



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**O PAPEL DA ISQUEMIA E OS EFEITOS DA INSULINA ASSOCIADA A UM
INIBIDOR DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA SOBRE OS MECANISMOS
DE CARDIOPROTEÇÃO À LESÃO ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Tese de Doutorado

UBIRAJARA O. DE OLIVEIRA

Porto Alegre, Janeiro de 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**O PAPEL DA ISQUEMIA E OS EFEITOS DA INSULINA ASSOCIADA A UM
INIBIDOR DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA SOBRE OS MECANISMOS
DE CARDIOPROTEÇÃO À LESÃO ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Tese de Doutorado

UBIRAJARA O. DE OLIVEIRA

Orientadora: Dr^a Maria Cláudia Irigoyen: Prof^a Adjunta do Depto de Fisiologia da UFRGS, Pesquisadora da Unidade de Hipertensão do InCor, São Paulo.

Co-Orientadora: Dr^a Beatriz D'Agord Schaan: Prof^a Adjunta do Departamento de Medicina Interna da UFRGS e Divisão de Endocrinologia do HCPA, Porto Alegre.

Colaboradores:

Dr^a Adriane Belló Klein: Prof^a Adjunta do Depto. de Fisiologia da UFRGS;

Dr. Álvaro Reischak de Oliveira: Prof. Adjunto da Escola Superior de Educação Física (ESEF) da UFRGS, Pesquisador do Laboratório de Pesquisa em Exercício da ESEF;

Dr. Lício A. Velloso: Prof. Adjunto do Depto de Clínica Médica da UNICAMP;

Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski: Prof. Adjunto do Depto de Fisiologia da UFRGS;

Dr. Ubiratan Fabres Machado: Prof. Adjunto do Depto de Fisiologia da USP.

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia.

*“Eu tenho um sonho que... crianças vão um dia
viver em uma nação onde elas não serão
julgadas pela cor da pele, mas pelo conteúdo
de seu caráter. Eu tenho um sonho hoje!...”*

Martin Luther King

*“Todos estes que aí estão
Atravancando o meu caminho,
Eles passarão.
Eu passarinho!”*

Mario Quintana

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro (*in memoriam*) e Ana, aos meus irmãos pela criação e ensinamentos, e à minha esposa e filhos pelo carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida;

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen e Profa. Dra. Beatriz D'Agord Schaan, pela confiança em mim depositada e pelos valiosos ensinamentos durante a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos R. Kucharski por compartilhar o seu conhecimento científico, toda a minha admiração pelo exemplo de pessoa, pela sua dedicação, pela sua paciência e amizade;

Ao Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira por compartilhar o seu conhecimento científico, por ter despertado o meu interesse pela Fisiologia e por ter confiado na minha capacidade;

Às Profas. Dra. Adriane Belló Klein, Dra. Ilma S. Brum, Dra. Maria Flávia M. Ribeiro e Dra. Roselis S. M. da Silva Ribeiro pelas sugestões e auxílio técnico na realização desse trabalho, por disponibilizarem equipamentos e produtos de seus laboratórios para a realização desse trabalho; mas principalmente pela convivência e amizade;

Aos Profs. Dr. Ubiratan Fabres Machado e Dr. Lício A. Velloso por compartilharem o seu conhecimento científico e por disponibilizarem equipamentos de seus laboratórios para a realização desse trabalho;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular: em especial à Tânia R. Fernandes, Aléx Sander Araújo e a Roberta Mendes pelo auxílio na realização dos experimentos;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada: Ana, Márcia, Vanessa, Sandra, Alan, Glauco, Matheus e Ricardo pela convivência e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia que colaboraram para a minha formação;

Às secretárias do PPG-Fisiologia: Alice, Fabiana e Uira pelo auxílio e carinho;

À CAPES, CNPq e a FAPERGS pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO	12
2. LESÃO DE REPERFUSÃO: MITOCÔNDRIAS E A MORTE CELULAR	13
3. MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO PELO USO DA INSULINA	15
3.1. Efeitos sobre o metabolismo dos substratos.....	16
3.2. Efeitos sobre a vasodilatação.....	17
3.3. Efeitos antiinflamatórios.....	17
3.4. Efeitos na sobrevivência celular.....	18
4. VIA RISK E SEUS MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO	18
5. MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO PELA INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	21
5.1. Sistema Renina-Angiotensina.....	21
5.2. Efeitos da angiotensina-II sobre o transporte de glicose.....	23
5.3. Efeitos da angiotensina-II sobre a produção do radical superóxido (O ₂ [•]) e a disfunção endotelial.....	23
5.4. Efeitos da Angiotensina-II na sobrevivência celular.....	24
6. CROSS-TALK ENTRE O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A INSULINA	25
7. HIPÓTESE	27
8. OBJETIVOS	27
8.1. Objetivos - ESTUDO 1	27
Objetivos Específicos.....	27
8.2. Objetivos - ESTUDO 2	28
Objetivos Específicos.....	28
9. MATERIAL E MÉTODOS	29
9.1. Animais.....	29
9.2. Reagentes.....	29
9.3. Procedimentos Experimentais.....	29
9.3.1. Solução Krebs-Henseleit.....	29
9.3.2. Preparação e Perfusão dos Corações.....	30
9.3.3. Registros Efetuados.....	33
9.3.4. Critérios de Exclusão.....	36
9.3.5. Acondicionamento dos Tecidos.....	36
9.3.6. Grupos Experimentais.....	36
9.3.6.1. Grupos Experimentais - ESTUDO 1:.....	36
9.3.6.2. Grupos Experimentais - ESTUDO 2:.....	37
9.3.7. Homogeneizados: Lipoperoxidação, Enzimas Antioxidantes e Metabólitos do NO [•]	37
9.3.8. Determinação das Proteínas Totais.....	38
9.3.9. Lipoperoxidação.....	38
9.3.10. Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	39
9.3.11. Metabólitos do NO [•] (NOX).....	40
9.3.12. GLUT-4: Homogeneizado e Frações Celulares.....	40
9.3.13. Western blot e Imunodeteção.....	41
9.4. Análise Estatística.....	42
ESTUDO 1: Recuperação funcional no modelo de coração isolado de rato: Papel do tempo de isquemia e do sistema renina-angiotensina	43
JUSTIFICATIVA.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	44

DISCUSSÃO	48
ESTUDO 2: Efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-angiotensina sobre os mecanismos de cardioproteção	52
JUSTIFICATIVA	53
MATERIAIS E MÉTODOS	53
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1. Via RISK.....	20
Figura - 2. Vias de sinalização da insulina e inibição provocada pela angiotensina-II.....	26
Figura - 3. Esquema mostrando o sistema de perfusão Langendorff.....	31
Figura - 4. Esquema do fluxo coronariano durante a perfusão.....	32
Figura - 5. Esquema da posição do balonete intracardíaco.....	32
Figura - 6. Registro típico gerado no sistema Isoheart.....	34
Figura - 7. Variação temporal de FC, PVS e PVD, +dP/dt, -dP/dt e PP média.....	34
Figura - 8. Curva de pressão ventricular.....	35
Figura - 9. Planilha em DBase III plus gerada pelo software Isoheart.....	35
Figura - 10. Recuperação do dP/dt _{máx} a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia.....	46
Figura - 11. Recuperação do duplo produto a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia.....	47
Figura - 12. Recuperação da PVD a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia.....	47
Figura - 13. Recuperação da PP a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia.....	48
Figura - 14. Recuperação da PVD _{es} após 20 min de isquemia.....	56
Figura - 15. Recuperação do dP/dt _{máx} após 20 min de isquemia.....	57
Figura - 16. Recuperação da PVD após 20 min de isquemia.....	57
Figura - 17. Recuperação do duplo produto após 20 min de isquemia.....	58
Figura - 18. Recuperação da PP após 20 min de isquemia.....	58
Figura - 19. Western blot e quantificação da Akt.....	60
Figura - 20. Western blot e quantificação da AMPK.....	61
Figura - 21. Western blot e quantificação do GLUT-4.....	63
Figura - 22. Determinação da lipoperoxidação.....	65
Figura - 23. Western blot e quantificação das enzimas Cu/Zn SOD e GST.....	68
Figura - 24. Determinação do NOX e Western blot da enzima e NOS.....	69

RESUMO

Resultados controversos têm sido obtidos em estudos experimentais e clínicos com a infusão de insulina e glicose na lesão isquemia-reperfusão, havendo muito a ser esclarecido sobre os mecanismos deste tratamento. No coração, a insulina tem efeitos sobre a utilização dos substratos, fluxo coronariano, atua como antiinflamatório e, propõem-se efeitos diretos na sobrevivência celular; estes efeitos devem-se a ativação da via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3k)-Akt. As interações intracelulares entre os sistemas de sinalização da insulina e da angiotensina-II são muitas, salientando-se a possível importância do *cross-talk* angiotensina-II/insulina. Apesar da popularidade das preparações em corações isolados no estudo das lesões isquemia-reperfusão, diversos protocolos vêm sendo utilizados quanto a duração da isquemia, dificultando a escolha do melhor período de isquemia para se testar os efeitos de fármacos sobre a recuperação da função cardíaca.

Nesse trabalho objetivamos: determinar o melhor tempo de isquemia para investigar a recuperação funcional e a capacidade de resposta do sistema renina-angiotensina (SRA) tecidual em coração isolado e os efeitos da insulina associada a um inibidor do SRA sobre os mecanismos de cardioproteção à lesão isquemia-reperfusão.

No estudo 1 investigamos a recuperação funcional e a capacidade de resposta do SRA tecidual em corações isolados e submetidos a diferentes períodos de isquemia. Os corações foram submetidos a diferentes períodos de isquemia global (20, 25 ou 30 min) e reperfundidos (30 min) com diferentes soluções: Krebs-Henseleit (KH) (grupo KH), KH + angiotensina-I (grupo Angio) ou KH + angiotensina-I + captopril (grupo AC). O índice de contratilidade ventricular (dP/dt_{max}) e o duplo produto foram reduzidos nos corações expostos à 25 min (~73%) e 30 min de isquemia (~80%) vs 20 min de isquemia. A pressão ventricular diastólica (PVD) e a pressão de perfusão (PP) aumentaram nos corações expostos à 25 min (5,5 e 1,08 vezes, respectivamente) e 30 min de isquemia (6 e 1,10

vezes, respectivamente) vs 20 min de isquemia. A angiotensina-I causou uma diminuição no dP/dt_{\max} e no duplo produto (~85-94%) em todos os períodos isquêmicos, e um aumento na PVD e na PP (6,9 e 1,25 vezes, respectivamente) apenas aos 20 min isquemia. O captopril reverteu parcialmente ou totalmente os efeitos da angiotensina-I sobre a recuperação funcional, somente nos períodos 20 e 25 min de isquemia. Esses dados sugerem que a transição de dano pós-isquêmico leve/moderado para severo ocorre após 20 min de isquemia. Dessa forma, 20 min de isquemia é o melhor período de tempo para se estudar os efeitos de abordagens farmacológicas sobre a recuperação funcional.

No estudo 2 investigamos os efeitos da insulina associada a um inibidor do SRA sobre os mecanismos de cardioproteção à lesão isquemia-reperfusão. Os corações foram submetidos a um período de isquemia global (20 min) e reperfundidos (30 min) com diferentes soluções: KH (grupo KH), KH + angiotensina-I (grupo Angio), KH + angiotensina-I + captopril (grupo AC), KH + insulina (grupo Insulina), KH + insulina + angiotensina-I (grupo IA) e KH + insulina + angiotensina-I + captopril (grupo IAC). Durante a recuperação, o grupo Angio apresentou uma redução de ~24% na pressão ventricular desenvolvida (PVD_{es}) e de ~29% no dP/dt_{\max} vs período basal, e apresentou um aumento de ~2,7 vezes na PVD vs período basal, estes efeitos foram revertidos parcialmente ou totalmente pelos tratamentos AC, IA e IAC. O grupo Angio apresentou uma redução de ~24% no duplo produto vs período basal, este efeito foi revertido pelo tratamento IA, que também foi maior vs grupos KH e AC. Os grupos Angio e IA apresentaram um aumento de ~20% na PP vs período basal, e todos os grupos (exceto o insulina) foram maiores vs grupo KH; os grupos AC e IAC não diferiram dos grupos Angio e insulina. A Akt fosforilada foi maior nos grupos insulina e IA vs grupos KH (~47% e ~42%, respectivamente) e Angio (~60% e ~55%, respectivamente), os grupos AC e IAC não diferem dos demais. A AMPK fosforilada foi ~31% maior nos grupos insulina,

IA e IAC vs grupos KH, Angio e AC. Os níveis de TBA-RS no grupo KH foram ~73% maior vs outros grupos; a quimiluminescência também foi maior (~2,2 vezes) no grupo KH vs outros grupos, e o grupo IA foi ~35% menor vs grupo Angio. A atividade da SOD não foi alterada pelos tratamentos, mas a atividade da catalase foi ~28% maior no grupo KH vs outros grupos (exceto o IA, $P = 0,058$) e a atividade da GST foi menor no grupo insulina vs grupos Angio e AC (~45% e ~50%, respectivamente). Os grupos Angio, AC e IAC apresentaram uma menor concentração da Cu/Zn SOD vs grupo KH (~40%, ~43% e ~27%, respectivamente), os grupos insulina e IA não diferem do grupo KH. Nenhum dos tratamentos alterou a concentração das enzimas GST e eNOS, os níveis de NOX ou a translocação do GLUT-4. Assim, a insulina ativa a via PI3k-Akt e parece exercer uma melhor regulação do estado redox celular, podendo ainda ativar a AMPK e ambas atuarem sinergicamente para um melhor perfil metabólico do miocárdio. Desse modo, a insulina administrada no início da reperfusão opõe-se aos efeitos deletérios da angiotensina-II e exerce um efeito cardioprotetor.

1. INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana em todas as suas manifestações e complicações é atualmente a causa líder de mortes no mundo, com 3,8 milhões de homens e 3,4 milhões de mulheres morrendo a cada ano. A carga global da doença arterial coronariana em termos de incapacidade ajustada pelos anos de vida (*DALY*) ou anos de vida saudável perdidos é projetada para aumentar de 47 milhões *DALY* em 1990 para 82 milhões *DALY* em 2020 [1].

No Brasil, mais de 60% dos óbitos informados em 2004 foram devidos a três grupos de causas principais: as doenças do aparelho circulatório (31,8%), as neoplasias (15,7%) e as causas externas (14,2%); sendo as duas primeiras causas de morte a doença cerebrovascular (10,1% do total) e a cardiopatia isquêmica (9,7% do total), com proporções similares em ambos os sexos. Além disso, a análise do período 1996–2004 mostrou um aumento no risco de morte por diabetes mellitus (30,5%) e por hipertensão arterial (38,0%) [2].

A doença arterial coronariana caracteriza-se pela oclusão de uma artéria coronária, causada por uma placa aterosclerótica (90% dos casos) ou por um vasoespasma, que reduz o fluxo sanguíneo (isquemia do miocárdio) resultando em hipóxia. Se o suprimento sanguíneo às células cardíacas for restringido intensamente ou totalmente, pode causar lesão tecidual irreversível (infarto do miocárdio). Dependendo da localização e do tamanho do infarto, o coração pode tornar-se incapaz de ejetar o sangue em quantidade suficiente para atender às necessidades metabólicas do organismo (insuficiência cardíaca), que tem múltiplas conseqüências clínicas, podendo inclusive ser fatal [3, 4].

Os mecanismos celulares envolvidos na patogênese da doença arterial coronariana são complexos e envolvem a interação de inúmeros tipos de células, incluindo células endoteliais, leucócitos, plaquetas e miócitos. Muitas destas são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem lesar diretamente os miócitos, o endotélio e as

células musculares lisas, como também, podem iniciar uma série de reações químicas locais e alterações gênicas que resultam em amplificação da citotoxicidade e/ou disfunção dos miócitos [5, 6].

A doença arterial coronariana pode causar uma síndrome coronariana aguda, cujo tratamento envolve o uso de agentes trombolíticos ou intervenção coronariana percutânea, que podem efetivamente restaurar o fluxo sanguíneo do miocárdio e reduzir o tamanho do infarto [7, 8]. Embora a restauração do fluxo sanguíneo preserve a função do ventrículo esquerdo e reduza a mortalidade em geral, a reoxigenação do miocárdio inicia uma cascata de eventos que paradoxalmente produzem disfunção adicional das células cardíacas (*stunning*) e/ou morte celular (apoptose ou necrose), fenômeno conhecido como lesão de reperfusão [9, 10].

Várias intervenções vêm se mostrando capazes de proteger o miocárdio da lesão de reperfusão: a reperfusão controlada (retardo na restauração completa do fluxo coronariano [11] ou da pressão de perfusão [12]), e modificações na solução de perfusão (ex: manutenção do pH ácido [13], inibição da bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [14], adição de antioxidantes [15], de insulina [16] e de inibidores do sistema renina-angiotensina [17]). Entretanto, a hipótese de que combinações destes agentes farmacológicos possam ter efeitos benéficos adicionais quando comparados ao seu uso isolado, vem sendo testada atualmente e existe muito ainda há ser esclarecido.

2. LESÃO DE REPERFUSÃO: MITOCÔNDRIAS E A MORTE CELULAR

A maior parte do ATP utilizado para as funções celulares é formado nas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa e da cadeia respiratória, onde o oxigênio é utilizado como o aceptor final de elétrons, sendo reduzido à água. Contudo, em aproximadamente 5% desse processo o oxigênio é reduzido parcialmente formando as EROs (ex: o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil) que podem

oxidar as biomoléculas e causar danos às células [18]. Em condições normais as células se protegem dos efeitos deletérios das EROs produzindo uma variedade de antioxidantes (ex: superóxido dismutase – SOD, catalase, glutathione peroxidase - GPX, glutathione S-transferase – GST, glutathione, vitaminas A, C e E) [18].

Entretanto, durante o processo de isquemia-reperfusão o aumento na produção das EROs e o acúmulo de Ca^{2+} no citosol/mitocôndrias podem causar lesão e/ou morte celular [19, 20]. Quando o fluxo sanguíneo é interrompido, diversos processos metabólicos e enzimáticos são afetados, ocorrendo depleção das reservas de ATP, acúmulo de lactato, ativação de proteases, redução dos componentes da cadeia respiratória e diminuição dos antioxidantes endógenos [5]. A reversibilidade destes processos está relacionada diretamente com a duração da isquemia [21].

Embora o benefício da reperfusão imediata seja indiscutível, a reintrodução do oxigênio inicia uma cascata de eventos que promovem lesão tecidual adicional [5, 22]. A reperfusão/reoxigenação causa um aumento na fuga de elétrons da cadeia respiratória, devido à redução dos seus componentes provocada pela isquemia, aumentando assim a produção das EROs [22, 23]. As EROs provocam lesão endotelial, comprometendo a liberação de óxido nítrico ($NO\bullet$) e de prostaciclina, favorecendo assim, a adesão de plaquetas e neutrófilos à superfície das células endoteliais [24, 25].

As plaquetas e neutrófilos aderidos às células endoteliais se tornam ativos e liberam fatores vasoativos (ex: serotonina, fator ativador de plaquetas, ADP e tromboxano), enzimas hidrolíticas (ex: elastase e colagenase), citocinas inflamatórias (ex: interleucina-1 e fator de necrose tumoral - TNF) e EROs [22-25]. Também aceleram o recrutamento e ativação de outras plaquetas e neutrófilos, resultando em lesão endotelial adicional [22-25].

Esta hiper-produção de EROs no início da reperfusão aumenta o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L e causa um acúmulo de Ca^{2+} no citosol [26, 27]. As EROs podem aumentar a atividade do trocador de Na^+/H^{2+} e deste modo, elevar os níveis

de Ca^{2+} citosólico através de uma possível reversão do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [27, 28]. Adicionalmente, o acúmulo de Ca^{2+} no citosol pode aumentar pela redução da sua captação pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático [29].

O aumento na produção das EROs e a sobrecarga de Ca^{2+} nas mitocôndrias no início da reperfusão estão relacionados com a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocôndrial (mPTP) [30]. O mPTP é um complexo protéico formado provavelmente pela translocase de adenina que sofre uma alteração na sua conformação e pela ciclofilina-*D* (membrana interna), e por membros da família BCL-2 (ex. BAD e BAX) e canais de ânions voltagem dependentes (membrana externa), que gera uma via de grande condutância. A abertura do mPTP pode causar “inchaço” da mitocôndria e romper a membrana externa, liberando citocromo-*C* no citosol, ativando as caspases e levando à morte celular [30-32].

3. MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO PELO USO DA INSULINA:

A insulina liga-se ao seu receptor na membrana celular, tornando-o ativo, este se autofosforila e causa a fosforilação de uma série de substratos protéicos intracelulares. Atualmente 10 substratos do receptor de insulina já foram identificados, 4 deles pertencem à família dos substratos do receptor de insulina (IRS). Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60^{dok} , Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina dos IRS (principalmente IRS-1 e IRS-2) cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios SH2 (homólogos a Src-2), dentre as quais destaca-se a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3k) [33, 34].

Classicamente são conhecidos os efeitos da insulina sobre o metabolismo dos substratos, mas este hormônio tem muitos outros efeitos. No coração, a insulina tem efeitos sobre a utilização dos substratos [35], sobre o fluxo coronariano [36], atua como antiinflamatório [37] e tem efeitos diretos na sobrevivência celular [16, 38].

3.1. Efeitos sobre o metabolismo dos substratos

Sob oxigenação normal o coração utiliza vários substratos para a produção de energia, incluindo ácidos graxos livres (AGL), glicose, lactato, piruvato e corpos cetônicos. Os AGL são responsáveis por aproximadamente 60-70% da energia produzida; sua captação e oxidação são proporcionais às suas concentrações séricas [39, 40]. Na síndrome coronariana aguda, a privação de oxigênio impossibilita o miocárdio de oxidar os AGL, e esse se torna dependente do metabolismo anaeróbico da glicose para produzir energia [40, 41]. Isto implica em maior translocação e/ou expressão dos transportadores de glicose (GLUT-1 e 4), para que ocorra um aumento do transporte de glicose para a célula [42, 43]. A maior captação e metabolização de glicose durante a síndrome coronariana aguda são associadas à preservação da função cardíaca [40, 41]. Durante a reperfusão, a rápida e elevada oxidação dos AGL causa um desacoplamento no metabolismo da glicose, que provoca disfunção contrátil e contribui para a lesão de reperfusão [44, 45].

Aproximadamente 50% dos pacientes com infarto agudo do miocárdio apresentam hiperglicemia na admissão hospitalar, secundária ao estresse como consequência do aumento de cortisol e noradrenalina ou por diabetes sem diagnóstico prévio [46]. A deficiência de insulina absoluta ou relativa, característica do diabetes, causa uma redução do GLUT-1 e 4, limitando a disponibilidade de glicose ao miocárdio e tornando-o ainda mais dependente dos AGL para produção de energia. Este padrão alterado causa um acúmulo de AGL e de seus intermediários tóxicos no miocárdio, resultando em menor produção de ATP, maior consumo de oxigênio, geração de EROs e disfunção contrátil [47]. A fim de otimizar a utilização de glicose e reduzir a oxidação dos AGL, pode-se utilizar uma infusão de glicose e insulina, que foi o suporte teórico do estudo DIGAMI [48] e outros envolvendo este tratamento no pós-infarto [49, 50].

3.2. Efeitos sobre a vasodilatação

Em indivíduos saudáveis, a insulina aumenta o fluxo sanguíneo e o volume sanguíneo no músculo esquelético, o que lhe confere características de um hormônio vasodilatador [51]. Nos vasos periféricos a insulina causa um aumento na produção de NO• pelas células endoteliais [52] e células musculares lisas [53]. Nestas células a insulina também estimula a Na⁺/K⁺-ATPase [54], ativa canais de K⁺ dependentes de Ca⁺² [55], ativa bombas de Ca⁺² na membranas plasmáticas e nos retículos sarcoplasmáticos [56], causando hiperpolarização e redução do Ca⁺² intracelular, resultando assim em relaxamento [54-56].

Opondo-se ao seu efeito vasodilatador a insulina pode ativar o sistema nervoso simpático [57] e pode também estimular a secreção de endotelina-1 (ET-1) no endotélio vascular [58]. Assim, o efeito final (vasodilatação) é um balanço entre seus efeitos vasodilatador e vasoconstritor, motivo pelo qual a insulina é um vasodilatador lento [59]. Tanto no miocárdio, como nos vasos periféricos, a insulina causa vasodilatação dose e tempo-dependente [59, 60], mas este efeito está prejudicado nos casos de resistência à insulina, tais como obesidade, hipertensão arterial e diabetes mellitus [60, 61].

3.3. Efeitos antiinflamatórios

Indivíduos criticamente doentes podem apresentar a chamada tempestade de citocinas, caracterizada pela liberação aguda destas, incluindo TNF-α e fator inibidor de macrófagos [62]. O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória, também liberada após o infarto agudo do miocárdio, causando disfunção endotelial, determinando a atividade pró-coagulante e a deposição de fibrina [63]. O fator inibidor de macrófagos é liberado na sepsis por bactérias Gram positivas e negativas, e sua neutralização pode proteger de endotoxemia e de choque tóxico [62]. A inibição de ambos está também entre os efeitos benéficos do uso da insulina [62].

