (BOOVARAHAN; KURIAN, 2021; MENG et al., 2016; VAJDA; BACZKÓ; LEPRÁN, 2007). Estudo clássico demonstrou que sua administração em corações promove prejuízo em parâmetros hemodinâmicos como: redução da LVDP (pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo) e do fluxo coronariano piorando a função cardíaca (MITANI et al., 1991). Além disso, já é reconhecido na literatura que a GLI inibe a IK_{ATP} (FINDLAY, 1992) e promove redução da concentração do cálcio diastólico $[Ca^{2+}]_d$ (URYASH et al., 2021).

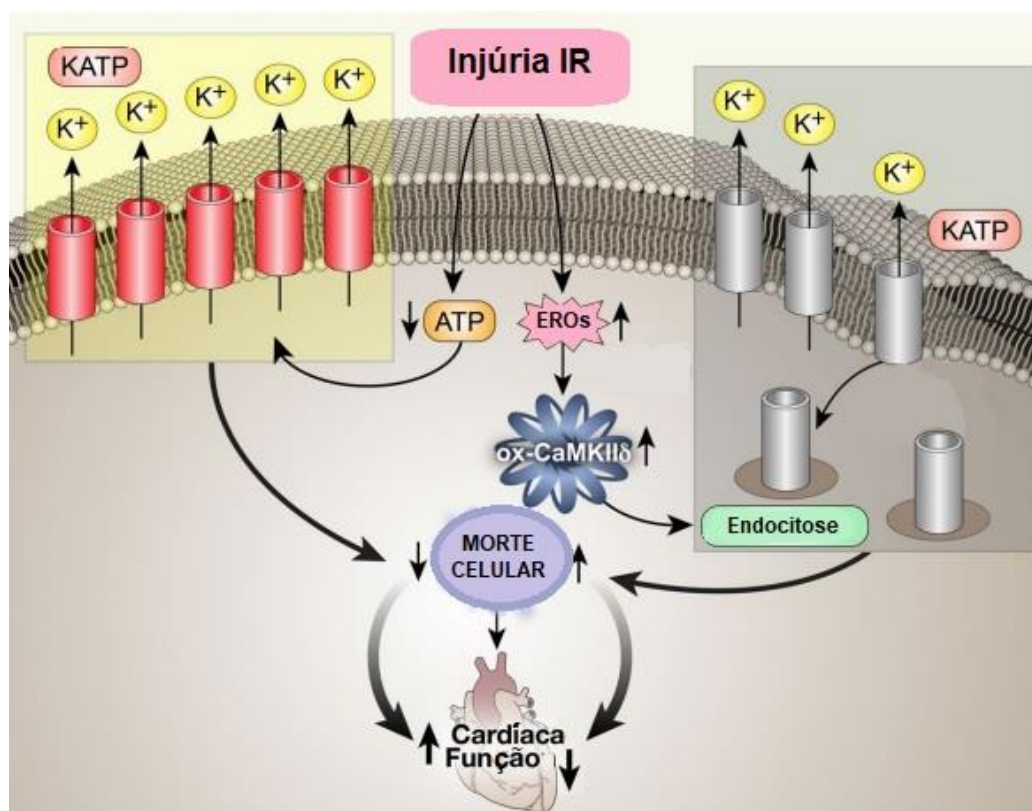


Figura 2 – Via proposta para oxidação da CaMKII (ox-CaMKII) após injúria de IR e internalização de canais K_{ATP} . ATP (adenosina trifosfato), EROs (espécies reativas de oxigênio). Adaptado de Wu et al. (2019).

2.5 Naringina e seus efeitos nas doenças e cardioproteção

A NRG é um glicosídeo de flavonona encontrada principalmente em frutas cítricas e em plantas medicinais (Fig. 3). O aumento do interesse em estudar essa molécula se deve ao potencial terapêutico em virtude das diversas propriedades biológicas que ela possui (CHEN et al., 2016).

Diversas pesquisas demonstraram efeitos benéficos da NRG nas doenças: metabólicas (BARAJAS-VEGA et al., 2022; GE; ZHOU, 2021; MASSARO et al., 2022); neurológicas (MENG et al., 2021; OLADAPO et al., 2021); renais (ELSAWY et al., 2021; WANG et al., 2021); câncer (ANSARI et al., 2022; STABRAUSKIENE et al., 2022), dentre outras. Além disso, possui grande valor medicinal, principalmente em virtude de suas ações antioxidantes com menores efeitos colaterais quando comparada aos compostos sintéticos existentes, soma-se a isso, sua ação anti-inflamatória (ZHAO; LIU, 2021).

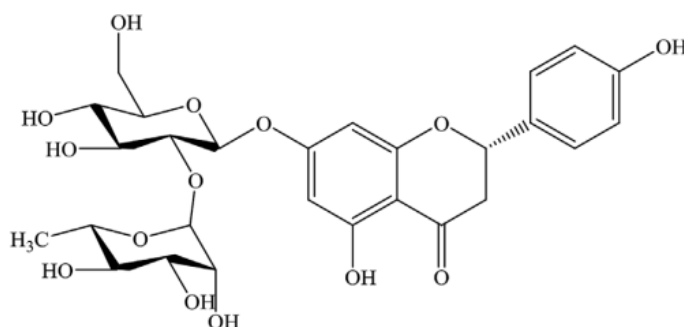


Figura 3 - Estrutura da naringina

Em relação às DCV, em uma revisão da literatura realizada por Heidary Moghaddam et al. (2020) foram encontrados estudos de cardioproteção da NRG em relação à aterosclerose, doença coronariana, hipertensão, hipertrofia cardíaca, IAM e acidente vascular cerebral isquêmico.

Pesquisas de IR cardíaca com a NRG são escassas. Em estudos *in vitro* realizados por Li et al. (2021b) mostraram que a NRG protegeu contra a hipóxia em cardiomiócitos de células H9C2 por aumentar a autofagia através da ativação da via de sinalização HIF-1 α /BNIP3. Guo et al. (2022) utilizaram células AC16 (linha celular de cardiomiócitos humanos) submetidas a hipóxia-reoxigenação, e concluíram que o pré-tratamento com a NRG diminuiu significativamente a liberação de citocinas e a apoptose de cardiomiócitos.

Estudos *in vivo* foram realizados por Rani et al. (2013) por meio da ligadura da coronária descendente anterior (LAD) como protocolo de IR e observaram que a NRG (40 e 80 mg/kg/dia, por 14 dias) promoveu melhora da função cardíaca, aumentou a atividade antioxidante através da regulação positiva da sinalização de p-Akt/p-eNOS/NO e a supressão de IKK- β /NF- κ B juntamente com a modulação de MAPKs *mitogen-activated protein kinases*). Li et al. (2021a) avaliaram que a NRG (100 mg/kg), em protocolo de IR induzida por LAD, melhorou a injúria através da inibição da apoptose cardíaca, redução de reações - e estresse oxidativo e atenuação da autofagia. Os autores sugeriram que tais efeitos cardioprotetores da NRG poderiam ser atribuídos à ativação da via PI3K/Akt. Em outro estudo também por LAD, Liu et al. (2022c) fizeram um pré-tratamento com a NRG (5 mg/kg, i.p., por 5 dias) e concluíram que a mesma foi capaz de suprimir a apoptose, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo.

Além disso, em estudo prévio realizado em nosso laboratório por Araujo (2019), com protocolo *ex-vivo* de IR global, mostrou que corações de animais pré-tratados com a NRG (25 mg/kg, por 7 dias) apresentaram melhora dos parâmetros cardíacos, diminuição da área de infarto e da lesão tecidual por meio da redução da liberaçãolactato desidrogenase (LDH), redução do índice e ocorrência das arritmias. Somado a esses achados, foi constatado diminuição do dano oxidativo e restauração da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) (ARAUJO, 2019). No entanto, não foi elucidado o mecanismo envolvido nessa cardioproteção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Elucidar os mecanismos da NRG envolvidos na cardioproteção em modelo de infarto agudo do miocárdio induzida por injúria de IR.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da NRG sobre variáveis contráteis em coração isolado;
- Avaliar o efeito da NRG sobre variáveis eletrocardiográficas em coração isolado;
- Em corações perfundidos com NRG e submetidos a IR foram avaliados:
 - participação do canal K_{ATP} na cardioproteção, deteminando as variáveis:
 - ✓ pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo;
 - ✓ índice e a ocorrência de arritmias;
 - ✓ área de infarto e
 - ✓ lesão tedicual por meio da liberação de lactato desidrogenase.
- Em corações de animais tratados com a NRG e submetidos à IR foram avaliados:
 - ✓ a expressão de proteínas envolvidas na via apoptótica;
 - ✓ a expressão de proteínas envolvidas na via antioxidante;
 - ✓ alterações histopatológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e reagentes

Nos procedimentos experimentais foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar adultos (250–300 g), fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe e mantidos no biotério do Laboratório de Biofísica do Coração (LBC). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas a temperatura ($\pm 20,3^{\circ}\text{C}$ - $23,1^{\circ}\text{C}$ e 40-50%), foram alimentados livremente com ração comercial (Ração Nuvlab®, Brasil) e água *ad libitum*. Após os experimentos, as carcaças foram mantidas em freezer do LBC e em dia específico encaminhadas para o freezer do Biotério Central. O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob o protocolo nº 6747010620/2020 (CEUA/UFS) (Anexo A).

NRG, GLI, 2,3,5-trimetil-tetrazólio (TTC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). NAC foi adquirido da farmácia de manipulação. O cloreto de sódio P.A. (NaCl), cloreto de cálcio diidratado P.A. ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O cloreto de potássio (KCl), Tricrômico de Masson foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), a formalina foi adquirida da ACS científica (São Paulo, SP, Brasil) e a heparina da Roche (São Paulo, SP, Brasil). O Kit para lactato desidrogenase (LDH) foi adquirido do Labtest.

4.2 Avaliação dos efeitos da NRG sobre variáveis contráteis e eletrocardiográficas em coração isolado

Os animais foram heparinizados (1000 UI, i.p) e, após 15 min, foram eutanasiados em guilhotina, conforme orientação das Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. Em seguida, realizou-se a toracotomia, onde o coração foi rapidamente removido e mantido em solução de Krebs-Ringer (K-H, em mM: NaCl 120, KCl 5,4, MgCl_2 1,2, NaHCO_3 27, CaCl_2 1,25, Glicose 11, NaH_2PO_4 2,0) previamente filtrada em millipore ($0,45\mu\text{m}$), a fim de prevenir microembolia coronariana (HARRISON; RAYMOND, 1951). A canulação da aorta ocorreu por um curto período de tempo (no máximo 3 minutos) para minimizar infarto do miocárdio.

Dessa forma, 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 $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (Bomba HAAKE® C/F3, Berlim, Alemanha). 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®). Os sinais de pressão foram enviados a um amplificador (BRIDGE Amp FE221, ADInstrument®), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument®) e armazenados em computador (Fig. 4). A partir do registro de pressão foram determinados a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e frequência cardíaca.

Para captação dos sinais eletrocardiográficos foram usados três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl, 1 M) posicionados próximos ao coração e imersos no Krebs. Os sinais foram captados e monitorados por um cardioscópio (EMAI RX10), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument®) e armazenados em computador para processamento off-line. As seguintes variáveis foram avaliadas: frequência cardíaca (FC); duração do complexo QRS (QRS), que reflete a despolarização dos ventrículos (MARINHO et al., 2019); intervalo PRi (PRi) que reflete o período do início da onda P (despolarização dos átrios) até a onda R (SILVA et al., 2022) e intervalo QT (QTi) que é a medida da duração do início do complexo QRS até o final da onda T (repolarização dos ventrículos) (WU et al., 2020). O QTi foi corrigido pela frequência cardíaca usando a equação de Bazett corrigida ($QTc-B = QTi / \sqrt{RR/f}$; $f = 332 \text{ ms}$ (KMECOVA; KLIMAS, 2010), em que RR se refere ao intervalo RR do ECG.

Todas as variáveis foram determinadas em situação controle e após a perfusão de 5 e 10 μM de NRG. De acordo com a literatura, concentrações de NRG entre 5 a 160 μM foram utilizadas na cardioproteção em estudos com animais e células (HEIDARY MOGHADDAM et al., 2020).

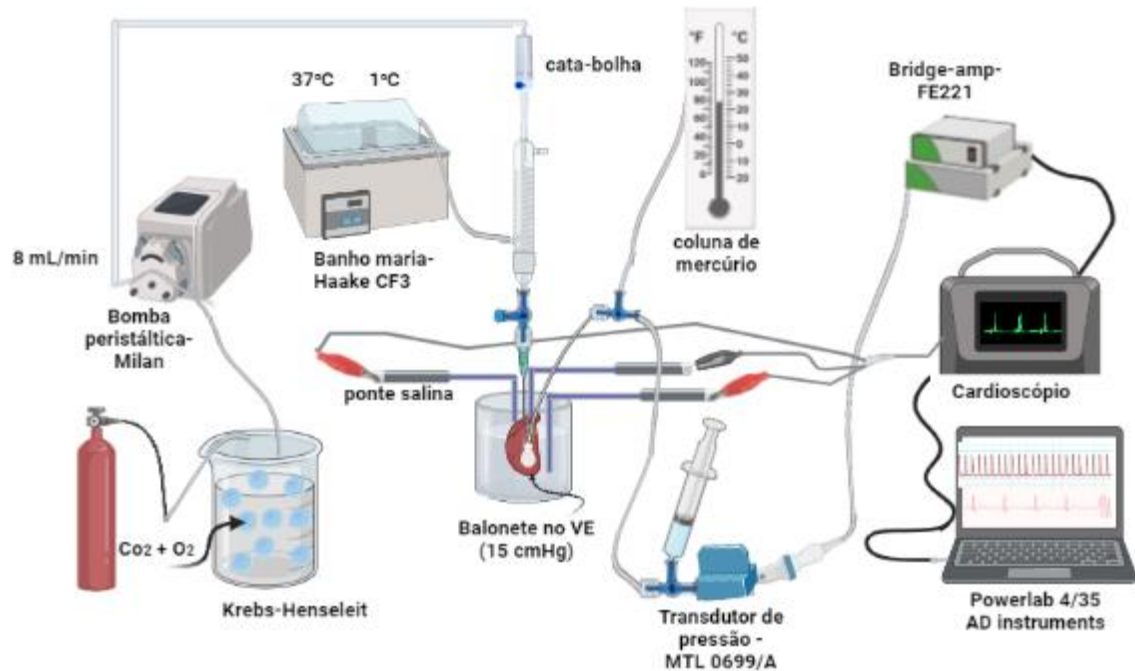


Figura 4 - Esquema gráfico da montagem experimental - a perfusão aórtica é de fluxo constante e do tipo Langendorff usado para registrar simultaneamente variáveis contráteis e ECG.

4.3 Avaliação do efeito da NRG administrada por via oral sobre a injúria de IR

Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos da seguinte forma:

- 1. Controle (CTR):** animais pré-tratados por 7 dias com solução salina (NaCl 0,9% + dimetilsufóxido - DMSO 2,5 %) sem injúria de IR (n = 5);
- 2. Veículo + IR:** animais pré-tratados por 7 dias com solução salina (NaCl 0,9% + DMSO 2,5 %) submetidos a injúria de IR (n = 5);
- 3. Naringina + IR (NRG+IR):** animais pré-tratados por 7 dias com naringina (25 mg/kg) + NaCl 0,9% e DMSO 2,5% submetidos a injúria de IR (n = 5);
- 4. NAC + IR (NAC+IR):** animais pré-tratados por 7 dias com N-acetil cisteína (NAC, 100 mg/kg) + NaCl 0,9% e DMSO 2,5% submetidos a injúria de IR (n = 5).

Os animais foram submetidos ao tratamento de gavagem (g.o.) sempre no mesmo horário, durante um período de sete dias consecutivos. A dose de NRG utilizada foi previamente escolhida em teste piloto durante o mestrado (ARAÚJO, 2019). O NAC é um

antioxidante extensamente conhecido e foi utilizado como controle positivo. Estudos demonstraram seus benefícios contra o IAM ao prevenir alterações no sarcolema, retículo sarcoplasmático, mitocôndria e miofibrilas, além de melhorar a função cardíaca pela sua propriedade antioxidante (BARTEKOVA et al., 2018; GONZÁLEZ-MONTERO et al., 2018; RHANNA et al., 2022).

No oitavo dia, após o período de pré-tratamento, os animais foram eutanasiados e os corações montados em sistema de perfusão aórtica segundo metodologia descrita no item 4.2. Após montagem do coração, aguardou-se um tempo de estabilização de 30 a 40 min. Para induzir a injúria de IR, foi realizada isquemia global por 30 min, os fluxos da mistura carbogênica e da solução de K-H foram interrompidos. Decorrido este tempo, procedeu-se à reperfusão por 60 min ao reestabelecer os fluxos. A PDVE, FC e eletrocardiograma (ECG) foram monitorados durante todo o período do protocolo. Os corações do grupo controle não foram submetidos à isquemia, sendo perfundidos com solução K-H durante 120 min (Fig. 5).

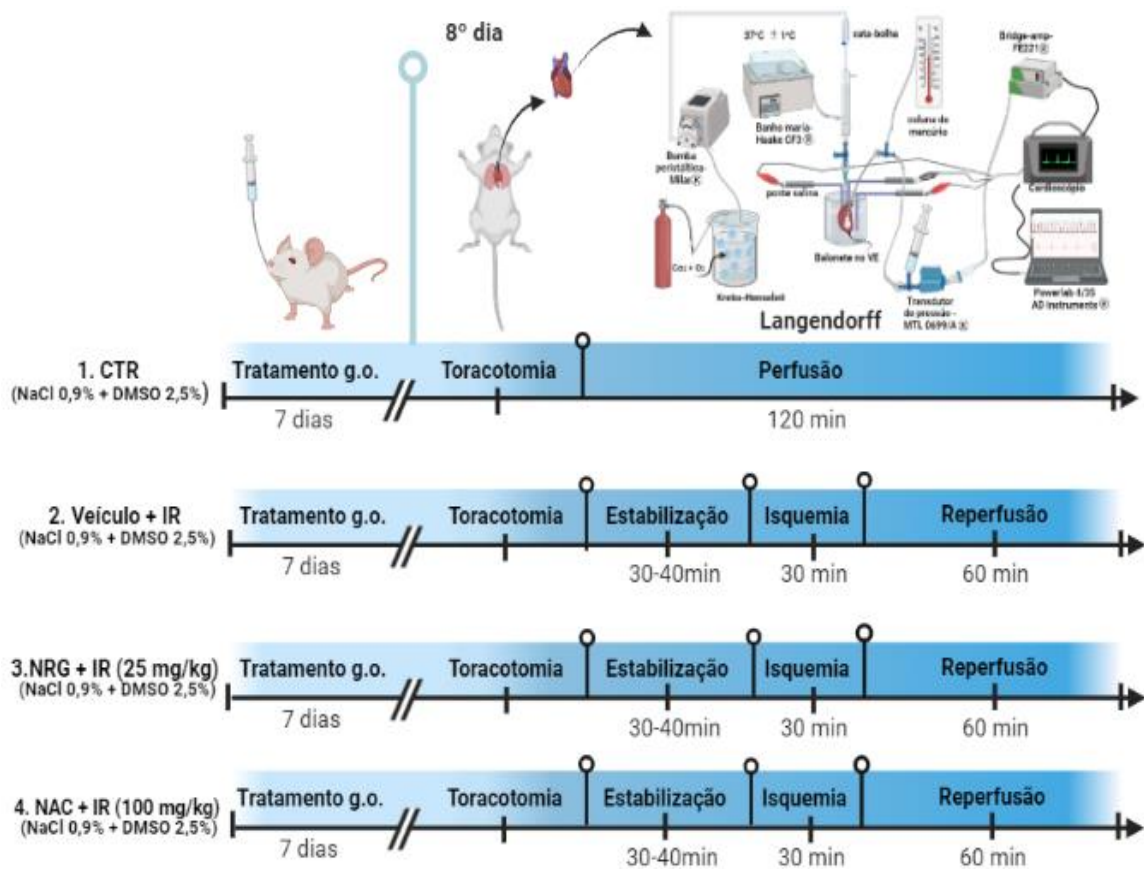


Figura 5 - Delineamento experimental da injúria de isquemia-reperfusão (IR) ex vivo. Os ratos foram tratados com NaCl 0,9% + DMSO 2,5% nos grupos CTR e veículo, respectivamente ou com NaCl 0,9% + DMSO 2,5% + NRG ou NAC por 7 dias, por gavagem (g.o.). Apenas no 8º dia, os corações foram isolados e submetidos à isquemia por 30 minutos e reperfusão por 60 minutos. Apenas o grupo CTR não passou pela isquemia, mantendo-se em perfusão por 120 minutos. CTR, controle; NRG, naringina; NAC, N-acetilcisteína.

4.3.1 Efeito da NRG sobre a expressão de proteínas relacionadas à IR

Logo após o término do experimento, os corações foram rapidamente congelados em temperatura de - 80°C para futura análise. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (RIPA: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA - Na₂ 5 mM, MgCl₂ 1 mM, 1% Nonidet P40, 0,3% triton X-100, 0,5% de SDS e DTT 100 mM) (Thermo Scientific®) e adicionados 0,05 mmol/L leupeptina, 1 mmol/L iodoacetamida, 1 mg/mL aprotinina, e 20 mg/mL inibidor de tripsina. Em seguida, foram centrifugados a 10.000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a - 80° C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951) Para tanto, 40 µg de proteínas foram submetidas a separação em um gel de poliacrilamida (10% e/ou 12%), a depender do peso molecular da proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95° C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120 V e tempo de ~1:30 h. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) por eletroblotting utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (BioRad), com voltagem fixa em 20 V e tempo de transferência variando entre 30 a 40 minutos. As membranas foram coradas em solução de Ponceau para verificar a qualidade da transferência.

Em seguida, as membranas foram lavadas em solução de TBS-Tween (em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). Então, as membranas foram incubadas e realizadas o bloqueio com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween - 0,3%) por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas por 18 a 20 h (*overnight*), a 4° C com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-Tween.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: Bax (#2772, Cell Signaling, 1:1000), Bcl-2 (#sc-7382, Santa Cruz, 1:1000), Mn-SOD (#33129, Cayman Chemical, 1:1000), CuZn SOD (#33363, Cayman Chemical, 1:1000). Após este período, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 h, com os seguintes anticorpos: anti-coelho (1:15000, Santa Cruz), anti-camundongo (1:15000, Santa Cruz) e anti-cabra (1:10000, Sigma-Aldrich). Logo após esse processo, as membranas foram novamente lavadas com TBS-Tween por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos).

As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® (enhanced chemoluminescence assay). Foi utilizado o GAPDH (#sc-47724, Santa Cruz, 1:1000) para expressão total da proteína como normalizador da expressão. A

visualização da imunoreatividade das bandas foi realizada com o ensaio de aumento de quimioluminescência, e a intensidade do sinal foi quantificada por análise das imagens obtidas usando o software IMAGE-J.

4.3.2 Envolvimento dos canais K_{ATP} na cardioproteção mediada por NRG

Para avaliar o mecanismo de ação na cardioproteção da NRG, foi feito o bloqueio de canais K_{ATP} com a GLI, um bloqueador não específico. O protocolo experimental seguiu as orientações de Meng et al. (2016).

Nesse protocolo foi usado a concentração de NRG de 5 μ M, uma vez que não promoveu alteração das variáveis contráteis e eletrocardiográficas em coração isolado. Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 5$) e os corações foram perfundidos de acordo com o quadro abaixo (Fig. 6):

1. **CTR** : após a estabilização, os corações foram perfundidos com solução K-H durante 120 min de reperfusão;
2. **Veículo + IR**: após a estabilização, os corações foram perfundidos com solução K-H submetidos à isquemia global de 30 min, seguida de 60 min de reperfusão;
3. **Naringina (NRG) + IR**: os corações foram perfundidos com 5 μ M de NRG durante 10 min antes da isquemia e durante todo o período de reperfusão;
4. **Naringina + glibenclamida (NRG + GLI) + IR**: Antes da isquemia, os corações foram perfundidos com (10 μ M de GLI por 10 min) seguido da perfusão de (5 μ M de NRG + 10 μ M de GLI por 10 min). Durante todo o período de reperfusão, os corações foram perfundidos novamente com (5 μ M de NRG + 10 μ M de GLI) por 60 min.

A fim de verificar a influência da GLI na proteção dos corações pela NRG, avaliou-se a PDVE, o ECG e a liberação da LDH. Além disso, foram feitas a mensuração da área de infarto, índice e ocorrência de arritmias, cujas metodologias estão descritas a seguir:

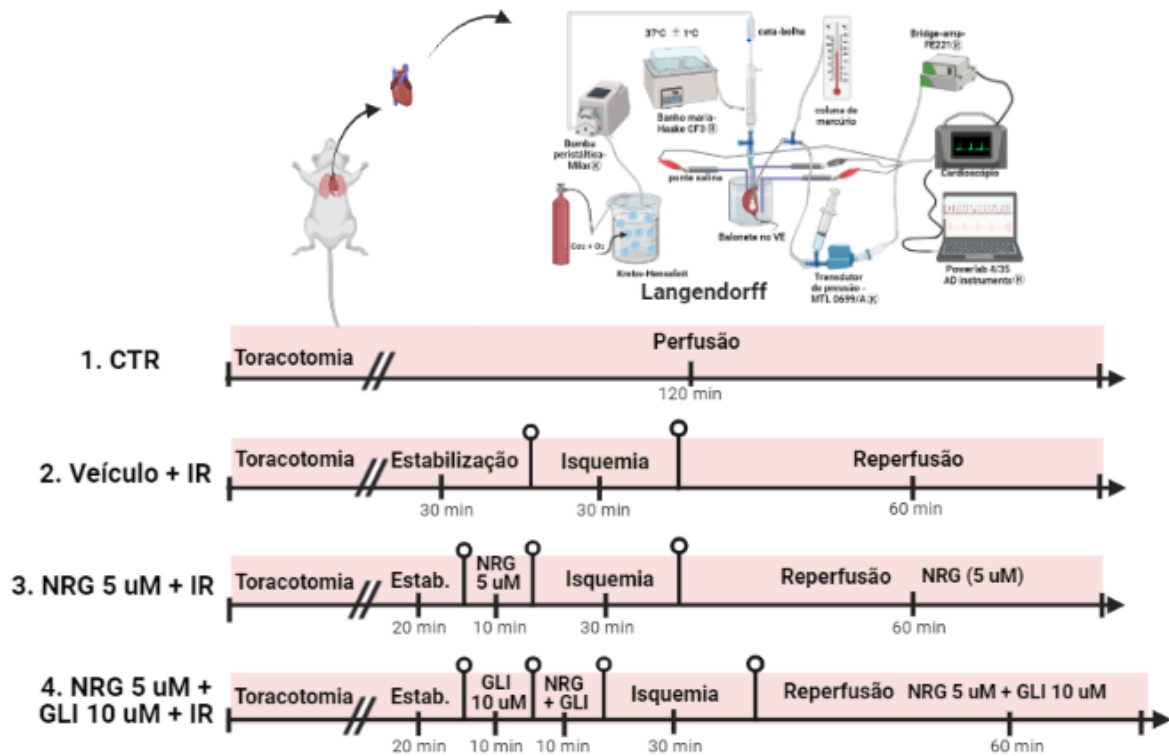


Figura 6 - Delineamento experimental (ex vivo) da influência da glimenclamida (GLI) em corações perfundidos com NRG. O grupo CTR foi perfundido durante 120 min com K-H. O grupo veículo + IR passou por estabilização (30 min), isquemia global (30 min) e reperusão (60 min). O grupo NRG 5 μ M passou por estabilização (30 min), após o coração foi perfundido com NRG 5 μ M por 10 min, em seguida procedeu-se à isquemia global (30 min) seguida de reperusão com NRG 5 μ M (60 min). No grupo NRG 5 μ M + GLI 10 μ M, após estabilização, os corações foram perfundidos com GLI 10 μ M (10 min), em seguida foram perfundidos com NRG 5 μ M e GLI 10 μ M (10 min) antes da isquemia e durante toda a reperusão. CTR, controle; NRG, naringina; GLI, glibenclamida.

4.3.3 Determinação da área de infarto

A área de infarto foi determinada pela coloração dos corações com 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) de acordo com Fishbein et al. (1981). Após o término da reperusão, 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) por 20 min, sendo posteriormente fixado em formalina tamponada por 30 min. As células viáveis ficaram coradas em vermelho, contrariamente, as células não viáveis apareceram pálidas. Foi utilizado câmera de celular com resolução de 12 megapixels para registro das imagens dos corações. Posteriormente, cada imagem do coração, dos grupos experimentais, foi analisada com o auxílio do programa ImageJ®1.38x. Avaliou-se a área total do coração e a área infartada, determinando-se a porcentagem da área de infarto pela seguinte fórmula: Área infartada (%) = área infartada x 100/área total do coração.

4.3.4 Determinação da lesão tecidual

Para a determinação da lesão tecidual, a liberação da LDH foi dosada, 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.

4.3.5 Análise do índice e ocorrência de arritmias

O índice 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 índice de arritmias

ÍNDICE 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 (1988).

4.3.6 Atividade de citrato sintase

O método de ensaio da atividade de citrato sintase foi o descrito por Srere (1969). Para tanto, foi adicionado à 2-4 µg de proteína do sobrenadante a 100 mM Tris (pH 8,0), 0,1 mM acetil-CoA, 0,1 mM 5,5'-ditiobis-(2 ácido nitrobenzóico), 0,1% triton X-100 e 0,2 mM oxaloacetato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 412 nm, por 3 minutos a 25°C.

4.3.7 Análises histopatológicas

Após os procedimentos experimentais, 1/3 do coração (base) foi fixado em formalina tamponada (10%), emblocados em parafina e cortados a 5 µm de espessura para posterior coloração com hematoxilina-eosina e tricomio de Masson. Posteriormente à confecção das lâminas histológicas foram realizadas fotos através de microscópio em objetiva de 10x com aumento real de 100 x. As lâminas foram avaliadas qualitativamente em cada grupo estudado (n = 5) para averiguar possíveis alterações, tais como: edema, fibrose, alterações nucleares como picnose, dilatação de vasos, distensão de fibrilas, dentre outras.

4.3.7.1 Análise morfométrica

Foram analisados 50 cardiomiócitos em cinco campos histológicos de 0,0625 mm² (ampliação 1000 x), selecionados por casualização sistemática (para cada campo selecionado, seguiam-se dois campos desprezados) em microscópio óptico Leica DM5000B. Os campos foram fotomicrografados (câmera digital Leica DFC340FX) acoplada ao microscópio óptico, digitalizados e armazenados sob o formato de arquivo .tiff para análise posterior. A determinação do diâmetro médio do citoplasma e dos núcleos dos cardiomiócitos foi realizada utilizando *software* de análise de imagens *Image J* (1.44, versão para *Windows*). O programa foi previamente calibrado e definida a escala de medida (µm), e as medidas foram obtidas usando a ferramenta de “mão livre”. Todas as medidas morfométricas foram realizadas de forma cega. Para obtenção da relação citoplasma/núcleo, as medidas lineares foram primeiramente transformadas em medidas de área utilizando a equação $A = \pi R^2$ ($R = \text{diâmetro}/2$). Posteriormente as áreas citoplasmáticas foram divididas pelas áreas nucleares, obtendo-se a relação entre elas.