Adicionalmente, a insulina mostrou exercer efeitos antiinflamatórios em células endoteliais da aorta de humanos *in vitro* [64] e em células mononucleares *in vivo* [65]. A infusão de insulina causa uma supressão na produção das EROs pelas células mononucleares e redução plasmática de proteína C reativa, ICAM-1, MCP-1 e PAI-1 [65, 66]. A insulina parece ser relevante na prevenção da ruptura da placa aterosclerótica, pois suprime a atividade das metaloproteinases [66].

3.4. Efeitos na sobrevivência celular

A insulina exerce efeitos benéficos sobre a lesão de reperfusão, demonstrando-se capaz de reduzir a área de infarto, desde que administrada no início da reperfusão [16, 67]. A insulina estimula a atividade de uma cascata de cinases promotoras da sobrevivência celular [16, 38], conhecidas como a via *RISK* (cinases protetoras contra a lesão de reperfusão) [22, 68]. Esta via promove cardioproteção por ativar vários mecanismos anti-apoptóticos.

4. VIA *RISK* E SEUS MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO:

A via *RISK* é formada pelas vias fosfatidilinositol-3 cinase (PI3k)-Akt e pelas cinases reguladas por sinal extracelular (Erk1/2) [22, 68] (figura 1). A via PI3k-Akt é ativada por um grande número de receptores, incluindo os receptores de fatores de crescimento [69] e os acoplados à proteína-G [70]. As Erk1/2 são membros da família das proteínas cinases ativadoras da mitose (*MAPK*), uma família de serina-treonina cinases responsáveis pela regulação da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência que são ativadas também por receptores tirosinas cinases e os acoplados à proteína-G [71].

A ativação da via *RISK* promove a fosforilação do peptídeo pró-apoptótico BAD diretamente [72] ou indiretamente através das cinases ribossomais (p70S6K [73] e/ou p90RSK [74]). Adicionalmente, a via PI3k-Akt, por intermédio da PKC, pode ativar Raf-1

que também fosforila o BAD [75]. A fosforilação do BAD resulta em sua ligação a proteínas 14-3-3, que o seqüestram da mitocôndria e previnem assim a apoptose [76]. A fosforilação da p90RSK mediada pela Erk1/2 pode regular a expressão da proteína CREB, que transcreve genes relacionados à sobrevivência celular [77].

A via *RISK* ativada previne a alteração conformacional do BAX (pró-apoptótico), inibindo a apoptose [78, 79]. O peptídeo BAX sofre alteração conformacional em resposta a estímulos apoptóticos, se transloca para a mitocôndria [78] onde forma um poro na membrana mitocôndrial externa e/ou abre o mPTP, induzindo a liberação do citocromo-C [79]. Adicionalmente, a via PI3k-Akt pode fosforilar a eNOS, resultando na produção de NO•, o qual pode inibir a abertura do mPTP [80].

A via *RISK* fosforila e inibe os fatores de transcrição FOXO. Essa fosforilação resulta em sua ligação a proteínas 14-3-3, que o deslocam de seus genes alvos e o seqüestram do núcleo [81], impedindo a transcrição de genes pró-apoptóticos, como o BIM, que estimula a morte celular em células hematopoiéticas [82]. A via PI3k-Akt fosforila e ativa a MDM2/HDM2 e o IKK-β. O MDM2/HDM2 fosforilado é translocado para o núcleo onde promove a degradação da p53 (pró-apoptótico) [83]. O IKK-β fosforilado promove a ativação e translocação do NF-κB para o núcleo, onde atua como um fator de transcrição para várias vias de sobrevivência [84].

A via PI3k-Akt inibe o processamento das caspases, diretamente fosforilando a pró-caspase-9 [85] ou indiretamente por fosforilar e inibir a GSK3. A GSK3 desfosforilada (ativa) inibe diretamente o MCL-1 (anti-apoptótico, membro da família Bcl-2), que também fosforila a pró-caspase-9 [86].

Células de fibroblastos que hiper-expressam uma proteína B-raf e apresentam as Erk1/2 ativadas tornam-se resistentes à apoptose induzida pelo citocromo-C [87], sugerindo uma inibição na cascata das caspases. Estudos em células hematopoiéticas confirmam a capacidade da Erk1/2 em inibir a caspase-3 [88].

A via *RISK* pode inibir a sinalização da JNK e da p38 [89, 90], prevenindo assim a apoptose. Entretanto, o papel dessas cinases na sobrevivência e na morte celular é muito controverso.

Muitos mecanismos pró-apoptóticos inativados pela via *RISK* convergem para a mitocôndria, a qual pelo exposto no item 2 tem um papel fundamental sobre os mecanismos da morte celular.

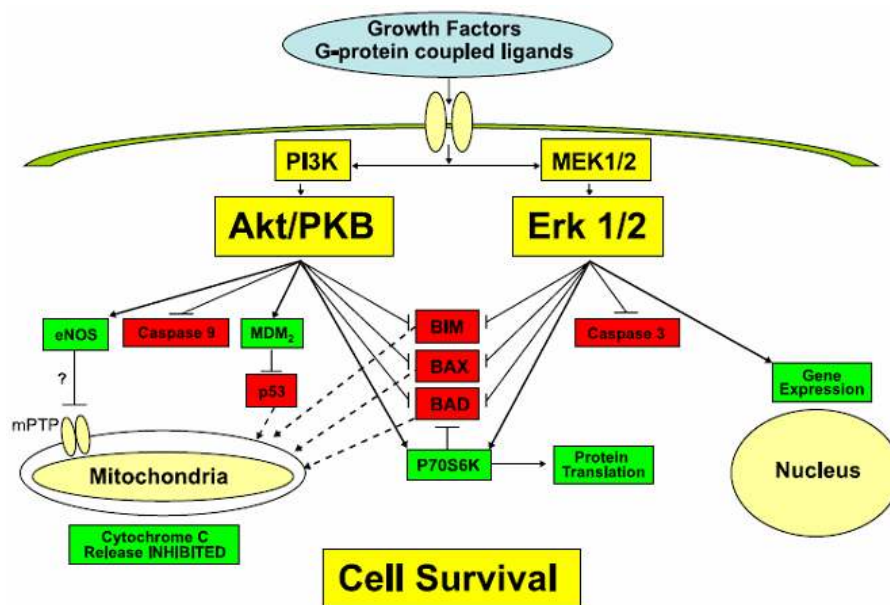


Figura 1 - Via RISK (modificado de Hausenloy & Yellon, 2004).

5. MECANISMOS DE CARDIOPROTEÇÃO PELA INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA:

5.1. Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é o principal modulador do volume e do balanço eletrolítico do corpo humano, sendo assim o maior regulador da pressão arterial [91]. A definição clássica do SRA o considera um sistema endócrino, com os componentes da cascata enzimática produzidos em locais bem definidos e tendo como seu peptídeo efetor a angiotensina-II, que exerce suas ações em órgãos-alvo distantes do local de produção. Adicionalmente à visão endócrina clássica, considera-se atualmente o SRA tecidual/local com funções parácrinas, autócrinas e epícrinas [92], tendo-se observado todos ou quase todos os seus componentes em tecidos como o coração [93], o tecido vascular [94] e o rim [95].

A renina (peptidase) é liberada pelo rim na circulação em resposta a vários estímulos entre eles, a diminuição na pressão de perfusão renal. Sua função é clivar o angiotensinogênio (liberado pelo fígado) formando a angiotensina-I, a qual é clivada pela enzima de conversão da angiotensina (ECA) nas células endoteliais, produzindo angiotensina-II, o hormônio biologicamente ativo [91]. Acredita-se que a enzima conversora da angiotensina tecidual seja responsável por mais de 90% da produção de angiotensina-II no corpo, entretanto a relativa contribuição das suas vias alternativas de produção (ex.: quimase, caliceína e catepsina-G) não está definida [92, 96]. As angiotensinases, presentes na maioria dos tecidos, inativam a angiotensina-II [97]. Outros produtos da proteólise do angiotensinogênio (ex.: angiotensina-3-8 e angiotensina-1-7) [98, 99] podem também ter efeitos biológicos importantes.

A angiotensina-II possui múltiplas ações sobre o sistema cardiovascular, com ações diretas sobre os vasos e coração, e indiretas através de suas ações sobre o sistema nervoso

simpático, produção de vasopressina e aldosterona, retenção renal de água e sódio [91]. A angiotensina-II é um vasoconstritor potente, induz hipertrofia e hiperplasia nas artérias de resistência (atuando nas células musculares lisas e endoteliais) e nos cardiomiócitos [100, 101]. Devido às suas ações, a angiotensina-II vem sendo considerada um mediador importante no desenvolvimento e manutenção da hipertensão, aterosclerose, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca e renal.

Entre os receptores para angiotensina-II, os subtipos AT₁ e AT₂ (receptores acoplados à proteína-G) são os mais estudados. Apesar da similar afinidade pela angiotensina-II, as ações desses receptores parecem ser funcionalmente opostas, podendo a angiotensina-II agir sobre ambos simultaneamente, modulando os seus efeitos [102].

Os receptores AT₁ são expressos amplamente na maioria das células, e quando ativados causam vasoconstricção, liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, liberação de vasopressina pelo hipotálamo e retenção renal de sódio e água [103]. Adicionalmente, os receptores AT₁ podem estimular a produção de EROs e TGF-β, o remodelamento vascular e cardíaco e fatores de transcrição (ex.: NF-κB e AP-1) [104, 105]. Estas ações contribuem para um estado pró-inflamatório, aterogênico e pró-trombótico.

As funções dos receptores AT₂, embora menos compreendidas, parecem opor-se às dos receptores AT₁, podendo favorecer um estado anti-aterogênico [106, 107]. Os receptores AT₂ são muito expressos em tecidos fetais, mas diminuem drasticamente na fase adulta [108, 109]. Entretanto, em algumas condições patológicas, como nas lesões vasculares e na hipertensão, os receptores AT₂ são hiper-expressos e suas ações parecem contrarregular às dos receptores AT₁ [110, 111]. Adicionalmente, animais que hiper-expressam os receptores AT₂ apresentam menos fibrose perivascular e cardíaca quando expostos à angiotensina-II [112]. Em camundongos *knockout* para os receptores AT₂ e expostos a lesões experimentais, demonstrou-se uma prolongada presença de células

inflamatórias e musculares lisas, sugerindo que estes receptores regulam a expressão celular nas lesões ateroscleróticas [113].

Apesar das ações benéficas atribuídas à ativação dos receptores AT₂, eles podem ter efeitos aterogênicos e pró-apoptóticos [114]. Alguns de seus efeitos benéficos podem ser mediados pelo sistema caliceína-cinina, que contrarregula as ações do SRA [112, 115].

5.2. Efeitos da angiotensina-II sobre o transporte de glicose

Existem evidências de que a inibição do SRA pode melhorar a captação e conversão de glicose em células de músculo esquelético e cardíaco. Animais diabéticos tratados com bloqueadores do receptor AT₁ (bAT) apresentam atenuada redução na expressão e maior translocação de GLUT-4 proteína quando comparados aos controles não tratados [116]. Estes efeitos podem ser mediados por um aumento da fosforilação do IRS-1 [117] e da atividade da bradicinina e do NO• [118].

Adicionalmente, ratos submetidos a dieta hipossódica apresentam resistência a insulina, associada à redução na translocação de GLUT-4 mediada pela insulina [119]. Estes efeitos podem ser devidos à ativação do SRA nesses animais, pois o tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (iECA) melhora a sensibilidade a insulina [120].

Vários ensaios clínicos também demonstram essa interação entre o SRA e o metabolismo da glicose. Estes estudos sugerem que a inibição do SRA, tanto utilizando iECA [121-122] quanto bAT [123, 124], melhora a sensibilidade à insulina.

5.3. Efeitos da angiotensina-II sobre a produção do radical superóxido (O₂^{•-}) e a disfunção endotelial

Numerosos estudos, em cultura de células, modelos animais e estudos clínicos corroboram o conceito de que a ativação do receptor AT₁ causa liberação vascular de O₂^{•-}

in vitro e *in vivo* levando ao desequilíbrio da vasodilatação dependente do endotélio [125, 126]. A angiotensina-II ativa a NAD(P)H oxidase causando aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ com conseqüente inativação do NO^{\bullet} ; esses radicais reagem entre si formando peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) e causando disfunção endotelial [127-129]. Geralmente, a enzima SOD e outros *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ mantêm esta reação em níveis mínimos [130].

A NAD(P)H oxidase não é a única fonte de EROs estimulada pela angiotensina-II. Sob algumas condições fisiopatológicas a $eNOS$ pode produzir grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ [131, 132]. A tetrahydrobiopterina é um co-fator crítico para função da $eNOS$ e sua ausência, por destruição oxidativa, pode levar a $eNOS$ a transferir elétrons para o oxigênio, em vez de transferi-los para a L-arginina, gerando $O_2^{\bullet-}$ [132-134] e contribuindo para a disfunção endotelial.

Corroborando com o envolvimento da angiotensina-II na disfunção do endotélio, a inibição do SRA, tanto por bAT ou quanto por iECA, pode atenuar a disfunção endotelial [135, 136].

5.4. Efeitos da Angiotensina-II na sobrevivência celular

Estudos têm relacionado as MAPKs a morte celular programada, mas o papel destas vias de sinalização na regulação da apoptose ainda não está bem definido, podendo ser célula-específico e/ou dependentes do estado celular [137-141]. Em cardiomiócitos submetidos à isquemia-reperfusão, a ativação das ERK1/2 causa efeitos anti-apoptóticos e pró-mitogênicos, enquanto que a ativação da p38 e da JNK induz apoptose [137-139]. A JNK é ativada por citocinas inflamatórias, EROs e angiotensina-II, associando-se a efeitos pró-apoptóticos [138, 139]. Nas células musculares lisas vasculares a ligação da angiotensina-II ao receptor AT_1 promove inibição da apoptose [138, 140], enquanto que em células endoteliais ocorre ativação da apoptose, mediada pelas caspases [141].

Apesar do controverso papel do receptor AT_1 na ativação das MAPKs e conseqüente regulação da apoptose, os iECA têm se mostrado eficazes em reduzir a mortalidade e/ou morbidade em pacientes com insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio (com e sem disfunção ventricular) e que sofreram angioplastia [122, 142, 143]. Da mesma forma, os iECA e os bAT têm mostrado efeitos benéficos sobre a progressão das doenças cardíacas e renais [123, 144-146].

6. *CROSS-TALK* ENTRE O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A INSULINA

As interações intracelulares entre diferentes sistemas de sinalização podem funcionar como mecanismo de regulação da atividade de um determinado hormônio. A angiotensina-II e a insulina são um exemplo deste tipo de interação: a insulina ativa o SRA vascular estimulando a produção do angiotensinogênio ou da angiotensina-II, além de aumentar a expressão dos receptores AT_1 [147], o que resulta em crescimento de células musculares lisas vasculares [148].

O *cross-talk* da angiotensina-II com vias mediadas por tirosina cinases, resulta em interações diretas entre os sistemas de sinalização da angiotensina-II e da insulina. A angiotensina-II é capaz de induzir uma rápida fosforilação dos IRS-1/2, de forma dose-dependente. Esta indução é mediada pela JAK-2, que é fosforilada rapidamente quando a angiotensina-II se liga ao receptor AT_1 [149]. A insulina também estimula a fosforilação dos IRS-1/2 e da JAK-2. Entretanto, a fosforilação dos IRS-1/2 pela insulina induz a ativação da PI3k, enquanto a angiotensina-II promove sua inibição (figura 2), a qual pode ser evitada pelo uso de inibidores do receptor AT_1 [150]. A angiotensina-II, mesmo inibindo a PI3k, pode estimular a hipertrofia e o crescimento celular por ativar as MAPKs e a p70S6k [151].

Adicionalmente, tem se demonstrado que a ativação do receptor AT_2 pode inibir a autofosforilação do receptor da insulina e a conseqüente fosforilação do IRS-1 [152]. Além

disto, o receptor AT_2 pode também inibir a associação do IRS-2 com a PI3k, diminuindo sua atividade e contribuindo para inibição da fosforilação da Akt [153].

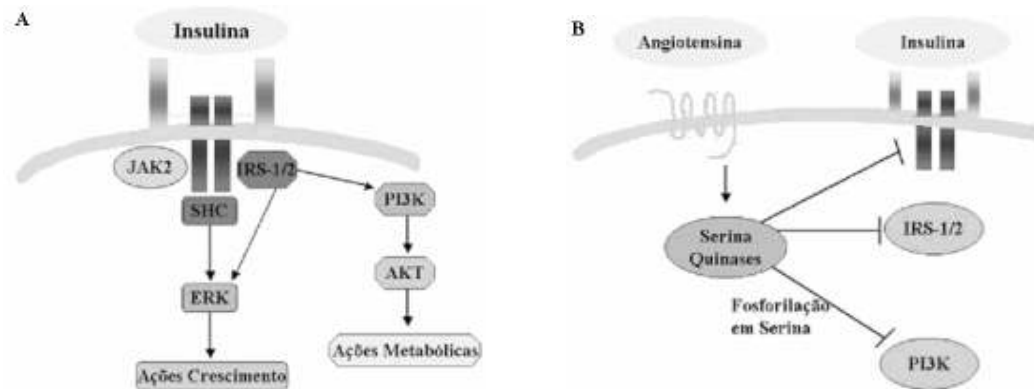


Figura 2 – Vias de sinalização da insulina (A). Inibição da sinalização da insulina provocada pela angiotensina-II (B) (segundo Carvalho-Filho e cols., 2007).

Conforme descritos acima, dados experimentais demonstraram claramente o papel da ativação da via PI3k-Akt na atenuação da lesão isquemia-reperfusão [37, 68, 70]. Neste contexto, a ativação da Akt parece ser um alvo interessante na busca de novas abordagens terapêuticas para a proteção cardíaca contra as conseqüências da lesão de perfusão. Muitos dos efeitos benéficos da inibição do SRA parecem envolver a preservação de sua ativação.

7. HIPÓTESE

O uso da insulina associada a um inibidor do SRA durante a reperfusão pode trazer benefício adicional em proteção miocárdica quando comparado ao uso da insulina isoladamente, num modelo de coração isolado submetido à isquemia-reperfusão.

8. OBJETIVOS

Determinar o melhor tempo de isquemia para se investigar a recuperação funcional e a capacidade de resposta do SRA tecidual em corações isolados e os efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-angiotensina sobre os mecanismos de cardioproteção à lesão isquemia-reperfusão. Para tanto, foram conduzidos 2 estudos.

8.1. Objetivos - ESTUDO 1

Determinar o melhor tempo de isquemia para se investigar a recuperação funcional e a capacidade de resposta do SRA tecidual em corações isolados.

Objetivos Específicos

Avaliar no modelo de coração isolado submetido a diferentes períodos de isquemia global (20, 25 e 30 min) os efeitos de se utilizar uma solução contendo angiotensina-I ou angiotensina-I associada ao captopril sobre a função cardíaca (frequência cardíaca, pressões ventriculares sistólica e diastólica, pressão desenvolvida no ventrículo, duplo produto, pressão de perfusão, índices de contratilidade e relaxamento do ventrículo).

8.2. Objetivos - ESTUDO 2

Determinar no modelo de coração isolado, os efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-angiotensina sobre os mecanismos de cardioproteção à lesão isquemia-reperfusão.

Objetivos Específicos

Avaliar no modelo de coração isolado submetido à isquemia-reperfusão, os efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-angiotensina (captopril) sobre:

- ✓ Função cardíaca: frequência cardíaca, pressões ventriculares sistólica e diastólica, pressão desenvolvida no ventrículo, duplo produto, pressão de perfusão, índices de contratilidade e relaxamento do ventrículo;
- ✓ Lipoperoxidação: TBA-RS e quimiluminescência;
- ✓ Atividade das enzimas antioxidantes: SOD, GST e catalase;
- ✓ Concentração das enzimas antioxidantes: SOD e GST;
- ✓ Metabolismo do NO•: concentração da eNOS e o conteúdo de nitritos/nitratos totais (NOX).
- ✓ Vias de sinalização intracelulares: Akt e AMPK;
- ✓ GLUT-4: proteína nas frações microsomal e membrana plasmática, e o índice de translocação.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (~125 animais), pesando entre 280 e 350 g, provenientes do biotério do ICBS/UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (4 animais por caixa) com o assoalho recoberto com serragem, tinham livre acesso água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS, Brasil), ficavam sob fotoperíodo de 12/12 h ciclo claro/escuro e sob temperatura média de 22°C. Nos procedimentos experimentais seguimos as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o projeto foi aprovado (nº 2004313) pelo Comitê de Ética da UFRGS.

9.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma, Merck, Gibco, Amersham, Vetec, Reagen, Synth, Novo Nordisk, White Martins, Air Liquid e Kodac.

9.3. Procedimentos Experimentais

9.3.1. Solução Krebs-Henseleit

Os corações foram perfundidos com uma solução Krebs-Henseleit modificada, apresentando a seguinte composição, em mmol/L: NaCl 120; KCl 5,4; CaCl₂ 1,4; MgCl₂ 1,8; NaHCO₃ 27; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1,8 e glicose 5,5.

Foram preparadas três soluções-estoque, numa concentração 20X maior do que a utilizada nas perfusões e armazenadas sob refrigeração (4°C):

Solução 1, Cloretos, contendo NaCl, KCl e MgCl₂;

Solução 2, Sódios, contendo NaHCO₃, NaH₂PO₄ e Na₂SO₄;

Solução 3, Cálcio, contendo CaCl₂.

Para obter a solução Krebs-Henseleit se misturava 50 mL da solução 1; 50 mL da solução 2; 12,5 mL da solução 3 e 1 g de D-glicose, e adicionava-se água destilada para completar um litro. Esta solução era borbulhada com carbogênio (95% O₂ – 5% CO₂) para equilibrar o pH (7,4), e filtrada através de uma membrana Millipore (0,45 µm), com o objetivo de remover qualquer partícula capaz de provocar microembolia no coração.

9.3.2. Preparação e Perfusão dos Corações

Depois de pesado, cada animal foi morto por deslocamento cervical. O tórax foi aberto com tesoura e o coração retirado rapidamente e imerso num recipiente com solução Krebs-Henseleit. Imediatamente, a artéria aorta era fixada à cânula do aparelho de perfusão (perfusor de coração isolado - tamanho 3, Hugo Sachs Elektronik, Alemanha) [154] (figura 3). A solução perfusora e a que circundava o coração eram mantidas aquecidas a 37°C, através de uma bomba de circulação de água com aquecedor e termostato (Modelo M3 Lauda, Hugo Sachs Elektronik, Alemanha). A solução perfusora era bombeada através do coração a uma velocidade de perfusão constante (10 mL/min), através de uma bomba peristáltica (Modelo Minipuls-2, Gibson Medical Electronics, França) e gaseificada com carbogênio (95% O₂ – 5% CO₂), mantendo o pH 7,4 durante todo o período experimental. A pressão do carbogênio que chegava ao oxigenador (10-12 mmHg) era controlada por uma válvula Gottliebe (Hugo Sachs Elektronik, Alemanha).

A perfusão das artérias coronárias, através de retroperfusão aórtica, com conseqüente abertura dos óstios coronários, faz com que a solução perfusora saia principalmente pelo seio venoso coronariano, situado no átrio direito, próximo a desembocadura da veia cava inferior, de onde a solução pode refluir pelas veias cavas ou passar ao ventrículo direito e ser expulsa através da artéria pulmonar (figura 4).

Com o auxílio de uma tesoura abria-se um orifício pequeno no átrio esquerdo, e através deste e da válvula mitral introduzia-se no ventrículo esquerdo um balonete de látex

(figura 5), conectado a um transdutor de pressão. O sistema era preenchido com água, evitando a presença de qualquer bolha de ar que pudesse atenuar o sinal mecânico da contração. O volume do balonete intraventricular era ajustado, usando uma seringa equipada com um micrômetro, a fim de proporcionar uma pressão ventricular diastólica (PVD) de 8-10 mmHg. Este ajuste da PVD era realizado somente durante o período de estabilização. Ao longo do experimento as alterações na PVD eram registradas para análise posterior. O recipiente para reter a solução de perfusão e mantê-la aquecida (37°C) ao redor do coração era levantado, de forma que o coração fosse envolvido totalmente pelo líquido de perfusão.

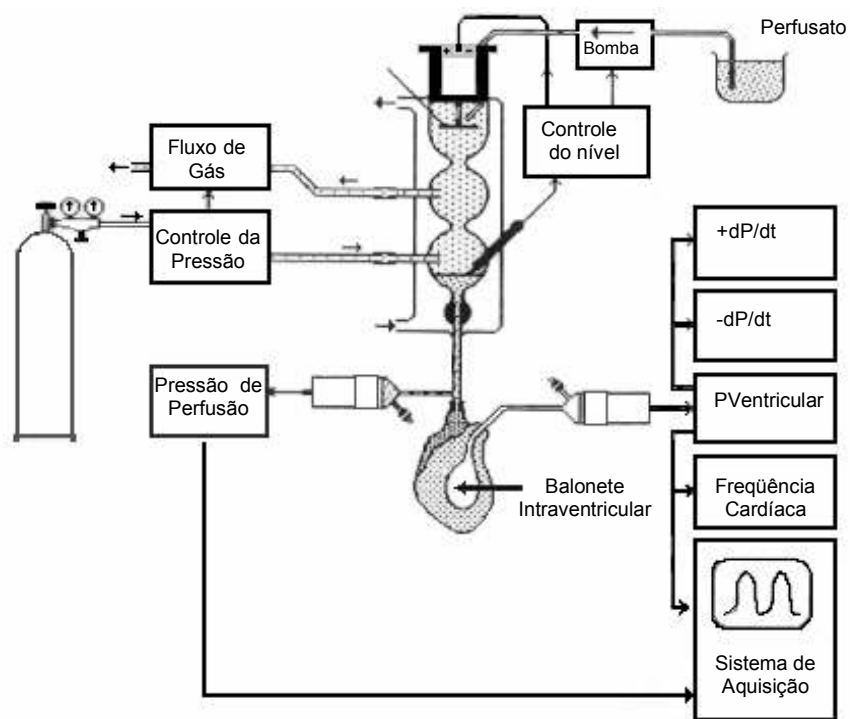


Figura 3 – Esquema mostrando o Sistema de Perfusão Langendorff.

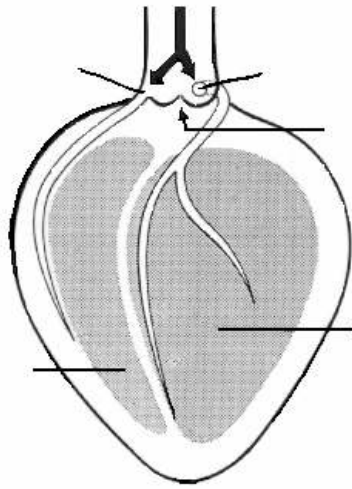


Figura 4 – Esquema do fluxo coronariano durante a perfusão.

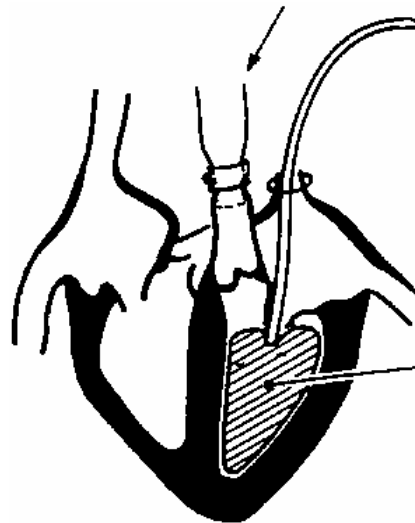


Figura 5 – Esquema da posição do balonete intracardiaco.

9.3.3. Registros Efetuados

Dois transdutores de pressão (TPS-2, São Paulo, Brasil), um acoplado a cânula aortica e outro ao balonete intraventricular, emitiam sinais que eram pré-amplificados e registrados por um sistema de aquisição e análise de dados (Isoheart, Hugo Sachs Elektronik, Alemanha).

O transdutor acoplado a cânula aortica informava as variações na pressão de perfusão coronariana média (PP), e o outro acoplado ao balão intraventricular informava as variações de frequência cardíaca (FC), pressão ventricular sistólica (PVS), pressão ventricular diastólica (PVD), índice de contratilidade ventricular ($+dP/dt$, representa a velocidade de contração) e índice de relaxamento ventricular ($-dP/dt$, representa a velocidade de relaxamento) (figuras 6, 7 e 8).

Os registros foram obtidos em intervalos de 15 s e o momento de cada período experimental era registrado no computador. Após o processamento dos sinais e apresentação visual no monitor do computador, o sistema gerava uma planilha eletrônica em DBase III plus (figura 9), que pode ser trabalhada posteriormente em Excel.

Com base nos dados fornecidos foram calculadas a pressão ventricular desenvolvida (PVDes - Equação 1) e o duplo produto (DP - Equação 2). Os resultados foram expressos em relação ao período basal.

Equação 1

$$PVDes = PVS - PVD$$

Equação 2

$$DP = PVDes \times FC$$

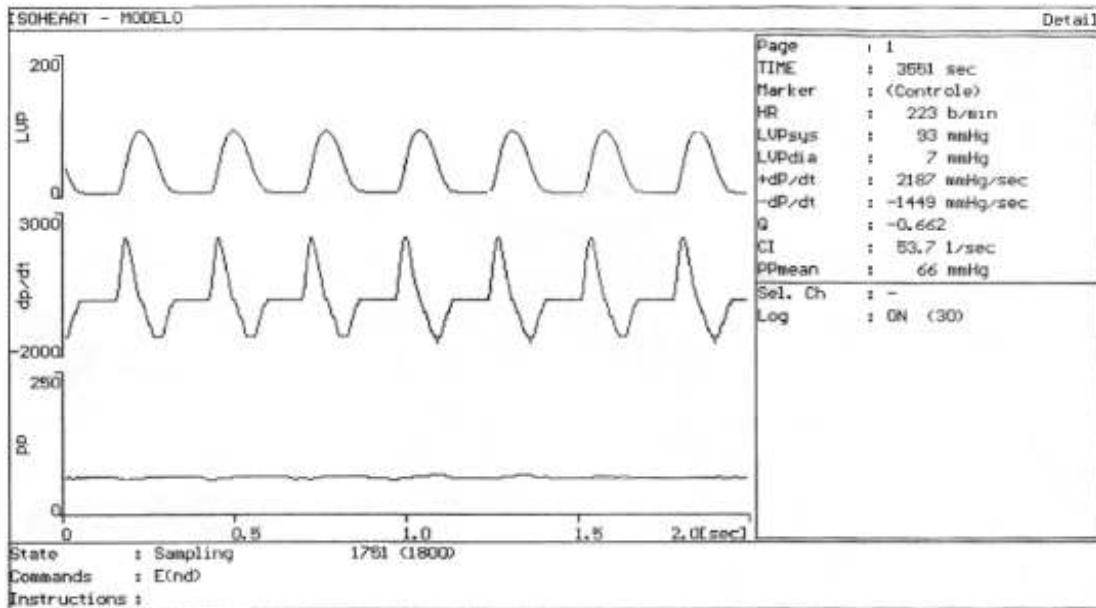


Figura 6 – Registro típico gerado no sistema Isoheart (Hugo Sachs Elektronik). Avaliação da pressão ventricular pulsátil, dP/dt , pressão de perfusão média e frequência cardíaca.

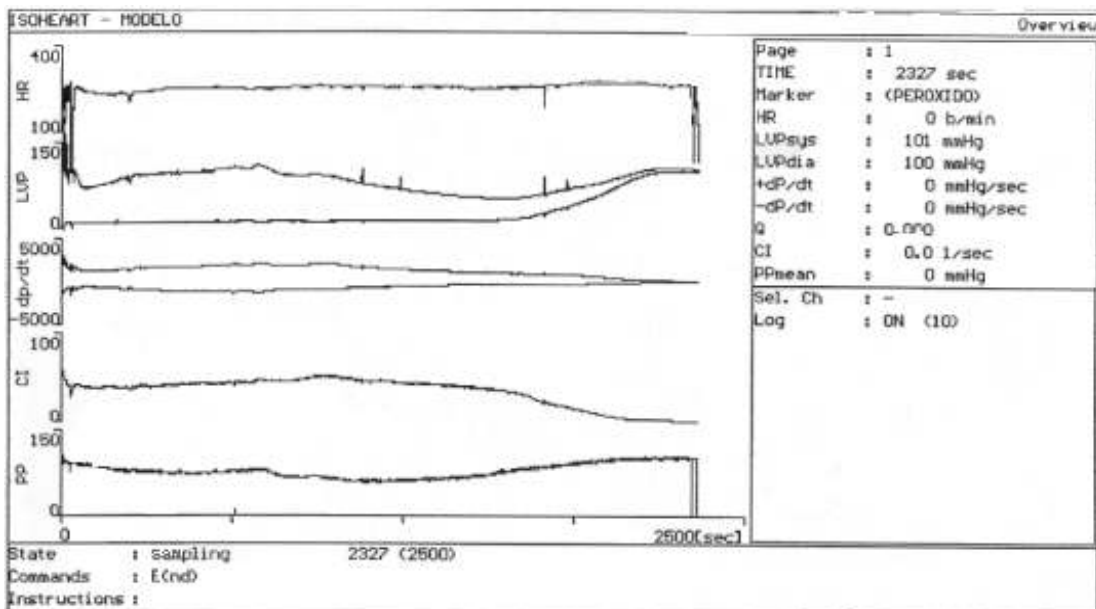


Figura 7 – Variação temporal de frequência cardíaca, pressão ventricular sistólica e diastólica, $+dP/dt$, $-dP/dt$ e pressão de perfusão média.

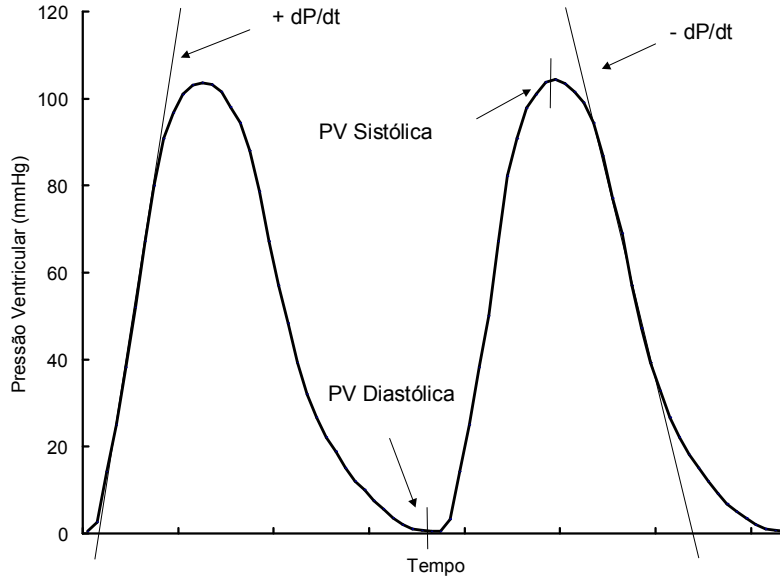


Figura 8 – Curva de pressão ventricular evidenciando os picos de pressão (PV Sistólica), os vales (PV Diastólica), a inclinação máxima na fase sistólica (+dP/dt) e a inclinação máxima na fase diastólica (-dP/dt), e a frequência cardíaca (relação entre picos e tempo).

ISOHEART - MODELO				Numerical-Overview				
TIME	HR	LUPsys	LUPdia	+dP/dt	-dP/dt	Q	CI	PPmean
sec	b/min	mmHg	mmHg	mmHg/sec	mmHg/sec		l/sec	mmHg
31	170	121	10	1901	-1181	-0.606	33.4	80
41	188	120	10	1990	-1245	-0.626	35.1	81
51	191	109	9	1779	-1136	-0.638	36.3	89
61	187	107	9	1739	-1120	-0.644	35.0	86
71	188	107	10	1722	-1106	-0.642	34.7	89
81	189	103	9	1670	-1070	-0.640	34.3	71
91	186	103	9	1646	-1063	-0.646	35.5	86
101	184	103	10	1643	-1071	-0.652	35.3	86
111	182	103	10	1644	-1065	-0.648	35.2	82
121	176	103	9	1611	-1046	-0.649	35.9	86
130	170	101	10	1556	-1013	-0.651	34.7	84
141	164	102	10	1560	-1005	-0.644	33.3	82
151	162	103	10	1576	-1009	-0.640	34.1	85
161	158	103	10	1556	-995	-0.640	33.2	86
171	154	103	10	1562	-997	-0.638	34.2	82
181	152	107	10	1611	-1029	-0.638	35.0	88
191	150	107	10	1595	-1018	-0.638	33.9	89
201	147	105	10	1568	-1003	-0.640	34.7	79
211	145	108	10	1624	-1030	-0.634	33.5	86
217	143	110	10	1648	-1047	-0.635	33.0	85

State : Sampling 218 (4300)
 Commands : E(nd)
 Instructions :

Figura 9 – Planilha em DBase III plus gerada pelo software Isoheart (Hugo Sachs Elektronik).

9.3.4. Critérios de Exclusão

Para assegurarmos um funcionamento cardíaco fisiológico, os corações que não apresentaram uma FC 210-300 bpm, PVS 60-90 mmHg e PP 60-100 mmHg ao final do período de estabilização foram excluídos.

9.3.5. Acondicionamento dos Tecidos

Após reperfundido, cada coração era pesado, seus átrios retirados rapidamente e os ventrículos congelados imediatamente em nitrogênio líquido, e eram posteriormente acondicionados em freezer (-80°C).

Os restos dos animais eram congelados em sacos plásticos, identificados e encaminhados ao biotério, de onde eles eram recolhidos pelo Setor de Coletas Especiais do DMLU (ZOONOZE), para seu devido descarte.

9.3.6. Grupos Experimentais

9.3.6.1. Grupos Experimentais - ESTUDO 1:

Os corações foram perfundidos com solução Krebs-Henseleit (KH) durante 25 min para permitir a estabilização da frequência cardíaca e da força de contração (período de estabilização/basal). A seguir, a torneira do aparelho de perfusão foi fechada e a bomba peristáltica desligada induzindo diferentes períodos de isquemia global normotérmica (20, 25 ou 30 min). Após este período, a torneira foi aberta e a bomba peristáltica ligada para proporcionar a reperusão dos corações por um período de 30 min, com as seguintes soluções:

a) Grupo KH: solução KH;

b) Grupo Angio: solução KH + Angiotensina-I (400 nmol/L – Sigma) [155];

c) Grupo AC: solução KH + Angiotensina-I + Captopril (100 µmol/L - Sigma)

[155].

9.3.6.2. Grupos Experimentais - ESTUDO 2:

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

a) Grupo KH: Os corações foram perfundidos com solução Krebs-Henseleit (KH) durante 25 min para permitir a estabilização da frequência cardíaca e da força de contração (período de estabilização/basal). A seguir, a torneira do aparelho de perfusão foi fechada e a bomba peristáltica desligada induzindo um período de isquemia global normotérmica de 20 min. Após este período, a torneira foi aberta e a bomba peristáltica ligada para proporcionar a reperfusão dos corações com a solução KH por um período de 30 min.

Nos demais grupos foram realizados os mesmos procedimentos estabelecidos acima, exceto que os corações eram reperfundidos com a solução indicada.

b) Grupo Angio: solução KH + Angiotensina-I (100 nmol/L - Sigma) [155].

c) Grupo AC: solução KH + Angiotensina-I + Captopril (100 µmol/L - Sigma) [155].

d) Grupo Insulina: solução KH + Insulina (1 mU/mL – Biohulin R, Novo Nordisk) [16].

e) Grupo IA: solução KH + Insulina + Angiotensina-I.

f) Grupo IAC: solução KH + Insulina + Angiotensina-I + Captopril.

9.3.7. Homogeneizados para Lipoperoxidação, Enzimas Antioxidantes e Metabólitos do NO•

Os tecidos foram homogeneizados (Ultra-Turrax T25 Basic, Ika Labortechnik, Alemanha) em KCl 1,15% (5 mL/g de tecido) e PMFS 100 mmol/L em isopropanol (10 µL/mL de KCl), centrifugados a 1.000 x g por 10 min. à 4°C (Sorvall RC 5B, Du Pont Instruments, EUA). O sedimentado foi descartado e o sobrenadante congelado em freezer (-80°C) para as dosagens posteriores [156].

9.3.8. Determinação das Proteínas Totais

As proteínas foram quantificadas pelo método de BRADFORD, 1976 [157], usando albumina bovina (1 mg/mL) como padrão.

9.3.9. Lipoperoxidação

9.3.9.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A concentração de malondialdeído foi determinada pelo método colorimétrico de BUEGE & AUST, 1978 [158]. Adicionando-se 0,25 mL de homogeneizado em 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v), centrifugou-se a 3.000 x g por 5 min. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante e misturou-se a 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), incubou-se por 15 min. à 100°C e resfriou-se em gelo. A leitura foi realizada a 535 nm em espectrofotômetro (Cary, Varian UV). Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína.

9.3.9.2. Quimiluminescência

A quimiluminescência foi medida em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer – 1215, LKB Produkter, Suécia) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. Misturou-se 4 mL de tampão (140 mmol/L de KCl, 20 mmol/L de fosfatos - pH 7,4) e 0,5 mL do homogeneizado, e realizou-se uma leitura (basal/expontânea). Adicionou-se então ao meio 30 µL de *t*-BOOH (3 mmol/L) e realizou-se uma segunda leitura (induzida), da qual descontou-se da leitura basal. Os resultados foram expressos em contas por segundo (cps)/mg de proteína [159].

As determinações foram realizadas em sala escura e os vials de cintilação mantidos na penumbra, para se evitar a fosforescência ativada pela iluminação do ambiente.

9.3.10. Atividade das Enzimas Antioxidantes

9.3.10.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método descrito por MARKLUND, 1985 [160], segundo o nível de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Aliquotas dos homogeneizados foram adicionadas a um tampão Tris/EDTA 50 mmol/L (pH 8,2) contendo 120 nmol/L de catalase e 190 mmol/L de pirogalol, num volume final de 1 mL. As variações na absorbância a 420 nm foram registradas durante 2 min. A atividade da enzima foi determinada a partir de uma curva padrão de SOD, onde 1 U de SOD corresponde a quantidade da enzima que inibiu em 50% a velocidade da oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

9.3.10.2. Glutathione S-transferase (GST)

Para determinar a atividade da GST se utilizou o método de MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981 [161], que se baseia na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4-dinitro-fenil-S-glutathione (DNP-SG). A formação do DNP-SG foi observada no comprimento de onda de 340 nm.

No ensaio, adicionou-se a cubeta 850 µL de tampão fosfato 0,2 mmol/L (pH 6,5), 50 µL de homogeneizado e 50 µL de GSH 20 mmol/L, zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 50 µL de CDNB 20 mmol/L e observou-se a formação do DNP-SG durante 2 min. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína.

9.3.10.3. Catalase

A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O método consiste em medir a diminuição da absorbância a 240 nm, que é o comprimento de onda onde há maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para

realização do ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: Tampão Tris (50 mmol/L)/EDTA (250 μ M) pH 8,0 e H₂O₂ (11,44 mmol/L) em tampão Tris/EDTA.

No ensaio adicionou-se a cubeta (quartzo) 1 mL de H₂O₂ e mediu-se contra um branco de tampão Tris/EDTA em espectrofotômetro (A_{240} entre 0,55 - 0,52). Posteriormente, colocou-se na cubeta 950 μ L do H₂O₂, zerou-se o espectrofotômetro e se adicionou 50 μ L de amostra, e registrou-se a diminuição da absorbância durante 2 min. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (modificado de BEUTLER, 1975) [162].

9.3.11. Metabólitos do Óxido Nítrico (NOX)

Os níveis de nitritos/nitratos foram medidos pela reação das amostras com o reagente Griess (Sulfanilamina 1 g; Naftilendiamina 0,1 g; Ácido ortofosfórico 85% - 2,3 mL; água destilada 97,7 mL); Tris 1 M - pH 7,5; NADPH 0,02 mmol/L; Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mmol/L; Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e Nitrato redutase (NR) 1 U/mL. O meio de reação continha 40 μ L da amostra, 10 μ L de NADPH, 7 μ L de Tris, 23 μ L de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 μ L de NR. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente sob agitação por 30 min. Após, adicionou-se 50 μ L do reagente Griess e incubou-se à temperatura ambiente sob agitação por 10 min, e realizou-se a leitura a 540 nm. O total de nitritos/nitratos foi estimado a partir de uma curva padrão de nitrato de sódio (1 mmol/L). Os resultados foram expressos em mmol/L [163].

9.3.12. GLUT-4: Homogeneizado e Frações Celulares

Os tecidos foram homogeneizados (Ultra-Turrax) em tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mmol/L; EDTA 5 mmol/L; Sacarose 250 mmol/L - pH 7,4) numa proporção 1:5 (p:v), mais PMFS 100 mmol/L em isopropanol (10 μ L/mL de tampão). Centrifugamos

a 760 x g por 10 min à 4°C; o sedimentado era descartado e o sobrenadante centrifugado a 31.000 x g por 60 min à 4°C (Sorvall RC 5B); o sedimentado resultante correspondeu ao conjunto de membranas (CM); o sobrenadante era ultracentrifugado a 190.000 x g por 60 min à 4°C (Ultra-Crimp); o sedimentado resultante correspondeu aos microsomas leves (ML). As frações CM e ML foram ressuspensas em 0,35 mL de tampão e acondicionadas em freezer (-80°C) [164].

Após a imunodeteção, o índice de translocação do GLUT-4 (IT_{GLUT4}) foi calculado segundo a fórmula [119]:

$$IT_{GLUT4} (\%) = GLUT4 \text{ CM} \times 100 / (GLUT4 \text{ CM} + GLUT4 \text{ ML})$$

9.3.13. Western blot e Imunodeteção

Amostras foram incubadas em tampão de Laemmli (Tris 0,5 M; SDS 10%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0.05%; 2-mercaptoetanol 6%; pH 6,8) à 100°C - 3 min [165] e submetidas a eletroforese (SDS-PAGE à 10%) - 100 Volts por 4 h, utilizando um tampão de corrida (Tris-HCl 25 mmol/L, Glicina 192 mmol/L, SDS 0,1%; pH 8,3). Após, realizou-se a transferência para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-Super, Amersham, UK) - 100 volts por 1,5 h utilizando um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mmol/L, Glicina 192 mmol/L, Metanol 20%; pH 8,3) [166]. Utilizamos um sistema Mini Trans Blot Cell-V8 (Bio-Rad, USA).

A membrana foi incubada em PBS (NaCl 0,8%; $Na_2HPO_4(12H_2O)$ 0,115%; KCl 0,02%; KH_2PO_4 0,02% - pH 7,2) acrescido de BSA 5% - 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se com PBS (3X - 5 min) e incubou-se a membrana com o anticorpo específico à 4°C, *overnight*. Lavou-se novamente a membrana com PBS (5X - 5 min) e

incubou-se com o 2º anticorpo (HRP conjugado) durante 2 h. Novamente lavou-se a membrana com PBS acrescido de Triton X-100 1% (5X - 5 min) [167].

A membrana foi exposta a um filme de RX (Hyperfilm - Amersham, UK) durante 30-60 s utilizando-se um Kit-ECL (Amersham, UK). Após esse período o filme foi revelado e fixado utilizando-se um kit GBX (Kodak - SP, BR). As bandas imunoreativas foram avaliadas por densitometria óptica utilizando-se um densitômetro (Image Master VDS - Amersham, UK). Os resultados foram normalizados com Ponceau (5% em ácido acético) e expressos em % de pixels, exceto para o GLUT-4 que foi expresso em UA/g de tecido.

Utilizamos os seguintes anticorpos (Santa Cruz Biotechnology, CA ou Upstate Biotechnology, NY): Cu-ZnSOD, GST, eNOS, p-Akt, Akt basal, p-AMPK, AMPK basal e GLUT-4.

9.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão para cada um grupos estudados, nos estudos 1 e 2.

Na análise dos resultados da função cardíaca os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida por teste complementar de SNK ou Tukey.

Na análise dos resultados da atividade enzimática e imunodeteção os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste complementar de SNK.

Foi utilizado o software SPSS, versão 13.0 para Windows (EUA), e as diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

ESTUDO 1

Recuperação funcional no modelo de coração isolado de rato:
Papel do tempo de isquemia e do sistema renina-angiotensina

JUSTIFICATIVA

O sistema renina-angiotensina pode modular a homeostasia cardiovascular através de seus componentes tanto circulantes como local. A angiotensina-I tem sido utilizada para estimar a atividade funcional da enzima conversora da angiotensina nos tecidos e na circulação, porque esta necessita ser convertida para angiotensina-II a fim de determinar uma resposta [168-170]. No modelo de coração isolado de ratos, a liberação de angiotensina-II só pode ser mantida pela adição de renina com angiotensinogênio [6] ou de angiotensina-I [168-170] no tampão de perfusão. Assim, eles devem ser adicionados ao perfusato para o estudo do SRA local, mas alguns autores não utilizam angiotensina-I no perfusato [171-173], dificultando as conclusões sobre a inibição da enzima conversora da angiotensina nestes estudos.

Apesar da popularidade das preparações em corações isolados de ratos no estudo das lesões de isquemia-reperfusão do miocárdio, diversos protocolos vêm sendo utilizados em relação à duração da isquemia [155, 174], ao grau de liberação de enzimas e ao grau de depleção dos fosfatos de alto poder energético (índices metabólicos da lesão pós-isquêmica) [175, 176], tornando difícil compará-los.