4.3.8 Análise estatística

Para a sistematização e observação dos resultados, os dados foram tabulados em Excel e o processamento de dados foi realizado no GraphPad Prism. Todos os dados foram expressos como média ± Erro Padrão Médio (EPM), e o número de animais está mostrado como n. Para a decisão estatística, foi usado o teste ANOVA *one-way*, seguido de teste de Tukey. Para a análise histológica, todos os dados ordinais contínuos foram submetidos a

teste de normalidade de distribuição Gaussiana por meio do teste de Shapiro Wilk, e a análise de homocedasticidade por meio do teste de Bartlett. Demonstrada a normalidade e homocedasticidade dos dados, a análise de diferenças entre médias foi abalisado por meio do teste de análise de variância (ANOVA, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey). Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da NRG sobre as variáveis contráteis e eletrocardiográficas em corações isolados

Em coração isolado, foram avaliadas os efeitos de duas concentrações de NRG (5 μ M e 10 μ M) sobre as variáveis contráteis. A Fig. 7A mostra registro da PDVE em situação controle e com 5 e 10 μ M de NRG. Como pode ser visto, a NRG nessas duas concentrações não foi capaz de promover alteração na PDVE. Os resultados revelaram que não houve diferença significativa, entre as concentrações avaliadas e o grupo controle, em relação à PDVE (Fig. 7B) e à frequência cardíaca (Fig. 7C) em comparação ao CTR.

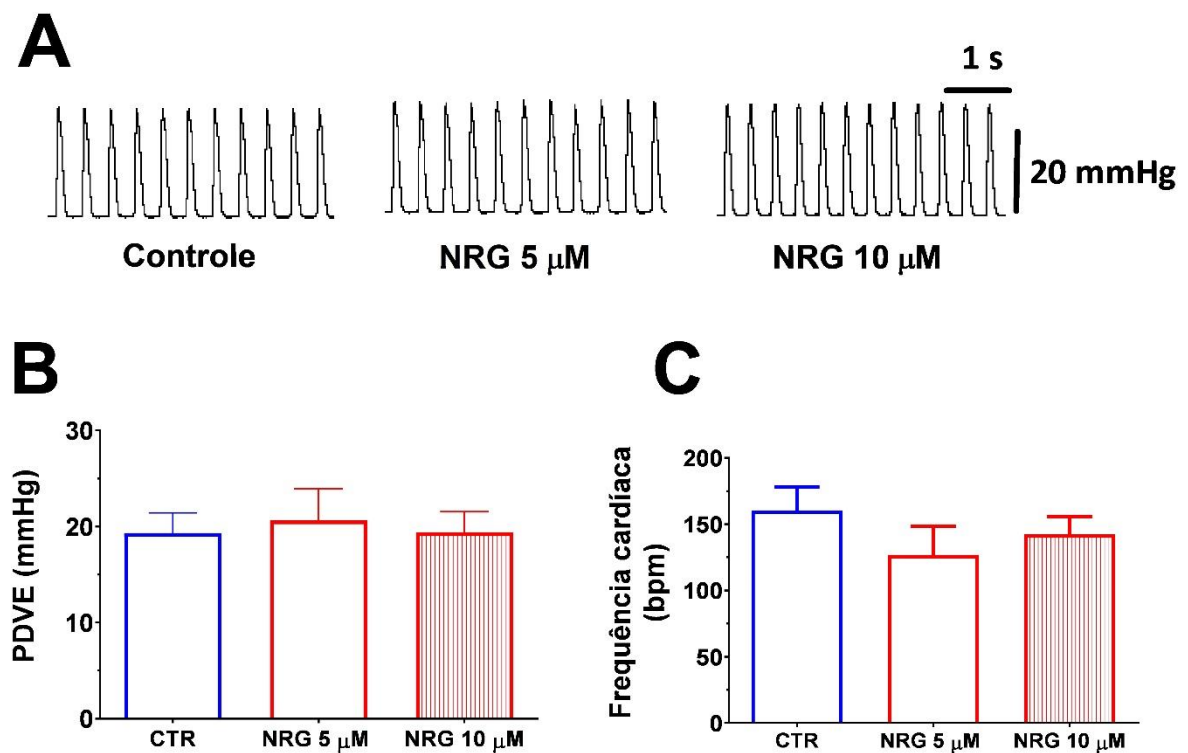


Figura 7 - Efeitos da naringina (NRG) sobre variáveis contráteis em coração isolado de rato (n = 5). (A) Registro representativo da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) em situação controle com 5 e 10 μ M de NRG, (B) PDVE e (C) Frequência cardíaca.

Com relação às variáveis eletrocardiográficas, a Fig.8A mostra que não houve diferença significativa do PRi com a perfusão dos corações com 5 e 10 μM de NRG. Entretanto, observou-se uma diminuição significativa da duração do complexo QRS e do QTc quando os corações foram perfundidos com 10 μM de NRG (Fig.8B e C).

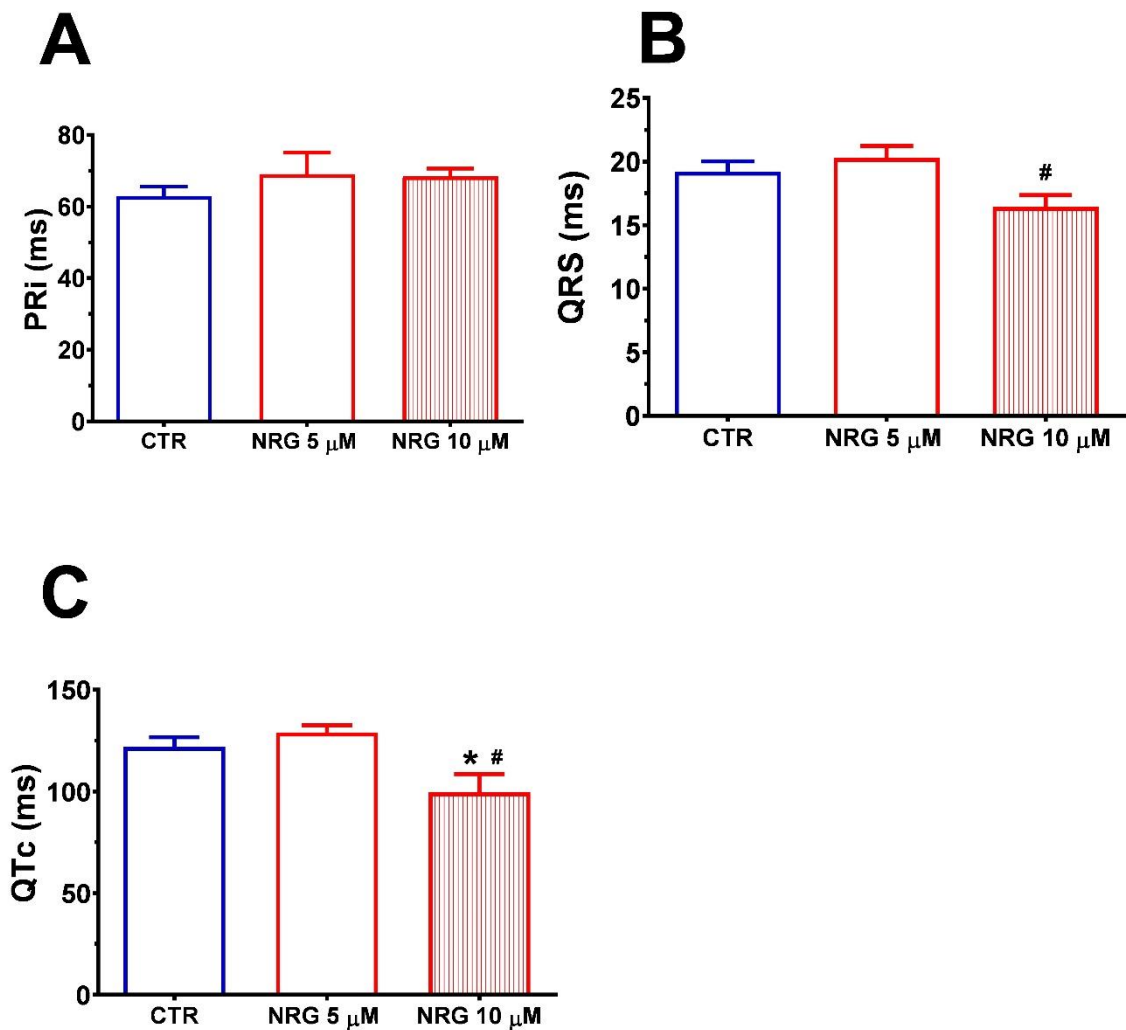


Figura 8 - Efeitos da naringina (NRG) sobre as variáveis eletrocardiográficas em coração isolado de rato. (A) Intervalo PR (Pri), (B) duração do complexo QRS (QRS) e (C) intervalo QT corrigido (QTc). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs controle e $\#p < 0,05$ vs NRG 5 μM).

5.2 Influência do K_{ATP} na cardioproteção mediada pela NRG

Para avaliar o envolvimento dos canais K_{ATP} no mecanismo de ação da NRG foram analisados as variáveis contráteis e elétricas. Como pode ser observado na Fig. 9A, a pré-

perfusão dos corações com a NRG preveniu a redução da PDVE quando comparado ao grupo veículo + IR. Os animais dos grupos veículo + IR e NRG/GLI + IR apresentaram comprometimento da PDVE em cerca de 30% e 25%, respectivamente, quando comparados ao grupo CTR. Dessa forma, o bloqueio dos canais K_{ATP} com a GLI reduziu o efeito cardioprotetor da NRG sobre a função contrátil dos corações. Além disso, houve redução significativa da PVDE no grupo NRG/GLI + IR quando comparado ao animais NRG + IR.

A liberação da LDH foi medida como um marcador bioquímico de lesão de IR. Como pode ser observado na Fig. 9B, não houve diferença na liberação do LDH ao final da reperfusão entre os grupos CTR e NRG + IR. Já o grupo veículo + IR apresentou aumento significativo de LDH quando comparado ao grupo CTR. A perfusão da GLI aboliu completamente o efeito cardioprotetor promovido pelo grupo NRG + IR, pois apresentou aumento da liberação da LDH.

Também foi constatado maior percentual de área de infarto nos grupos veículo + IR e NRG/GLI + IR (Fig. 9C). Os animais do grupo NRG/GLI + IR apresentaram um aumento em aproximadamente oito vezes na área de infarto em comparação ao grupo NRG + IR. Esses resultados sugerem que a NRG apresenta cardioproteção na injúria IR por ativação dos canais K_{ATP} , pois todos os efeitos benéficos foram abolidos na presença de GLI.

A Fig. 10A mostra os traçados representativos de ECG nos grupos CTR, veículo + IR, NRG + IR e NRG/GLI + IR. Como pode ser visto, foram registrados eventos de BVP, TV e FV no grupo veículo + IR. Ao avaliar o índice de arritmias nos grupos estudados, observou-se uma baixa pontuação nos eventos arrítmicos no grupo CTR e uma atenuação no índice de arritmias com a perfusão com NRG + IR quando comparado ao grupo veículo + IR (Fig. 10B). Por outro lado, os resultados mostraram que a perfusão da NRG/GLI + IR aumentou significativamente o índice de arritmia. Quando as arritmias foram estratificadas de acordo com sua gravidade, percebeu-se que nos corações em que a GLI foi administrada, cerca de 75% das arritmias ocorridas foram as que apresentam maior gravidade (TV e FV). Em contrapartida, os corações que foram perfundidos com a NRG + IR esse percentual foi de apenas 24% (Fig. 10C).

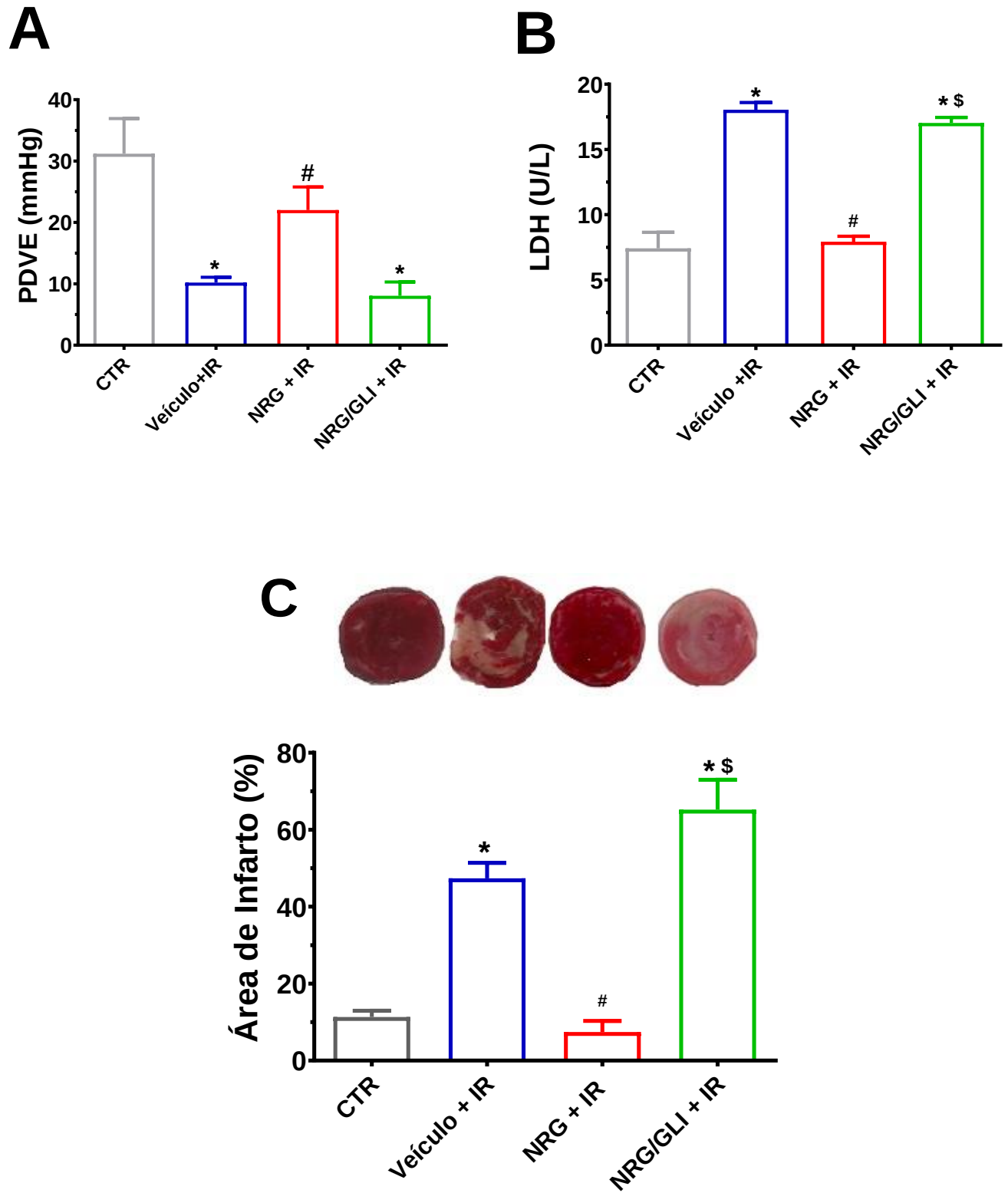


Figura 9 - Influência do K_{ATP} na cardioproteção mediada pela naringina (NRG) em modelo de isquemia-reperfusão (IR) em rato. (A) Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (B) lactato desidrogenase (LDH) e (C) área de infarto. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5$, * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs Veículo+IR e \$ NRG/GLI + IR vs NRG + IR), glibenclamida (GLI).