Deste modo, existe uma grande necessidade de caracterizar, no modelo de coração isolado de ratos, um período de isquemia no qual as abordagens farmacológicas possam realmente ter um efeito sobre a recuperação funcional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram descritos no item 9, que trata dos dois estudos de maneira geral.

RESULTADOS

Todos os corações perfundidos tinham função cardiovascular basal semelhante antes da isquemia. Devido à recuperação do dP/dt_{max} e dP/dt_{min} serem muito semelhantes,

apenas a recuperação do dP/dt_{\max} foi apresentado (figura 10). Observou-se que o dP/dt_{\max} foi menor nos grupos KH submetidos à 25 e 30 min de isquemia (74 e 80%, respectivamente), quando comparados ao grupo KH submetido à 20 min de isquemia. A angiotensina-I causou uma redução de 87-94% na recuperação do dP/dt_{\max} em todos os períodos isquêmicos comparados aos valores basais. Este efeito da angiotensina-I foi totalmente revertido pelo captopril no protocolo de estudo de 20 min de isquemia. No entanto, após 25 e 30 min de isquemia o captopril não reverteu o efeito da angiotensina-I sobre a recuperação do dP/dt_{\max} .

Devido à recuperação do duplo produto e da PVDs terem sido muito semelhantes, apenas a recuperação do duplo produto foi apresentada (figura 11). O duplo produto foi menor nos grupos KH submetidos à 25 e 30 min de isquemia (73 e 78%, respectivamente), quando comparado ao grupo KH submetido à 20 min de isquemia. A angiotensina-I causou uma redução de 85-93% na recuperação duplo produto em todos os períodos de isquemia quando comparados aos valores basais. Este efeito da angiotensina-I foi revertido pelo captopril nos grupos submetidos à 20 e 25 min de isquemia (85% e 29%, respectivamente, em relação aos valores basais), mas não no protocolo de estudo de 30 min de isquemia.

A figura 12 representa a PVD, que foi significativamente aumentada durante a reperfusão nos grupos KH submetidos à 25 e 30 min de isquemia global (5,5 e 6 vezes, respectivamente), quando comparados com o grupo KH submetido à 20 min de isquemia. A angiotensina-I causou um aumento de aproximadamente 6,9 vezes na recuperação da PVD quando comparada ao grupo KH submetido à 20 min de isquemia; este efeito foi revertido pelo captopril. No entanto, nos grupos submetidos à 25 e 30 min de isquemia, tanto a angiotensina-I quanto o captopril não causaram efeitos significativos na PVD.

A PP, representada na figura 13, aumentou significativamente durante a reperfusão nos grupos KH submetidos à 25 e 30 min de isquemia global (1,08 e 1,10 vezes, respectivamente) quando comparados ao grupo KH submetido à 20 min de isquemia. A

angiotensina-I causou um aumento de aproximadamente 1,25 vezes na recuperação da PP em comparação ao grupo KH submetido à 20 min de isquemia, efeito que foi parcialmente revertido pelo captopril. No entanto, nos grupos submetidos à 25 e 30 min de isquemia, tanto a angiotensina-I quanto o captopril, não causaram efeitos significativos na PP.

Não foram encontradas diferenças significativas na PVS e na FC (dados não mostrados) entre os grupos de reperfusão nos diferentes protocolos de isquemia.

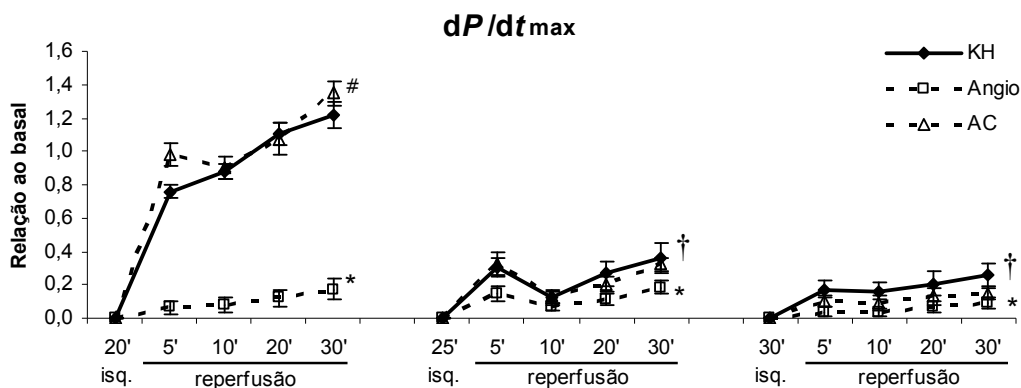


Figura - 10. Recuperação do índice de contratilidade ventricular (dP/dt_{max}) a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia global. KH (controle), Angio (angiotensina-I) e AC (angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como médias \pm SEM (n = 5 cada). * P < 0,05: Angio vs respectivo KH; # P < 0,001: AC vs respectivo Angio. † P < 0,001: KH 25 min e KH 30 min de isquemia versus KH 20 min de isquemia.

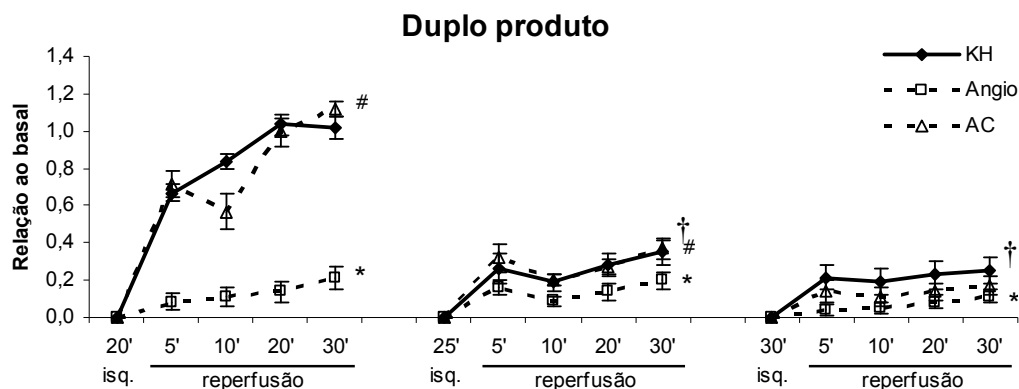


Figura - 11. Recuperação do duplo produto a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia global. KH (controle), Angio (angiotensina-I) e AC (angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como médias \pm EPM grupo (n = 5 cada). * $P < 0,04$: Angio vs respectivo KH; # $P < 0,02$: AC vs respectivo Angio; † $P < 0,001$: KH 25 min e KH 30 min de isquemia vs KH 20 min de isquemia.

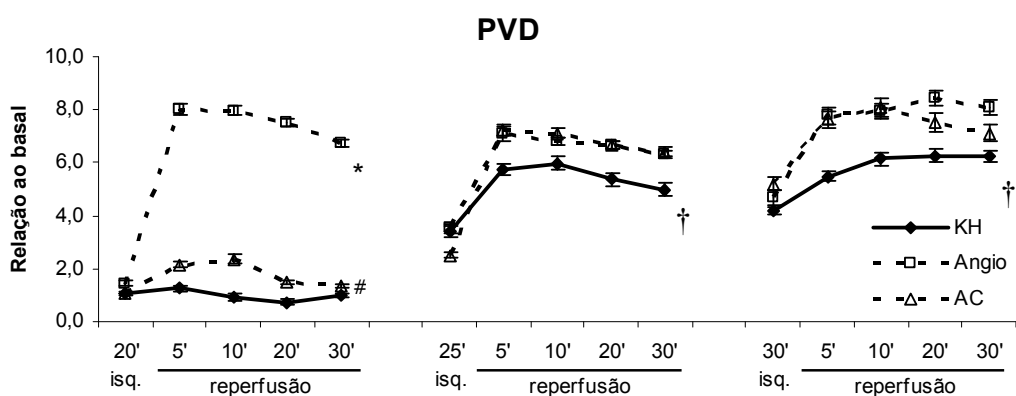


Figura - 12. Recuperação de pressão ventricular diastólica (PVD) a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia global. KH (controle), Angio (angiotensina-I) e AC (angiotensina-I + captopril). Os dados são mostrados como médias \pm EPM grupo (n = 5 cada). * $P < 0,001$: Angio vs respectivo KH; # $P < 0,001$: AC vs respectivo Angio; † $P < 0,001$: KH 25 min e KH 30 min de isquemia vs KH 20 min de isquemia.

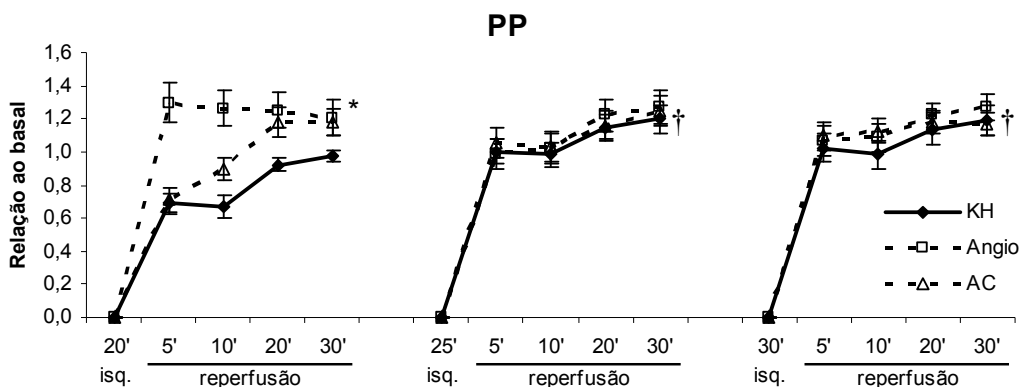


Figura - 13. Recuperação da pressão de perfusão (PP) a partir de 20, 25 e 30 min de isquemia global. KH (controle), Angio (angiotensina-I) e AC (angiotensina-I + captopril). Os dados são mostrados como médias \pm EPM grupo (n = 5 cada). * P = 0,02: Angio vs respectivo KH; † P <0,001: KH 25 min e KH 30 min de isquemia vs KH 20 min de isquemia.

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que, no modelo de coração isolado de ratos, 20 min de isquemia global resulta em disfunção contrátil leve/moderada, enquanto períodos mais prolongados de isquemia causam disfunção contrátil grave. Além disso, demonstramos que os efeitos da angiotensina-I e do captopril na recuperação funcional são melhor observados quando os corações são submetidos à 20 min de isquemia. Esse é o primeiro estudo que avaliou a recuperação funcional e a capacidade de resposta do sistema renina-angiotensina tecidual em corações de ratos submetidos a três diferentes períodos de isquemia.

O acompanhamento das alterações cardiovasculares induzidas pela isquemia global (20, 25 e 30 min) no modelo de coração isolado de ratos mostrou que nos corações expostos à 20 min de isquemia, a recuperação funcional foi reduzida na fase inicial da reperfusão, mas não no final da reperfusão (30 min), sugerindo que o grau de lesão tecidual foi de leve a moderado. O efeito do prolongamento do período de isquemia de 20 para 25

ou 30 min foi uma acentuada diminuição na recuperação funcional, conforme indicado por menores dP/dt_{\max} e duplo produto, e por maiores PVD e PP ao longo do período de reperfusão. Essas modificações demonstram que ocorre contratatura do miocárdio quando mais de 20 min de isquemia são aplicados, sugerindo lesão tecidual severa. Esses resultados estão de acordo com os dados funcionais e metabólicos de estudos anteriores [155, 177].

Palmer et al. [174] e Wang et al. [177] relataram que leve disfunção pós-isquêmica ocorre quando curtos períodos de isquemia global (15-20 min) são empregados, mas uma disfunção severa do miocárdio com uma persistente elevação da liberação de creatina cinase foi observada após 25 min ou mais de isquemia, sugerindo uma lesão miocárdica irreversível. Esses resultados e os nossos sugerem que a transição de lesão tecidual leve/moderada à grave ocorre após 20 min de isquemia global. No entanto, mudanças no tampão de perfusão (ex.: concentração de substrato e/ou composição [178], fluxo [179] e temperatura [180]) podem modificar este limiar isquêmico.

Muitos estudos confirmaram que a atividade da enzima conversora da angiotensina está presente no tecido cardíaco e que o SRA pode modular a homeostase cardiovascular, tanto através de seu sistema local, como sistêmico [168-170, 181]. No entanto, no modelo de coração isolado de ratos, o substrato (angiotensina-I) deve ser adicionado ao perfusato para o estudo do SRA local [168-170]. No presente estudo, a angiotensina-I resultou numa marcada redução na recuperação funcional após o estabelecimento da disfunção induzida pela isquemia, conforme indicado pelo menor dP/dt_{\max} e duplo produto em todos os períodos isquêmicos testados. Isto também é reforçado pela maior PVD e PP nos grupos submetidos a 20 min de isquemia. Estudos anteriores também mostraram que a angiotensina-I e a angiotensina-II reduzem a contratilidade cardíaca e/ou causam constrição das artérias coronárias [155, 182], mas outros autores não observaram nenhum efeito deletério induzido por estes compostos [183].

Os efeitos da angiotensina-I sobre a recuperação funcional foram total ou parcialmente revertidos pelo captopril nos grupos submetidos à 20 e 25 (mas não à 30) min de isquemia, sugerindo que eles dependem da conversão local para angiotensina-II. Diversos fatores são relacionados a este efeito protetor dos inibidores da enzima conversora da angiotensina sobre a lesão de isquemia-reperfusão: diminuição da infiltração leucocitária [184], efeitos antiinflamatórios [185], propriedades antioxidantes [17] e efeitos mediados pelo aumento nos níveis de bradicinina e de prostaglandina [186]. Possivelmente a incapacidade do captopril em atenuar completamente as respostas mediadas pela angiotensina-I deve-se a uma atividade intrínseca da angiotensina-I, pois a formação de angiotensina-II em corações intactos de ratos é primariamente dependente da enzima conversora da angiotensina [168-170]. No entanto, muitas vias alternativas para a formação da angiotensina-II (ex.: quimase, calicreína e catepsina-G), podem ser ativadas em diversas condições patológicas, tais como a isquemia, hipercolesterolemia, hipertensão e inflamação [96]. Devido a inibição da enzima conversora da angiotensina aumentar os níveis circulantes da angiotensina-1-7 [187], alguns destes efeitos cardiovasculares podem ser atribuídos a ela, embora as ações cardíacas desse peptídeo sejam discrepantes [99, 188].

Esses resultados mostraram que, após 20 min de isquemia a recuperação funcional do miocárdio é significativamente reduzida e pouco afetada pela angiotensina-I ou pelo captopril, sugerindo uma menor capacidade de resposta do tecido cardíaco causada pela contratatura isquêmica. Assim, é pouco provável que a menor capacidade de resposta do tecido cardíaco às drogas testadas possa ser devida a uma saturação da atividade da enzima conversora da angiotensina tecidual.

No modelo de coração isolado a liberação de enzimas causada tanto pela isquemia como pela lesão induzida pela reperfusão vem sendo descrita [174-176, 189, 190]. No entanto, embora importantes, os resultados apresentados são discordantes e ilustram a falta de padronização entre os diversos ensaios e/ou na sensibilidade dos métodos utilizados.

Além disso, os dados são freqüentemente expressos em diferentes unidades (ex.: unidades/mg de proteína, unidade/g do peso seco, etc), tornando difícil comparar os resultados dos diferentes estudos. Deste modo, nós preferimos a utilização de múltiplos índices funcionais para avaliar a extensão da lesão tecidual no coração isquêmico, considerando que esta abordagem possa ser mais reprodutível.

Concluimos que 20 min de isquemia global é o melhor período para o estudo da disfunção contrátil leve/moderada do miocárdio, de modo que possa ser atenuada ou agravada pelas drogas aqui testadas (angiotensina-I e captopril). Períodos de isquemia maiores podem levar a lesão severa do miocárdio, com o desenvolvimento de contratatura isquêmica, que não pode ser revertida pelo uso de drogas testadas durante o período de reperfusão. Assim, abordagens farmacológicas testadas nesses períodos podem não ter nenhum efeito por razões metodológicas.

ESTUDO 2

Efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-
angiotensina sobre os mecanismos de cardioproteção
à lesão isquemia-reperfusão

JUSTIFICATIVA

Há muitos anos existe o interesse no desenvolvimento de tratamentos que através de modulações metabólicas melhorem os resultados da isquemia cardíaca. O tratamento com glicose-insulina-potássio (GIK) representa um exemplo clássico. Descrito pela primeira vez há mais de quatro décadas, substanciais evidências a partir de pesquisas em animais e em humanos têm mostrado um efeito benéfico do GIK no tratamento da isquemia cardíaca [49, 191-193]. Entretanto, recentemente uma grande pesquisa clínica (CREATE-ECLA) mostrou que o GIK não teve efeito em pacientes com infarto agudo do miocárdio [194]. Embora estes resultados tenham sido extremamente desapontadores para a sustentação do tratamento metabólico, despertou ainda mais o interesse por pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta terapêutica.

Por outro lado, o uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina tem demonstrado mais efeitos benéficos do que o esperado no tratamento da hipertensão arterial, após infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, causando redução na resistência à insulina além da redução da pressão arterial [122, 195, 196]. Os mecanismos responsáveis por estes efeitos extremamente positivos só recentemente vêm sendo compreendidos, e podem também estar relacionados aos efeitos destas drogas sobre as vias de sinalização intracelulares [197].

As implicações das interações intracelulares entre os sistemas de sinalização da angiotensina-II e insulina são muitas, porque ocorrem em concentrações fisiológicas dos hormônios em animais intactos. Além disto, a resistência à insulina e a hipertensão arterial coexistem frequentemente e são determinantes de um maior risco cardiovascular, chamando a atenção para a importância do *cross-talk* angiotensina-II/insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram descritos no item 9 que trata dos dois estudos de maneira geral.

RESULTADOS

Função Cardíaca

Todos os grupos apresentavam função cardiovascular (PVS, PVD, PVDes, DP, $dP/dt_{máx}$, $dP/dt_{mín}$, PP e FC) similar antes da indução do período isquêmico (Tabela 1).

A figura 14 mostra a recuperação da PVDes após 20 min de isquemia global, o grupo Angio apresentou uma redução de ~24% em relação ao período basal. Este efeito da Angio foi revertido pelos tratamentos IA e IAC, e parcialmente revertido pelo tratamento AC ($P = 0,055$). Os grupos KH e insulina não diferiram significativamente de nenhum grupo.

Na recuperação do $dP/dt_{máx}$ (figura 15), o grupo Angio apresentou uma redução de ~29% em relação ao período basal, e também foi menor significativamente em relação ao grupo KH. Este efeito da Angio foi revertido por todos os tratamentos (AC, IA e IAC). O grupo insulina também foi maior significativamente em relação ao grupo Angio. Na recuperação do $dP/dt_{mín}$, o grupo Angio apresentou uma redução de ~17% em relação ao período basal, mas não diferiu significativamente de nenhum grupo ($P = 0,066$ vs. grupo IA) (dados não mostrados).

A figura 16 mostra a recuperação da PVD, o grupo Angio apresentou um aumento de ~2,7 vezes na PVD em relação ao período basal, e também foi maior significativamente em relação ao grupo KH. Este efeito da Angio foi atenuado significativamente por todos os tratamentos (AC, IA e IAC; ~1,6 vezes em relação ao período basal). O grupo insulina (~1,5 vezes em relação ao período basal) também foi menor significativamente em relação ao grupo Angio.

Na recuperação do duplo produto (figura 17), o grupo Angio apresentou uma redução de ~24% em relação ao período basal. Este efeito da Angio foi revertido pelo

tratamento IA, que também foi maior significativamente em relação aos grupos KH e AC. Os grupos insulina e IAC não diferiram significativamente de nenhum grupo.

A figura 18 mostra a recuperação da PP, os grupos Angio e IA apresentaram um aumento de ~20% em relação ao período basal. Todos os grupos (exceto o grupo insulina) foram maiores significativamente em relação ao grupo KH. O grupo insulina apresentou valores menores em relação aos grupos Angio e IA. Os grupos AC e IAC não diferiram significativamente dos grupos Angio e insulina.

Os grupos estudados não apresentaram alterações significativas na PVS, durante a reperfusão. Na recuperação da FC todos os grupos (exceto o IA) apresentaram uma redução de ~10-15% em relação ao período basal. O grupo insulina apresentou uma redução de ~11% em relação ao grupo IA, mas não diferiu significativamente dos demais grupos (dados não mostrados).

Tabela 1. Parâmetros basais da função cardíaca nos diferentes grupos de tratamentos:

	GRUPOS					
	KH	Angio	AC	Insulina	IA	IAC
PVS (<i>mmHg</i>)	81,4 ± 7,3	76,8 ± 5,6	81,8 ± 6,7	70,6 ± 3,1	67,6 ± 2,7	68,0 ± 2,8
PVD (<i>mmHg</i>)	8,7 ± 0,2	8,7 ± 0,3	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,3	9,2 ± 0,2	9,5 ± 0,3
PVDes (<i>mmHg</i>)	72,8 ± 7,3	68,0 ± 5,5	73,4 ± 6,8	62,0 ± 2,4	58,6 ± 2,8	58,8 ± 3,0
DP (<i>mmHg.bpm</i>)	16598,4 ± 1726,4	16401,6 ± 1061,0	17439,8 ± 1866,8	14991,6 ± 649,5	14708,6 ± 387,9	15005,8 ± 273,0
dP/dt _{máx} (<i>mmHg/s</i>)	1787,4 ± 238,1	1533,0 ± 128,6	1687,4 ± 145,0	1462,8 ± 98,2	1492,2 ± 37,9	1527,8 ± 81,6
dP/dt _{mín} (<i>mmHg/s</i>)	1061,1 ± 142,0	1056,6 ± 108,0	1176,2 ± 89,1	1059,4 ± 124,0	934,0 ± 69,4	863,2 ± 61,1
PP (<i>mmHg</i>)	93,2 ± 8,3	72,7 ± 4,3	86,0 ± 6,9	90,2 ± 4,2	72,5 ± 4,9	84,7 ± 5,7
FC (<i>bpm</i>)	228,0 ± 5,8	241,2 ± 10,5	237,6 ± 10,6	241,8 ± 2,6	251,0 ± 5,3	255,2 ± 8,7

KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os resultados estão expressos como média ± EPM, *n* = 7.

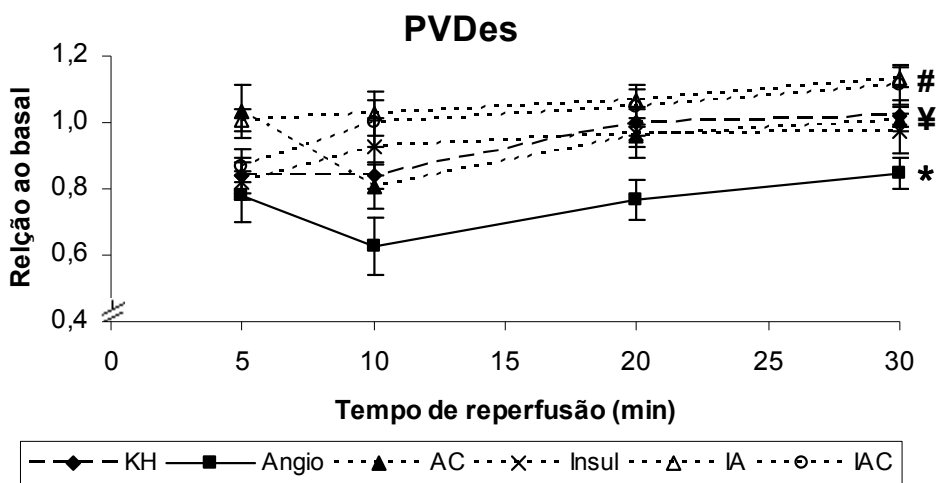


Figura - 14. Recuperação da Pressão Ventricular Desenvolvida (PVDes) após 20 min de isquemia global. KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), Insul (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média ± EPM (*n* = 7 cada). * Angio vs. KH; # IA e IAC vs. Angio; ¥ AC vs. Angio (*P* = 0,055).