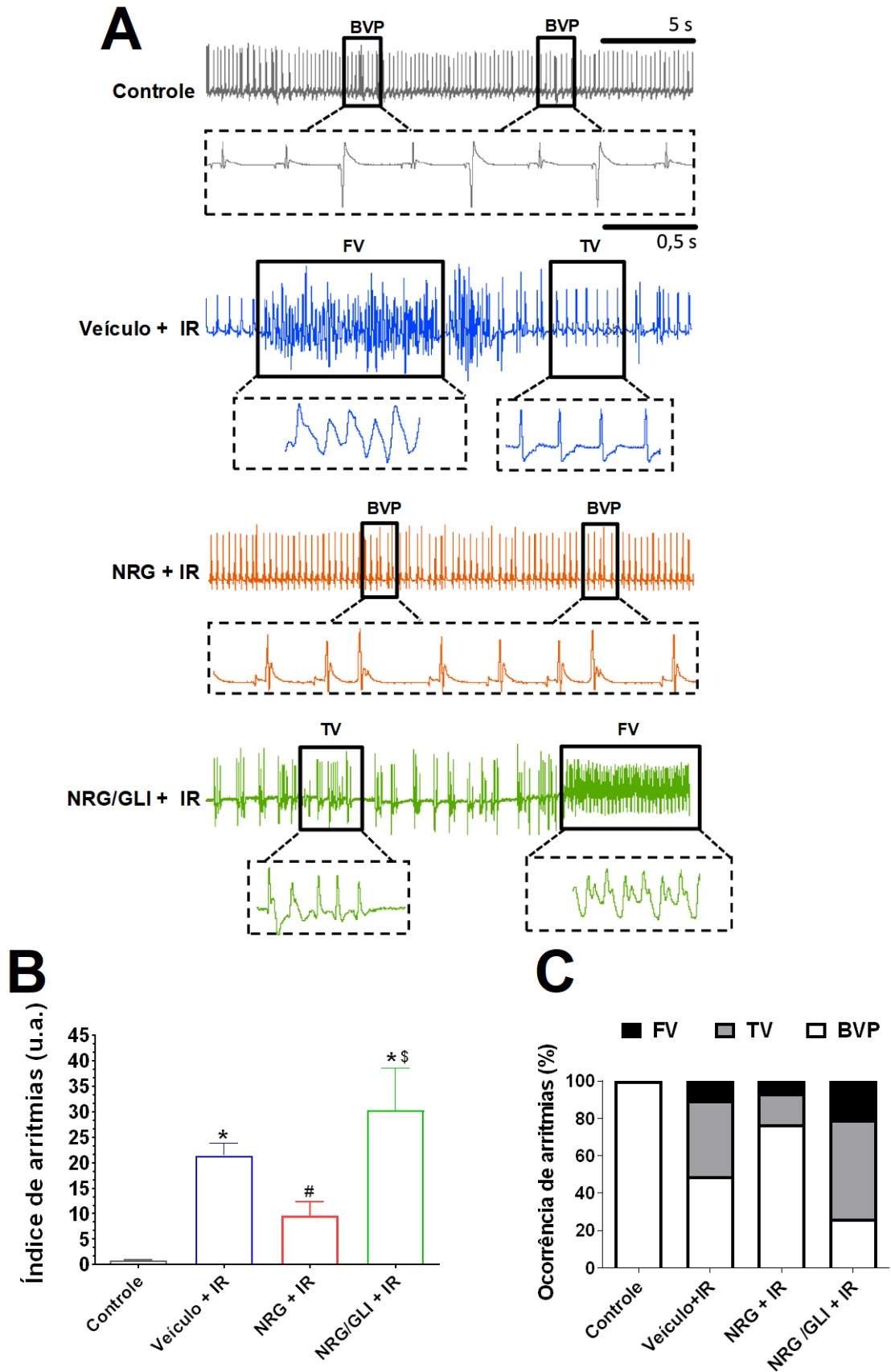


Figura 10 - A naringina (NRG) reduziu o índice e a ocorrência de arritmias induzida pela isquemia reperfusão (IR). (A) Traçado representativo das arritmias, (B) Índice de arritmias e (c) Ocorrência de arritmias. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs controle, $\#p < 0,05$ vs veículo + IR; $\$p < 0,05$ vs NRG $5 \mu\text{M}$ + IR). Glibenclamida (GLI), batimento ventricular prematuro (BVP), taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV).

5.3 NRG preveniu a apoptose cardíaca induzida pela IR

A injúria de IR induziu a ativação da via pró-apoptótica demonstrada pelo aumento significativo da expressão da proteína Bax em cerca de 84% no grupo veículo + IR ($1,29 \pm 0,16$ u.a.) quando comparado ao grupo CTR ($0,70 \pm 0,14$ u.a., Fig. 11A). O tratamento dos animais com NRG e NAC impediu o aumento da expressão da Bax ($0,63 \pm 0,14$ u.a. e $0,79 \pm 1,12$ u.a., respectivamente). Não houve aumento significativo entre os grupos estudados na expressão da Bcl-2 (Fig. 11B). Entretanto, a razão Bax/Bcl-2, que determina a resposta de sinalização para mecanismos de apoptose e regulação negativa da Bcl-2, apresentou aumento significativo no grupo veículo + IR ($1,59 \pm 0,17$ u.a., $p < 0,05$) em comparação ao CTR ($0,70 \pm 0,14$ u.a.). O pré-tratamento com a NRG preveniu a ativação da via apoptótica por diminuir a razão Bax/Bcl-2 ($0,50 \pm 0,03$ u.a., $p < 0,05$) em relação ao grupo veículo + IR (Fig. 11C). Resultado semelhante também foi observado com o grupo NAC + IR.

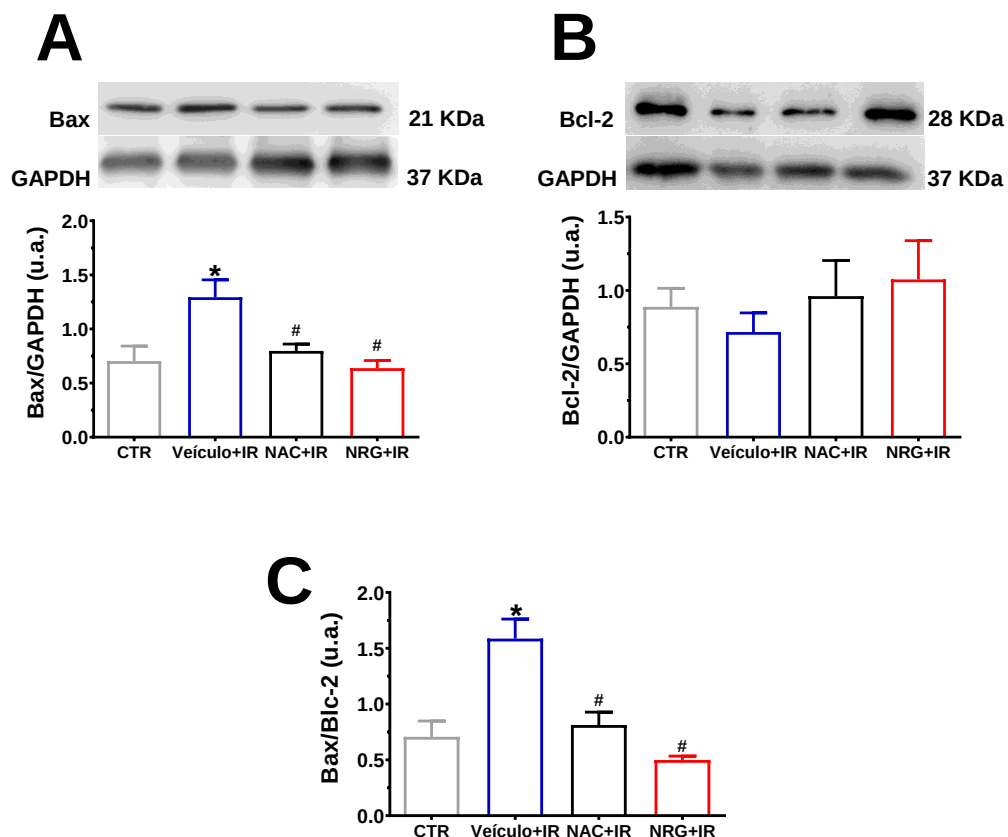


Figura 11 - Imunoconteúdo de proteínas associadas à apoptose nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais. (A) Bax, (B) Bcl-2, (C) Bax/Bcl-2. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 4$, $*p < 0,05$ vs controle, $\#p < 0,05$ vs veículo + IR). Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

5.4 Avaliação do potencial antioxidante da NRG na expressão de isoformas da SOD

Na análise do imunoconteúdo de proteínas envolvidas na via antioxidante, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa nos quatro grupos estudados tanto da SOD CuZn quando da SODMn (Fig.12 A e B).

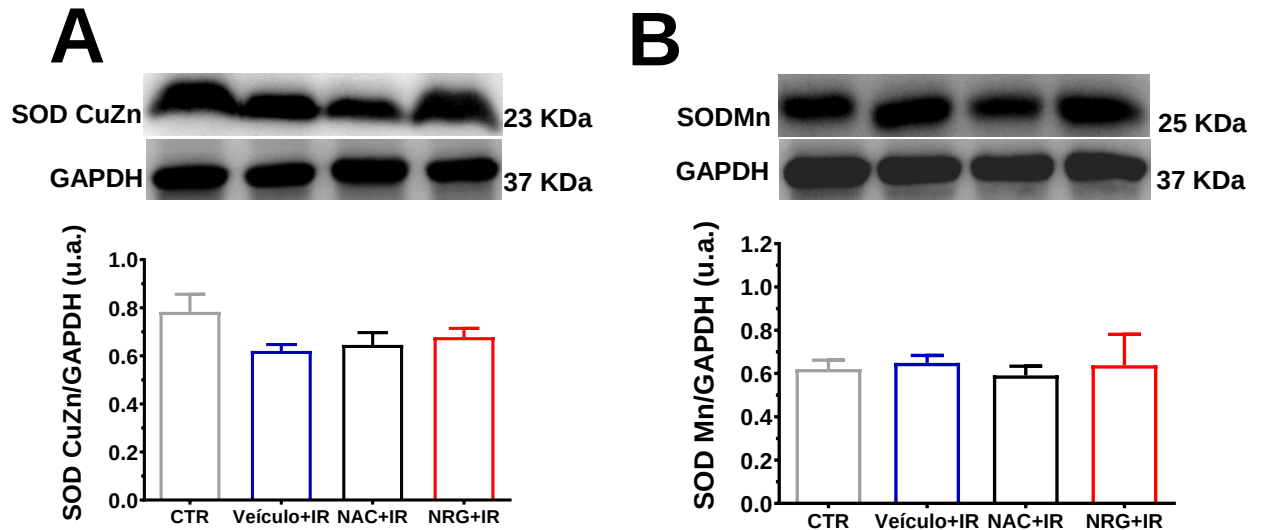


Figura 12 - Imunoconteúdo de isoformas da superóxido dismutase (SOD) nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais. (A) superóxido dismutase cobre e zinco (SOD CuZn) e (B) superóxido dismutase mangânes (SOD Mn). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 4$, $*p < 0,05$ vs controle, $\#p < 0,05$ vs veículo + IR). Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

5.5 Avaliação da citrato sintase

Ao avaliar a citrato sintase (CS), observamos que sua atividade foi significativamente menor nos animais do grupo veículo + IR ($128,03 \pm 1,59$ mmol/mg proteína/min) quando comparado ao grupo CTR ($250,30 \pm 11,03$ mmol/mg proteína/min). Os grupos NAC + IR e NRG + IR apresentaram um aumento significativo da CS em cerca de duas vezes em relação ao grupo veículo + IR (Fig. 13).

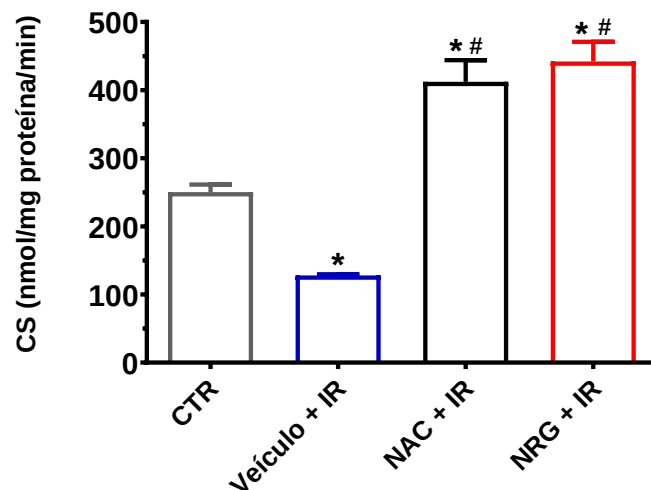


Figura 13. Atividade da enzima citrato sintase (CS) nos corações submetidos a isquemia-reperfusão (IR) nos diferentes grupos experimentais. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs controle, $\#p < 0,05$ vs veículo + IR). Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG).

5.6 Análise histopatológica

No grupo CTR, os cardiomiócitos exibiram morfologia poligonal, citoplasma fortemente eosinofílico e núcleos arredondados ou ovóides excêntricos (deslocados para a periferia) e se mostraram dispostos em grupamentos compactos com pouco estroma interveniente. No grupo veículo + IR, essas células apresentaram aspecto balonizado, com discreta perda de eosinofilia, achados esses sugestivos de edema intracelular, e núcleos muitas vezes escuros e contraídos (compatível com picnose). Foi observado nítido aumento do espaço entre os cardiomiócitos e distensão das fibrilas de colágeno estromais, conferindo aspecto reticular, aspecto morfológico esse que foi interpretado como compatível com edema intersticial (Fig. 14). Além disso, os vasos capilares localizados entre as fibras musculares se mostraram, em sua maioria, dilatados e congestionados pela avaliação qualitativa. Os grupos NAC + IR e NRG + IR exibiram características morfológicas semelhantes àsquelas observadas no grupo CTR (Fig. 15).

Com relação ao diâmetro nuclear médio (Fig. 16A), foi observada uma redução significativa nos grupos veículo + IR ($4,35 \pm 0,12 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) em comparação com o grupo CTR ($4,75 \pm 0,11 \mu\text{m}$), mas não houve diferença entre esse último e os grupos NAC + IR ($4,65 \pm 0,12 \mu\text{m}$) e NRG + IR ($4,46 \pm 0,06 \mu\text{m}$). Com relação ao diâmetro citoplasmático médio (Fig. 16B) dos cardiomiócitos do grupo veículo + IR ($22,53 \pm 0,46 \mu\text{m}$) foi significativamente maior que do grupo CTR ($18,08 \pm 0,31 \mu\text{m}$) ($p < 0,001$). Interessantemente, nos grupos NAC + IR

($19,29 \pm 0,39 \mu\text{m}$) e NRG + IR ($18,58 \pm 0,22 \mu\text{m}$) houve diminuição do diâmetro citoplasmático em comparação ao grupo veículo + IR ($p < 0,05$). Também foi analisada a relação citoplasma/núcleo (Fig. 16C) nos cardiomiócitos submetidos às diferentes condições experimentais. O grupo veículo + IR exibiu os valores de relação citoplasma/núcleo ($5,39 \pm 0,16$) significativamente maiores que nos grupos CTR ($3,77 \pm 0,16$). Os valores nos grupos NAC + IR ($4,32 \pm 0,17$) e NRG + IR ($4,21 \pm 0,09$) foram menores que o grupo veículo + IR.

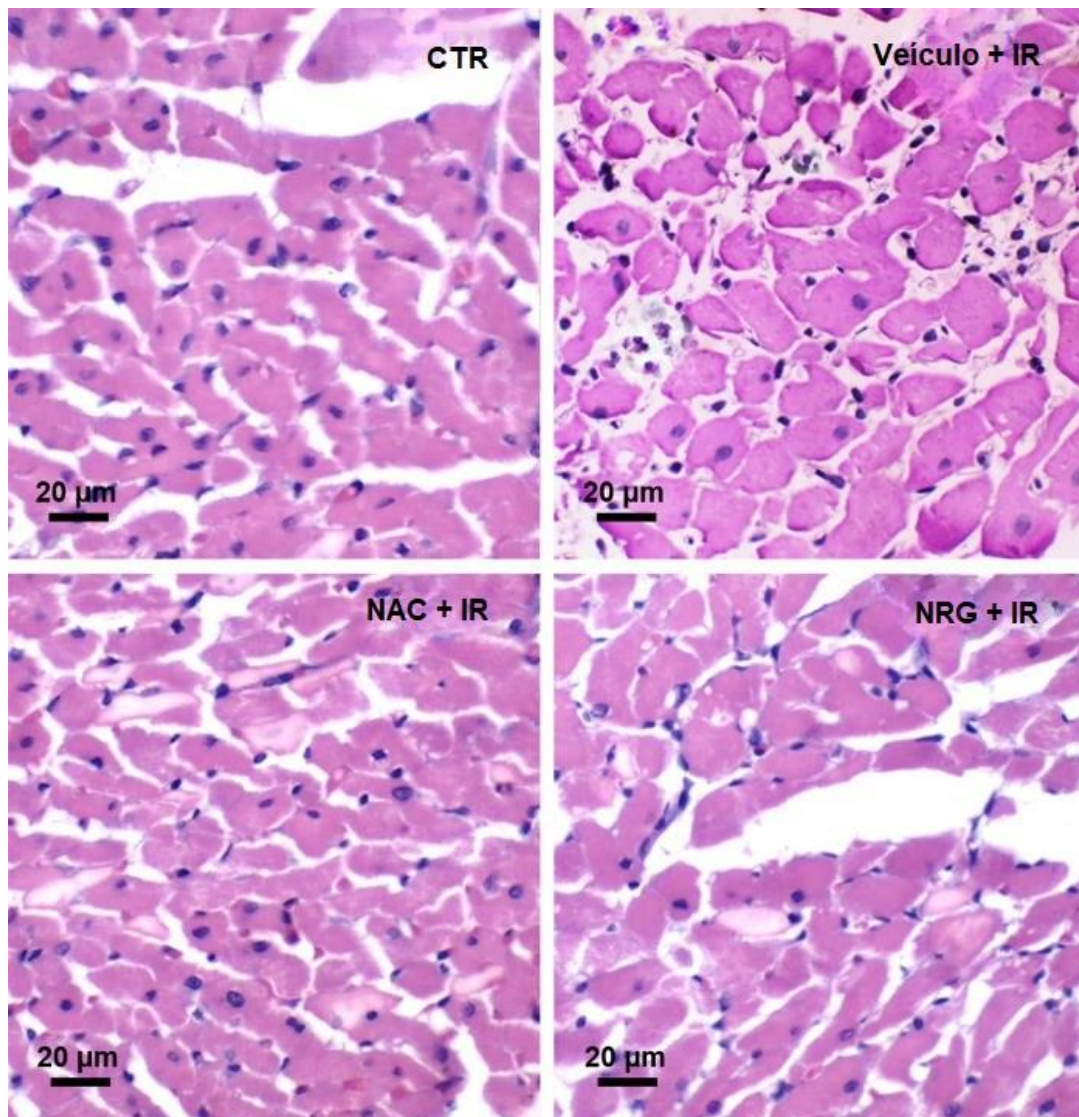


Figura 14 - Fotomicrografia de cortes histológicos coradas em HE (400 x) exibindo seções transversais de fibras musculares estriadas cardíacas de ratos. Os grupos CTR, NAC + IR e NRG + IR exibem cardiomiócitos típicos, com morfologia poligonal eosinofílico e núcleos pequenos, redondos ou ovóides em posição excêntrica. O estroma de tecido conjuntivo intersticial é escasso. No grupo veículo + IR é possível evidenciar cardiomiócitos aumentados de volume (balonizados), além de edema intersticial moderado (alargamento do espaço intercelular e distensão de fibrilas de colágeno). Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG).

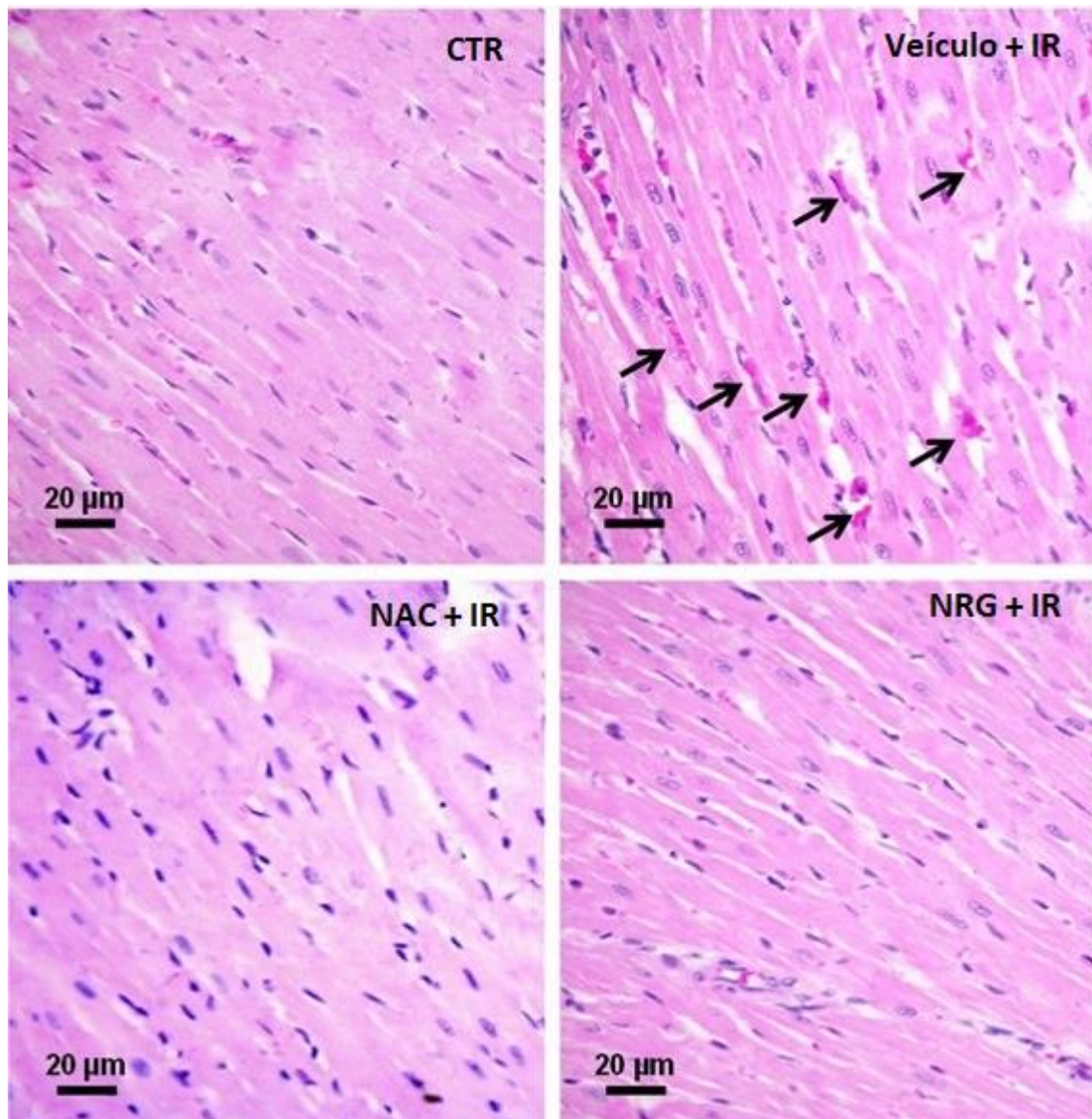


Figura 15 - Fotomicrografia de cortes histológicos coradas em HE (400 x) exibindo secções longitudinais de fibras musculares estriadas cardíacas de ratos. Grupos CTR, NAC e NRG + IR exibem fibras compactamente dispostas, permeadas por escasso tecido conjuntivo intersticial e poucos vasos capilares. O grupo veículo + IR exhibe afastamento das fibras musculares, e numerosos vasos capilares dilatados e congestionados (setas), sugerindo edema intersticial e hiperemia capilar. Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG).

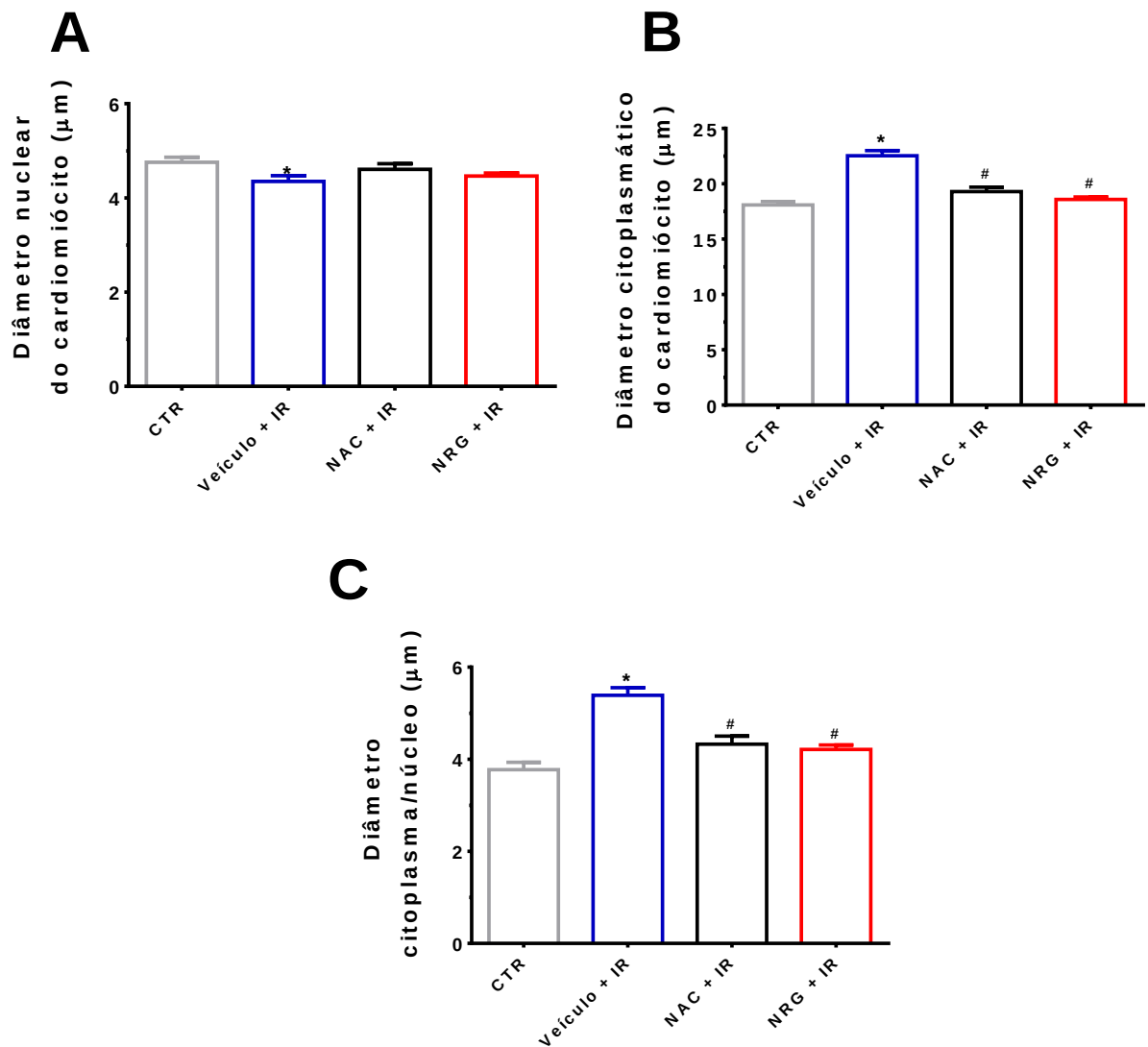


Figura 16 - Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos ratos submetidos a isquemia-reperusão (IR). (A) diâmetro nuclear do cardiomiócito, (B) diâmetro citoplasmático cardiomiócito e (C) diâmetro citoplasma/núcleo em cardiomiócitos seccionados transversalmente. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs controle, $\#p < 0,05$ vs veículo + IR). Controle (CTR), n-acetilcisteína (NAC), naringina (NRG).

6 DISCUSSÃO

Em coração isolado de rato, foram avaliados os efeitos de 2 concentrações de NRG (5 e 10 μM) sobre a contratilidade ventricular (inotropismo) e o eletrocardiograma. Como observado em nossos resultados, em relação às variáveis contráteis do coração, não foram encontradas diferenças significativas nas duas concentrações. Em estudo de López-Medina et al. (2014) foi verificado que a NRG, em coração isolado de rato, exerceu inotropismo negativo com uma IC_{50} de 72 μM . Alvarez-Collazo et al. (2014) também observaram que a NRG (0,001 a 100 μM) apresentou atividade inotrópica negativa em coração isolado de camundongo, explicado pela redução das correntes de sódio e de cálcio tipo-L. Nenhuma alteração foi observada sobre a frequência cardíaca (cronotropismo) com a perfusão do coração com as duas concentrações testadas de NRG. Nossos resultados corroboram os achados de López-Medina et al. (2014) e Alvarez-Collazo et al. (2014) que também não detectaram efeito cronotrópico da NRG.

No eletrocardiograma, 10 μM de NRG promoveu redução do intervalo QTc, que é um parâmetro que reflete a duração do potencial de ação ventricular. O encurtamento do QTc, em geral, significa que houve uma repolarização ventricular mais rápida e que pode ser devido à ativação de canais para potássio (CHIAMVIMONVAT et al., 2017; NOORDAM et al., 2019; WEI; YOHANNAN; RICHARDS, 2022). Alvarez-Collazo et al. (2014), observaram que a NRG nas concentrações de 30-100 μM ocasionou encurtamento do QTc. Em experimentos em recombinantes humanos Kir3.1-3.4 (principalmente expresso no coração) e Kir3.1-3.2 (principalmente expresso no cérebro) expressos em oócitos de *Xenopus* ou células HAC₁₅₀ (OKI et al., 2012; YOW et al., 2011), a NRG mostrou ser um ativador direto dos canais Kir, o que poderia explicar o encurtamento do QTc evidenciado em nosso estudo. O bloqueio dos canais de cálcio tipo-L induzido pela NRG (ALVAREZ-COLLAZO et al., 2014) também pode contribuir para redução do QTc.

Também foi verificado que a NRG (10 μM) promoveu redução da duração do complexo QRS. Sabe-se que este parâmetro corresponde ao tempo de ativação ou despolarização dos ventrículos (AKGUN; KALKAN; KURSAT TIGEN, 2014). A redução do QRS com 10 μM de NRG sinaliza uma despolarização mais rápida dos ventrículos o que pode ter relação com ativação de canais para Na^+ . Em contrapartida, Alvarez-Collazo et al. (2014) verificaram, em cardiomiócito isolado de camundongo, que a NRG reduziu I_{Na} com um IC_{50} de 0,07 μM mas com uma inibição máxima de 60%.