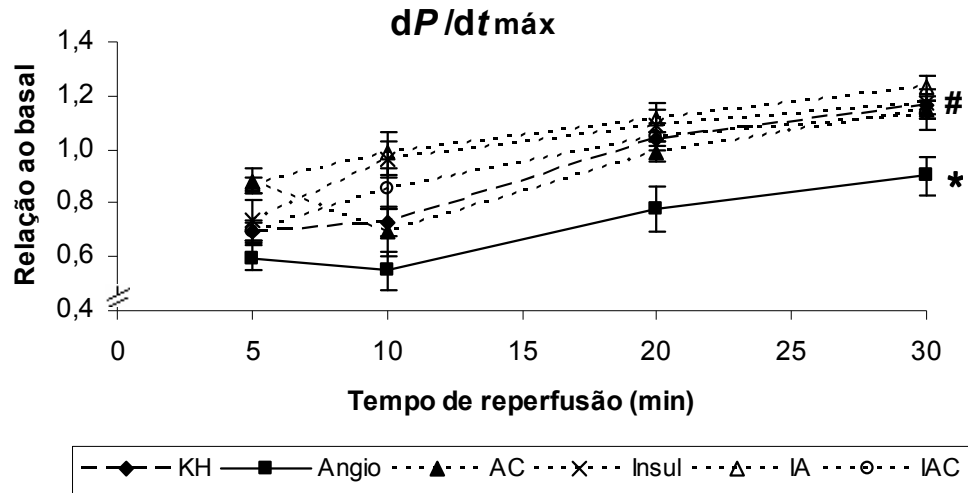


Figura - 15. Recuperação do índice de contratilidade ventricular ($dP/dt_{\text{máx}}$) após 20 min de isquemia global. KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), Insul (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 7$ cada). * Angio vs. KH; # Todos vs. Angio.

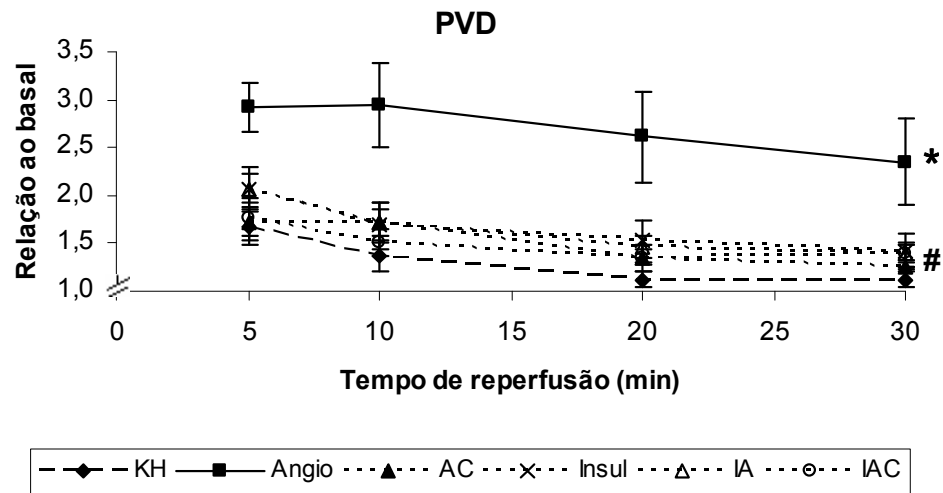


Figura - 16. Recuperação da Pressão Ventricular Diastólica (PVD) após 20 min de isquemia global. KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), Insul (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 7$ cada). * Angio vs. KH; # Todos vs. Angio.

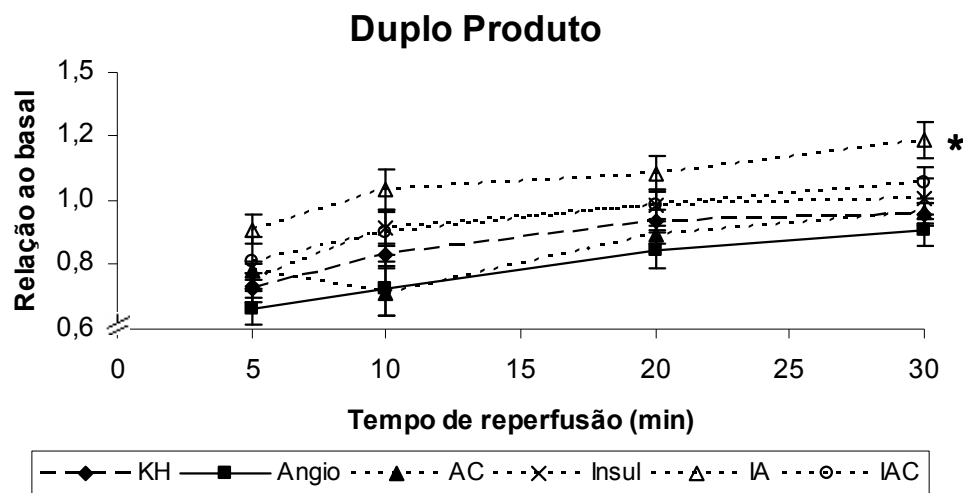


Figura - 17. Recuperação do Duplo Produto após 20 min de isquemia global. KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), Insul (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 7$ cada). * IA vs. KH, Angio e AC.

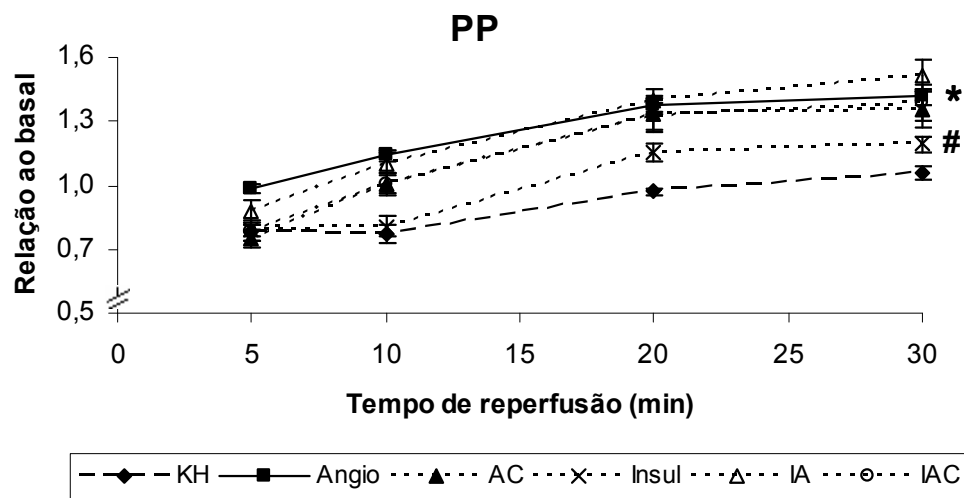


Figura - 18. Recuperação da Pressão de Perfusão (PP) após 20 min de isquemia global. KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), Insul (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 7$ cada). * Todos vs. KH; # Insul vs. Angio e IA.

Concentração das Enzimas Akt e AMPK

A figura 19 mostra a concentração da enzima Akt em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas na concentração da Akt basal (figura 19.A). Entretanto, na concentração da Akt fosforilada (figura 19.B) os grupos I e IA foram maiores em relação ao grupo KH (~47% e ~42%, respectivamente) e ao grupo A (~60% e ~55%, respectivamente). Os demais grupos estudados não apresentaram diferenças significativas.

A figura 20 mostra a concentração da enzima AMPK em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas na concentração da AMPK basal (figura 20.A). Entretanto, na concentração da AMPK fosforilada (figura 20.B), os grupos I, IA e IAC foram ~31% maiores em relação aos grupos KH, A e AC.

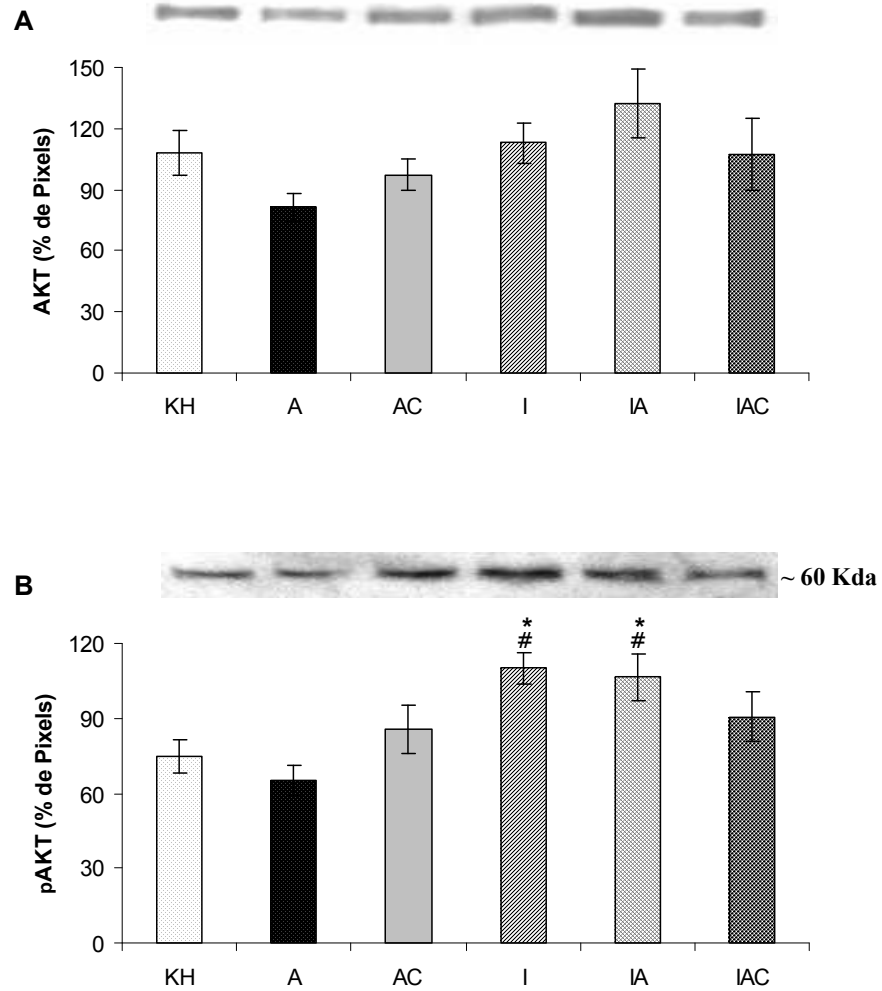


Figura - 19. Western blot representativo e quantificação da enzima Akt em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. **(A)** Akt basal. **(B)** Akt fosforilada (pAkt). KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada). * vs. grupo KH; # vs. grupo A.

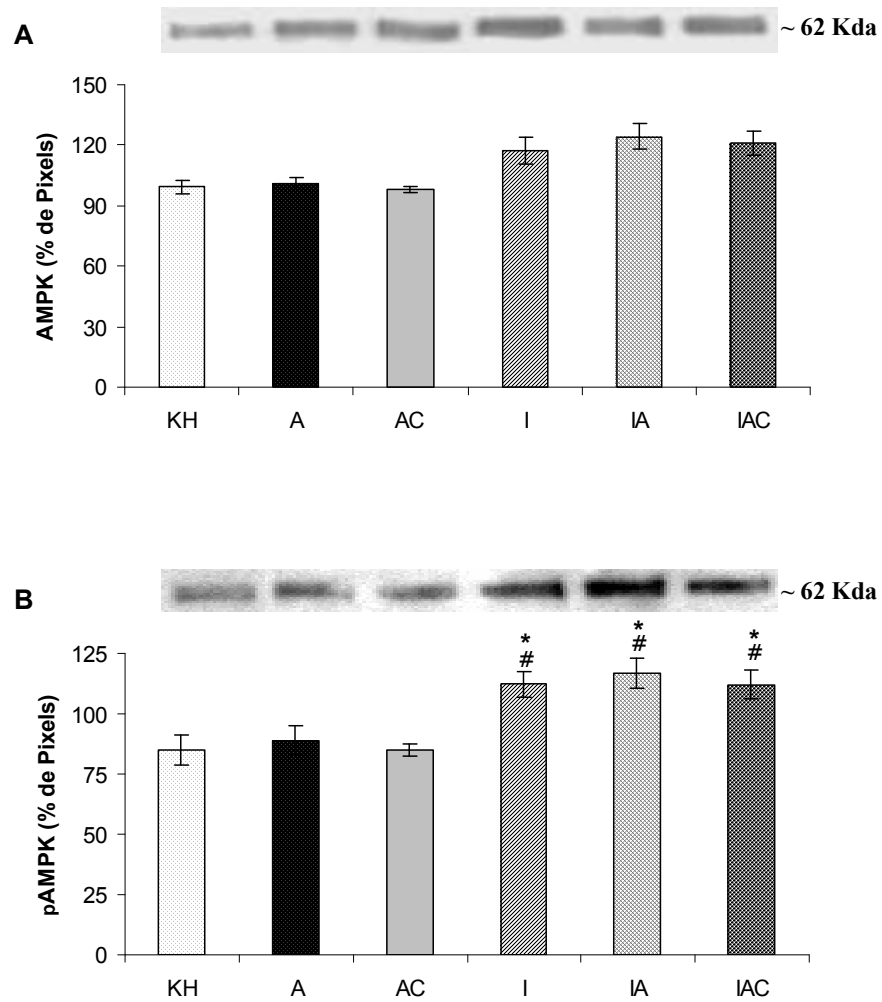


Figura - 20. Western blot representativo e quantificação da enzima AMPK em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. **(A)** AMPK basal. **(B)** AMPK fosforilada (pAMPK). KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada). * vs. grupo KH; # vs. grupos A e AC.

Concentração e translocação do GLUT-4

A figura 21 mostra a concentração do GLUT-4 em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas na concentração do GLUT-4, tanto na fração microsomal (figura 21.A) quanto na fração de membrana plasmática (figura 21.B). O mesmo foi observado em relação a translocação do GLUT4 (figura 21.C).

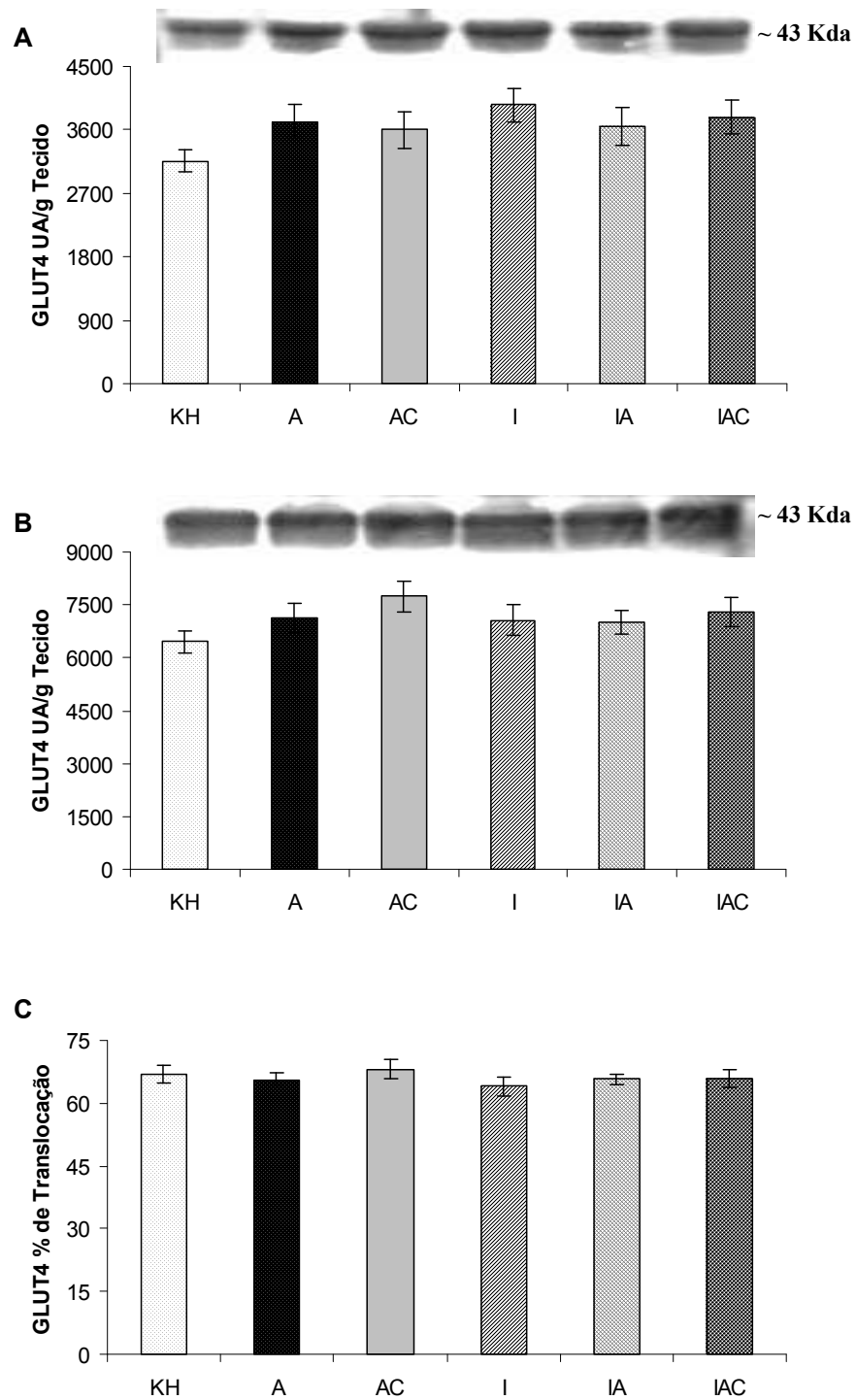


Figura - 21. Western blot representativo e quantificação do GLUT-4 em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. **(A)** Fração microsomal. **(B)** Fração de membrana. **(C)** Percentual de translocação. KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada).

Lipoperoxidação

A lipoperoxidação, um marcador de dano oxidativo às membranas celulares, foi avaliada através da medida de TBA-RS e quimiluminescência nos corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. No TBA-RS (figura 22.A), o grupo KH foi ~73% maior em relação aos outros grupos. Na quimiluminescência (figura 22.B), o grupo KH também foi maior (~2,2 vezes) em relação aos outros grupos; e o grupo IA foi ~35% menor em relação ao grupo A.

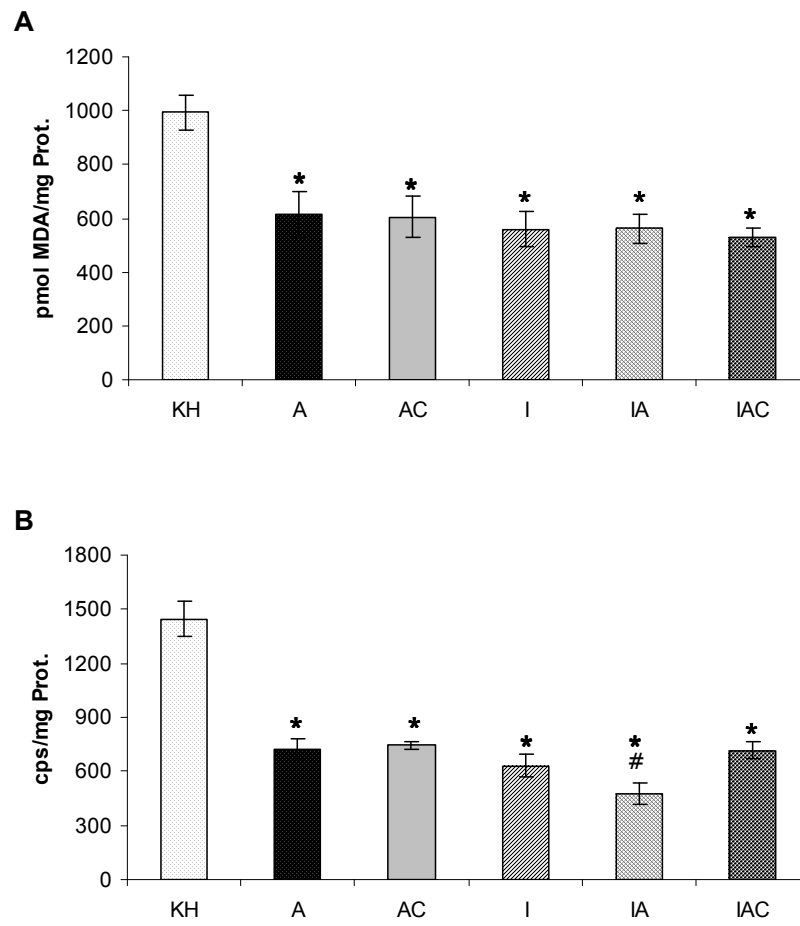


Figura - 22. Determinação da lipoperoxidação em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. **(A)** TBA-RS. **(B)** Quimiluminescência. KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada). * vs. grupo KH; # vs. grupo A.

Atividade das Enzimas Antioxidantes

A tabela 2 mostra a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GST) em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Nenhum dos grupos apresentou alterações significativas na atividade da SOD. A atividade da catalase foi ~28% maior no grupo KH em relação aos outros grupos (exceto o IA, $P = 0,058$). Na atividade da GST, o grupo insulina foi menor em relação ao grupo Angio e AC (~45% e ~50%, respectivamente).

Tabela 2. Atividade das enzimas antioxidantes em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão com diferentes tratamentos:

GRUPOS	ENZIMAS		
	<i>SOD</i>	<i>Catalase</i>	<i>GST</i>
KH	414 ± 41	27,4 ± 1,8	34,3 ± 3,8
Angio	324 ± 29	19,9 ± 1,5*	39,9 ± 5,6
AC	344 ± 28	20,5 ± 1,3*	43,9 ± 3,9
Insulina	308 ± 28	18,2 ± 1,6*	22,4 ± 2,2 [#]
IA	298 ± 22	22,5 ± 1,5 [‡]	30,8 ± 2,1
IAC	294 ± 25	20,1 ± 2,4*	30,0 ± 2,6

KH (Krebs-Henseleit), Angio (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os resultados estão expressos como média ± EPM, $n = 5$. * vs. grupo KH; [#] vs. grupos Angio e AC; [‡] vs. grupo KH ($P = 0,058$).

Concentração das Enzimas Antioxidantes

A figura 23 mostra a concentração das enzimas antioxidantes (Cu/ZnSOD e GST) em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Na concentração da Cu/ZnSOD (figura 23.A), os grupos A, AC e IAC foram menores em relação ao grupo KH (~40%, ~43% e ~27%, respectivamente). O grupo I foi maior em relação aos grupos A e AC (~37% e ~41%, respectivamente). Os demais grupos estudados não apresentaram diferenças significativas (IA vs. AC, $P = 0,067$).

Nenhum dos tratamentos causou alterações significativas na concentração da enzima GST (figura 23.B).

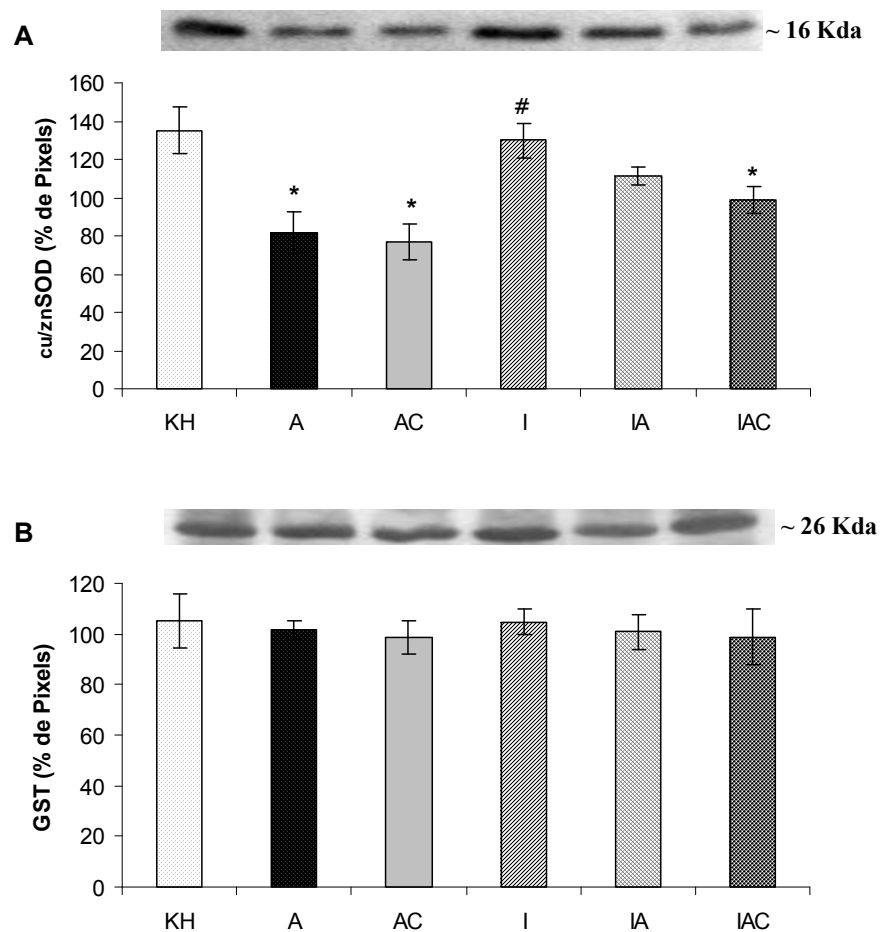


Figura - 23. Western blot representativo e quantificação das enzimas antioxidantes (Cu/ZnSOD e GST) em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. **(A)** Cu/ZnSOD . **(B)** GST. KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada). * vs. grupo KH; # vs. grupos A e AC.