Em estudo realizado por Huang et al. (2013) foi observado que a concentração de 5 μM de NRG foi suficiente para promover cardioproteção por inibir a apoptose em cardiomiócitos submetidos a alta concentração de glicose. No estudo de Chen et al. (2015), foram avaliadas as concentrações de 10, 20 e 40 μM de NRG que conferiram cardioproteção em modelo de anóxia/reoxigenação em células cardíacas H9c2 contra apoptose e por atenuar a injúria de IR decorrente do estresse oxidativo. You et al. (2016) observaram regulação de canais K_{ATP} , proteção mitocondrial e redução de dano cardíaco com a concentração de 80 μM de NRG.

Considerando os resultados supracitados, observamos que a concentração de 5 μM de NRG demonstrou ser promissora por não modificar as variáveis contráteis e elétricas do coração, sendo semelhante ao grupo CTR. Dessa forma, essa concentração foi escolhida para avaliar se o efeito cardioprotetor da NRG na injúria de IR era mediada pela ativação de canais K_{ATP} .

Para isso, já é reconhecido que a GLI é um hipoglicemiante oral com ação inibitória sobre os canais K_{ATP} pancreáticos formados pelas subunidades Kir 6.2/SUR1 (LEE et al., 2020). Os canais K_{ATP} desempenham grande importância em vários tecidos e ligam a excitabilidade da membrana ao metabolismo celular (BRENNAN et al., 2020). O canal K_{ATP} é caracterizado como um canal para potássio retificador de entrada e influencia diretamente no potencial de membrana de repouso tornando-o próximo ao potencial de equilíbrio do potássio. No entanto, em células com alta permeabilidade intrínseca ao potássio, os principais efeitos podem ser no processo de repolarização (AZIZ et al., 2014, 2018). Além disso, são amplamente expressos e recebem este nome por serem ativados com a redução da produção celular de ATP (TINKER et al., 2018). Esses canais são constituídos por subunidades, sendo a Kir6.1 e Kir6.2 formadoras dos poros, e as SUR1, SUR2A e SUR2B receptores de sulfonilureia que são reguladoras/catalisadoras (BRENNAN et al., 2020; CHEN et al., 2019; TINKER et al., 2018). Em cardiomiócitos de mamíferos existem duas classes de canais K_{ATP} que são expressos, sendo eles: o sarcolemal (Kir6.2/SUR2A) e o situado na membrana interna mitocondrial (Kir6.1/SUR1) (LIU et al., 2001).

Dentro desse contexto, os canais K_{ATP} expressos no coração podem ocasionar efeitos pronunciados na repolarização durante condições fisiológicas e fisiopatológicas (NICHOLS; SINGH; GRANGE, 2013). Deste modo, em uma situação de injúria de IR ocorre redução de ATP ativando os canais K_{ATP} encurtando a duração do potencial de ação, reduzindo a fase de platô (fase 2) e o influxo de cálcio, com o intuito de preservar a energia do músculo (FLAGG

et al., 2010; HIBINO et al., 2010). Esse mecanismo reduz a contratilidade cardíaca e diminuindo a demanda de ATP promovendo cardioproteção (TINKER et al., 2018).

De maneira mais aprofundada, a isquemia global causa perda na distribuição dos canais K_{ATP} sarcolemas e promove sua internalização para os compartimentos endossomais, a inibição dessa internalização é cardioprotetora, pois acredita-se que a densidade dos canais K_{ATP} na superfície representa um novo mecanismo cardioprotetor (YANG et al., 2016).

Sendo assim, os corações que foram perfundidos com a NRG e submetidos a IR, apresentaram uma melhora da função contrátil cardíaca, e da lesão tecidual caracterizada pela diminuição do extravasamento da LDH, redução da área de infarto miocárdica e diminuição do índice de arritmias quando comparado ao grupo Veículo + IR. Todo o efeito cardioprotetor da NRG foi abolido na presença da GLI na perfusão, sugerindo a ativação dos K_{ATP} pela NRG. Na literatura científica, não encontramos trabalhos avaliando a ação da NRG sobre o K_{ATP} em coração isolado de rato. No entanto, em um estudo com animais pré-tratados com a naringenina, metabólito da NRG, submetidos a IR, mostrou que seu mecanismo cardioprotetor envolvia a ativação do K_{ATP} (MENG et al., 2016).

Em relação à averiguação da lesão tecidual, o extravasamento aumentado da LDH reflete que a via fermentativa foi ativada, assim, na ausência de O_2 a continuação da glicólise fica dependente de NAD^+ a partir de NADH acompanhada pela fermentação de piruvato a lactato. A LDH catalisa essa reação e por este motivo é utilizada como potencial marcador de injúria (FOURNY et al., 2019). Assim, a NRG foi capaz de atenuar a sua liberação, efeito este que foi bloqueado pela administração da GLI na perfusão. Outros estudos realizados com a NRG observaram diminuição na liberação do LDH em animais tratados por via oral e submetidos a IR (ARAUJO et al., 2019; RANI et al., 2013). A injúria de IR é acompanhada pelo desenvolvimento de infarto no miocárdio. Interessantemente, a NRG foi capaz de prevenir a ocorrência de grande área do infarto do miocárdio (região tecidual pálida) demonstrando seu efeito cardioprotetor. A naringenina também foi capaz de reduzir tanto os níveis de LDH quanto da área de infarto e esse efeito cardioprotetor foi significativamente reduzido na presença de GLI (MENG et al., 2016).

Também foi investigado a incidência de arritmias nos grupos estudados. Em nosso estudo, evidenciamos que a NRG foi capaz de diminuir a incidência de taquicardia e fibrilação ventricular em comparação ao grupo veículo + IR. As arritmias cardíacas graves, TV e FV, após injúria de IR, são as principais causas de mortalidade em pacientes com doenças

isquêmicas do coração em todo o mundo (HAGHI; ETERAF-OSKOU EI; NAJAFI, 2018; KAZEMIRAD; KAZERANI, 2020; MENEZES-RODRIGUES et al., 2021). Entretanto, na presença de GLI, a incidência de arritmias foi significativamente aumentada, removendo a cardioproteção mediada pela NRG.

Embora alguns estudos recentes tenham estudado a cardioproteção mediada pela NRG sobre a injúria de IR (GUO et al., 2022; LI et al., 2021a) não há informações sobre os efeitos da NRG contra arritmias, especialmente usando um modelo de coração isolado perfundido. Em pesquisa prévia realizada em nosso laboratório, observamos que quando a NRG foi administrada por via oral, também foi capaz de reduzir o índice e a ocorrência de arritmias mais graves quando comparado ao grupo veículo + IR (ARAUJO, 2019).

De forma contraditória, tem sido descrito na literatura (BACZKÓ et al., 2011; KANTOR et al., 1990; WOLLEBEN; SANGUINETTI; SIEGL, 1989) que o canal K_{ATP} pode estar envolvido na arritmogênese induzida pela injúria de IR. A ativação do canal K_{ATP} com a isquemia resulta em efluxo do potássio levando ao encurtamento da duração do potencial, podendo reativar correntes de entrada gerando substratos para taquiarritmias (FARID; BHASKARAN; NANTHAKUMAR, 2018). Entretanto, como pode ser observado, a NRG foi capaz de prevenir tanto o índice das arritmias de uma maneira geral, quanto a ocorrência das arritmias mais letais (FV e FV).

No que concerne à investigação da via apoptótica, sabe-se que a apoptose tem seu início na isquemia e é acelerada com a restauração do ATP e cálcio durante o período de reperfusão (DEL RE et al., 2019; EEFTING, 2004). Assim, muitas estratégias têm sido desenvolvidas, por meio de estudos com animais, para minimizar o dano de reperfusão e a apoptose induzida nesse período. O presente estudo demonstrou que a injúria de IR resultou em um aumento acentuado da expressão da proteína Bax e da razão Bax/Bcl-2 no grupo veículo + IR. Interessantemente, estas alterações foram prevenidas com o tratamento com a NRG. Em experimento de IR *in vivo* realizado por Li et al. (2021a) com a NRG na dose de 100 mg/kg, foi observado que a expressão da Bax também diminuiu significativamente em relação ao grupo veículo + IR, todavia, atenta-se ao fato de que a dose utilizada foi quatro vezes maior que a dose adotada nos nossos experimentos onde os animais foram pré-tratados com 25 mg/kg de NRG g.o por 7 dias (ARAUJO, 2019). Em outro estudo realizado por Guo et al. (2022), porém com cardiomiócitos, foi constatado que a NRG (200 μ M) também foi capaz de reduzir a expressão da Bax.

Após o estímulo intrínseco da injúria de IR, o Bax citosólico sofre mudança

conformacional e translocação para a membrana lipossomal resultando em permeabilização da membrana externa mitocondrial com saída do citocromo c que culmina na apoptose (GARNER et al., 2019). A liberação do cit c ativa a caspase-9 pró-apoptótica e, finalmente, a caspase-3, resultando na indução de apoptose (EEFTING, 2004). Dentro desse contexto, a regulação negativa da Bax evidenciada pelo pré-tratamento dos animais com a NRG pode desempenhar um importante papel na proteção do coração contra a injúria de IR ao bloquear a apoptose cardíaca, sendo demonstrado através do equilíbrio de vias de sobrevivência e morte celular.

Além disso, embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos estudados, o grupo veículo + IR apresentou tendência para diminuição da expressão da Bcl-2. O aumento da expressão da Bcl-2 é importante na sobrevivência celular através da supressão da morte celular apoptótica (KORSHUNOVA et al., 2020). Já a razão Bax/Bcl-2 determina a sobrevivência ou morte de células após um estímulo apoptótico (OLTVAL; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993). Como a Bax e Bcl-2 estão no início da cascata de apoptose, novos estudos podem revelar se a NRG modula uma resposta tardia na via apoptótica.

Como constatado em nossa pesquisa, não houve diferença entre os grupos em relação à expressão de proteínas envolvidas na via antioxidante SOD CuZn e SOD Mn. A família da SOD é caracterizada como sendo um grupo de enzimas antioxidantes que atuam na conversão do ânion $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . Padrões de expressão da SOD podem ter importância por serem biomarcadores moleculares na avaliação do estresse oxidativo (KIM et al., 2018). Dentre as isoformas da SOD têm-se a SOD CuZn com o cobre (Cu) e zinco (Zn) participando do centro catalítico e localizado nos compartimentos citoplasmáticos intracelulares. Já a SOD Mn com o Mn (manganês) no centro catalítico está localizado na mitocôndria (CAMPOS-SHIMADA et al., 2020).

Dentro desse contexto, embora nossos resultados não tenham apresentado maior expressão dessas proteínas nos animais pré-tratados com a NRG, em estudo anterior realizado por Araujo (2019) foi observado que os animais pré-tratados com mesma dose, 25 mg/kg de NRG, apresentaram uma diminuição do estresse oxidativo pela restauração da atividade da SOD e CAT em relação ao grupo veículo + IR. Assim, como a técnica de *Western blotting* detecta a quantidade de proteínas em uma determinada amostra (MEFTAH et al., 2021), ainda que a quantidade da SOD não tenha crescido consideravelmente, o aumento de sua atividade promovida pelo pré-tratamento com a NRG, foi suficientemente capaz de promover cardioproteção (ARAUJO, 2019). Além disso, em mesmo estudo foi observado, através da

técnica do DHE (dihidroetídio), que houve uma diminuição da fluorescência dos grupos tratados com a NRG em comparação ao grupo veículo + IR demonstrando menor produção de EROs (ARAUJO, 2019).

O $O_2\bullet^-$ é considerado uma das principais EROs, sendo que o excesso de sua produção na mitocôndria durante a injúria de IR, causa vários danos oxidativos, tais como: perda do potencial de membrana mitocondrial, sobrecarga de cálcio celular e apoptose em cascata. Somado a isso, contribui para a produção de outras EROs (HAN et al., 2018). Com isso, como a produção aumentada das EROs é reconhecidamente associada à injúria de IR, equilibrar fatores oxidantes e antioxidantes é de suma importância para reduzir os danos no miocárdio.

Além dos resultados apresentados, avaliamos os níveis da CS, uma enzima que faz parte do ciclo de Krebs. Intermediários do ciclo de Krebs são moléculas sinalizadoras com funções que podem controlar a resposta hipóxica podendo afetar a fisiologia do organismo (MARTÍNEZ-REYES; CHANDEL, 2020). Em relação a CS, ela pode ser utilizada como biomarcador do estresse mitocondrial. Na primeira reação do ciclo de Krebs, ela catalisa a conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato. Por este motivo, a CS é considerada uma enzima limitante do ciclo de Krebs regulando, então, a produção energética das mitocôndrias (SAJNANI et al., 2017).

No nosso estudo, observamos que tanto a NRG quando o NAC conseguiram aumentar a atividade da CS quando o coração passou pela injúria de IR, o que pode caracterizar maior oxidação de ácidos graxos e, conseqüentemente, melhora da função mitocondrial via antioxidante intracelular. Não há dados na literatura disponíveis sobre a realização da dosagem da citrato sintase em injúria de IR com a NRG, sendo portanto, achado inédito. Em estudo de Alegre et al. (2020) foi observado que ratos *wistar* suplementados com 5% de açaí na ração por seis semanas, e posteriormente submetidos ao protocolo global de IR, apresentaram aumento da atividade miocárdica da CS. O açaí possui 31% de flavonoides em sua composição (YAMAGICHI et al., 2015). Em outro estudo de Yu et al. (2016) com Gypenosides (GP), uma saponina triterpenoide, animais que foram pré-tratados com 200 mg/kg de GP (g.o.) dissolvido em água destilada 1 hora antes do protocolo de IR por LAD apresentaram, igualmente, aumento da atividade da CS quando comparado ao grupo dos animais que foram submetidos à injúria de IR sem o pré-tratamento.

Em relação às alterações histopatológicas, o edema presente no grupo veículo + IR igualmente, foi encontrado no estudo de Rani et al. (2013) que também constataram inflamação

e necrose atenuados com o tratamento da NRG. Liu et al. (2022c) estudaram as alterações patológicas após injúria de IR e observaram diminuição da necrose e células inflamatórias com menos ruptura de fibra miocárdica nos animais tratados com a NRG. Vale ressaltar, que o protocolo utilizado na pesquisa foi isquemia global e os trabalhos realizados por Rani et al. (2013) e Liu et al. (2022c) foram com isquemia por meio de oclusão de LAD (*in vivo*).

Nenhum dos trabalhos com a NRG avaliaram o tamanho do núcleo e citoplasma, sendo este dado inédito na literatura. De acordo com Rao et al. (2011), mudanças tanto no diâmetro do núcleo quanto do citoplasma refletem a atividade da célula, além disso, modificações apenas no diâmetro do núcleo pode indicar a ocorrência da apoptose (MIRKAMALI et al., 2022). Sendo assim, a análise dessas variáveis pode ser útil para avaliar mudanças que ocorrem após a injúria de IR como apoptose e edema celular. Como observado nos nossos resultados, foi encontrada uma diminuição no diâmetro do núcleo no grupo veículo + IR que pode refletir a ocorrência de apoptose, dado este que corrobora com o aumento da expressão da Bax demonstrado anteriormente. O aumento do diâmetro citoplasmático e da razão diâmetro citoplasma/núcleo observado no grupo veículo + IR pode ter ocorrido pelo aumento do edema intracelular que foi prevenido nos animais tratados tanto com a NRG quanto com o NAC.

Assim, além dos resultados positivos do pré-tratamento com a NRG contra a injúria de IR apresentados, a NRG demonstra-se promissora para prevenir complicações decorrentes do IAM, pois apresenta baixa toxicidade reconhecida pela literatura. Em estudo com ratos *sprague-dawley*, foram avaliados a toxicidade e os efeitos adversos na administração da NRG (extraída e purificada da *Citrus grandis*). Tanto na administração aguda (dose única em bolus de até 16 g/kg), quanto na subcrônica (13 semanas com a NRG administrada via oral em doses até 1250 mg/kg) não foram encontrados: mortalidade, sinais clínicos adversos, alterações anormais no peso corporal ou na ingestão de alimentos, alterações relevantes na hematologia, bioquímica clínica e nos achados macroscópicos (LI et al., 2013).

Em outra pesquisa também com ratos *sprague-dawley*, mas com administração crônica, a NRG via oral em doses de até 1250 mg/kg por 6 meses consecutivos, não apresentou mortalidade e alterações nos exames clínicos, na bioquímica clínica, no peso dos órgãos e no exame histopatológico (LI et al., 2014). Quando a toxicidade da NRG foi avaliada em animais maiores, em cães Beagles, também apresentou boa segurança em seu consumo via oral. A administração da NRG (extraída e purificada da *Citrus grandis*) tanto aguda (dose única em bolus de até 5 g/kg); quanto subcrônica (doses de até 500 mg/kg por 3 meses) e crônica (doses

até 500mg/kg por 6 meses) nenhuma morbidade, mortalidade e eventos toxicologicamente relevantes foram observadas durante a administração ou no período de recuperação pós-administração (Li et al., 2020).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com a NRG pode contribuir para prevenir danos decorrentes da injúria de IR, e associado à baixa toxicidade apresentada pela literatura, suporta subsídios para novos estudos que possam complementar as vias estudadas.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados é possível concluir que a NRG promove cardioproteção contra o processo de apoptose por diminuir a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax) e possível ativação do K_{ATP} . Além disso, não altera as variáveis contráteis e eletrocardiográficas nas duas concentrações estudadas. Por todos esses resultados, conclui-se que a NRG tem valor potencial por minimizar ou prevenir danos cardíacos em corações submetidos à IR mediado pela sua ação anti-apoptótica, possível ativação de K_{ATP} e ação antiarrítmica.

Este trabalho traz uma perspectiva de discussão de uma pesquisa básica com resultados que possam ser futuramente translacionados à vertente clínica. Desse modo, os resultados promissores decorrentes do pré-tratamento com a NRG frente à injúria de IR, possuem relevância ao fornecer subsídios para futuros estudos que possam assegurar o uso de plantas medicinais, produtos naturais e alimentos ricos em NRG na cardioproteção contra o IAM. Assim, pesquisas clínicas são evidentemente necessárias para fornecer informações sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos da NRG em humanos.

8 PERSPECTIVAS

A pesquisada realizada apresentou resultados que necessitam de uma maior exploração para complementar informações referentes à via apoptótica. Desse modo, o imunconteúdo de outros mediadores relacionados à fase tardia desta via, tais como pró-caspase 9, caspase 9, pró-caspase 3, caspase 3 poderão, dentre outros, poderão ser quantificados. Somado a isso, para continuar a investigação da ativação dos canais K_{ATP} , poderão ser realizados estudos da expressão de subunidades do canal K_{ATP} como o Kir 6.2 e o SUR, além da avaliação da corrente para potássio em cardiomiócitos isolados através da técnica de patch-clamp.

9 RESUMO GRÁFICO

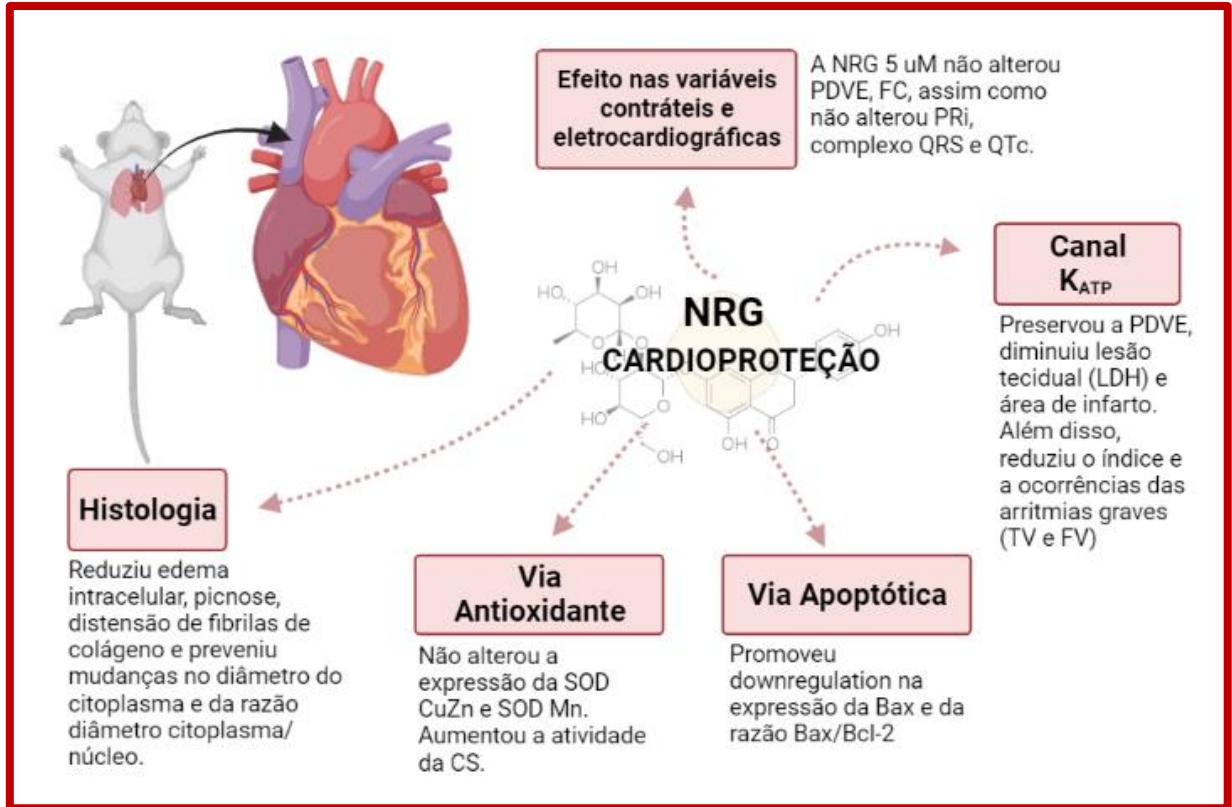


Figura 15 – Resumo Gráfico dos mecanismos de cardioproteção da naringina (NRG) frente à injúria de isquemia-reperfusão. Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), frequência cardíaca (FC), intervalo PR (PRi), duração do complexo QRS (QRS), QT corrigido pela frequência cardíaca (QTc), lactato desidrogenase (LDH), taquicardia ventricular (TV), fibrilação ventricular (FV), Bcl-2-associated X (Bax), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), superóxido dismutase (SOD), citrato sintase (CS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEOVA, A.; SHAH, A. K.; DHALLA, N. S. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Ventricular Arrhythmias. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. E4200, 12 jun. 2020.

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

AGHAEI, M. et al. Targeting autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury: A novel therapeutic strategy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16768–16778, ago. 2019.

AHIRE, V.; MISHRA, K. Issue 3 Citation: Vidhula Ahire, A Review of Reactive Oxygen Species and the Antioxidant System. v. 5, p. 102–107, 17 fev. 2022.

AKGUN, T.; KALKAN, S.; KURSAT TIGEN, M. Variations of QRS Morphology in Patients with Dilated Cardiomyopathy; Clinical and Prognostic Implications. **Journal of Cardiovascular and Thoracic Research**, 2014.

ALEGRE, P. et al. Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduces Oxidative Stress and Improves Energetic Metabolism in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.114, n.1, p. 78-8, 2020.

ALTSHULER, P. J. et al. Superoxide Dismutase-Loaded Nanoparticles Attenuate Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Protect Against Chronic Adverse Ventricular Remodeling. **Advanced Therapeutics**, v. 4, n. 6, p. 2100036, jun. 2021.

ALVAREZ-COLLAZO, J. et al. Mechanism of the negative inotropic effect of naringin in mouse heart. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.2, n.5, p. 148-157, 2014.

ANDRIENKO, T. N. et al. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 110, p. 1–14, set. 2017.

ANSARI, B. et al. Suppression of colorectal carcinogenesis by naringin. **Phytomedicine**, v. 96, p. 153897, 1 fev. 2022.

ARAUJO, A. M. **Naringina exerce efeito cardioprotetor na injúria de isquemia-reperfusão em coração de rato através da redução do estresse oxidativo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) — São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2019.

AZIZ, Q. et al. The ATP-sensitive potassium channel subunit, Kir6.1, in vascular smooth muscle plays a major role in blood pressure control. **Hypertension**, v. 64, n. 3, p. 523–529, set. 2014.

AZIZ, Q. et al. ATP-sensitive potassium channels in the sinoatrial node contribute to heart rate control and adaptation to hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 23, p.

8912–8921, jun. 2018.

BACZKÓ, I. et al. Sarcolemmal KATP channel modulators and cardiac arrhythmias. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 24, p. 3640–3661, 2011.

BAI, S. et al. Cardioprotective effect of anisodamine against ischemia/reperfusion injury through the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. **European Journal of Pharmacology**, v. 901, p. 174095, 15 jun. 2021.

BALLAL, A. et al. Gazing into the remarkable world of non-heme catalases through the window of the cyanobacterial Mn-catalase “KatB”. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 160, p. 480–487, 20 nov. 2020.

BARAJAS-VEGA, J. L. et al. Naringin reduces body weight, plasma lipids and increases adiponectin levels in patients with dyslipidemia. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition**, v. 92, n. 3–4, p. 292–298, jul. 2022.

BHARTI, S. et al. Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review. **Planta Medica**, v. 80, n. 06, p. 437–451, 7 abr. 2014.

BOMPOTIS, G. C. et al. Altered Calcium Handling in Reperfusion Injury. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 114–130, 2016.

BOOVARAHAN, S. R.; KURIAN, G. A. Preconditioning the rat heart with 5-azacytidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/GSK3 β and mitochondrial KATP signaling axis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 12, p. e22911, dez. 2021.

BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 100, p. 14–31, nov. 2016.

BRENNAN, S. et al. Kir6.2-D323 and SUR2A-Q1336: an intersubunit interaction pairing for allosteric information transfer in the KATP channel complex. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 3, p. 671–689, 14 fev. 2020.

BUGGER, H.; PFEIL, K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 7, p. 165768, jul. 2020.

BUTTERFIELD, D. A.; MATTSON, M. P. Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Disease**, v. 138, p. 104795, maio 2020.

CAMPOS-SHIMADA, L. B. et al. Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 126, n. 4, p. 292–299, out. 2020.

CHANG, J.-C. et al. Intermittent Hypoxia Prevents Myocardial Mitochondrial Ca²⁺ Overload and Cell Death during Ischemia/Reperfusion: The Role of Reactive Oxygen Species. **Cells**, v. 8, n. 6, p. E564, 9 jun. 2019.

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

CHEN, R. C. et al. Naringin protects against anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells via the Nrf2 signaling pathway. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1331–1344, abr. 2015.

CHEN, X. et al. Computational Identification of Novel Kir6 Channel Inhibitors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 549, 2019.

CHIAMVIMONVAT, N. et al. Potassium currents in the heart: functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 7, p. 2229–2252, 1 abr. 2017.

CHOUCHANI, E. T. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 431–435, 20 nov. 2014.

CHOUCHANI, E. T. et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 254–263, 9 fev. 2016.

CURRAN, J.; BURKHOFF, D.; KLONER, R. A. Beyond Reperfusion: Acute Ventricular Unloading and Cardioprotection During Myocardial Infarction. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 12, n. 2, p. 95–106, abr. 2019.

CURTIS, M. J.; WALKER, M. J. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. **Cardiovascular Research**, v. 22, n. 9, p. 656–665, set. 1988.

DAI, H. et al. Global, regional, and national burden of ischaemic heart disease and its attributable risk factors, 1990–2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. **European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes**, v. 8, n. 1, p. 50–60, 5 jan. 2022.

DAIBER, A. et al. Discovery of new therapeutic redox targets for cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and heart failure. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 163, p. 325–343, 1 fev. 2021.

DAMBROVA, M. et al. Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 165, p. 24–37, mar. 2021.

DAMLUJI, A. A. et al. Mechanical Complications of Acute Myocardial Infarction: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 144, n. 2, p. e16–e35, 13 jul. 2021.

DEL RE, D. P. et al. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1765–1817, 1 out. 2019.

- DHALLA, N. S. et al. Role of Oxidative Stress in Cardiac Dysfunction and Subcellular Defects Due to Ischemia-Reperfusion Injury. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1473, 22 jun. 2022.
- DONG, Y. et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 136, p. 27–41, nov. 2019.
- DUBOIS-DERUY, E. et al. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 864, 14 set. 2020.
- EEFTING, F. Role of apoptosis in reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 3, p. 414–426, 15 fev. 2004.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.
- ELSAWY, H. et al. Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112180, nov. 2021.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.
- FARID, T. A.; BHASKARAN, A.; NANTHAKUMAR, K. KATP Channel Blockade as a Novel Antiarrhythmic Strategy: Evolving From Tachy to Brady Therapy. **Endocrinology**, v. 159, n. 8, p. 3081–3082, 1 ago. 2018.
- FINDLAY, I. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac muscle by the sulphonylurea drug glibenclamide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 261, n. 2, p. 540–545, maio 1992.
- FISCHESSER, D. M. et al. Controlling Reperfusion Injury With Controlled Reperfusion: Historical Perspectives and New Paradigms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 504–523, nov. 2021.
- 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.
- FLAGG, T. P. et al. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799–829, jul. 2010.
- FORTE, M. et al. Mitochondrial complex I deficiency and cardiovascular diseases: current evidence and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 97, n. 5, p. 579–591, maio 2019.
- FOURNY, N. et al. Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: An in vivo/ex vivo longitudinal follow-up. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 69, p. 139–150, jul. 2019.
- GARNER, T. P. et al. Small-molecule allosteric inhibitors of BAX. **Nature Chemical**

Biology, v. 15, n. 4, p. 322–330, abr. 2019.

GE, X.; ZHOU, G. Protective effects of naringin on glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 13, n. 6, p. 6330–6341, 2021.

GUNATA, M.; PARLAKPINAR, H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 2, p. 190–217, mar. 2021.

GUO, X. et al. Naringin attenuates acute myocardial ischemia-reperfusion injury via miR-126/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 37, n. 1, p. e370102, 2022.

HAGHI, J.; ETERAF-OSKOU EI, T.; NAJAFI, M. Effects of Postconditioning with Fructose on Arrhythmias and the Size of Infarct Caused by Global Ischemia and Reperfusion in Isolated Rat Heart. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 57–62, 18 mar. 2018.

HAN, X. et al. A mitochondrial-targeting near-infrared fluorescent probe for bioimaging and evaluating endogenous superoxide anion changes during ischemia/reperfusion injury. **Biomaterials**, v. 156, p. 134–146, fev. 2018.

HAN, Y. et al. Protective effects of 5(S)-5-carboxystrictosidine on myocardial ischemia-reperfusion injury through activation of mitochondrial KATP channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 920, p. 174811, 5 abr. 2022.

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.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, fev. 2015.

HEIDARY MOGHADDAM, R. et al. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. **European Journal of Pharmacology**, v. 887, p. 173535, nov. 2020.

HERNANDEZ-RESENDIZ, S. et al. Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 12, p. 6571–6585, jun. 2020.

HEUSCH, G. Coronary blood flow in heart failure: cause, consequence and bystander. **Basic Research in Cardiology**, v. 117, n. 1, p. 1, 13 jan. 2022.