Metabolismo do Óxido Nítrico

A figura 24 mostra os metabólitos do óxido nítrico (NOX) e a concentração da eNOS em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. Nenhum dos tratamentos causou alterações significativas nos níveis de NOX (figura 24.A) e nem na concentração da eNOS (figura 24.B).

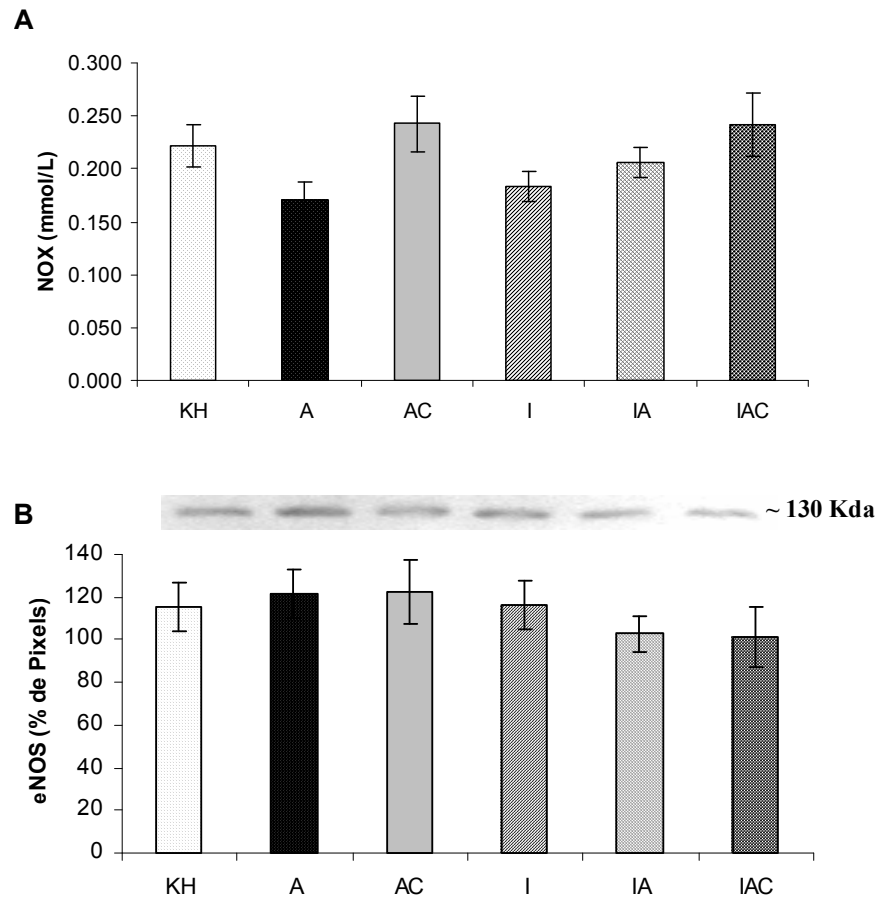


Figura - 24. (A) Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOX) em corações expostos à 20 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusão. (B) Western blot representativo e quantificação da enzima eNOS. KH (Krebs-Henseleit), A (angiotensina-I), AC (angiotensina-I + captopril), I (insulina), IA (insulina + angiotensina-I) e IAC (insulina + angiotensina-I + captopril). Os dados são representados como média \pm EPM ($n = 5$ cada).

DISCUSSÃO

Nesse estudo, demonstramos que a administração de insulina após isquemia, no início do período de reperfusão, reverte os efeitos deletérios da angiotensina-II sobre a contratilidade cardíaca, mas não sobre a pressão de perfusão, no modelo de isquemia-reperfusão em coração isolado. Este efeito cardioprotetor é mediado, ao menos parcialmente, pela Akt, que modula o estado redox celular, e pode atuar sinergicamente com a AMPK para melhorar o estado metabólico do miocárdio, apesar de não ter ocorrido alteração na translocação do GLUT-4 durante a reperfusão. Além disso, a combinação da insulina com um inibidor do sistema renina angiotensina (captopril) não promoveu um efeito cardioprotetor adicional ao uso da insulina na reversão dos efeitos deletérios da angiotensina-II durante a reperfusão. É possível que o efeito antioxidante do captopril exerça um efeito negativo sobre a sinalização intracelular da insulina. Demonstramos também que o uso de captopril, apesar de não exercer nenhuma ação sobre a Akt e sobre a AMPK, atenua e/ou reverte os efeitos da angiotensina-II sobre a contratilidade cardíaca, mas não sobre a pressão de perfusão.

Muitos estudos demonstraram que a angiotensina-I e/ou angiotensina-II reduzem a contratilidade do miocárdio e/ou causam constrição das artérias coronárias [155, 182], mas outros não relatam nenhum efeito deletério induzido por estes compostos [183]. Nesse estudo, a infusão de angiotensina-I resultou numa marcada redução na recuperação da função cardíaca após o estabelecimento da disfunção cardíaca induzida pela isquemia, como indicado pelas menores PVDes e $dP/dt_{m\acute{a}x}$, assim como, pelas maiores PVD e PP.

Os efeitos deletérios da angiotensina-I sobre a recuperação da contratilidade cardíaca foram revertidos total ou parcialmente pelo captopril (grupo AC), mas este não reverteu os efeitos da angiotensina-I sobre a PP. O fato do captopril reverter os efeitos da angiotensina-I sobre a função cardíaca demonstra que estes efeitos dependem de uma conversão local da angiotensina-I para angiotensina-II. Múltiplos fatores podem estar

envolvidos na cardioproteção às lesões de reperfusão apresentada pelos iECA: eles diminuem infiltração leucocitária [184], possuem efeitos anti-inflamatórios [185], efeitos antioxidantes [17], e efeitos mediados por aumentar os níveis de bradicinina e de prostaglandina [186]. Possivelmente a incapacidade do captopril em reverter os efeitos da angiotensina-I sobre a PP deva-se a sua atividade intrínseca, pois a formação de angiotensina-II em coração de rato intacto depende principalmente da atividade da enzima conversora da angiotensina [168-170]. No entanto, vias enzimáticas alternativas que formam a angiotensina-II (ex.: quimase, calicreína e catepsina-G) podem ser ativadas em condições patológicas [96]. Devemos considerar ainda que o efeito do captopril sobre a PVDs não foi estatisticamente significativo ($P = 0,055$), provavelmente pelo número amostral pequeno.

Neste estudo, demonstramos que a insulina combinada a angiotensina-I (grupo IA) ou a angiotensina-I e captopril (grupo IAC) reverte os efeitos da angiotensina-II sobre a função cardíaca, como observado pelas maiores PVDs e $dP/dt_{máx}$, assim como pela menor PVD. Adicionalmente, o grupo IA apresentou um melhor duplo produto em relação ao grupo Angio, mas este efeito foi atenuado pela adição do captopril (grupo IAC), que pode exercer um efeito inibitório sobre as vias de transdução do sinal da insulina, como discutido abaixo. Esses dados corroboram os de outros estudos, que demonstraram que a insulina melhora a função contrátil do miocárdio durante a reperfusão [16, 67, 178, 192], apesar destes não utilizarem angiotensina no perfusato.

No entanto, a insulina não reverteu os efeitos da angiotensina-II sobre a PP. Apesar da insulina causar vasodilatação dose e tempo-dependente, no coração e nos vasos periféricos [59, 60], este efeito pode estar prejudicado em situações patológicas [60, 61]. Devemos salientar ainda, que a dose de insulina utilizada não provocou nenhuma alteração na função cardíaca quando comparada ao grupo KH, o que ratifica nossa afirmação de que a insulina opõe-se aos efeitos deletérios da angiotensina-II sobre a função cardíaca.

Vários estudos têm demonstrado que as vias de transdução do sinal da insulina e da angiotensina-II compartilham um grande número de moléculas efetoras e através destas, um hormônio pode modular a resposta celular do outro [150-153].

Estudos realizados *in vivo* e em cultura de células mostraram que, assim como a insulina, a angiotensina-II é capaz de fosforilar os IRS-1/2 em resíduos de tirosina [150, 151], de forma dependente da JAK-2 [150]. No entanto, de modo contrário ao estímulo da insulina, a atividade da via PI3-k/Akt encontra-se diminuída após a fosforilação dos IRS-1/2 pela angiotensina-II [151-153].

Os resultados desse estudo corroboram os estudos citados acima, uma vez que demonstramos que a insulina aumentou a fosforilação da Akt e que a angiotensina-I isoladamente não exerceu nenhum efeito sobre sua fosforilação. No entanto, quando associamos os dois hormônios (insulina + angiotensina, grupo IA), a angiotensina-I não inibiu o efeito da insulina sobre a fosforilação da Akt. Este efeito contraditório resulta provavelmente de diferenças nas condições experimentais. Em nosso estudo, na busca de doses mais próximas das fisiológicas, utilizamos uma concentração de 100 nmol/L de angiotensina-I, que se estima ter um efeito quatro vezes menor do que a mesma concentração de angiotensina-II [155], e nos estudos referidos a menor concentração utilizada foi de 100 nmol/L de angiotensina-II. A associação da angiotensina-I com o captopril (grupo AC) não exerceu nenhum efeito sobre a fosforilação da Akt. No entanto, quando associamos insulina, angiotensina-I e captopril (grupo IAC), o captopril exerceu um efeito inibitório sobre a capacidade da insulina em fosforilar a Akt.

Numerosos estudos têm mostrado que a insulina estimula a produção de baixas concentrações de H₂O₂, e este atua como segundo mensageiro, exercendo um papel importante na transdução do sinal da insulina [198-201]. Esta produção de H₂O₂ estimulada pela insulina pode ser bloqueada pela enzima antioxidante catalase [201]. Deste modo, o efeito inibitório do captopril sobre a capacidade da insulina em fosforilar a Akt

pode se dever a sua propriedade antioxidante [17]. No entanto, alguns estudos relataram que o captopril pode aumentar a fosforilação da via PI3k-Akt [202, 203], mas estes estudos foram realizados em fígado e músculo de ratos velhos [202] e no coração de camundongos (ob/ob) [203], condições estas de resistência à insulina onde os iECA parecem ter um efeito melhor [118].

Nos processos de isquemia-reperusão a produção energética é comprometida e há um aumento na relação AMP/ATP, o que resulta na fosforilação e ativação da AMPK [204]. A AMPK atua como um sensor energético intracelular, e ativada inibe as vias de consumo de ATP (ex.: síntese de ácidos graxos e de colesterol) e ativa as vias que geram ATP (ex.: glicólise e oxidação de ácidos graxos), mantendo assim o balanço energético intracelular [205, 206]. Neste estudo a angiotensina-I, isolada ou combinada ao captopril (grupo AC), não exerceu nenhum efeito sobre a fosforilação da AMPK. No entanto, divergindo de outros estudos [207, 208], nos grupos tratados com insulina (grupos I, IA e IAC) houve um aumento da fosforilação da AMPK.

Dados de literatura mostraram que, a insulina ativando a Akt promoveria uma inibição da ativação da AMPK [207, 208], contudo estes relatos aplicam-se na ausência de hipóxia. Entretanto, em estudos realizados sob condições de estresse metabólico, como isquemia [209] e exposição ao frio [210], os efeitos da insulina sobre a fosforilação da AMPK são reduzidos ou ausentes. Adicionalmente, Fisher e cols. (2002) [211] sugerem que durante a hipóxia e exercício, a ativação da AMPK pode aumentar a sensibilidade à insulina. De fato, existem evidências de que a AMPK ativada poderia contribuir para a captação de glicose pelo músculo por pelo menos dois mecanismos: aumentando a translocação do transportador de glicose GLUT-4 e aumentando a sensibilidade à insulina [212, 213]. Estes estudos sugerem que em condições de estresse metabólico possa ocorrer uma inibição no *cross-talk* entre as vias da insulina e da AMPK. Além disso, a ativação de cinases e/ou a inibição de fosfatases podem ativar a AMPK, mesmo com a Akt ativada

[214]. Deste modo, é possível que sob condições de estresse a insulina possa ativar ou manter ativa a AMPK, exercendo algum tipo de modulação sobre as cinases e/ou fosfatases que regulam a atividade desta enzima.

Em cardiomiócitos isolados de ratos, a insulina, e também a isquemia (hipóxia) estimulam o transporte de glicose e translocação dos GLUT-1 e -4 do interior da célula para sua superfície. O GLUT-1 é o responsável primariamente pela captação basal de glicose, tendo sua importância aumentada na ausência do GLUT-4 [39] e na isquemia cardíaca [40]. Nesse estudo, apesar das vias responsáveis por estimular a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, PI3k-Akt e AMPK, terem sido ativadas nos grupos tratados com a insulina (grupos I, IA e IAC), quando avaliamos a concentração do GLUT-4 nas frações microssomal e plasmática, não observamos nenhuma diferença no percentual de translocação (~67%) entre os tratamentos. Estudos utilizando um protocolo de fracionamento similar ao utilizado nesse, demonstraram que 15 min de isquemia são capazes de provocar aumento de ~41% de translocação do GLUT-4, enquanto que o uso de insulina pode provocar aumento de ~61% de translocação [215, 216]. A combinação de ambos não resultou em translocação adicional à provocada pela insulina [215, 216]. Assim, o tempo de isquemia utilizado nesse estudo (20 min) pode ter esgotado a capacidade celular de translocar o GLUT-4 para a membrana plasmática, por isso não encontramos diferenças entre os tratamentos. O sistema nervoso simpático, através da liberação de catecolaminas, também pode estimular a translocação dos GLUT-1/4 para a membrana [217, 218]. No modelo de coração isolado, aqui empregado, as terminações nervosas simpáticas são fonte de noradrenalina, deste modo, devemos considerar uma possível participação do sistema nervoso simpático.

Numerosos estudos demonstraram não haver uma relação direta entre o conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática e a magnitude da captação de glicose estimulada pela insulina [219, 220]. Esta discrepância entre a translocação do GLUT-4 e a captação de

glicose sugere que este transportador possua uma atividade intrínseca, que pode também ser regulada (aumentada) pela insulina [219, 220]. Deste modo, apesar de não termos avaliado a captação de glicose, é possível que os grupos tratados com insulina tenham uma captação de glicose aumentada.

O aumento na produção das EROs pode causar vários efeitos deletérios, tais como aumento da lipoperoxidação das membranas, carbonilação de proteínas e danos ao DNA, podendo causar a morte celular [221]. Vários estudos experimentais [15-17] e clínicos [222, 223] demonstraram um aumento no estresse oxidativo associado ao dano celular e o tamanho do infarto, causado pelas EROs produzidas durante o período de reperfusão. Nesse estudo, observamos um aumento significativo na lipoperoxidação avaliada por TBA-RS e quimiluminescência no grupo KH em relação aos demais grupos. Estudos têm demonstrado que a angiotensina-1-7, um metabólito da angiotensina-II tem ações opostas às induzidas pela angiotensina-II [224, 225] e através da liberação de NO• e prostaglandinas pode entre outras ações, causar vasodilatação [226] e inibir a proliferação celular [227]. Por outro lado, tem se demonstrado que a reperfusão controlada ou pós-condicionamento pode proteger o miocárdio da lesão de reperfusão [11, 12, 223]. Assim, a menor lipoperoxidação encontrada no grupo angiotensina-I em relação ao grupo KH, pode ser devido aos efeitos da angiotensina-1-7 ou a restrição do fluxo causada pela angiotensina-II, onde uma menor exposição ao oxigênio pode diminuir a produção de EROs. A associação da insulina com a angiotensina-I (grupo IA) provocou uma diminuição na lipoperoxidação (quimiluminescência) em relação ao grupo Angio. Este efeito deveu-se provavelmente aos efeitos da insulina: metabólicos, antiinflamatórios, antiapoptóticos, entre outros [228], associados possivelmente aos efeitos da angiotensina-1-7 [224].

As enzimas antioxidantes intracelulares têm alto potencial redutor, e fazem parte do mecanismo de proteção do organismo contra a formação das EROs durante a isquemia-

reperfusão [229]. Nesse estudo demonstramos que a angiotensina-I, isolada ou combinada ao captopril (grupo AC), causou uma diminuição na expressão da SOD e na atividade da catalase em relação ao grupo KH. A angiotensina-II pode causar hipertensão arterial por elevar a produção do anion superóxido [230] e por diminuir a expressão de enzimas antioxidantes no córtex renal [231]. Adicionalmente, o captopril devido a sua propriedade antioxidante [17] pode exercer um efeito inibitório sobre as vias sinalizadoras que controlam a expressão gênica. Embora, em situações patológicas o tratamento crônico com captopril possa ter um efeito benéfico sobre a expressão das enzimas antioxidantes [232, 233]. Assim, as alterações encontradas nesse estudo podem dever-se tanto a capacidade da angiotensina-II, como do captopril em alterar a atividade e/ou a expressão das enzimas antioxidantes.

Demonstramos também que a insulina atenuou os efeitos da angiotensina-I sobre a expressão da SOD (grupo IA), mas não teve efeito quando esta foi associada ao captopril (grupo IAC). Este efeito protetor da insulina sobre a expressão da SOD deve-se provavelmente a sua capacidade de expressar uma grande variedade de genes, mas este efeito pode ser reduzido pelo captopril, uma vez que demonstramos que ele inibe a fosforilação da Akt. A insulina reduz a atividade da GST em ~50% em relação aos grupos Angio e AC. E quando comparados os efeitos de sua associação (grupo IA e IAC) aos efeitos da angiotensina (grupo Angio e AC), observa-se uma redução de ~25% na atividade da GST, embora não significativa ($P=0,08$).

A GST é uma enzima muito importante na detoxificação de xenobióticos, e o aumento de sua expressão e/ou atividade sugere uma condição de estresse oxidativo [234]. Estudos indicam que a insulina aumenta a síntese de glutathione, considerada o maior antioxidante hidrossolúvel endógeno [235, 236]. Adicionalmente, cardiomiócitos de ratos diabéticos apresentam uma marcante disfunção mecânica que pode ser melhorada pela insulina. Nestes, a insulina normaliza os níveis de glutathione, e esta promove um melhor

controle redox das proteínas que regulam o transporte do cálcio e a contratilidade [236]. Assim, nos grupos tratados com a insulina, um provável aumento nos níveis de glutathione induz a remoção das EROs, com conseqüente redução na atividade da GST. Por outro lado, o aumento na atividade das enzimas catalase (~26%) e SOD (~23%, $p > 0,05$) no grupo KH em relação aos demais grupos, pode ser um mecanismo compensatório frente ao dano celular causado pelo estresse oxidativo [229], na ausência de um controle hormonal.

Embora não se tenha observado alteração nos metabólitos do $\text{NO}\cdot$ em todas as situações estudadas, um aumento da atividade da eNOS poderia estar associada com o aumento da produção de ONOO^- (não avaliado), indicando um possível envolvimento das espécies reativas de nitrogênio nessas circunstâncias. Este potente agente oxidante formado pela reação do $\text{NO}\cdot$ com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), indiretamente poderia também ativar a AMPK [212] e dessa forma estar envolvido no papel da insulina nessa ativação. Vale ressaltar que o ONOO^- não ativa diretamente a AMPK, mas induz a formação de intermediários ou outras moléculas capazes de ativar a LKB1, uma das enzimas responsáveis pela fosforilação e conseqüente ativação da AMPK [212].

Deste modo, concluímos que a insulina apresenta um efeito cardioprotetor à lesão de reperfusão opondo-se aos efeitos deletérios da angiotensina-II sobre a função cardíaca. Este efeito deve-se à ativação da via PI3k-Akt que parece exercer uma melhor regulação do estado redox celular e pode ainda atuar sinergicamente com AMPK para um melhor perfil metabólico do miocárdio. O uso de insulina após 20 min de isquemia global, não promove um efeito adicional na translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, além daquele induzido pela isquemia. Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao captopril sobre a função cardíaca, quando ele foi associado à insulina, atenuou a capacidade desta em opor-se às ações da angiotensina-II durante a reperfusão. No entanto, o captopril apesar de menos eficaz em relação à insulina, atenuou e/ou reverteu os efeitos deletérios da

angiotensina-II sobre a contratilidade cardíaca, apesar dos mecanismos moleculares pelos quais ele exerce este efeito continuarem obscuros.

CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos apresentados mostram que 20 min de isquemia global é o melhor período para o estudo da disfunção contrátil leve/moderada do miocárdio, de modo que possa ser atenuada ou agravada pelo uso de drogas. Períodos de isquemia maiores podem levar a lesão severa do miocárdio, com o desenvolvimento de contração isquêmica, que não pode ser revertida pelo uso de drogas durante o período de reperfusão. Demonstramos também, que a insulina apresenta um efeito cardioprotetor à lesão de reperfusão opondo-se aos efeitos deletérios da angiotensina-II sobre a função cardíaca. Este efeito deve-se a ativação da via PI3k-Akt que parece exercer uma melhor regulação do estado redox celular e pode ainda atuar sinergicamente com a AMPK para um melhor perfil metabólico do miocárdio. O uso de insulina após 20 min de isquemia global não promove um efeito adicional na translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, além daquele induzido pela isquemia. Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao captopril sobre a função cardíaca, quando ele foi associado a insulina, atenuou a capacidade desta em opor-se às ações da angiotensina-II durante a reperfusão. No entanto, o captopril apesar de menos eficaz em relação a insulina, atenuou e/ou reverteu os efeitos deletérios da angiotensina-II sobre a contratilidade cardíaca, conforme esperado, apesar dos mecanismos moleculares pelos quais ele exerce este efeito continuarem obscuros.

Entretanto, devemos ter muita cautela em extrapolar estes resultados para um modelo *in vivo*, pois nesse modelo não temos as plaquetas e os leucócitos circulantes, que amplificam a citotoxicidade e a disfunção dos cardiomiócitos. Além disso, não utilizamos ácidos graxos no perfusato, que são o substrato preferencial do miocárdio. Apesar destas limitações, os resultados reforçam os efeitos benéficos do uso da insulina no tratamento da lesão de reperfusão, estimulando assim novas pesquisas clínicas com a administração da insulina no momento da reperfusão, onde o seu efeito cardioprotetor possa realmente ser observado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, et al. Heart disease and stroke statistics: 2006 update - A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113:e85-e151.
2. RIPSAs - Rede Interagencial de Informação para a Saúde. Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações – 2 ed. – Brasília: OPAS, 2008. www.saude.gov.br/ripsa
3. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*. 2000;109(4):315-23.
4. Manfroi WC, Peukert C, Berti CB e cols. Infarto Agudo do Miocárdio. Primeira Manifestação da Cardiopatia Isquêmica e Relação com Fatores de Risco. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78(4):288-91.
5. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999; 6:167-78.
6. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*. 1998; 40:426-32.
7. Rogers WJ, Coggin CJ, Gersh BJ, et al. Ten-year follow-up of quality of life in patients randomized to receive medical therapy or coronary artery bypass graft surgery. The Coronary Artery Surgery Study (CASS). *Circulation*. 1990;82(5):1859-62.
8. Gersh BJ. Current issues in reperfusion therapy. *Am J Cardiol*. 1998;82:3P-11P.
9. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*. 1999;138:S69-75.
10. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol*. 1993;21(2):537-45.
11. Sato H, Jordan JE, Zhao ZQ, Sarvotham SS, Vinten-Johansen J. Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg*. 1997;64:1099–107.
12. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986;92:613–20.
13. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2004–8.
14. Gumina RJ, Moore J, Schelling P, Beier N, Gross GJ. Na(+)/H(+) exchange inhibition prevents endothelial dysfunction after I/R injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H1260-6.
15. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jul;27(1-2):160-9.
16. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res*. 2001;89:1191–8.

17. Anderson B, Khaper N, Dhalla AK. Anti free radical mechanism in captopril protection against reperfusion injury in isolated rat hearts. *Can J Cardiol*. 1996;10:1099-104.
18. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3th ed. Oxford University Press Inc, NY, 1999.
19. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res*. 2000;86:541-8.
20. Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2321-8.
21. Manintveld OC, Te Lintel HM, van den Bos EJ, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1551-60. Epub 2006 Nov 22.
22. Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9:245-9.
23. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001;104:2981-9.
24. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*. 2004;23:265-95.
25. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. 2000;45:651-60.
26. Gen W, Tani M, Takeshita J, Ebihara Y, Tamaki K. Mechanisms of Ca₂⁺ overload induced by extracellular H₂O₂ quiescent isolated rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:623-9.
27. Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*. 2001;38:713-21.
28. Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW & Figueredo VM. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺] mitochondrial overload in rat hearts. *Am J Physiol*. 1996;271:H2145-53.
29. Igarashi-Saito K, Tsutsui H, Yamamoto S, Takahashi M, Kinugawa S, Tagawa H, et al. Role of SR Ca²⁺-ATPase in contractile dysfunction of myocytes in tachycardia induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;275:H31-40.
30. Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2003;60:617-25.
31. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307(Pt 1):93-8.

32. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:339-41.
33. Kahn CR, Saltiel AR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806.
34. Carvalheira J, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(4):419-25.
35. Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res.* 1997;34:3-24.
36. Sundell J, Knuuti J. Insulin and myocardial blood flow. *Cardiovasc Res.* 2003;57:312-9.
37. Hansen T, Thiel S, Wouters PJ, Christiansen JS, Van Den Berghe G. Intensive insulin therapy exerts antiinflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effect of low manose-binding lectin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1082-8.
38. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Cristopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: The roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation.* 2002;105:1497-502.
39. Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, et al. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol.* 1997;80(3A):65A-76A.
40. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, et al. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions: potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res.* 1997;33:243-57.
41. Goodwin GW, Taylor CS, Taegtmeier H. Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J Biol Chem.* 1998;273:29530-9.
42. Olson AL, Pessin J. Structure, function and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Ann Rev Nutr.* 1996;16:235-56.
43. Young LH, Russell R 3rd, Yin R, Caplan MJ, Ren J, Bergeron R, et al. Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. *Am J Cardiol.* 1999;83(12A):25H-30H.
44. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, et al. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochem Biophys Acta.* 1994;1213:263-76.
45. Liu B, El Aloui-Talibi Z, Clanachan AS, et al. Uncoupling of contractile function from mitochondrial TCA cycle activity and MVO₂ during reperfusion of ischemic hearts. *Am J Physiol.* 1996;260:H72-80.
46. Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, Hamsten A, Efendic S, Rydén L, Malmberg K. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet.* 2002;359:2140-4.

47. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. Regulation of energy substrate in the diabetic heart. *Cardiovasc Res.* 1997;34:25-33.
48. Malmberg K, Ryden L, Efendic S. Randomized trial of insulin-glucose infusion followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI Study): effects on mortality at 1 year. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:57-65.
49. Fath-Ordoubadi F, Beatt KJ. Glucose-insulin-potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials. *Circulation.* 1997;96:1152-6.
50. Bothe W, Olschewski M, Beyersdorf F, Doenst T. Glucose-insulin-potassium in cardiac surgery: a meta-analysis. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:1650-7.
51. Raitakari M, Knuti MJ, Ruotsalainen U, Laine H, Makea P, Teras M, et al. Insulin increases blood volume in human skeletal muscle: studies using [¹⁵O]CO and positron emission tomography. *Am J Physiol.* 1995;269:E1000-5.
52. Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996;98:894-8.
53. Bergandi L, Silvagno F, Russo I, Rignti C, Anfossi G, et al. Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2215-21.
54. Tack C, Lutterman JA, Vervoort G, Thien T, Smits P. Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilatation in humans. *Hypertension.* 1996;28:426-32.
55. Wiecha J, Reineker K, Reitmayer M, Voisard R, Hannekum A, et al. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human vascular cells by insulin and basic fibroblast growth factor. *Growth Horm IGF Res.* 1998;8:175-81.
56. Kin YC, Zemel MB. Insulin increases vascular smooth muscle recovery from intracellular calcium loads. *Hypertension.* 1993;22:74-7.
57. Scherrer U, Sartori C. Insulin as a vascular and sympatho excitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity and cardiovascular morbidity. *Circulation.* 1997;96:4104-13.
58. Eringa EC, Stehouwer CD, van Nieuw AGP, Ouwehand L, Westerhof N, Sipkema P. Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK1/2 activation in endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2043-8.
59. Sundell J, Nuutila P, Luotolahti M, Knuuti J, et al. Dose-dependent vasodilating effects of insulin on adenosine-stimulated myocardial blood flow. *Diabetes.* 2002;51:1125-30.
60. Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res.* 2001;38(5):415-22.
61. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction

- characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H813-22.
62. Das UN. Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. *Med Sci Monitor.* 2003;9(8):RA181-92.
 63. Tziakas DN, Chalikias GK, Hatzinikolaou HI, Parissis JT, Papadopoulos ED, Trypsianis GA, et al. Anti-inflammatory cytokine profile in acute coronary syndromes: behavior of interleukin-10 in association with serum metalloproteinases and proinflammatory cytokines. *Intern J Cardiol.* 2003;92(2-3):169-75.
 64. Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NFkB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:450-3.
 65. Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1419-22.
 66. Ghanim H, Mohnaty P, Aljada A, Chowhan S, Tripathy D, Dandona P. Insulin reduces the pro-inflammatory transcription factor, activation protein-1 (AP-1) in mononuclear cells (MNC) and plasma matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration. *Diabetes.* 2001;50(suppl 2):A408.
 67. Jonassen A, Aasum E, Riemersma RA, Mjos OD, Larsen TS. Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2000;14(6):615-23.
 68. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 2004;61:448–60.
 69. Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 1997;272(1):154-61.
 70. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:57–63.
 71. Baxter GF, Mocanu MM, Brar BK, Latchman DS, Yellon DM. Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:930–9.
 72. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91:231–41.

73. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the proapoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(17):9666–70.
74. Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. p90(RSK) blocks bad mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(49):34859–67.
75. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*. 1996;87(4):629–38.
76. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14–3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*. 2000;6:41–51
77. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*. 1999;286(5443):1358–62.
78. Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*. 2001;20(53):7779–86.
79. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998;281(5385):2027–31
80. Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem*. 1997;246(3):710-8.
81. Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans*. 2003 Feb;31(Pt 1):292-7.
82. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol*. 2002;156:531–42.
83. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98, 11598–603.
84. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 1999;401(6748):86–90.
85. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvasen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282:1318–21.
86. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell*. 2006;21:749–60.

87. Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol.* 1999;19(8):5308–15.
88. Terada K, Kaziro Y, Satoh T. Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267(1):449–55.
89. Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 2006;11:1583–93.
90. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2001;21:893–901.
91. Beevers D, Lip GH, O'Brien E. ABC of hypertension - the pathophysiology of hypertension. *Br Med J.* 2001;322:912-6.
92. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 1998;32:387-92.
93. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:227-41.
94. Tamura K, Umemura S, Fukamizu A, Ishii M, Murakami K. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. *Hypertension Res.* 1995;18:7-18.
95. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension.* 1999;34:1265-74.
96. Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension.* 2000 Oct;36(4):638-41.
97. Hilgrs KF, Bingener E, Stumpf C, Müller DN, Schmieder RE, Veelken R. Angiotensinases restrict locally generated angiotensin II to the blood vessel wall. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2):368-72.
98. Ferrario CM, Chappell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2720-7.
99. Oudot A, Vergely C, Ecartot-Laubriet A, Rochette L. Pharmacological concentration of angiotensin-(1–7) activates NADPH oxidase after ischemia–reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation. *Regulatory Peptides.* 2005;127:101–10.
100. Itoh H, Muloyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1993;91:2268-72.

101. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998;39:89-105.
102. Prasad A, Quyyumi A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation*. 2004;110:1507-12.
103. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease: Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006;7:3-14.
104. Zafari A, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998;32:488-95.
105. Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park J-K, Fiebeler A, Barta P, et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002;2:3-14.
106. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: An in vitro gene transfer study. *Life Sci*. 1998;63:PL289-95.
107. Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA, et al. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation*. 2005;112:3328-36.
108. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Savedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179:1361-7.
109. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998;83:1182-91.
110. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and 2 receptors to vascular remodeling is spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:467-72.
111. Hutchinson HG, Hein L, Fujinaga M, Pratt RE. Modulation of vascular development and injury by angiotensin II. *Cardiovasc Res*. 1999;41:689-700.
112. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999;104:925-35.
113. Akishita M, Yamada H, Dzau VJ, Horiuchi M. Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:345-9.
114. Sigary HM. The role of the AT₂ receptor in hypertension. *Am J Hypertens*. 2000;13:S62-7.
115. Sigary HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol*. 1996;271:R1090-5.
116. Hoenaek C, Roesen P. Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes*. 1996;45(Suppl 1):S82-7.

117. Hammoud RA, Vaccari CS, Nagamia SH, Khan BV. Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: A review of the literature. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(1):1-9.
118. Shiuchi T, Cui TX, Wu L, et al. ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension.* 2002;40:329-34.
119. Okamoto MM, Sumida DH, Carvalho CRO, Vargas AM, Heimann JC, Schaan BDA, et al. Changes in dietary sodium consumption modulate GLUT4 gene expression and early steps of insulin signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R779-85.
120. Prada PdO, Okamoto MM, Furukawa LNS, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or Low-Salt Diet From Weaning to Adulthood: Effect on Insulin Sensitivity in Wistar Rats. *Hypertension.* 2000;35(1):424-9.
121. The DREAM (Diabetes reduction assessment with ramipril and rosiglitazone medication) Trial investigators. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med.* 2006;355:1551-62.
122. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet.* 2000;355(9200):253-9.
123. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension study (LIFE): A randomized trial against atenolol. *Lancet.* 2002;359:995-1003.
124. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: The VALUE randomized trial. *Lancet.* 2004;363:2022-31.
125. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in cultured smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74:1141-8.
126. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, et al. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997;95:588-93.
127. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109:33-44.
128. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1456-62.
129. Harrison DG. Endothelial function and oxidat stress. *Clin Cardiol.* 1997; 20(suppl II):11-7.
130. Tomasian D, Keaney JF, Vita JÁ. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 2000;47:426-35.
131. Wang W, Wang S, Yan L, et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000;275:16899-903.
132. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res.* 2000;87:566-73.

133. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂-imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*. 1999;48:2437-45.
134. Xia Y, Tsai AL, Berka V, et al. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase: a Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998; 273:25804-8.
135. Mancini JGB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996;94:258-65.
136. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, et al. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101:2349-54.
137. Yue T-L, Wang C, Gu J-L, Ma X-L, Kumar S, Lee JC, et al. Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Enhances Ischemia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in Cultured Cardiac Myocytes and Exaggerates Reperfusion Injury in Isolated Perfused Heart. *Circ Res*. 2000;86(6):692-9.
138. Schmitz U, Ishida M, Surapitschat J, Hasham MI, Pelech S, Berk BC. Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ Res*. 1998;82:1272-78.
139. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-31.
140. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive Substances Regulate Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis: Countervailing Influences of Nitric Oxide and Angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79(4):748-56.
141. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II Induces Apoptosis of Human Endothelial Cells: Protective Effect of Nitric Oxide. *Circ Res*. 1997;81(6):970-6.
142. Effects of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (the EUROPA study). *Lancet*. 2003;362:782-8.
143. Al-Mallah M, Tleyjeh I, Abdel-Latif A, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in coronary artery disease and preserved left ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1576-83.
144. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: The OPTIMAAL randomized trial. *Lancet*. 2002;360:752-60.
145. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomized trial. *Lancet*. 1999;353:611-6.

146. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): Principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens*. 2003;21:875-86.
147. Nickenig G, Roling J, Strehlow K, Schnabel P, Bohm M. Insulin Induces Upregulation of Vascular AT1 Receptor Gene Expression by Posttranscriptional Mechanisms. *Circulation*. 1998;98(22):2453-60.
148. Kamide K, Hori MT, Zhu J-H, Barrett JD, Eggena P, Tuck ML. Insulin-Mediated Growth in Aortic Smooth Muscle and the Vascular Renin-Angiotensin System. *Hypertension*. 1998;32(3):482-7.
149. Morrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: role of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol*. 1998;275:C1216-23.
150. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJA, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *PNAS*. 1996;93(22):12490-5.
151. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:16047-52.
152. Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C. Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinol*. 2000;14:795-804.
153. Cui T-X, Nakagami H, Nahmias C, Shiuchi T, Takeda-Matsubara Y, et al. Angiotensin II Subtype 2 Receptor Activation Inhibits Insulin-Induced Phosphoinositide 3-Kinase and Akt and Induces Apoptosis in PC12W Cells. *Mol Endocrinol*. 2002;16:2113-23.
154. Langendorff O. Untersuchungen am uberlebenden saugtierherzen. *Pflügers Arch Ges Physiol*. 1895;61:291-332.
155. Traquandi C, Riva E. Cardiac effects of angiotensin I and angiotensin II: dose-response studies in the isolated perfused rat heart. *Pharmacol Res*. 1998; 37(1):57-65.
156. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. *Tumor*. 1985;71:241-9.
157. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
158. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol*. 1978; 52:302-10.
159. Gonzalez-Flecha B, Llesuy SF, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med*. 1991;10:41-7.
160. Marklund S. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, 1985.
161. Mannervik B, Gluthenberg C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*. 1981;77:231-5.

162. Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 2nd ed. Grune & Stratton, NY, 1975.
163. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*. 1999;301:58-61.
164. Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, Masuzaki H, et al. Troglitazone Induces GLUT4 Translocation in L6 Myotubes. *Diabetes*. 2001; 50:1093–101.
165. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
166. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*. 1983;131:1-13.
167. Timmons TM, Dunbar BS. Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol*. 1990;182:679-88.
168. de Lannoy LM, Danser AHJ, Bouhuizen AMB, Saxena PR, Schalekamp MADH. Localization and production of angiotensin II in isolated perfused rat heart. *Hypertension*. 1998;31:1111-17.
169. Müller DN, Fischli W, Clozel JP, et al. Local angiotensin II generation in the rat heart. Role of renin uptake. *Circ Res*. 1998;82(1):13-20.
170. de Lannoy LM, Schuijt MP, Saxena PR, et al. Angiotensin converting enzyme is the main contributor to angiotensin I-II conversion in the interstitium of the isolated perfused rat heart. *J Hypertens*. 2001;19:959-65.
171. Gurevitch J, Pevni D, Frolkis I, Matsa M, Paz Y, et al. Captopril in cardioplegia and reperfusion: Protective effects on the ischemic heart. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:627-33.
172. Isbir CS, Dogan R, Farsk B and Aydin M. The effect of captopril on membrane bound enzymes in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg*. 2000;8(3):192-7.
173. Liu X, Lukasova M, Zubakova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U. Kallidin-like peptide mediates the cardioprotective effect of the ACE inhibitor captopril against ischaemic reperfusion injury of rat heart. *Br J Pharmacol*. 2006 Jul;148(6):825-32.
174. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*. 2004 Jul;62(1):97-106.
175. Chocron S, Alwan K, Toubin G, et al. Effects of myocardial ischemia on the release of cardiac troponin I in isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112:508-13.
176. Bertinchant JP, Polge A, Robert E, et al. Time-course of troponin I release from isolated perfused rat hearts during hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion. *Clin Chim Acta*. 1999;283:43-56.
177. Wang QD, Swardh A, Sjoquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiol Scand*. 2001 Feb;171(2):123-8.

178. Angelos MG, Murray HN, Gorsline RT, Klawitter PF. Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics. *Resuscitation*. 2002;55(3):329-36.
179. Klawitter PF, Murray HN, Clanton TL, Palmer BS, Angelos MG. Low flow after global ischemia to improve postischemic myocardial function and bioenergetics. *Crit Care Méd*. 2002 Nov;30(11):2542-7.
180. Bes S, Roussel P, Laubriet A, et al. Influence of deep hypothermia on the tolerance of the isolated cardiomyocyte to ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Nov;33(11):1973-88.
181. Neves LAA, Almeida AP, Klosla MC, Santos RA. Metabolism and angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50:1451-9.
182. Meulemans AL, Andries LJ, Brutsaert DL. Does endocardial endothelium mediate positive inotropic response to angiotensin I and angiotensin II? *Circ Res*. 1990 Jun;66(6):1591-601.
183. Ford WR, Clanachan AS, Hylei R, Jugdutt BI. Angiotensin II reduces infarct size and has no effect on pos-ischaemic contractile dysfunction in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol*. 2001;134:38-45.
184. Ferrari R, Pepi P, Nesta F, et al. Metabolic dearrangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol*. 1998;82:2k-13k.
185. Peng H, Carretero OA, Liao TD, Peterson EL, Rhaleb NE. Role of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in the antifibrotic and anti-inflammatory effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril in hypertension. *Hypertension*. 2007 Mar;49(3):695-703. Epub 2007 Feb 5.
186. Ehring T, Baumgart D, Krajcard M, et al. Attenuation of myocardial stunning by ACE inhibitor ramiprilat through a signal cascade of bradykinin and prostaglandins but not nitric oxide. *Circulation*. 1994;90:1368-85.
187. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):356-61.
188. Almeida AP, Fabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(6):709-13.
189. Mohanlal RW, Mauve I, Zoet ACM, Van Der Laarse A. Reperfusion induced enzyme release: washout effect or manifestation of reperfusion damage? *Cardiovasc Res*. 1988;22:603-10.
190. Poston JM, Parenteau GL. Biochemical effects of ischemia on isolated, perfused rat heart tissues. *Arch Biochem Biophys*. 1992;295:35-41. 190

191. Sodi-Pallares D, Testelli MR, Fishleder BL, Bisteni A, Medrano GA, Friedland C, De Micheli A. Effects of an intravenous infusion of potassium-insulina-glucose solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1962;9:166-181.
192. Doenst T, Richwine RT, Bray MS, Goodwin GW, Frazier OH, Taegtmeier H. Insulin improves functional and metabolic recovery of reperfused working rat heart. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1682–1688.
193. Zaha V, Francischetti I, Doenst T. Insulin improves postischemic recovery of function through PI3K in isolated working rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2003;247:229–232.
194. Mehta SR, Yusuf S, Diaz R, Zhu J, Pais P, Xavier D, Paolasso E, Ahmed R, Xie C, Kazmi K, Tai J, Orlandini A, Pogue J, Liu L. Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;293:437– 446.
195. Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, *et al.* A Clinical Trial of the Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor Trandolapril in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 1995;333(25):1670-1676.
196. Cohn JN, Tognoni G, The Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure. *N Engl J Med.* 2001;345(23):1667-1675.
197. Bernobich E, de Angelis L, Lerin C, Bellini G. The role of the angiotensin system in cardiac glucose homeostasis: therapeutic implications. *Drugs.* 2002;62(9):1295-1314.
198. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem.* 2001;276:21938-42.
199. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Rubby JM, Arnold RS, *et al.* The NAD(P)H oxidase homolog NOX4 modulates Insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol.* 2004;24:1844-54.
200. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Insulin actions is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes.* 2005;54:311-21.
201. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(7-8):1021–31.
202. Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JÁ, Velloso LA, Saad MJ. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes.* 1997;46(12):1950-7.
203. Tabbi-Anni I, Buchanan J, Cooksey RC, Abel ED. Captopril normalizes insulin signaling and insulin-regulated substrate metabolism in obese (ob/ob) mouse hearts. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):4043-50.
204. Hardie DG. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem Soc Symp.* 1999;64:13-27.

205. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003;546:113-20.
206. Russell R 3rd. Stress signaling in the heart by AMP-activated protein kinase. *Curr Hypertens Rep.* 2006 Dec;8(6):446-50.
207. Kovacic S, Soltys C-L M, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JRB. Akt Activity Negatively Regulates Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase in the Heart. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39422-27.
208. Hue L, Beauloye C, Marsin A-S, Bertrand L, Horman S, Rider MH. Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *J Mol Cel Cardiol.* 2002;34(9):1091-7.
209. Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Krause U, Hardie DG, Vanoverschelde JL, Hue L. Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides. *FEBS Letters.* 2001;505:348-52.
210. Roman EA, Cesquini M, Stoppa GR, Carvalheira JB, Torsoni MA, Velloso LA. Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals. *J Physiol.* 2005;568(3):993-1001.
211. Fisher JS, Gao J, Han D-H, Holloszy JO, Nolte LA. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E18-E23.
212. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo – role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004;279:43940-51.
213. Schimmack G, DeFronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2006;8:591-602.
214. Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Progress in Lipid Research.* 2003;42:238-56.
215. Brosius FC 3rd, Nguyen N, Egert S, Lin Z, Deeb GM, Haas F, et al. Increased sarcolemmal glucose transporter abundance in myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1997;80(3A):77A-84A.
216. Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M, Brosius FC 3rd. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation.* 1994;89:793-8.
217. Fischer Y, Thomas J, Holman GD, Rose H, Kammermeier H. Contraction independent effects of catecholamines on glucose transport in isolated rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1996;270: C1204-C1210.
218. Fischer Y, Kamp J, Thomas J, Pöpping S, Rose H, et al. Signals mediating stimulation of cardiomyocyte glucose transport by the α -adrenergic agonist phenylephrine. *Am J Physiol.* 1996; 270:C1211-C1220.

219. Montessuit C, Papageorgiou I, Remondino-Müller A, Tardy I, Lerch R. Post-ischemic stimulation of 2-deoxyglucose uptake in rat myocardium: role of translocation of Glut-4. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Feb;30(2):393-403.
220. Zaha V, Nitschke R, Göbel H, Fischer-Rasokat U, Zechner C, Doenst T. Discrepancy between GLUT4 translocation and glucose uptake after ischemia. *Mol Cell Biochem.* 2005 Oct;278(1-2):129-37.
221. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115:500-8.
222. Senthil S, Veerappan RM, Ramakrishna RM, Pugalendi KV. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 2004;348:131-7.
223. Yang XC, Liu Y, Wang LF et al. Reduction in Myocardial Size by Postconditioning in Patients after Percutaneous Intervention. *J Invasive Cardiol.* 2007;19:424-30.
224. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7) na update. *Regul Pept.* 2000;91:45-62.
225. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;14(8):1019-31.
226. Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(4):459-63.
227. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the Mas Receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1560-66.
228. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular Actions of Insulin. *Endocrine Reviews.* 2007;28:463-91.
229. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. *Am J Pathol.* 1996;148:291-300.
230. Alvarez A, Sanz MJ. Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *J Leukoc Biol.* 2001;70:199-206.
231. De Craemer D, Lobe E, Pauwels M, Verbeelen D, Branden CVd. Angiotensin II administration causes enhanced expression of glomerulosclerosis-related markers and decreased renal antioxidant enzymes activities in rats. *Exp Nephrol.* 2001;9:125-32.
232. Fu YF, Xiong Y, Guo Z. A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005 Jan;508(1-3):167-75.

233. Chen SX, Song T, Zhou SH, Liu YH, Wu SJ, Liu LY. Protective effects of ACE inhibitors on vascular endothelial dysfunction induced by exogenous advanced oxidation protein products in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr;584(2-3):368-75.
234. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
235. Langston W, Circu ML, Aw TY. Insulin stimulation of γ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression increases endothelial GSH during oxidative stress: Influence of low glucose. *Free Rad Biol Medic.* 2008;45(11):1591-9.
236. Li S, Li X, Li YL, Shao CH, Bidasee KR, Rozanski GJ. Insulin regulation of glutathione and contractile phenotype in diabetic rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:1619-29.

ANEXOS

Artigo submetido à Cardiovascular Pathology

**Functional Recovery in Isolated Rat Heart: role of ischemic periods
and renin-angiotensin system**

Ubirajara O. de Oliveira^{1,2}; Adriane Belló-Klein¹; Álvaro Reischak de Oliveira³; Luiz Carlos Rios
Kuchaski²; Ubiratan Fabres Machado⁴; Maria Claudia Irigoyen^{1,5}; Beatriz D'Agord Schaan⁶

1. Laboratory of Cardiovascular Physiology, Department of Physiology/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil
2. Laboratory of Metabolism and Comparative Endocrinology, Department of Physiology /Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Laboratory of Research of Exercise, Escola de Educação Física/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil
4. Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil
5. Laboratory of Experimental Hypertension, Unity of Hypertension, Instituto do Coração, HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil
6. Internal Medicine Department/UFRGS and Endocrine Division/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS.

Running title: Recovery in Heart: role of ischemia and RAS

Beatriz D'Agord Schaan
Av. Princesa Isabel, 370 – Santana
Porto Alegre, Brazil
Phone: +55 2151 32232746
Fax: +55 2151 32232746
e-mail: beatrizschaan@gmail.com

**Functional Recovery in Isolated Rat Heart: role of ischemic periods
and renin-angiotensin system**

Ubirajara O. de Oliveira^{1,2}; Adriane Belló-Klein¹; Álvaro Reischak de Oliveira³; Luiz Carlos Rios Kuchaski²; Ubiratan Fabres Machado⁴; Maria Claudia Irigoyen^{1,5}; Beatriz D'Agord Schaan⁶

SUMMARY

Cardiac arrest resuscitation cause myocardial dysfunction determined by ischemia time and inhibition of the RAS can reduce cardiac dysfunction. To investigate this relationship, we evaluated the functional recovery and responsiveness of the RAS tissue in hearts submitted to different ischemic periods. Thus 20 min ischemia is likely the best period to study the effects of pharmacological approaches in functional recovery.

ABSTRACT

Introduction: Cardiac arrest resuscitation cause myocardial dysfunction determined by ischemia time. Inhibition of the renin-angiotensin system (RAS) can reduce cardiac dysfunction. Aim: To investigate functional recovery and responsiveness of the RAS tissue in Langendorff-perfused rat hearts submitted to different ischemic periods.

Methods: Isolated hearts were submitted to different periods of global ischemia (20, 25 or 30 min) and reperfused (30 min) with Krebs-Henseleit buffer alone or added with 400 nmol/L angiotensin-I, or 400 nmol/L angiotensin-I + 100 µmol/L captopril.

Results: The maximal derivative of pressure (dP/dt_{max}) and rate-pressure product were reduced in hearts exposed to 25 min ischemia (~73%) and 30 min ischemia (~80%) vs. 20 min ischemia. The left ventricle end-diastolic pressure (LVEDP) and perfusion pressure (PP) were increased in hearts exposed to 25 min ischemia (5.5 and 1.08 fold, respectively) and 30 min ischemia (6 and 1.10 fold, respectively) vs. 20 min ischemia. Angiotensin-I caused a decrease in dP/dt_{max} and rate-pressure product (~85-94%) in all ischemic periods and an increase in LVEDP and PP (6.9 and 1.25 fold, respectively) only at 20 min ischemia. Captopril reverted partially or

completely the effects of angiotensin-I on functional recovery in 20 min and 25 min ischemia periods.

Conclusions: These data suggest that the transition from mild/moderate to severe post-ischemic damage occurs after 20 min ischemia. Thus 20 min ischemia is likely the best period of time to study the effects of pharmacological approaches in functional recovery.

Key Words: ACE inhibition, cardiac RAS, ischemia, functional recovery, Langendorff-perfused, post-ischemic.

INTRODUCTION

Cardiac arrest resuscitation has important clinical implications, mainly due to causing myocardial dysfunction. In this situation, contractile dysfunction is caused by duration of myocardial ischemia preceding reperfusion [1, 2] or by myocardial stunning when ischemia time do not result in cell death [3, 4]. With increasing duration of myocardial ischemia, contractile dysfunction may be due to combinations of reversible and irreversible processes (including apoptosis and/or necrosis) [1, 5].

The renin-angiotensin system can modulate cardiovascular homeostasis both via its circulating components and tissue systems. Angiotensin-I has been used to estimate functional activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in tissue and in circulation because it requires conversion to angiotensin-II to determine a response [6-8]. In isolated rat heart model, the angiotensin-II release can only be maintained by adding renin with angiotensinogen [6] or angiotensin-I [6-8] in the perfusion buffer. Hence they should be added in the perfusate to study local renin-angiotensin system (RAS) and some authors do not even use angiotensin-I in the perfusate [9-11], hindering the conclusions about ACE inhibition in these studies. In ischemic myocardial the local ACE inhibition can improve cardiac function and reduce biochemical markers of cell necrosis [12, 13]. Captopril is one of the first and most extensively studied ACE inhibitors, a class of drugs that can effectively reduce the extent of contractile dysfunction after myocardial infarction [14, 15].

Despite the popularity of isolated rat heart preparations in studies of myocardial ischemia-reperfusion (I-R) injury, many different protocols have been used, concerning the duration of ischemia [16, 17] and the degree of enzyme leakage or depletion of high-energy phosphates (metabolic indices of the post-ischemic injury) [18, 19], making it difficult to compare them. Traquandi et al. [16] using 45 min of global ischemia reported that moderate contractile dysfunction occurs. On the other hand, Palmer et al. [17] observed that 25 or 30 min of global ischemia resulted in severe myocardial dysfunction. Considering metabolic variables, Chocron et al. [18] reported that early cardiac troponin-I release correlates with the extent of ischemic injury,

but Bertinchant et al. [19] showed that only lactate dehydrogenase increased as the ischemic time is extended.

These data support a great need to characterize in the isolated rat heart, a time of ischemia where pharmacological approaches could really have an effect on the functional recovery. The purpose of the present study was to investigate the functional recovery and the responsiveness of the RAS tissue in isolated rat hearts submitted to different periods of global ischemia (20, 25 and 30 min), using modified Krebs-Henseleit buffer containing angiotensin-I or angiotensin-I plus captopril.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Isolated heart preparation

Male Wistar rats (250-300 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil. They were maintained on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) in an air-conditioned constant temperature (22 °C) colony room, and had free access to commercial chow and water. Animal care followed the official government guidelines in compliance with the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) and was approved (n° 2004313) by the Ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

Animals were killed by cervical dislocation, the hearts were quickly excised and perfused via aorta (Langendorff technique) using an isolated heart apparatus – size 3 (Hugo Sachs Electronick, Germany). The hearts were perfused with a modified Krebs-Henseleit buffer (composition in mmol/L: NaCl 120, KCl 5.4, MgCl₂ 1.8, NaHCO₃ 27, Na₂SO₄ 1.8, NaH₂PO₄ 2, glucose 5.5 and CaCl₂ 1.4), bubbled with 95% O₂-5% CO₂ (pH of 7.4), warmed at 37 °C and keeping a constant flow of 10 mL/min with a peristaltic pump (Miniplus-2, Gilson Medical Electronics, France). The perfusion buffer was previously filtered through a 0.45 µm membrane (Omnipore, Millipore) to remove any contaminant particles. A latex balloon connected to a pressure transducer (TPS-2 Statham, Incor, São Paulo, Brazil) through a cannula was inserted into the left ventricle to measure left ventricular (LV) contractile function. The balloon volume was

adjusted to maintain an end diastolic pressure of 8-10 mmHg at the beginning of the experiment. The hearts were immersed in a glass chamber kept at 37 °C by a water pump with heater (M3 Lauda, Hugo Sachs Electronick, Germany). Left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressures (LVEDP), heart rate (HR), maximal derivative of LV pressure (dP/dt_{\max}) and minimal derivative of LV pressure (dP/dt_{\min}) were measured throughout the experiment. Developed pressure (LVDP = systolic - diastolic pressure) and rate-pressure product (heart rate x developed pressure) were calculated. The perfusion pressure (PP) was continuously measured using a pressure transducer (TPS-2 Statham) connected to a sidearm of the aortic cannula. The transducers transmitted the signals to a data acquisition and analysis system (Isoheart, Hugo Sachs Electronick, Germany), where data were recorded continuously for later analyses.

Reperfusion protocol

After a stabilization period of 25 min, hearts were submitted to different periods of global ischemia (20, 25 or 30 min) and then reperfused for 30 min with Krebs-Henseleit buffer alone (KH) or added with 400 nmol/L angiotensin-I (Angio), or 400 nmol/L angiotensin-I + 100 μ mol/L captopril (AC). In order to ensure physiologic cardiac functioning, hearts that did not display a HR of at least 210 beats/min and an LVPS or PP of at least 60 mmHg at the end of the stabilization period were excluded.

Statistical analysis

All measured parameters were expressed as a ratio from the baseline value. Data are presented as group means \pm SEM. The groups were compared using two-way ANOVA for repeated measures followed by Tukey's *post hoc* test (SPSS version 13.0 for Windows). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

All isolated perfused hearts had similar baseline cardiovascular function prior to ischemia. Because the dP/dt_{\max} and dP/dt_{\min} recoveries were almost identical, only dP/dt_{\max} recovery is presented (Figure 1): it was significantly reduced in KH groups submitted to 25 and 30 min of ischemia (74 and 80%, respectively), as compared to the KH group submitted to 20 min of ischemia. Angiotensin-I caused a reduction of 87-94% in dP/dt_{\max} recovery in all ischemic periods as compared to baseline values. This effect of angiotensin-I was completely reverted by captopril in the study protocol of 20 min of ischemia. However, after 25 and 30 min of ischemia captopril did not revert the effect of angiotensin-I in the dP/dt_{\max} recovery.

Because the LVDP and rate-pressure product recoveries were almost identical, only the rate-pressure product recovery is presented (Fig. 2). The rate-pressure product was significantly reduced in KH groups submitted to 25 and 30 min of ischemia (73 and 78%, respectively), as compared to the KH group submitted to 20 min of ischemia. Angiotensin-I caused a reduction of 85-93% in the rate-pressure product recovery in all ischemic periods as compared to baseline values. This effect of angiotensin-I was reverted by captopril in groups submitted to 20 min and 25 min of ischemia (85% and 29%, respectively, from baseline values), but not in the study protocol of 30 min of ischemia.

Figure 3 represent the LVEDP, which was significantly increased during reperfusion in KH groups submitted to 25 and 30 min of global ischemia (5.5 and 6 fold, respectively), as compared to the KH group submitted to 20 min of ischemia. Angiotensin-I caused an approximately 6.9 fold increase in LVEDP recovery as compared to the KH in the groups submitted to 20 min of ischemia; this effect was reverted by captopril. However, in groups submitted to 25 and 30 min of ischemia, neither angiotensin-I nor captopril caused significant effects in LVEDP.

The PP, depicted in Figure 4, was significantly increased during reperfusion in KH groups submitted to 25 and 30 min of global ischemia (1.08 and 1.10 fold, respectively) as compared to the KH group submitted to 20 min of ischemia. Angiotensin-I caused an approximately 1.25 fold increase in PP recovery as compared to the KH in the groups submitted to 20 min of ischemia; this

effect was partially reverted by captopril. However, in groups submitted to 25 and 30 min of ischemia, neither angiotensin-I nor captopril caused significant effects in PP.

There were no significant differences in LVSP and HR (data not shown) among reperfusion groups, in the different ischemic protocols.

DISCUSSION

This study showed that, in the isolated rat heart model, twenty minutes of global ischemia results in mild/moderate contractile dysfunction, while more prolonged periods of ischemia lead to severe contractile dysfunction. Also, we characterized that angiotensin-I and captopril effects on functional recovery are better demonstrated when hearts are submitted to 20 min of ischemia. This is the first study that evaluated the functional recovery and responsiveness of the RAS tissue in rat hearts submitted to three different ischemic periods.

The time-course of cardiovascular changes induced by global ischemia (20, 25 and 30 min) in the isolated perfused rat heart model, showed that in hearts exposed to 20 min of ischemia, the functional recovery was reduced in the early phase of reperfusion, but not at end of reperfusion (30 min.), suggesting that the degree of tissue damage was mild to moderate. Prolonging the ischemic period from 20 to 25 or 30 min, a marked decrease in functional recovery was observed, as indicated by the lower dP/dt_{\max} and rate-pressure product and by the higher LVEDP and PP along the reperfusion period. These modifications showed that myocardial contracture occurs when more than 20 min of ischemia were applied, suggesting a high degree of tissue damage. These findings are in agreement with previous functional and metabolic data [17, 20].

Palmer et al. [17] and Wang et al. [20] reported that mild post-ischemic dysfunction occurs when short periods of global ischemia (15-20 min) were employed, but a severe myocardial dysfunction with persistent elevation of creatine kinase release was observed after 25 min or more of ischemia, suggesting irreversible myocardial injury. These and our results suggest that the transition from mild/moderate tissue damage to severe tissue damage occurs after 20 min of global ischemia. However, changes in the perfusion buffer (e.g. substrate concentration and/or composition [21], flow [22], and temperature [23]) could modify this ischemic threshold.

Many reports confirm that ACE activity is present in the cardiac tissue and that the RAS can modulate cardiovascular homeostasis both via its systemic and local systems [6-8, 24]. However, in isolated rat heart model the substrate (angiotensin-I) should be added in the perfusate to study local RAS [6-8]. In the present study, angiotensin-I resulted in a marked decrease in LV functional recovery after the establishment of ischemia-induced dysfunction, as indicated by the lower dP/dt_{\max} and rate-pressure product in all tested ischemic periods. This is also supported by the higher LVEDP and PP in groups submitted to 20 min of ischemia. Earlier reports also showed that angiotensin-I and angiotensin-II reduced the cardiac contractility and/or constricted coronary arteries [13, 16], but other authors did not observe any deleterious effect induced by these compounds [25].

The effects of angiotensin-I on LV functional recovery were totally or partially reversed by captopril in groups submitted to 20 and 25 (but not to 30) min of ischemia, suggesting that they depend on local conversion to angiotensin-II. Multiple factors are likely to play in the protective effect of ACE inhibitors in I-R injury: they decrease leukocyte infiltration [26], possess anti-inflammatory effects [27], free radical scavenging properties [28], and effects mediated by enhanced bradykinin and prostaglandin levels [29]. Possibly the inability to completely abolish angiotensin-I-mediated responses was due to intrinsic angiotensin-I activity, since angiotensin-II formation in the intact rat heart is primarily ACE-dependent [6, 8]. Nevertheless, many alternative pathways angiotensin-II-forming (chymase, kallikrein and cathepsin G) could be activated in several pathological conditions such as ischemia, hypercholesterolemia, hypertension and inflammation [30]. Because ACE inhibition would increase the circulating levels of angiotensin-(1-7) [31], it is likely to mediate some of these cardiovascular effects, although the cardiac actions of this peptide are discrepant [32, 33].

These results showed that after 20 min. of ischemia the LV functional recovery is significantly depressed and marginally affected by angiotensin-I or captopril, suggesting a lower responsiveness of the cardiac tissue due to ischemic contracture. Thus, we rule out a possibility that a lower responsiveness of the cardiac tissue to the drugs could be due to the myocardial ACE exhaustion.

In the isolated heart model a release of enzymes due to both ischemia and reperfusion-induced injury has been recognized [17-19, 34, 35]. However, although important, the results shown are discordant and illustrate the lack of standardization between different assays and/or in sensitivity of the methods used. Furthermore, data are frequently expressed in various different units (unit/mg protein, unit/g dry wt, etc), making it difficult to compare their results. Because of this, we preferred to use multiple functional indices to assess the extent of tissue injury in the ischemic heart, considering that this approach would be more reproducible.

In conclusion, 20 min of global ischemia is likely to be the best period for study of mild to moderate myocardial contractile dysfunction, at a level that can be alleviated or exacerbated by the drugs tested here (angiotensin-I and captopril). Longer periods of ischemic led to much more intense myocardial damage, with development of the ischemic contracture, which cannot be reversed by drugs tested during the reperfusion period. Thus, pharmacological approaches tested in these periods may not have any effect due to methodological reasons.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Ms. Tania RG Fernandes for her technical assistance. This research was supported by grants from CAPES, CNPq and FAPERGS, Brazilian Research Agencies.

REFERENCES

1. Reimer KA, Heide RSV, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol.* 1993;72:13G-21G.
2. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, Berg RA. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol.* 1996 Jul;28(1):232-40.
3. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999 Apr;79(2):609-34.
4. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation.* 2001;104:2981-9.
5. Galinanes M, Hearse DJ. Assessment of ischemic injury and protective interventions: the Langendorff versus working rat heart preparation. *Can J Cardiol.* 1990;6(2):83-91.
6. de Lannoy LM, Danser AHJ, Bouhuizen AMB, Saxena PR, Schalekamp MADH. Localization and production of angiotensin II in isolated perfused rat heart. *Hypertension.* 1998;31:1111-17.
7. Müller DN, Fischli W, Clozel JP, et al. Local angiotensin II generation in the rat heart. Role of renin uptake. *Circ Res.* 1998;82(1):13-20.
8. de Lannoy LM, Schuijt MP, Saxena PR, et al. Angiotensin converting enzyme is the main contributor to angiotensin I-II conversion in the interstitium of the isolated perfused rat heart. *J Hypertens.* 2001;19:959-65.
9. Gurevitch J, Pevni D, Frolkis I, Matsa M, Paz Y, et al. Captopril in cardioplegia and reperfusion: Protective effects on the ischemic heart. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:627-33.
10. Isbir CS, Dogan R, Farsk B and Aydin M. The effect of captopril on membrane bound enzymes in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg.* 2000;8(3):192-7.
11. Liu X, Lukasova M, Zubakova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U. Kallidin-like peptide mediates the cardioprotective effect of the ACE inhibitor captopril against ischaemic reperfusion injury of rat heart. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul;148(6):825-32. Epub 2006 Jun 12.

12. Arad M, Shotan A, Horowitz LR. Effect of captopril on metabolic and hemodynamic alterations in global ischemia and reperfusion in the isolated working rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19:319-23.
13. Neves LAA, Almeida AP, Klosla MC, Santos RA. Metabolism and angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1451-9.
14. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. *N Engl J Med.* 1992;327:669-77.
15. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA.* 1995 May 10;273(18):1450-6
16. Traquandi C, Riva E. Cardiac effects of angiotensin I and angiotensin II: dose-response studies in the isolated perfused rat heart. *Pharmacol Research.* 1998;37(1):57-65.
17. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation.* 2004 Jul;62(1):97-106.
18. Chocron S, Alwan K, Toubin G, et al. Effects of myocardial ischemia on the release of cardiac troponin I in isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112:508-13.
19. Bertinchant JP, Polge A, Robert E, et al. Time-course of troponin I release from isolated perfused rat hearts during hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion. *Clin Chim Acta.* 1999;283:43-56.
20. Wang QD, Swardh A, Sjoquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiol Scand.* 2001 Feb;171(2):123-8.
21. Angelos MG, Murray HN, Gorsline RT, Klawitter PF. Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics. *Resuscitation.* 2002;55(3):329-36.

22. Klawitter PF, Murray HN, Clanton TL, Palmer BS, Angelos MG. Low flow after global ischemia to improve postischemic myocardial function and bioenergetics. *Crit Care Méd.* 2002 Nov;30(11):2542-7.
23. Bes S, Roussel P, Laubriet A, et al. Influence of deep hypothermia on the tolerance of the isolated cardiomyocyte to ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Nov;33(11):1973-88.
24. Meulemans AL, Andries LJ, Brutsaert DL. Does endocardial endothelium mediate positive inotropic response to angiotensin I and angiotensin II? *Circ Res.* 1990 Jun;66(6):1591-601.
25. Ford WR, Clanachan AS, Hylei R, Jugdutt BI. Angiotensin II reduces infarct size and has no effect on pos-ischaemic contractile dysfunction in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol.* 2001;134:38-45.
26. Ferrari R, Pepi P, Nesta F, et al. Metabolic dearrangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol.* 1998;82:2k-13k.
27. Peng H, Carretero OA, Liao TD, Peterson EL, Rhaleb NE. Role of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in the antifibrotic and anti-inflammatory effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril in hypertension. *Hypertension.* 2007 Mar;49(3):695-703. Epub 2007 Feb 5.
28. Anderson B, Khaper N, Dhalla AK. Anti free radical mechanism in captopril protection against reperfusion injury in isolated rat hearts. *Can J Cardiol.* 1996;10:1099-104.
29. Ehring T, Baumgart D, Krajcard M, et al. Attenuation of myocardial stunning by ACE inhibitor ramiprilat through a signal cascade of bradykinin and prostaglandins but not nitric oxide. *Circulation.* 1994;90:1368-85.
30. Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension.* 2000 Oct;36(4):638-41.
31. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1998;31(1 Pt 2):356-61.

32. Almeida AP, Fabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1–7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(6):709–13.
33. Oudot A, Vergely C, Ecarnot-Laubriet A, Rochette L. Pharmacological concentration of angiotensin-(1–7) activates NADPH oxidase after ischemia–reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation. *Regulatory Peptides.* 2005;127:101–10.
34. Mohanlal RW, Mauve I, Zoet ACM, Van Der Laarse A. Reperfusion induced enzyme release: washout effect or manifestation of reperfusion damage? *Cardiovasc Res.* 1988;22:603-10.
35. Poston JM, Parenteau GL. Biochemical effects of ischemia on isolated, perfused rat heart tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1992;295:35-41.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Maximal derivative of LV pressure (dP/dt_{\max}) recovery from 20, 25 and 30 min of global ischemia. KH (control), Angio (angiotensin-I) and AC (angiotensin-I + captopril). Data are displayed as means \pm SEM ($n = 5$ each). * $P < 0.05$: Angio vs. respective KH; # $P < 0.001$: AC vs. respective Angio. † $P < 0.001$: KH 25 min and KH 30 min ischemia vs. KH 20 min ischemia. All analyses were performed using a two-way ANOVA for RM followed by Tukey's *post hoc* test.

Fig. 2. Rate-pressure product recovery from 20, 25 and 30 min of global ischemia. KH (control), Angio (angiotensin-I) and AC (angiotensin-I + captopril). Data are displayed as group means \pm SEM ($n = 5$ each). * $P < 0.04$: Angio vs. respective KH; # $P < 0.02$: AC vs. respective Angio; † $P < 0.001$: KH 25 min and KH 30 min ischemia vs. KH 20 min ischemia. All analyses were performed using a two-way ANOVA for RM followed by Tukey's *post hoc* test.

Fig. 3. Left ventricle end-diastolic pressure (LVEDP) recovery from 20, 25 and 30 min of global ischemia. KH (control), Angio (angiotensin-I) and AC (angiotensin-I + captopril). Data are displayed as group means \pm SEM ($n = 5$ each). * $P < 0.001$: Angio vs. respective KH; # $P < 0.001$: AC vs. respective Angio; † $P < 0.001$: KH 25 min and KH 30 min ischemia vs. KH 20 min ischemia. All analyses were performed using a two-way ANOVA for RM followed by Tukey's *post hoc* test.

Fig. 4. Perfusion pressure (PP) recovery from 20, 25 and 30 min of global ischemia. KH (control), Angio (angiotensin-I) and AC (angiotensin-I + captopril). Data are displayed as group means \pm SEM ($n = 5$ each). * $P = 0.02$: Angio vs. respective KH; † $P < 0.001$: KH 25 min and KH 30 min ischemia vs. KH 20 min ischemia. All analyses were performed using a two-way ANOVA for RM followed by Tukey's *post hoc* test.

Figure 1

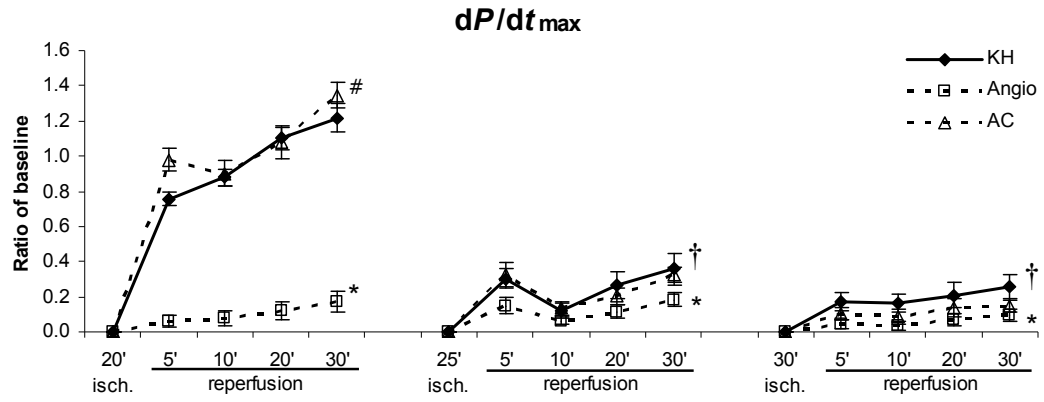


Figure 2

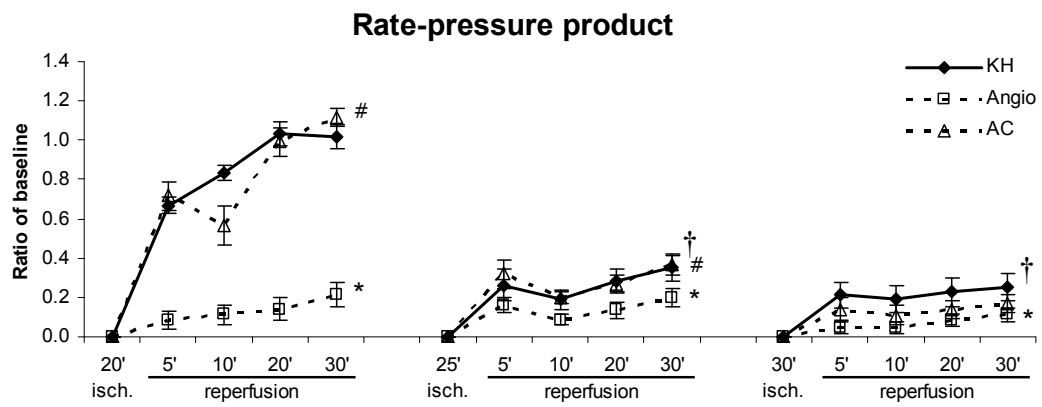


Figure 3

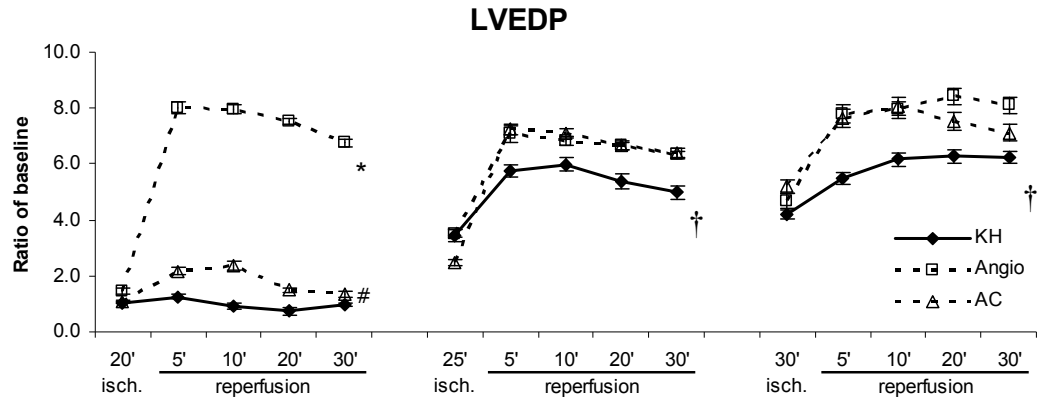


Figure 4