HIBINO, H. et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 291–366, jan. 2010.

HUANG, H. et al. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 32, n. 2, p. 396–402, ago. 2013.

IBANEZ, B. et al. Cardiac MRI Endpoints in Myocardial Infarction Experimental and Clinical Trials. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 2, p. 238–256, 16 jul. 2019.

IBGE. **Produção agrícola. Lavoura permanente -Laranja**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/se/pesquisa/15/0?localidade1=0>>. Acesso em: 11 dez. 2022a.

ISTOMINA, A. et al. Antioxidant activity of Far Eastern bivalves in their natural habitat. **Marine Environmental Research**, v. 169, p. 105383, jul. 2021.

JAKUBCZYK, K. et al. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 124–127, 22 abr. 2020.

JIANG, M. et al. Astragaloside IV Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury from Oxidative Stress by Regulating Succinate, Lysophospholipid Metabolism, and ROS Scavenging System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 9137654, 2019.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruit in vegetables and beverages by high – performance liquid chromatogaghy with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. 1998. v. 799. p. 101 - 110

KALPAGE, H. A. et al. Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 121, p. 105704, abr. 2020.

KANG, P. T. et al. Impairment of pH gradient and membrane potential mediates redox dysfunction in the mitochondria of the post-ischemic heart. **Basic Research in Cardiology**, v. 112, n. 4, p. 36, jul. 2017.

KANTOR, P. F. et al. Reduction of ischemic K⁺ loss and arrhythmias in rat hearts. Effect of glibenclamide, a sulfonylurea. **Circulation Research**, v. 66, n. 2, p. 478–485, fev. 1990.

KAPUR, N. K.; THAYER, K. L.; ZWECK, E. Cardiogenic Shock in the Setting of Acute Myocardial Infarction. **Methodist DeBakey Cardiovascular Journal**, v. 16, n. 1, p. 16–21, 2020.

KAZEMIRAD, H.; KAZERANI, H. R. Cardioprotective effects of resveratrol following myocardial ischemia and reperfusion. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 8, p. 5843–5850, ago. 2020.

KIRAZ, Y. et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 7, p. 8471–8486, jul. 2016.

KLONER, R. A.; KING, K. S.; HARRINGTON, M. G. No-reflow phenomenon in the heart and brain. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n.

3, p. H550–H562, set. 2018.

KMECOVA, J.; KLIMAS, J. Heart rate correction of the QT duration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2–3, p. 187–192, 1 set. 2010.

KORSHUNOVA, A. et al. BCL2-regulated apoptotic process in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 1, p. 23–36, 4 nov. 2020.

KRUGER, N.J. **The Bradford Method For Protein Quantitation**. In: Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ, p.17-24, 2009.

KUPPE, C. et al. Spatial multi-omic map of human myocardial infarction. **Nature**, v. 608, n. 7924, p. 766–777, ago. 2022.

LEE, S. E. et al. Physiological function and molecular composition of ATP-sensitive K⁺ channels in human gastric smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 56, n. 0, p. 29–45, 2020.

LEE, T.-L. et al. Conditioned medium from adipose-derived stem cells attenuates ischemia/reperfusion-induced cardiac injury through the microRNA-221/222/PUMA/ETS-1 pathway. **Theranostics**, v. 11, n. 7, p. 3131–3149, 1 jan. 2021.

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, 6 jan. 2017.

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

LI, F. et al. Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis, oxidative stress and autophagy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 2, p. 811, 28 maio 2021a.

LI, P. et al. Acute and 13weeks subchronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 1–9, out. 2013.

LI, P. et al. Six months chronic toxicological evaluation of naringin in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 65–75, 1 abr. 2014.

LI, P. et al. Toxicological evaluation of naringin: Acute, subchronic, and chronic toxicity in Beagle dogs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 111, p. 104580, mar. 2020.

LI, S. et al. Naringin protects H9C2 cardiomyocytes from chemical hypoxia-induced injury by promoting the autophagic flux via the activation of the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 6, p. 102, jun. 2021b.

LIU, M. et al. Role of upregulation of the KATP channel subunit SUR1 in dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 21, n. 5, p. e13618, 2022a.

LIU, W. et al. Urocortin I Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Sustaining Respiratory Function and Cardiolipin Content via Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel Opening. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 7929784, 2022b.

LIU, W. et al. Short-term pretreatment of naringin isolated from *Citrus wilsonii* Tanaka attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 395, n. 9, p. 1047–1059, set. 2022c.

LIU, Y. et al. Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 225–230, fev. 2001.

LIU, Y. et al. Cardioprotective Effect of Quercetin against Ischemia/Reperfusion Injury Is Mediated Through NO System and Mitochondrial K-ATP Channels. **Cell Journal**, v. 23, n. 2, p. 184–190, jul. 2021.

LÓPEZ-MEDINA, A. I. et al. Direct actions of naringin on rat cardiac and vascular smooth muscle, **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n.3, p. 238-248, mai. 2014.

LUND, T. M. et al. The metabolic impact of β -hydroxybutyrate on neurotransmission: Reduced glycolysis mediates changes in calcium responses and KATP channel receptor sensitivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 132, n. 5, p. 520–531, mar. 2015.

MAKEPEACE, C. M. et al. Superior diastolic function with KATP channel opener diazoxide in a novel mouse Langendorff model. **The Journal of Surgical Research**, v. 227, p. 186–193, jul. 2018.

MARCHIO, P. et al. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 8563845, 1 jul. 2019.

MARIN, W. et al. Mitochondria as a therapeutic target for cardiac ischemia-reperfusion injury (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 2, p. 485–499, 16 dez. 2020.

MARINHO, L. B. et al. A novel electrocardiogram feature extraction approach for cardiac arrhythmia classification. **Future Generation Computer Systems**, v. 97, p. 564–577, 1 ago. 2019.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 102, 3 jan. 2020.

MASSARO, L. et al. The Potential Role of Naringin and Naringenin as Nutraceuticals against Metabolic Syndrome. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, 27 ago. 2022.

MEFTAH, G. H. et al. Applications of western blot technique: From bench to bedside. **Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the**

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, v. 49, n. 4, p. 509–517, jul. 2021.

MENEZES-RODRIGUES, F. S. et al. Cardioprotection stimulated by resveratrol and grape products prevents lethal cardiac arrhythmias in an animal model of ischemia and reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 36, n. 3, p. e360306, 2021.

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. 2016a.

MENG, X. et al. Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 5, p. 332, maio 2021.

MIRKAMALI, M. et al. Involvement of caspase-3 in apoptosis of human lymphocytes exposed to cadmium chloride. **Human & Experimental Toxicology**, v. 41, p. 9603271221121796, dez. 2022.

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.

MITANI, A. et al. Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 6, p. H1864–H1871, 1 dez. 1991.

NICCOLI, G. et al. Optimized Treatment of ST-Elevation Myocardial Infarction. **Circulation Research**, v. 125, n. 2, p. 245–258, 5 jul. 2019.

NICHOLS, C. G.; SINGH, G. K.; GRANGE, D. K. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. **Circulation Research**, v. 112, n. 7, p. 1059–1072, 29 mar. 2013.

NICOLAU, J. C. et al. Brazilian Society of Cardiology Guidelines on Unstable Angina and Acute Myocardial Infarction without ST-Segment Elevation - 2021. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 117, n. 1, p. 181–264, jul. 2021.

NING, K. et al. ATP-Sensitive Potassium Channels Mediate the Cardioprotective Effect of Panax notoginseng Saponins against Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury and Inflammatory Reaction. **BioMed Research International**, p. 3039184, 2020.

NOORDAM, R. et al. Effects of Calcium, Magnesium, and Potassium Concentrations on Ventricular Repolarization in Unselected Individuals. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 24, p. 3118–3131, jun. 2019.

OKI, K. et al. The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4328–4335, set. 2012.

OLADAPO, O. M. et al. Naringin Confers Protection against Psychosocial Defeat Stress-Induced Neurobehavioral Deficits in Mice: Involvement of Glutamic Acid Decarboxylase Isoform-67, Oxido-Nitregic Stress, and Neuroinflammatory Mechanisms. **Journal of molecular neuroscience**, v. 71, n. 3, p. 431–445, mar. 2021.

OLTVAL, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609–619, ago. 1993.

ONG, S.-B. et al. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 78, p. 23–34, jan. 2015.

PANTA, A. M. D. S.; SANTOS, V. R. A. Agronegócio da citricultura sergipana entre 2010 a 2017. **Citrus Research & Technology**, v. 40, p. e1050, 2019.

PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS journal**, v. 285, n. 3, p. 416–431, fev. 2018.

RAMACHANDRA, C. J. A. et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102884, jul. 2020.

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, 6 dez. 2013.

RAO, S. M. et al. Morphometry of buccal mucosal cells in fluorosis--a new paradigm. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 11, p. 1761–1768, nov. 2011.

REDD, M. A. et al. Therapeutic Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a Recovers Heart Function After Ischemia–Reperfusion Injury. **Circulation**, v. 144, n. 12, p. 947–960, 21 set. 2021.

RIVOIRA, M. A. et al. New Perspectives in the Pharmacological Potential of Naringin in Medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1987–2007, [s.d.].

ROUT, A. et al. Targeted pharmacotherapy for ischemia reperfusion injury in acute myocardial infarction. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 15, p. 1851–1865, 12 out. 2020.

SAJNANI, K. et al. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. **Biochimie**, v. 135, p. 164–172, 1 abr. 2017.

SAMAL, R. R. et al. Interaction of artemisinin protects the activity of antioxidant enzyme catalase: A biophysical study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 418–428, 1 mar. 2021.

SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 428, 2017.

SEVERINO, P. et al. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8118, 30 out. 2020.

SHAH, A. H.; PURI, R.; KALRA, A. Management of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: A review. **Clinical Cardiology**, v. 42, n. 4, p. 484–493, 27 mar. 2019.

SILVA, G. B. A. DA et al. A (-)-Carvona Modula a Sinalização de Cálcio Intracelular com Ação Antiarrítmica em Corações de Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, n. 2, p. 294–304, 29 jul. 2022.

SRERE, P. A. [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. Em: **Methods in Enzymology**. Citric Acid Cycle. [s.l.] Academic Press, 1969. v. 13p. 3–11.

STABRAUSKIENE, J. et al. Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1686, 13 jul. 2022.

SU, X. et al. Protective effects of natural products against myocardial ischemia/reperfusion: Mitochondria-targeted therapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 149, p. 112893, 1 maio 2022.

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.

TINKER, A. et al. ATP-Sensitive Potassium Channels and Their Physiological and Pathophysiological Roles. Em: TERJUNG, R. (Ed.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2018. p. 1463–1511.

URYASH, A. et al. Effects of Naringin on Cardiomyocytes From a Rodent Model of Type 2 Diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 719268, 23 ago. 2021.

UTHMAN, L. et al. Delayed ischaemic contracture onset by empagliflozin associates with NHE1 inhibition and is dependent on insulin in isolated mouse hearts. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 10, p. 1533–1545, 1 ago. 2019.

VAJDA, S.; BACZKÓ, I.; LEPRÁN, I. Selective cardiac plasma-membrane KATP channel inhibition is defibrillatory and improves survival during acute myocardial ischemia and reperfusion. **European Journal of Pharmacology**, v. 577, n. 1–3, p. 115–123, dez. 2007.

VAN DER WEG, K.; PRINZEN, F. W.; GORGELS, A. P. Editor's Choice- Reperfusion cardiac arrhythmias and their relation to reperfusion-induced cell death. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, v. 8, n. 2, p. 142–152, 1 mar. 2019.

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.

WANG, R. et al. Naringin attenuates renal interstitial fibrosis by regulating the TGF- β /Smad

- signaling pathway and inflammation. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 1, p. 66, jan. 2021.
- WANG, X.-Q. et al. Free radicals for cancer theranostics. **Biomaterials**, v. 266, p. 120474, jan. 2021.
- WANG, X. et al. ATF4 Protects the Heart From Failure by Antagonizing Oxidative Stress. **Circulation Research**, v. 131, n. 1, p. 91–105, 24 jun. 2022.
- WATANABE, S.; USUI, M. Serum uric acid level is associated with reperfusion ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 15, n. 4, p. 102198, ago. 2021.
- WEI, N.; TOLKACHEVA, E. G. Mechanisms of arrhythmia termination during acute myocardial ischemia: Role of ephaptic coupling and complex geometry of border zone. **PloS One**, v. 17, n. 3, p. e0264570, 2022.
- WEI, X.; YOHANNAN, S.; RICHARDS, J. R. Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- WOLLEBEN, C. D.; SANGUINETTI, M. C.; SIEGL, P. K. Influence of ATP-sensitive potassium channel modulators on ischemia-induced fibrillation in isolated rat hearts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 21, n. 8, p. 783–788, ago. 1989.
- WU, Y. et al. Myocardial death and dysfunction after ischemia-reperfusion injury require CaMKII δ oxidation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9291, 26 jun. 2019.
- WU, T. C. et al. Controle do Intervalo QT para Prevenção de Torsades de Pointes Durante uso de Hidroxicloroquina e/ou Azitromicina em Pacientes com COVID 19. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, p. 1061–1066, 3 jul. 2020.
- WU, Y.; LIU, H.; WANG, X. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Life Sciences**, v. 264, p. 118628, 1 jan. 2021.
- YAMAGUCHI, K. K. DE L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 15 jul. 2015.
- YANG, H.-Q. et al. Plasticity of sarcolemmal KATP channel surface expression: relevance during ischemia and ischemic preconditioning. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 11, p. H1558-1566, 1 jun. 2016.
- YOU, Q. et al. Naringin protects cardiomyocytes against hyperglycemia-induced injuries in vitro and in vivo. **The Journal of Endocrinology**, v. 230, n. 2, p. 197–214, ago. 2016.
- YOW, T. T. et al. Naringin directly activates inwardly rectifying potassium channels at an overlapping binding site to tertiapin-Q: Naringin directly activates K_{IR} 3 channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 5, p. 1017–1033, jul. 2011.
- YU, H. et al. Gypenosides alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuation of oxidative stress and preservation of mitochondrial function in rat heart. **Cell Stress and**

Chaperones, v. 21, n. 3, p. 429–437, maio 2016.

ZHANG, X. et al. Sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel protects cardiac myocytes against lipopolysaccharide-induced apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 3, p. 758–766, set. 2016.

ZHANG, Y. et al. Biomimetic Design of Mitochondria-Targeted Hybrid Nanozymes as Superoxide Scavengers. **Advanced Materials**, v. 33, 4 mar. 2021.

ZHAO, Y. et al. Curculigoside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 45, n. 5, p. 1514–1524, maio 2020.

ZHAO, Y.; LIU, S. Bioactivity of naringin and related mechanisms. p. 5, 2021.

ANEXO - Certificado da comissão de ética no uso de animais



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA CARDIOPROTEÇÃO DA NARINGINA FRENTE A INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO.", protocolada sob o CEUA nº 6747010620 (ID 000383), sob a responsabilidade de **Carla Maria Lins de Vasconcelos e equipe; Andreza Melo de Araujo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 14/09/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE MECHANISM INVOLVED IN THE CARDIOPROTECTION OF NARINGIN FRONT OF THE ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY.", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 6747010620 (ID 000383), under the responsibility of **Carla Maria Lins de Vasconcelos and team; Andreza Melo de Araujo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 09/14/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2020** a **03/2024** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério da Universidade Federal de Sergipe**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 10 semanas**

N: **144**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: Os procedimentos serão realizados no Laboratório de Biofísica do Coração - UFS e após eutanásia e retirada do coração para estudo, algumas análises serão realizadas no próprio laboratório e outras poderão ser realizadas em parceria com o instituto de ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

São Cristóvão, 09 de julho de 2022

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe