**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Luciano Rocha Mendonça

**EFEITOS DA BRADICININA NA LESÃO DE
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS**

**Ribeirão Preto
2011**

Luciano Rocha Mendonça

EFEITOS DA BRADICININA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do **Título de Mestre**.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: **Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato**

**RIBEIRÃO PRETO
2011**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendonça, Luciano Rocha

Efeitos da bradicinina na lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos. Ribeirão Preto, 2011.

88 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Piccinato, Carlos Eli.

1. Bradicininina. 2. Isquemia. 3. Reperfusão.
4. Músculo Esquelético. 5. Ratos.

Luciano Rocha Mendonça

Efeitos da bradiginina na lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do **Título de Mestre**

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

*À minha esposa **Lara**, pela compreensão e amor.
Presença fundamental em momentos de alegrias e
dificuldades*

*À minha filha **Beatriz**, fruto do amor e que me
ajudou a senti-lo em toda sua plenitude.*

*Ao meu pai **Jaime Edson** e minha mãe **Alba
Maria** por todo amor recebido, todos os conselhos dados e
todas as lições que me ajudaram a aprender.*

*Ao meu irmão **Fernando**, exemplo de caráter e
espirituosidade.*

*A todos os **Famíliares e Amigos** que de alguma
forma influenciaram na minha formação.*

*À **Deus** pela inspiração para iniciar, energia
para executar e saúde para concluir este trabalho.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Carlos Elí Píccinato, meu orientador, exemplo de formação acadêmica pela receptividade, pelos ensinamentos e por toda ajuda para conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. Takachi Moriya e Dr. Jesualdo Cherri pelo incentivo e inspiração para seguir minha formação como cirurgião vascular.

Ao Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda, pela oportunidade de conhecer o meio científico e incentivo para continuar nele.

Ao Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pela disponibilidade e ajuda para iniciar o projeto.

À Profª. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pela disponibilidade e fundamental ajuda na realização e análise dos métodos imunohistoquímicos.

À Equipe do CEMEQ pela ajuda na realização das análises estatísticas.

À Sra. Elettra Greene pela revisão do texto em inglês.

Aos Srs. Paulo Alves Júnior e José Carlos Vanni, técnicos do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pelo incomensurável auxílio no manejo dos animais e nas técnicas cirúrgicas utilizadas neste trabalho.

Aos demais Funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pela ajuda nos cuidados com os animais.

Às Sras. Maria Cecília Jordani Gomes, Maria Aparecida Neves Cardoso Piccinato, Clarice Fleury Fina Franco e Maria Eliza Jordani de Souza, técnicas do Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela inestimável ajuda na realização das dosagens bioquímicas.

À Sra. Sandra B. T. Martins, técnica do setor de histologia do Laboratório de Cirurgia Experimental pelo preparo do material para realização dos métodos imunohistoquímicos.

*“A viagem da descoberta consiste não em
achar novas paisagens, mas em ver com
novos olhos.”*

Marcel Proust

França

1871-1922

RESUMO

MENDONÇA, L.R. **Efeitos da bradicinina na lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos.** 88 f. [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; 2011.

Contexto: Alguns agentes farmacológicos em estudos de modelos animais demonstraram proteção nas lesões de isquemia e reperfusão do miocárdio. Entre eles, a bradicinina desempenha papel cardioprotetor durante a reperfusão do miocárdio. Os efeitos desta substância no músculo esquelético isquêmico não são conhecidos. **Objetivo:** Demonstrar os efeitos da bradicinina administrada após 2 horas de isquemia total seguidas de 4 horas de reperfusão em músculo esquelético de ratos com base nos efeitos sobre enzimas musculares (aspartato aminotransferase - AST, lactato desidrogenase - LDH, e creatinina fosfoquinase - CPK), membrana celular, recrutamento de leucócitos e apoptose. **Materiais e Métodos:** Foram estudados 18 ratos da linhagem Wistar distribuídos em 3 grupos com 06 animais e submetidos a 2 horas de isquemia total pelo método do torniquete do membro pélvico e 4 horas de reperfusão. Durante o período de reperfusão o grupo *Controle* recebeu solução salina, o grupo *Bradicinina* recebeu solução de bradicinina na dose de 1mg/Kg e o grupo *HOE* recebeu solução de icatibant (HOE 140), um antagonista do receptor B₂, na dose de 125µg/kg. Coletou-se 1,5ml de sangue da veia cava inferior antes do início da isquemia, ao final do período de isquemia e após a reperfusão para dosagem das enzimas AST, LDH e CPK. Colheu-se também, após a reperfusão, biópsia do músculo gastrocnêmio (membro pélvico esquerdo) para dosagem tissular de malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO) e para avaliação imunohistoquímica da apoptose (TUNEL). **Resultados:** Houve aumento significativo da AST após a reperfusão apenas no grupo Bradicinina. O valor da LDH no grupo Bradicinina foi maior em relação aos demais antes da isquemia, após a isquemia e após a reperfusão. Observou-se que nos três grupos ocorreu diminuição significativa de LDH após a reperfusão. Ocorreu aumento significativo dos valores da CPK após a reperfusão nos três grupos. Não houve diferença dos valores de CPK entre os grupos antes da isquemia. Os valores de CPK no grupo Bradicinina foram maiores quando comparados aos grupos Controle e HOE após a isquemia e após a reperfusão. O MDA elevou-se significativamente após a reperfusão no grupo Bradicinina em relação aos grupos Controle e HOE. Após a reperfusão, a MPO, elevou-se significativamente no grupo Bradicinina em relação ao grupo Controle. O número de núcleos apoptóticos foi semelhante entre os grupos. **Conclusão:** A bradicinina (1mg/Kg) aplicada continuamente, intra-arterial, durante 4 horas de reperfusão agrava a lesão de isquemia e reperfusão em musculatura esquelética de ratos submetidos a 2 horas de isquemia total, com base na elevação de enzima muscular (CPK), no aumento de indicador de lesão de membrana celular (MDA) e no maior recrutamento neutrofílico (MPO).

Palavras-Chave: Bradicinina. Isquemia. Reperfusão. Músculo Esquelético. Ratos

ABSTRACT

Mendonca, L.R. **Effects of bradykinin in ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle.** 88 f. [Thesis] Ribeirão Preto: Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo; 2011.

Background: Some studies of pharmacological agents in animal models have demonstrated protection in ischemia and reperfusion of the myocardium. Among them, bradykinin plays a cardioprotective effect during myocardial reperfusion. The effects of Bradykinin on ischemic skeletal muscle are unknown. **Objective:** To demonstrate the effects of bradykinin administered after 2 hours of total ischemia followed by 4 hours of reperfusion on rat skeletal muscle based on the effects on the muscle enzymes (aspartate aminotransferase - AST, lactate dehydrogenase - LDH and creatinine phosphokinase - CPK), on the cell membrane, on the recruitment of leukocytes and on apoptosis. **Materials and Methods:** Eighteen Wistar rats were studied and distributed to three groups of 06 animals each and submitted to 2 hours of total ischemia by the tourniquet method of hind limb and to 4 hours of reperfusion. During the reperfusion period the *Control* group received saline solution, the *Bradykinin* group received bradykinin solution at the dose of 1mg/Kg and the *HOE* group received icatibant (HOE 140) solution, a B₂ receptor antagonist, at the dose of 125 µg/Kg. A blood volume of 1,5 ml was collected from the inferior vena cava before the onset of ischemia, at the end of the period of ischemia and after reperfusion for the measurement of AST, LDH and CPK. A gastrocnemius muscle biopsy (left pelvic limb) was collected at the end of the reperfusion period for the determination of tissue malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and immunohistochemical evaluation of apoptosis (TUNEL). **Results:** There was a significant increase in AST after reperfusion only in Bradykinin group. LDH was higher in the Bradykinin group compared to the others before ischemia, after ischemia and after reperfusion. All three groups showed a significant decrease in LDH after reperfusion. There was a significant increase in CPK values after reperfusion in all three groups. There was no difference in CPK values between groups before ischemia. CPK values were higher in the Bradykinin group when compared to the Control and HOE groups after ischemia and after reperfusion. MDA increased significantly after reperfusion in the Bradykinin group compared to the Control and HOE groups. After reperfusion, MPO increased significantly in the Bradykinin group compared to the control group. The number of apoptotic nuclei was similar in all groups. **Conclusion:** Bradykinin (1mg/Kg) continuously applied intra-arterially for 4 hours of reperfusion aggravates ischemia and reperfusion in skeletal muscle of rats submitted to 2 hours of total ischemia, based on the elevation of muscle enzyme (CPK), on the increase in the indicator of cell membrane damage (MDA) and on the greater neutrophil recruitment (MPO).

Keywords: Bradykinin. Ischemia. Reperfusion. Skeletal Muscle. Rats

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
Ca²⁺	Cálcio
CPK	Creatinino fosfoquinase
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECA	Enzima de conversão de angiotensina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HOE	Icatibant (HOE 140)
iECA	Inibidor da enzima de conversão de angiotensina
I/R	Isquemia e reperfusão
IRA	Insuficiência renal aguda
K⁺	Potássio
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
M/E	Musculatura esquelética
MPO	Mieloperoxidase
Na⁺	Sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O₂	Oxigênio
OAA	Obstrução arterial aguda
PreC	Pré condicionamento
PosC	Pós condicionamento
SIR	Síndrome de isquemia e reperfusão
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema demonstrando a formação de hipoxantina durante o período de isquemia e a entrada de oxigênio no tecido durante o período de reperfusão com a formação de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos deletérios (AALTO, RAIVIO 1993).21
- Figura 2** – Esquema ilustrativo do sistema calicreína-cininas, englobando a síntese das cininas a partir da fração $\alpha 2$ -globulina (cininogênios). A degradação pelas cininases I e II, e os receptores B_1 e B_2 apresentando agonistas (retângulos verdes) e antagonistas (retângulos vermelhos) distintos. ECA: enzima de conversão de angiotensina.27
- Figura 3** – Esquema mostrando a distribuição dos grupos de animais, infusão de drogas e períodos de coleta de material. I (isquemia); R (reperfusão).38
- Figura 4** – A: animal anestesiado com tricotomia abdominal. B: punção veia caudal para infusão de anestésico. C: dissecação dos vasos abdominais com aorta reparada (seta).39
- Figura 5** – A: rato traqueostomizado com membro pélvico esquerdo garroteado. B: cianose decorrente da isquemia total.40
- Figura 6** – A: punção anterógrada da aorta em posição infra-renal. B: bomba de infusão utilizada para infusão das drogas.40
- Figura 7** – A: coloração cianótica de pata de rato submetida a 2 horas de isquemia total pelo método do torniquete. B: hiperemia reativa após liberação do fluxo sanguíneo no início do período de reperfusão.42
- Figura 8** – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para AST nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em relação ao tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos em cada grupo.48
- Figura 9** – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para LDH nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em função do tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos estudados em cada grupo.49

Figura 10 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para CPK nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em cada tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos em cada grupo.	50
Figura 11 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para MDA após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.	52
Figura 12 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para MPO após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.	53
Figura 13 – Lâminas preparadas pela técnica de TUNEL e visualizadas em aumento de 40X. Observam-se cortes transversais de miócitos com núcleos marcados na periferia. A: Controle. B: Bradicinina. C:HOE.	54
Figura 14 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para os números de núcleos marcados (TUNEL) após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.	54
Figura 15 – Média e desvio padrão dos pesos dos animais do estudo	78
Figura 16 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável AST.	79
Figura 17 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável LDH.	81
Figura 18 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável CPK.	83
Figura 19 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável MDA após a reperfusão.	85
Figura 20 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável MPO após a reperfusão.	86
Figura 21 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável TUNEL após a reperfusão.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Peso individual em gramas dos animais do estudo.	78
Tabela 2	-	Valores individuais da AST expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos pré isquemia, isquemia e reperfusão.	79
Tabela 3	-	Descrição da variável AST por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	80
Tabela 4	-	Comparações entre grupos para cada tempo para a variável AST.	80
Tabela 5	-	Comparações entre tempos para cada grupo para a variável AST. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$).	80
Tabela 6	-	Valores individuais da LDH expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos pré isquemia, isquemia e reperfusão.	81
Tabela 7	-	Descrição da variável LDH por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	82
Tabela 8	-	Comparações entre grupos para cada tempo para a variável LDH. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$).	82
Tabela 9	-	Comparações entre tempos para cada grupo para a variável LDH. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$).	82
Tabela 10	-	Valores individuais da CPK expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos pré isquemia, isquemia e reperfusão.	83
Tabela 11	-	Descrição da variável CPK por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	84
Tabela 12	-	Comparações entre grupos para cada tempo para a variável CPK. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$).	84

Tabela 13 - Comparações entre tempos para cada grupo para a variável CPK. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).	84
Tabela 14 - Valores individuais da MDA expressos em μ molar nos grupos Controle, Bradicinina e HOE no período reperfusão.	85
Tabela 15 - Descrição da variável MDA por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	85
Tabela 16 - Comparações entre grupos para a variável MDA. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).	86
Tabela 17 - Valores individuais da MPO expressos em número de neutrófilos por miligrama de tecido nos grupos Controle, Bradicinina e HOE no período reperfusão.	86
Tabela 18 - Descrição da variável MPO por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	87
Tabela 19 - Comparações entre grupos para a variável MPO. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).	87
Tabela 20 - Valores individuais de TUNEL expressos em (%) número de núcleos marcados em cada 100 células nos grupos Controle, Bradicinina e HOE no período reperfusão.	88
Tabela 21 - Descrição da variável TUNEL por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).	88
Tabela 22 - Comparações entre grupos para a variável TUNEL.	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Fisiopatologia.....	19
1.2 Isquemia e Reperfusão.....	21
1.3 Apoptose.....	26
1.4 Bradicininina	27
1.5 Marcadores de Isquemia e Reperfusão	30
1.5.1 Transaminases.....	31
1.5.2 Desidrogenases	31
1.5.3 Creatinino fosfoquinase (CPK).....	32
1.5.4 Malondialdeído (MDA).....	32
1.5.5 Mieloperoxidase (MPO).....	33
1.6 Marcador de Apoptose.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Gerais	35
2.2 Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais	37
3.2 Grupos Experimentais	37
3.3 Procedimentos Cirúrgicos.....	39
3.3.1 Traqueostomia e exposição dos vasos abdominais	41
3.3.2 Modelo de isquemia total	41
3.3.3 Infusão intra-arterial	41
3.4 Coleta de Amostras	42
3.5 Eutanásia.....	43
3.6 Dosagem de Marcadores Séricos e Tissulares	43
3.6.1 Dosagem de aspartato aminotransferase (AST)	43
3.6.2 Dosagem de lactato desidrogenase (LDH)	43
3.6.3 Dosagem de creatinino fosfoquinase (CPK)	44
3.6.4 Dosagem do malondialdeído muscular (MDA).....	44
3.6.5 Dosagem da mieloperoxidase (MPO)	44
3.6.6 Imunohistoquímica	45
3.7 Análise Estatística	46

4 RESULTADOS	48
4.1 Valores de Aspartato Aminotransferase (AST)	48
4.2 Valores de Lactato Desidrogenase (LDH)	49
4.3 Valores de Creatinino Fosfoquinase (CPK)	50
4.4 Valores de Malondialdeído (MDA)	51
4.5 Valores de Mieloperoxidase (MPO)	52
4.6 Imunohistoquímica (TUNEL).....	53
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE.....	78

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A oclusão arterial aguda (OAA) de extremidades é uma das urgências mais freqüentes em cirurgia vascular correspondendo a cerca de 10 a 16% dos atendimentos (SILVEIRA, YOSHIDA 2004). Com o aumento da idade da população concomitante a maior incidência de doença aterosclerótica e também devido ao maior número de traumas espera-se um aumento na freqüência de OAA estimando-se uma incidência aproximada de 17 casos por 100.000 habitantes/ano (DAVIES et al., 1997).

As principais causas de OAA são as embolias, trombozes, traumas e as cirurgias com pinçamento de vasos arteriais ocasionando interrupção do fluxo sanguíneo. Ao longo dos anos, diferentes tratamentos – embolectomia, anticoagulação, trombólise química e mecânica – foram desenvolvidos para restaurar o fluxo sanguíneo para a extremidade. Apesar do fluxo restabelecido comprova-se que a reperfusão agrava as lesões provocadas pela isquemia. Além das lesões tissulares locais observa-se resposta sistêmica deletéria. Chegou-se a conclusão de que as conseqüências da reperfusão tecidual eram tão ou mais prejudiciais que as alterações decorrentes da isquemia (TURRENS et al., 1991; HOBSON II, MILAZZO, DURÁN 1996), esta condição ficou conhecida como síndrome de isquemia-reperfusão (SIR) ou síndrome metabólica mionefropática, descrita por Haimovici (1979).

1.1 Fisiopatologia

Além do processo destrutivo que a isquemia prolongada pode provocar, a correção da causa da obstrução arterial, com conseqüente retorno da circulação sanguínea, dá início a um processo altamente prejudicial, local e sistemicamente (BLAISDELL 2002). A isquemia tecidual aguda representa para a célula graus variados de aporte de oxigênio (O_2) e de substrato energético levando a uma alteração da fosforilação oxidativa mitocondrial, processo aeróbico de geração de adenosina trifosfato (ATP). A falta de O_2 exige a geração de ATP por vias alternativas (glicólise anaeróbia), depletando estoques de glicogênio e fosfocreatina

dos tecidos atingidos e acarretando diminuição da geração de energia que em última instância leva ao acúmulo de ácido láctico e fosfatos inorgânicos no interior das células (STACPOOLE 1997) e, portanto, diminuição do pH intracelular.

Com as reservas e fontes de energia depletadas, a bomba Na-K ATPase entra em falência, levando ao acúmulo de sódio (Na^+) intracelular acompanhado de ganho isosmótico de água e conseqüente edema celular (WALKER et al., 1988) e a difusão de potássio (K^+) para o extracelular desencadeando alterações elétricas importantes na condução cardíaca.

Enquanto a diminuição da oferta de O_2 favorece também o acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no citosol, a diminuição do pH lesa as membranas dos ribossomos ocasionando extravasamento de enzimas (RNases, DNases, fosfatases, fosfolipases, proteases, glicosidases entre outras) que se tornam ativas na presença do Ca^{2+} (ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY, NICOTERA 2003), levando a um processo de autólise celular (WYLLIE 1997).

O consumo de ATP durante a isquemia e a ativação das fosfolipases levam, respectivamente, à diminuição da síntese e a degradação dos fosfolípidos da membrana celular (VANLANGENAKKER et al., 2008).

Como pode ser visto na Figura 1 na próxima página, após a revascularização, a entrada de O_2 em áreas isquêmicas, predispõe a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MCCORD 1983; AKIMITSU, GUTE, JEROME 1994), moléculas instáveis e altamente reativas, extremamente tóxicas para o metabolismo celular (AKIMITSU, GUTE, JEROME 1994; SILVEIRA, YOSHIDA 2004). Os principais efeitos destas ERO estão ligados às lesões nas membranas celulares, atingindo ligações sulfidrílicas de proteínas, lipídios e nucleotídeos de DNA, culminando com citólise e necrose celular (DAL MAESTRO 1980), liberando substâncias como o malondialdeído (MDA). Elas podem alterar também o potencial elétrico transmembrana dos miócitos; lesar a matriz extracelular; facilitar a atração e ativação dos neutrófilos acarretando liberação de enzimas como a mieloperoxidase (MPO) (GUTE et al., 1998); e ainda, aumentar a permeabilidade microvascular (RUBIN et al., 1996; GUTE et al., 1998; SOUZA et al., 2001).

Figura 1 – Esquema demonstrando a formação de hipoxantina durante o período de isquemia e a entrada de oxigênio no tecido durante o período de reperfusão com a formação de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos deletérios (AALTO, RAIVIO 1993).

As alterações celulares e metabólicas decorrentes da SIR do músculo esquelético (M/E) arranjam-se em uma complexa e multifatorial cascata de eventos interdependentes, que têm como destino final a lesão da fibra muscular. Os passos desta cascata têm sido estudados separadamente com o intuito de aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos e assim desenvolver propostas terapêuticas.

1.2 Isquemia e Reperfusão

O estudo das lesões acarretadas pela SIR, tanto do ponto de vista local com a liberação de ERO e lesão de organelas e membranas, quanto do ponto de vista sistêmico com acidose metabólica, hiperpotassemia e mioglobínúria levando a insuficiência renal aguda (IRA), arritmia cardíaca e instabilidade hemodinâmica, vem sendo alvo de inúmeros trabalhos na literatura mundial (BECKER, AMBROSIO 1987; FORMAN, VIRMANI, PUETT 1990; TURRENS et al., 1991; MARCEAU, HESS, BACHVAROV 1998; PAN et al., 2000; SOUZA et al., 2001; PICCINATO et al., 2004b; YANG et al., 2004; GROSS, GROSS 2006; KLONER, REZKALLA 2006;

ZHAO, VINTEN-JOHANSEN 2006; ELIASON, WAKEFIELD 2009; MEDLING et al., 2009; WANG et al., 2009; WANG et al., 2010).

Os efeitos da isquemia sobre a musculatura são bem conhecidos e além de resultar em oferta inadequada de oxigênio, ocasionam acúmulo de metabólitos que, agindo diretamente ou através de mediadores, causam lesão à célula M/E. Se por um lado a isquemia é capaz de gerar lesões celulares importantes, a reperfusão pode acentuá-las, piorando o processo e tornando-o irreversível (HEARSE, HUMPHREY, BULLOCK 1978; HOBSON II, MILAZZO, DURÁN 1996; ZHAO, VINTEN-JOHANSEN 2006).

Conclui-se que a SIR é um processo complexo e cíclico que leva a disfunção endotelial (JOVILIANO et al., 2005), alterações metabólicas, necrose e apoptose (ZHAO, VINTEN-JOHANSEN 2006) e que o melhor tratamento para isquemia/reperfusão (I/R) é a rápida restauração do fluxo sanguíneo o que nem sempre pode ser feito, visto que, os pacientes chegam ao pronto socorro com várias horas e até mesmo dias de evolução. Alguns fatores como o nível e a gravidade da oclusão, a presença de circulação colateral e as condições basais do paciente influenciam no prognóstico. Dos fatores citados, o tempo de isquemia é o principal para determinação da gravidade das lesões e da viabilidade do membro afetado (LASTORIA, MAFFEI 2002; SILVEIRA, YOSHIDA 2004; ELIASON, WAKEFIELD 2009).

Algumas técnicas vêm sendo desenvolvidas para diminuir o dano causado pela SIR à musculatura, entre elas destacam-se a hipotermia e reperfusão controlada, reperfusão com sangue neutropênico, as intervenções mecânicas conhecidas como pré-condicionamento (PreC) e pós-condicionamento (PosC) (GROSS, GROSS 2006; KLONER, REZKALLA 2006; ZHAO, VINTEN-JOHANSEN 2006; PARK et al., 2010) e a infusão de agentes farmacológicos (KOKSAL et al., 2003; KEARNS et al., 2004; ALVES et al., 2010; WANG et al., 2010).

Quanto ao uso de agentes farmacológicos, estudos em modelos animais demonstraram que adenosina, bradicinina (BK), opióides, eritropoetina e agonistas adrenérgicos e muscarínicos contribuem para proteção miocárdica quando administrados após indução de isquemia (GROSS, GROSS 2006). A BK também desempenha um papel cardioprotetor durante a reperfusão que simula o PosC (YANG et al., 2004) e dois receptores, um constitutivo, mais importante (B₂) e um

induzido por stress (B_1), estão relacionados com esta resposta (GARRISON 1990; MARCEAU, HESS, BACHVAROV 1998; PAN et al., 2000).

Assim como na musculatura cardíaca, a BK infundida nos instantes iniciais da reperfusão talvez possa atenuar as lesões provocadas pela restauração do fluxo sanguíneo na M/E, reduzindo assim a disfunção endotelial, necrose e apoptose, principalmente via receptor B_2 (FIGUEROA, DIETZE, MÜLLER-ESTERL 1996; MARGOLIUS 1996; LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Entre as alterações decorrentes da SIR em M/E merecem destaque a alteração da função mitocondrial, a sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, a produção de ERO, a degradação da membrana celular, o seqüestro de neutrófilos e a disfunção endotelial.

Com relação à alteração da função mitocondrial a isquemia total obtida pelo modelo do torniquete aplicado ao membro pélvico de ratos por um período de 5 horas mostrou diminuição do potencial de membrana mitocondrial e da taxa de controle respiratório em comparação ao membro contralateral (controle) propiciando condições para a lesão de reperfusão por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial (BRANDÃO et al., 2003).

As alterações na função mitocondrial também foram estudadas por Wang et al. (2010). Utilizando-se o modelo de músculo grácil isolado de rato submetido a 4 horas de isquemia e 24 horas de reperfusão observou-se que a malatonina apresenta efeito protetor contra lesão de I/R por reduzir seus efeitos sobre o potencial de membrana mitocondrial.

Piccinato et al. (2004a), em um modelo de músculo grácil de cão submetido a 5 horas de isquemia total, demonstraram queda do glicogênio e aumento do lactato muscular, queda do pH sanguíneo e queda da razão de controle respiratório.

A sobrecarga de Ca^{2+} citosólico foi estudada por Piccinato, Santos e Roselino (1991) por meio de dois modelos de isquemia, um parcial (oclusão da aorta abdominal infrarenal em ratos) e um segundo de isquemia total (torniquete do membro pélvico de ratos). Observaram aumento do Ca^{2+} mitocondrial nas duas situações, sendo maior no grupo de animais submetidos à isquemia parcial. Consideraram que este aumento deve acompanhar a elevação do Ca^{2+} citosólico já conhecido em célula isquêmica de vários tecidos (STEENBERGEN et al., 1987; BOYS et al., 2010). A elevação do Ca^{2+} citosólico leva ao desacoplamento da

fosforilação oxidativa, à ativação das fosfolipases e proteases da célula e à contratura muscular (BURKE, DENNIS 2009; NOGUEIRA, HOGAN 2010).

Como descrito anteriormente as ERO são formadas a partir da entrada de O_2 em tecidos isquêmicos após revascularização. Por meio da ação da xantina oxidase sobre a hipoxantina, durante a reperfusão, liberam-se os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e urato (Figura 1). Uma forma de avaliar a formação de ERO é indiretamente quantificar os seus efeitos sobre a membrana celular e sobre a migração de neutrófilos por meio da dosagem de MDA (DAL MAESTRO 1980) e MPO (GUTE et al., 1998), respectivamente. Outra maneira seria por meio do sistema antioxidante da glutathione sintetase. O aumento das ERO na circulação leva ao aumento da glutathione oxidada e consumo da enzima glutathione sintetase no músculo como demonstrado por Grisotto et al. (2000) por meio do modelo do torniquete aplicado no membro pélvico de ratos por 3 horas seguido de 45 minutos de reperfusão.

A degradação da membrana celular é um evento diretamente relacionado à liberação de ERO e leva à liberação de MDA. Utilizando-se retalhos epigástricos de ratos submetidos a 16 horas de isquemia e 45 minutos de reperfusão demonstrou-se aumento significativo dos valores de MDA quando comparados aos retalhos controles (FREITAS et al., 2002).

Piccinato et al. (2004b) estudaram o efeito da vitamina E, um antioxidante, durante o processo de I/R de M/E de ratos submetidos a 30 minutos de isquemia parcial (pinçamento aórtico infra-renal) e 30 minutos de reperfusão. Observaram redução de produtos de degradação da membrana celular (MDA). Medling et al. (2009), utilizando um modelo de músculo grácil isolado de ratos submetidos a 4 horas de isquemia total e 24 horas de reperfusão, demonstraram o mesmo efeito protetor, no entanto, usaram como parâmetro o fluxo arterial registrado pelo Doppler.

Koksal et al. (2003), estudando a isquemia total de 4 horas (mediante a dissecação e pinçamento vasos arteriais femorais e suas colaterais) e reperfusão de 1 hora, demonstraram que os animais tratados desde a indução anestésica com N-acetilcisteína ou dimetil-sulfóxido (DMSO), ambos agentes antioxidantes, apresentaram menor liberação de lactato desidrogenase (LDH), creatinino fosfoquinase (CPK) e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS/MDA) quando comparados aos animais que receberam apenas salina.

Recentemente, em um trabalho realizado em humanos com doença arterial obstrutiva periférica apresentando isquemia crítica de extremidade, os pesquisadores demonstraram que a utilização de L-alanil-glutamina, um precursor do glutamato, protege contra lesão de I/R por aumento da capacidade antioxidante após procedimento de ponte fêmoro-distal e reperfusão de 30 minutos (ALVES et al., 2010).

Outro evento relacionado à liberação de ERO é a atração de neutrófilos para o tecido em situação de I/R. Este efeito pode ser mensurado indiretamente pela dosagem da MPO (GUTE et al., 1998). A isquemia total (síndrome compartimental) induzida em músculo cremaster de ratos (3 horas de isquemia seguida por 1 ou 24 horas de reperfusão) demonstrou que a atividade da MPO era maior quando comparada com controle e que após 24 horas de reperfusão era ainda mais evidente. Os animais pré-tratados com vitamina C na dose de 2g/Kg/dia apresentaram menor atividade de MPO (KEARNS et al., 2004).

O uso de técnicas de PreC e PosC também mostraram efeito protetor contra lesão de I/R. Park et al. (2010) demonstraram que o PosC pode proteger a M/E contra lesão de I/R em patas de ratos submetidas a 3 horas de isquemia total seguido de 6 ciclos de 15 segundos de reperfusão intercalados com ciclos de 15 segundos de re-occlusão antes do restabelecimento final do fluxo sanguíneo. Kloner e Rezkalla (2006) demonstraram em humanos os efeitos destas manobras em cirurgia cardíaca. Lintz (2011) concluiu que o PreC bem como a associação do PreC com o PosC foram capazes de minimizar a lesão tecidual em musculatura esquelética de ratos submetidos a I/R, porém a associação dos métodos não trouxe vantagens adicionais sobre o PreC aplicado isoladamente.

Outro efeito da lesão I/R é a indução de apoptose e necrose, sendo que estes fenômenos ocasionam disfunção endotelial, vasoconstrição, trombose e não refluxo em musculatura esquelética em modelos animais (WANG et al., 2009).

O endotélio em seu estado de repouso, inativo, é uma superfície anti-trombótica. Condições como I/R e inflamação podem tornar o endotélio ativado propiciando maior adesão de neutrófilos e plaquetas tornando-o uma superfície trombótica. Desta forma, a disfunção endotelial nada mais é que o conjunto de reações auto-propagativas que aumentam a oxidação levando à perda de mecanismos vasodilatadores (EVORA et al., 1996).

O pinçamento aórtico infra-renal de 2 h, seguido de 90 minutos de reperfusão, provocou disfunção do endotélio com diminuição da capacidade de liberar óxido nítrico (NO) e da musculatura lisa vascular da artéria femoral de cão (JOVILIANO et al., 2005).

1.3 Apoptose

Trata-se de um tipo de morte celular conhecido por morte anunciada ou morte celular programada e que desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento de tecidos adultos normais (GERSCHENSON, ROTELLO 1992). Apresenta características morfológicas e bioquímicas distintas da necrose. Ocorre de maneira rápida com a retração celular levando a perda de aderência com a matriz celular e com as células vizinhas. As organelas mantêm sua morfologia e a cromatina sofre condensação concentrando-se junto a membrana nuclear que está intacta. Formam-se os corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos sendo removidos sem causar processo inflamatório (GERSCHENSON, ROTELLO 1992; GRIVICICH, REGNER, ROCHA 2007).

Vários fatores podem iniciar o processo apoptótico tais como ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, choque térmico, baixa quantidade de nutrientes, níveis elevados de ERO. Trata-se de um processo irreversível que também pode ser desencadeado por fenômenos fisiológicos determinando morte celular sem que ocorra injúrias. A idéia de morte celular geneticamente programada também é discutida e pode explicar patologias como a insuficiência cardíaca idiopática (SCARABELLI et al., 2006). A lesão de I/R também está relacionada ao processo apoptótico (WANG et al., 2009). São reconhecidas duas vias para início deste processo: via extrínseca (citoplasmática) e via intrínseca (mitocondrial). A primeira desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) ativando a cascata das caspases (BUDIHARDJO et al., 1999). A segunda por estresse intra ou extracelular como na deprivação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (HENGARTNER 2000).

1.4 Bradicinina

As cininas, BK e calidina, são peptídeos autacóides de ação local que produzem dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas relacionadas a diversos fatores incluindo lesão tecidual, reações alérgicas e outros eventos inflamatórios (LEWIS 1970; REGOLI, BARABÉ 1980; LINZ et al., 1995; LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

A BK é um nonapeptídeo formado a partir da clivagem do cininogênio α 2-globulina de alto peso molecular, sintetizado no fígado e circulante no plasma. A caliceína é uma protease específica capaz de realizar esta clivagem (GARRISON 1990), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema ilustrativo do sistema caliceína-cininas, englobando a síntese das cininas a partir da fração α 2-globulina (cininogênios). A degradação pelas cininases I e II, e os receptores B_1 e B_2 apresentando agonistas (retângulos verdes) e antagonistas (retângulos vermelhos) distintos. ECA: enzima de conversão de angiotensina.

As cininas têm uma existência efêmera, sendo que sua meia vida plasmática é de cerca de 15 segundos, além disto, em uma única passagem através do leito vascular pulmonar cerca de 80 a 90% das cininas podem ser degradadas (RYAN 1982; LINZ et al., 1995). A principal enzima responsável pela degradação

das cininas nos pulmões e em outros leitos vasculares é a cininase II, também conhecida como enzima de conversão de angiotensina (ECA).

Embora os mecanismos de síntese e degradação das cininas sejam bem conhecidos o seu papel fisiológico ainda não foi totalmente desvendado (MARGOLIUS 1996), sendo seus principais efeitos relacionados à cascata inflamatória (LEWIS 1970). As cininas desempenham uma variedade de processos biológicos através da ativação de receptores, evidências sugerem a existência de dois deles: B₁ e B₂ (REGOLI, BARABÉ 1980; REGOLI et al., 1998; LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

O receptor B₁ cuja formação parece ser induzida por trauma ou por insultos patológicos (REGOLI 1987; LEEB-LUNDBERG et al., 2005) menos importante, ativado principalmente pelos metabólitos resultantes da via da cininase I (Des-Arg-BK e Des-Arg-Calidina) e bloqueado pelo antagonista Des-Arg-[Leu]BK e o receptor B₂, constitutivo, que parece ser o principal responsável pelos efeitos da BK, ativado diretamente pelas cininas e bloqueado pelo antagonista icatibant (HOE 140) (LINZ et al., 1995).

Os receptores descritos estão expressos nos mesmos tipos celulares: endotélio, musculatura lisa, fibroblastos, células epiteliais (LEE-LUNDBERG et al., 2005). Podem também ser encontrados na M/E (FIGUEROA, DIETZE, MÜLLER-ESTERL 1996). A ativação de receptores B₁, por exemplo, pode desencadear a contração da aorta isolada de coelhos e da musculatura do duodeno de ratos bem como levar ao relaxamento das artérias mesentéricas de coelhos (REGOLI, BARABÉ 1980). Já os receptores B₂ presentes no endotélio, quando ativados, podem ocasionar a formação de NO, prostaciclina e de fatores ativadores de plaquetas (LINZ et al., 1995).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a BK desempenha diversos papéis por vezes antagônicos nos diversos tecidos. No miocárdio de coelhos e porcos, por exemplo, está associada à proteção contra I/R mediante PreC (HEUSCH, SCHULZ 1997; JANCOS et al., 2004) via receptor B₂. Em cardiomiócitos de ratos esta proteção está associada à inibição da ECA que leva ao aumento das concentrações de BK ocasionando maior produção de NO (MATOBA et al., 1999; KOBARA et al., 2003). Outro efeito importante deste autacóide é o estímulo a produção de NO em células endoteliais via ativação de receptores B₁ com efeito vasodilatador (SKIDGEL, STANISAVLJEVIC, ERDÖS 2006).

Em um mesmo tecido pode-se vislumbrar duas respostas antagônicas. No rim, por exemplo, um estudo utilizando modelo de camundongos modificados geneticamente para não expressão dos receptores B₁ e B₂ mostrou que a ativação destes receptores apresentou efeito protetor contra lesão de I/R (KAKOKI et al., 2007). No entanto, outro trabalho também utilizando camundongos modificados geneticamente demonstrou que o antagonismo de receptores B₁ desencadeava aquele efeito (WANG et al., 2008).

O uso de inibidores de enzima de conversão de angiotensina (iECA) não previne nem aumenta o efeito deletério das lesões de I/R em M/E (THAVEAU et al., 2010). Já foi discutido que a ECA (cininase II) é responsável pela degradação das cininas em peptídeos inativos principalmente no leito pulmonar. Portanto, o aumento da concentração da BK não altera as lesões de I/R em patas de ratos submetidas a 5 horas de isquemia através da técnica do torniquete.

Como as pesquisas na área de I/R têm aumentado muito nos últimos anos e tendo em vista o interesse na busca por novas drogas para atenuar as lesões decorrentes deste processo delineou-se o trabalho descrito a seguir com o objetivo de verificar os efeitos da BK na lesão de I/R em M/E de ratos. Utilizou-se o modelo de isquemia total através da técnica do torniquete (STROCK, MAJNO 1969; TRAN et al., 2010) aplicado ao membro pélvico de ratos por se tratar de um modelo bem conhecido e estudado (PICCINATO, SANTOS, ROSELINO 1991; GRISOTTO et al., 2000; BRANDÃO et al., 2003; TRAN et al., 2010) capaz de simular quadros de OAA freqüentes na prática médica.

Optou-se pela infusão intra-arterial de modo contínuo de BK devido à sua rápida metabolização nos tecidos principalmente após sua passagem pelo leito pulmonar (RYAN 1982; LINZ et al., 1995). O tempo de 2 horas de isquemia e 4 horas de reperfusão foi escolhido baseando-se em trabalhos prévios onde se encontram diferentes tempos de I/R dependendo do tipo de tecido estudado (SOUZA et al., 2003; FREISE, PALMES, SPIEGEL 2006; NOWAK et al., 2007). Levou-se em consideração que tempos muito extensos de I/R poderiam ocasionar um processo irreversível o que poderia prejudicar a análise dos resultados. Brandão et al. (2003) demonstraram efeitos deletérios significativos em M/E de ratos com 5 horas de isquemia total e que até 3 horas esta musculatura apresenta resistência. Piccinato et al. (2004a) demonstraram em cães que após 5 horas de isquemia total e 30 minutos de reperfusão o processo ainda é reversível. Em contrapartida, em

humanos, Eckert e Schnackerz (1991) demonstraram que existe uma tolerância da M/E a um tempo de isquemia de até 2 horas e meia e que após 4 horas o dano é irreversível. Andrade-Silva et al. (2009), estudando M/E de ratos submetidas a 2 horas de isquemia total pelo modelo do torniquete e 4 horas de reperfusão, demonstraram aumentos significativos dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e outros parâmetros.

Realizou-se também um estudo piloto prévio com isquemia total de 2 horas por meio do garroteamento do membro pélvico de ratos e a seguir 3 horas de reperfusão. A dose de BK utilizada foi de 500µg/Kg. Observou-se elevação significativa da CPK no grupo controle após a reperfusão ($892,1 \pm 236$ vs 3646 ± 2044 ; $p < 0,001$). A administração de BK durante a reperfusão não elevou significativamente a CPK ($577,7 \pm 333,5$ vs $1690 \pm 448,9$). A comparação entre os grupos controle e bradicinina após a reperfusão mostrou que a CPK neste último foi menor, sugerindo um efeito protetor desta substância na lesão de I/R.

1.5 Marcadores de Isquemia e Reperfusão

O tecido muscular corresponde a aproximadamente 80% do tecido metabolicamente ativo e a 75% da massa total dos membros inferiores. Tem resistência intermediária à isquemia sendo, por exemplo, mais resistente que nervos, porém, menos resistente que a pele, ossos e tendões (RUDERMAN et al., 1977). Demonstrou-se que a partir de 4 a 6h, a musculatura esquelética pode sofrer alterações irreversíveis (BLEBEA et al., 1988; ECKERT, SCHNACKERZ 1991). Como fatores de resistência muscular à isquemia, destacam-se as grandes reservas de glicogênio e fosfatos de alta energia sob a forma de creatina, a baixa atividade metabólica em repouso e a capacidade de manter funções básicas celulares à custa de glicólise anaeróbia (PERRY 1988).

As lesões musculares devido a SIR podem ser determinadas de diferentes maneiras desde a dosagem de marcadores bioquímicos como a AST, a CPK e a LDH (ANAYA-PRADO et al., 2002) até a determinação da taxa de controle respiratório (RCR) e do potencial de membrana mitocondrial para quantificação da fosforilação oxidativa (BRANDÃO et al., 2003). A ação das ERO sobre os

fosfolípidos da membrana celular promove liberação de produtos de degradação desta membrana como o MDA e este pode ser usado como marcador de lesão (GRISOTTO et al., 2000; FREITAS et al., 2002; KOKSAL et al., 2003; PICCINATO et al., 2004b; ALVES et al., 2010).

A I/R de M/E favorece também o recrutamento e ativação de neutrófilos e pode-se inferir por meio de dosagens das enzimas tissulares como a MPO o nível do recrutamento neutrofílico (GUTE et al., 1998; FREITAS et al., 2002; KEARNS et al., 2004; PARK et al., 2010).

1.5.1 Transaminases

A AST pertence ao grupo das transaminases, enzimas que catalisam reações envolvidas na interconversão dos metabólitos dos carboidratos e nas vias catabólicas das proteínas. As transaminases, sobretudo a AST, estão presentes nas bactérias e em todos os tecidos animais, existindo em quantidades mais apreciáveis no miocárdio, fígado, musculatura esquelética, rins, cérebro, testículos, pulmões e pâncreas. Assim, qualquer lesão com destruição celular destes tecidos como acontece nas hepatites, pancreatites e nos traumatismos extensos, provoca considerável aumento destas enzimas no sangue. Por este motivo, nestas lesões, devido à necrose ou ao simples aumento da permeabilidade celular, a dosagem da AST proporciona informações de grande utilidade (ANDRIOLO, BORGES, ARAÚJO 1987; HICKEY et al., 1996).

Outro fato importante é que o aumento desta enzima segue uma curva que no caso do infarto agudo do miocárdio, por exemplo, eleva-se 6 a 12 horas após o início do evento atingindo seu pico máximo entre 24 e 48 horas e retornando aos valores basais após 5 ou 6 dias (WIDMANN 1993).

1.5.2 Desidrogenases

As desidrogenases fazem parte dos sistemas biológicos de oxidação-redução. A LDH é uma enzima tetramérica contendo apenas duas subunidades diferentes: H, para o coração e M, para o músculo esquelético. São identificadas cinco isoformas: LDH₁ (HHHH) e LDH₂ (HHHM), encontradas no

miocárdio e nos eritrócitos; LDH₃ (HHMM), no cérebro e rim; LDH₄ (HMMM) e por fim LDH₅ (MMMM), encontrada no fígado e músculo esquelético. Atua como substância oxidante, catalisando a oxidação reversível do piruvato em lactato em situação anaeróbia (isquemia). Encontra-se amplamente distribuída nos tecidos dos mamíferos, sendo abundante no miocárdio, músculo esquelético, rins e fígado. Assim como as transaminases, a LDH é marcadora de lesão nos tecidos onde é encontrada (OLIVEIRA, BERTONI, MARTINS 1982; BOZKURT 2002).

Também se observa a formação de uma curva a partir do início do quadro isquêmico. No caso do miocárdio, inicia-se após 12 horas e apresenta pico máximo em 48 horas.

1.5.3 Creatinino fosfoquinase (CPK)

Também denominada creatina quinase (CK) e ATP-creatinafosfotransferase é encontrada no miocárdio, na musculatura esquelética, no cérebro, nos pulmões e intestino. A sua concentração é muito alta nos músculos esqueléticos e no miocárdio. Na fase aguda de lesões destes órgãos, há nítida elevação dos níveis séricos desta enzima. Na isquemia do miocárdio a CPK começa a elevar-se 6 horas após o início do quadro, atinge um pico máximo após 12 a 24 horas e retorna aos valores normais após 72 horas.

São três as isoenzimas da CPK, formadas por combinações de cadeias M e B: a BB (CK1), encontrada no cérebro; a MB (CK2), presente no miocárdio e a MM (CK3), dos músculos esqueléticos e miocárdio (OLIVEIRA, BERTONI, MARTINS 1982; BOZKURT 2002).

1.5.4 Malondialdeído (MDA)

O MDA é um metabólito dos fosfolípidos formadores da membrana celular, liberado pelo processo de peroxidação dessas membranas pelas ERO durante o período de reperfusão tecidual, sendo assim um importante marcador da lesão da membrana celular (DAL MAESTRO 1980; CAMPOS, YOSHIDA 2004).

1.5.5 Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima contida nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos que catalisa a oxidação de substâncias na presença de H_2O_2^- e de um halogênio, constituindo a ligação peróxido de hidrogênio-halogênio-MPO um sistema altamente tóxico. Os grânulos dos neutrófilos contendo MPO são liberados mediante estimulação por imunocomplexos, por catecolaminas ou durante a morte celular. Como a MPO circulante no plasma em grande porcentagem provém dos neutrófilos e sua liberação ocorre em situações de inflamação e necrose associadas a ativação das ERO, esta enzima é considerada um marcador de neutrófilos ativados (MATTHEWS, CAMPBELL 1984; NAKAMUTA et al., 1993; PEDRO et al., 2003)

1.6 Marcador de Apoptose

A apoptose é um processo de controle celular e de defesa, que atua promovendo a renovação celular e eliminando células danificadas (GERSCHENSON, ROTELLO 1992). A principal forma de detecção de células apoptóticas é por meio de técnicas imunohistoquímicas. Desta forma, é importante identificar e quantificar o número de núcleos apoptóticos, que marcam as células que evoluíram para morte celular e a irreversibilidade da lesão de I/R.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar os efeitos da bradicinina administrada durante 4 horas de reperfusão após 2 horas de isquemia total em músculo esquelético de ratos.

2.2 Específicos

1. Avaliar os parâmetros bioquímicos da lesão celular por meio da dosagem de AST, LDH e CPK séricos.
2. Quantificar os efeitos da peroxidação lipídica sobre a membrana celular pela dosagem do malondialdeído tecidual (MDA).
3. Quantificar o recrutamento e ativação de neutrófilos mediante dosagem de mieloperoxidase tecidual (MPO).
4. Quantificar a apoptose.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Trata-se de um estudo prospectivo no qual foram utilizados 18 ratos da linhagem Wistar, de ambos os sexos e peso variando entre 350 e 500g conforme observado na Tabela 1 e na Figura 15 do Apêndice. Utilizou-se a mesma dieta, uma ração balanceada fornecida por meio de tampas comedouras e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A pesquisa foi conduzida respeitando-se as normas de experimentação animal, regulamentadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, segundo protocolo número 039/2008.

Os animais foram submetidos ao experimento no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram alocados sucessivamente em 3 grupos cada um com 06 ratos conforme descrito abaixo e representado na Figura 3 na próxima página:

- a. **Grupo Controle:** ratos submetidos a 2 horas de isquemia total por meio do modelo clássico do torniquete (STROCK, MAJNO 1969; TRAN et al., 2010) aplicado à raiz do membro pélvico esquerdo e posteriormente a 4 horas de reperfusão com infusão intra-aórtica de solução salina em bôlus (5ml) e após continuamente por meio de uma bomba de infusão (SAGE INSTRUMENTS, Boston, MA, USA) completando um volume total de 9ml.

- b. **Grupo Bradicinina:** ratos submetidos ao mesmo modelo e aos mesmos períodos de I/R do grupo Controle sendo que no início do período de reperfusão realizou-se infusão intra-aórtica de BK (acetato de bradicinina Sigma-Aldrich B3259) na dose de 1mg/kg, sendo metade da dose infundida em bôlus e o restante continuamente por meio de uma bomba de infusão completando um volume total de 9ml.
- c. **Grupo HOE:** ratos submetidos ao mesmo modelo a aos mesmos períodos de I/R dos grupos anteriores sendo que no início do período de reperfusão realizou-se infusão intra-aórtica de HOE 140 (Sigma-Aldrich H157), um antagonista seletivo dos receptores B₂ de BK, na dose de 125µg/kg. Metade da dose foi infundida em bôlus e o restante continuamente por meio de uma bomba de infusão completando um volume total de 9ml.

Figura 3 – Esquema mostrando a distribuição dos grupos de animais, infusão de drogas e períodos de coleta de material. I (isquemia); R (reperfusão).

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

Os ratos foram anestesiados com tionembutal (50mg/Kg) intraperitoneal e mantidos anestesiados durante o período do experimento (6 horas ao todo) com aplicação endovenosa de tionembutal pela veia caudal (Figura 4). Durante todo o procedimento cirúrgico a temperatura ambiente foi mantida em 23°C. Após a anestesia todos os animais foram submetidos à tricotomia cervical para cervicotomia e realização de traqueostomia com intuito de manter pérvea a via aérea e a tricotomia abdominal para realização de laparotomia para dissecar, isolar e reparar a veia cava inferior e aorta (Figura 4).

Figura 4 – A: animal anestesiado com tricotomia abdominal. B: punção veia caudal para infusão de anestésico. C: dissecção dos vasos abdominais com aorta reparada (seta).

Foi coletado sangue da veia cava de todos os animais antes do início do período de isquemia e em seguida a aorta foi reparada com fio de algodão 2-0. A coleta dos materiais (sangue e músculo) de todos os ratos foi executada conforme ilustra a Figura 3. Coletou-se 1,5ml de sangue antes do início da isquemia, ao final da isquemia e após o período de reperfusão para dosagem de AST, LDH e CPK totalizando 4,5ml que foi repostado com solução salina infundida na aorta. Ao final do período de observação foi coletada biópsia do músculo gastrocnêmico para dosagem de MDA, MPO e avaliação imunohistoquímica (Figura 3).

Os animais do grupo Controle foram submetidos a 2 horas de isquemia total através do modelo clássico do torniquete (STROCK, MAJNO 1969) aplicado à raiz do membro pélvico esquerdo (Figura 5) e posteriormente reperfusão por um período de 4 horas com infusão intra-aórtica de solução salina através de Abocath® 24 conforme mostra a Figura 6. Foi administrado bôlus de 5ml desta solução e a seguir infundiu-se continuamente a solução na velocidade de 1ml/h durante 4 horas por meio de uma bomba de infusão completando um volume final de 9 ml.

Figura 5 – A: rato traqueostomizado com membro pélvico esquerdo garroteado. B: cianose decorrente da isquemia total.

Figura 6 – A: punção anterógrada da aorta em posição infra-renal. B: bomba de infusão utilizada para infusão das drogas.

Os animais do grupo Bradicinina foram submetidos aos mesmos procedimentos e períodos de I/R do grupo anterior, mas durante o período de reperfusão foi realizada infusão intra-aórtica de solução de BK na dose de 1mg/kg, sendo metade em bôlus e o restante continuamente por meio de uma bomba de infusão por um período de 4 horas, completando um volume final de 9 ml.

Os animais do grupo HOE seguiram o mesmo protocolo dos grupos anteriores, mas durante o período de reperfusão receberam infusão de solução de HOE 140 na dose de 125 µg/kg, sendo metade em bôlus e o restante de maneira contínua por um período de 4 horas.

A eutanásia de todos os ratos foi executada ao final do experimento conforme descrito a seguir.

3.3.1 Traqueostomia e exposição dos vasos abdominais

Foi realizada anestesia intraperitoneal e posicionamento dos animais em decúbito dorsal sobre tábua rígida (Figuras 4 e 5). A temperatura ambiente foi mantida em 23°C durante todo o período do experimento. Puncionou-se a veia caudal para infusão de anestésico durante o período de observação e em seguida realizou-se a tricotomia cervical e abdominal conforme Figura 4.

Após incisão mediana na região cervical e dissecção da traquéia realizou-se a traqueostomia para posicionamento de uma cânula com diâmetro compatível com o intuito de facilitar a aspiração de secreções. Fez-se a laparotomia e a exposição da aorta abdominal infra-renal e da veia cava inferior. A aorta foi dissecada e reparada com fio de algodão 2-0. A veia cava foi puncionada para retirada de 1,5ml de sangue para dosagens séricas. A cavidade abdominal foi então suturada com fio de algodão 2-0 em pontos separados.

3.3.2 Modelo de isquemia total

Aplicou-se torniquete na raiz do membro pélvico esquerdo por um período de 2 horas, conforme demonstrado na Figura 5. Ao final deste período as cavidades abdominais dos ratos foram novamente abertas para nova coleta de sangue venoso (1,5ml) e para punção aórtica (Figura 6).

3.3.3 Infusão intra-arterial

Durante o período de reperfusão realizou-se infusão de solução salina, BK ou HOE 140 intra-arterial por meio de uma punção da aorta infra-renal no sentido anterógrado com Abocath® 24 (Figura 6). A solução foi administrada em bôlus e a seguir mantida continuamente por meio de uma bomba de infusão projetada para pequenos animais (SAGE INSTRUMENTS, Boston, MA, USA).

Observou-se a coloração dos membros pélvicos dos animais durante os períodos de isquemia e reperfusão como exemplificado na Figura 7.

Figura 7 – A: coloração cianótica de pata de rato submetida a 2 horas de isquemia total pelo método do torniquete. B: hiperemia reativa após liberação do fluxo sanguíneo no início do período de reperfusão.

3.4 Coleta de Amostras

As amostras de sangue coletadas através da punção da veia cava inferior foram acondicionadas em tubo seco e enviadas rapidamente para determinação das dosagens de AST, LDH e CPK.

As biópsias do músculo gastrocnêmico, de aproximadamente 3g, foram feitas após o término do experimento no membro pélvico esquerdo e divididas para análise imunohistoquímica e dosagem de MPO e MDA. As amostras para histoquímica foram mantidas em formol por 24 horas e posteriormente incluídas em parafina. Os fragmentos musculares para dosagem de MDA e MPO foram acondicionados em papel alumínio e colocados em caixas com gelo sendo encaminhadas rapidamente ao laboratório para resfriamento a -70°C .

3.5 Eutanásia

A eutanásia dos ratos foi feita logo após a coleta das amostras, utilizando-se injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1%, com os animais ainda anestesiados.

3.6 Dosagem de Marcadores Séricos e Tissulares

As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 3000g por 10 min, e o soro obtido foi utilizado para a determinação dos níveis séricos de AST, LDH e CPK. As determinações do MDA e do MPO foram realizadas a partir da biópsia muscular, armazenadas a -70°C.

3.6.1 Dosagem de aspartato aminotransferase (AST)

A determinação da AST foi realizada por kit, utilizando-se um espectrofotômetro CELM (mod. SB - 190), através do método cinético – UV otimizado pela CELM-Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos (HENRY et al., 1960). O soro extraído foi misturado aos reativos (tampão TRIS-HCl, NADH, MDH/LDH e 2-oxoglutarato). Posteriormente foram registradas as absorbâncias após 1, 2, 3 e 4 min, para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores obtidos foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.2 Dosagem de lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da LDH foi realizada por kit, utilizando-se um espectrofotômetro CELM (mod. SB – 190), através do método cinético – UV (KEIDING, HORDER, GERHARDT 1974), otimizado por LABORLAB – Produtos para Laboratórios Ltda. O soro extraído foi misturado aos reativos: tampão fosfato e NADH. A seguir, foram registradas as absorbâncias após 1, 2 e 3 minutos, para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores obtidos foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.3 Dosagem de creatinino fosfoquinase (CPK)

A determinação da CPK foi realizada por *kit*, utilizando-se um espectrofotômetro CELM (mod. SB - 190), através do método cinético - UV, otimizado por WIENER Laboratórios. O soro extraído foi misturado aos reagentes tampão e substrato. Após 2 min foram registradas as absorbâncias após 1, 2 e 3 min, para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.4 Dosagem do malondialdeído muscular (MDA)

Para as dosagens do MDA muscular, as amostras de tecido foram lavadas em Tris-HCl, 20mM, pH 7,4, enxugadas em papel absorvente e a seguir pesadas e diluídas a 10% em Tris-HCl, 20mM, pH 7,4. O tecido foi então picotado e homogeneizado em três ciclos com 1 minuto de intervalo entre os ciclos. O homogenato obtido foi centrifugado a 3000g por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante coletado para a determinação do MDA. O MDA foi determinado a 586 nm, utilizando-se um espectrofotômetro DU-640B - Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), através do kit Lipid Peroxidation Assay (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Os valores foram expressos em μ molar, obtidos a partir de uma curva padrão.

3.6.5 Dosagem da mieloperoxidase (MPO)

A quantificação da MPO foi feita por radioimunoensaio pelo duplo anticorpo segundo descrito por Nakamuta et al. (1993). Foram utilizados antígeno marcado com isótopo I^{125} (mieloperoxidase I^{125}), o anticorpo anti-mieloperoxidase, os padrões da mieloperoxidase em concentrações conhecidas e os soros descongelados diluídos na proporção 1:5 em tampão. De cada um destes reagentes foram retirados 50 μ L para tubos de contagem e os padrões substituídos pela amostra desconhecida (soro a estudar). Após a incubação contínua durante 3 horas com agitação e temperatura ambiente foi adicionado o segundo anticorpo (reagente de separação) e as amostras foram novamente incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os tubos contendo os reagentes foram

centrifugados a 1500g durante 10 minutos. Os sobrenadantes contendo a fração livre (antígeno livre I¹²⁵) foram descartados e os precipitados contendo a fração ligada (complexo antígeno-anticorpo I¹²⁵) lidos em um leitor de microplacas da Molecular Devices Versa Max. Os valores foram expressos em número de neutrófilos por miligrama de tecido.

3.6.6 Imunohistoquímica

Biópsias de tecido muscular (gastrocnêmico) incluídas em parafina foram desparafinizadas e pré-tratadas com 20mg/ml de proteinoquinase K (Promega Corporation, Madison, EUA). Foi utilizado para a detecção da apoptose in situ, a Peroxidase DeadEnd, com o kit (TUNEL DeadEnd; Promega Corporation, Madison, EUA) sendo utilizado biotina dUTP-nick-end.

As amostras foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3% para extinguir a atividade da peroxidase endógena. Após adicionar o tampão de equilíbrio, os cortes foram tratados com deoxinucleotídeo-transferase (TdT) e digoxigenina-dNTPS por 60 minutos a 37°C. As amostras foram então tratadas com anti-peroxidase-digoxigenina por 30 minutos a 37°C, coradas com substrato de 3,3'diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com hematoxilina de Mayer. Finalmente as lâminas foram enxaguadas, desidratadas e montadas. Um controle negativo foi preparado pela omissão da enzima deoxinucleotídeo-transferase para controlar a incorporação não específica de nucleotídeos ou a ligação conjugada da enzima.

TUNEL foi considerada positiva quando a coloração marrom estava presente homogeneamente. O número de núcleos TUNEL positivos em cada amostra foi avaliado em cada 100 células com auxílio de um microscópio em campos de grande aumento (40X) e a média dos valores determinada (GAVRIELI, SHERMAN, BEN-SASSON 1992).

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em valores individuais e como médias $\pm$ desvio padrão.

As variáveis AST, LDH e CPK entre grupos e tempos foram comparadas utilizando o modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) que é utilizado na análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Para a utilização deste modelo, é preciso que seus resíduos tenham distribuição normal com média zero e variância constante. O ajuste do modelo foi feito através do procedimento PROC MIXED do software SAS[®] 9.0. Para as construções dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 4 (SCHALL 1991; AGRESTI 2002; SAS INSTITUTE 2003; PAGANO, GAUVREAU 2004).

As variáveis MDA, MPO e TUNEL entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento PROC GLM do software SAS versão 9. Para a utilização desse modelo é necessário que os resíduos tenham distribuição normal com variância constante. Os contrastes ortogonais serviram para a análise da diferença entre os grupos (MONTGOMERY 2000; SAS INSTITUTE 2003; PAGANO, GAUVREAU 2004). Utilizou-se o software GraphPad Prism 4 para a construção dos gráficos.

A comparação entre os grupos foi feita considerando-se nível de significância 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Valores de Aspartato Aminotransferase (AST)

Os valores individuais da AST em unidades por litro (U/l) bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos nos períodos estudados (Pré isquemia, Isquemia e Reperusão) nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 2 e 3 do Apêndice. A Figura 16 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

A Figura 8 mostra gráficos com os valores das médias e desvios padrão das dosagens de AST nos três grupos estudados comparando os grupos para cada tempo e os tempos para cada grupo.

Figura 8 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para AST nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em relação ao tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos em cada grupo.

As Tabelas 4 e 5 do Apêndice mostram as comparações realizadas para a variável AST entre os grupos para cada tempo (Tabela 4) e entre os tempos para cada grupo (Tabela 5).

A comparação entre os grupos em cada tempo mostra que não há diferença estatística entre eles (Figura 8 A, B, C e Tabela 4). Há aumento significativo de AST após a reperfusão em comparação ao tempo pré isquemia no grupo Bradicinina ($p=0,046$), porém não há diferença entre os tempos pré isquemia e isquemia (Figura 8 E e Tabela 5). A comparação entre os tempos para os grupos Controle e HOE (Figura 8 D, F e Tabela 5) não mostra diferença estatística.

4.2 Valores de Lactato Desidrogenase (LDH)

Os valores individuais da LDH em unidades por litro (U/l) bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos nos períodos estudados (Pré isquemia, Isquemia e Reperfusão) nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 6 e 7 do Apêndice. A Figura 17 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

Figura 9 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para LDH nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em função do tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos estudados em cada grupo.

A Figura 9, na página anterior, mostra gráficos com os valores das médias e desvios padrão das dosagens de LDH nos três grupos estudados comparando os grupos em cada tempo e os tempos estudados em cada grupo.

As Tabelas 8 e 9 do Apêndice mostram as comparações realizadas em relação à LDH entre os grupos em cada tempo (Tabela 8) e entre os tempos para cada grupo (Tabela 9).

Observa-se que na pré isquemia o valor da LDH no grupo Bradicinina é maior em relação aos demais ($p=0,002$) o que também ocorre após isquemia ($p=0,002$) e reperfusão ($p=0,016$) (Figura 9 A, B, C e Tabela 8)

Observa-se que nos três grupos ocorre diminuição significativa de LDH após a reperfusão em relação aos tempos pré isquemia e isquemia (Figura 9 D, E, F e Tabela 9).

4.3 Valores de Creatinino Fosfoquinase (CPK)

Os valores individuais da CPK em unidades por litro (U/l) bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos nos períodos estudados (Pré isquemia, Isquemia e Reperfusão) nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 10 e 11 do Apêndice. A Figura 18 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

A Figura 10, na próxima página, mostra gráficos com os valores das médias e desvios padrão das dosagens de CPK nos três grupos estudados comparando-se os grupos entre si em relação aos tempos e estes em cada grupo.

As Tabelas 12 e 13 do Apêndice mostram as comparações realizadas em relação à CPK entre os grupos em função dos tempos (Tabela 12) e entre estes em cada grupo (Tabela 13).

Como pode ser visto na Figura 10 e na Tabela 12 não há diferença dos valores de CPK entre os grupos no tempo Pré-isquemia (Figura 10 A). A CPK eleva-se significativamente no grupo Bradicinina em relação ao grupo HOE no tempo Isquemia (Figura 10 B $p=0,043$). Após a reperfusão há elevação significativa do valor de CPK no grupo Bradicinina em relação aos demais (Figura 10 C) sendo que não existe diferença estatística entre os grupos Controle e HOE neste tempo.

Figura 10 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para CPK nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Em A, B e C comparam-se os grupos em cada tempo. Em D, E e F comparam-se os tempos em cada grupo.

Ocorre aumento significativo nos valores da CPK após a reperusão nos três grupos (Controle, Bradicinina e HOE) em relação à pré isquemia e isquemia (Figura 10 D, E, F e Tabela 13).

4.4 Valores de Malondialdeído (MDA)

Os valores individuais do MDA em μ molar bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos após a reperusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 14 e 15 do Apêndice. A Figura 19 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

A Figura 11 mostra um gráfico com os valores das médias e desvios padrão das dosagens de MDA nos três grupos estudados após a reperusão.

Figura 11 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para MDA após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.

A Tabela 16 do Apêndice mostra as comparações realizadas para a variável MDA entre os grupos no tempo Reperfusão.

O MDA eleva-se significativamente após a reperfusão no grupo Bradicinina em relação aos grupos Controle e HOE ($p<0,001$). Não há diferença do MDA nos grupos Controle e HOE.

4.5 Valores de Mieloperoxidase (MPO)

Os valores individuais observados da MPO em número de neutrófilos por miligrama de tecido bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 17 e 18 do Apêndice. A Figura 20 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

A Figura 12 mostra um gráfico com os valores das médias e desvios padrão das dosagens de MPO nos três grupos estudados após a reperfusão

Figura 12 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para MPO após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.

A Tabela 19 do Apêndice mostra as comparações realizadas em relação à variável MPO entre os grupos após a reperfusão.

A MPO no grupo Bradicinina eleva-se significativamente após a reperfusão em relação ao grupo Controle ($p=0,024$). Não há diferença entre os grupos Controle e HOE.

4.6 Imunohistoquímica (TUNEL)

Os valores individuais observados do TUNEL em número de núcleos marcados em cada 100 células (%) bem como os valores das médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE encontram-se nas Tabelas 20 e 21 do Apêndice. A Figura 21 do Apêndice mostra um gráfico tipo boxplot com o resumo dos dados encontrados.

A Figura 13 mostra fotos das lâminas montadas a partir de cortes histológicos do músculo gastrocnêmio do membro pélvico esquerdo dos animais estudados observadas em aumento de 40x com a presença de núcleos marcados pela técnica de TUNEL.

Figura 13 – Lâminas preparadas pela técnica de TUNEL e visualizadas em aumento de 40X. Observam-se cortes transversais de miócitos com núcleos marcados na periferia. A: Controle. B: Bradicinina. C:HOE.

A Figura 14 mostra um gráfico com os valores das médias e desvios padrão para TUNEL nos três grupos estudados após a reperfusão.

Figura 14 – Representação gráfica dos valores das médias e dos desvios padrão para os números de núcleos marcados (TUNEL) após a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE.

A Tabela 22 do Apêndice mostra as comparações realizadas em relação ao número de núcleos marcados pela técnica de TUNEL entre os grupos após a reperfusão. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,067$).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O tratamento das lesões de I/R continua a desafiar a todos que se dedicam a cuidar de um paciente que, além do quadro agudo isquêmico do membro, apresenta frequentemente comprometimento em outros territórios como no miocárdio, cérebro, rins que podem ser agravados levando a quadros irreversíveis e até a morte.

A corrida contra o tempo para restabelecer o fluxo sanguíneo para as diferentes regiões ocasionalmente revela-se inútil tendo em vista os fenômenos destrutivos acarretados pela reperfusão (HOBSON II, MILAZZO, DURÁN 1996; DORMANDY, HEECK, VIG 1999; SILVEIRA, YOSHIDA 2004). Torna-se de fundamental importância buscar meios para diminuir esta resposta sistêmica e proporcionar uma melhor recuperação ao paciente, diminuindo a morbi-mortalidade do processo.

Há muito, observa-se um aumento na quantidade de trabalhos na área de I/R, diversos deles têm mostrado o efeito benéfico de alguns agentes farmacológicos como a BK, a adenosina, os opióides, a eritropoetina e os agonistas adrenérgicos e muscarínicos na proteção contra lesão de I/R (MCCORD, ROY 1982; MORENO 1991; SEYAMA 1993; OREDSSON, PLATE, QVARFORDT 1994; BOZKURT 2002; KOKSAL et al., 2003; KEARNS et al., 2004; PICCINATO et al. 2004a; PICCINATO et al., 2004b; MEDLING et al., 2009; ALVES et al., 2010; WANG et al., 2010). Outros, no entanto, não demonstraram efeitos protetores ou prejudiciais como na utilização de análogos de prostaglandinas (ANTONIO, EVORA, PICCINATO 2009) e na utilização de iECA (THAVEAU et al., 2010).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a infusão de BK em baixas doses desempenha um papel protetor contra a lesão de I/R que parece ser secundário ao seu potente efeito vasodilatador. Em corações de cães, coelhos e porcos, por exemplo, a infusão de BK reduz a área de infarto (NODA et al., 1992; KOSITPRAPA, OCKAILI, KUKREJA 2001; SHIGEMATSU et al., 2001). A lesão de I/R também pode ser atenuada com o uso de iECA que atua prevenindo a degradação da BK endógena pela cininase II (LAZAR et al., 2001).

Shigematsu et al. (1999) demonstraram por meio de um modelo de microscopia intravital os efeitos dose dependentes da BK em mesentério de ratos e

concluíram que esta substância em baixas doses ($<10^{-7}\text{M}$) diminui a adesão leucocitária e a formação de agregados de plaquetas-leucócitos via receptor B_2 além de aumentar o fluxo sanguíneo via liberação de NO com vasodilatação, o que em última análise previne a lesão de I/R. Por outro lado, altas doses de BK ($>10^{-6}\text{M}$) apresentam efeitos contrários.

A BK é uma substância que atua local e sistemicamente interferindo em diversos processos como na permeabilidade vascular e na síntese de prostaglandinas (LEWIS 1970; LEEB-LUNDBERG et al., 2005), sendo amplamente estudada no miocárdio (HEUSCH, SCHULZ 1997; MATOBA et al., 1999; PAN et al., 2000; YANG et al., 2004; GROSS, GROSS 2006). Apresenta efeitos protetores contra lesão de I/R por meio da produção de NO, mas também é um potente agente pró-inflamatório. Atua em diversos tecidos via receptores acoplados à proteína G e por vezes desempenha papéis antagônicos em um mesmo sítio. No miocárdio de ratos, por exemplo, Kobara et al. (2003) observaram que a utilização de iECA reduz a lesão de I/R ocasionando uma redução da área de infarto e do número de células apoptóticas e que o HOE 140 na dose de $250\mu\text{g/Kg/dia}$ administrado por via subcutânea inibe este efeito. Matoba et al. (1999) já haviam demonstrado este efeito protetor mas com redução da lesão celular evidenciada pela dosagem de CPK. Kumari et al. (2003), em um modelo in vivo de isquemia miocárdica em gatos, demonstraram que a infusão intravenosa de $200\mu\text{g/Kg}$ de HOE 140 apresentou efeito protetor contra lesão de I/R reduzindo a concentração de MDA, mantendo os estoques de ATP e a concentração de glutathiona reduzida.

Outro tecido que apresenta efeitos antagônicos da BK é o renal. Kakoki et al. (2007) demonstraram em camundongos modificados geneticamente que esta substância protege este tecido contra lesão de I/R, enquanto Wang et al. (2008) obtiveram melhora deste tipo de lesão por meio do bloqueio dos receptores B_1 .

Trabalhos realizados em pulmão, fígado e intestino de ratos foram considerados para a determinação das doses de BK e HOE 140. Em um modelo de I/R mesentérica por meio do clampeamento da artéria mesentérica superior de ratos Souza et al. (2003) demonstraram que a ativação de receptores B_2 é essencial para o desenvolvimento das lesões inflamatórias e para a letalidade ocasionada pela SIR utilizando doses de 0,01 a 1mg/Kg de HOE 140 por via endovenosa. Freise, Palmes e Spiegel (2006), em um modelo de isquemia hepática por meio do clampeamento

da tríade portal de ratos, demonstraram que o uso de iECA reduziu a lesão de I/R e que o uso de HOE 140 na dose de 50µg/Kg intravenoso inibiu este efeito. Neste trabalho, os autores aplicaram 30 minutos de isquemia e 5 horas de reperfusão levando-se em consideração parâmetros de microscopia intravital (fluxo sinusoidal, aderência de leucócitos) e de lesão hepatocelular (dosagem de AST e ALT). Quando se provocou 1 hora de isquemia e 2 horas de reperfusão em pulmões de ratos, utilizando BK (100µg) e HOE 140 (100 µg/Kg) infundidos 5 minutos antes da reperfusão, demonstraram-se efeitos protetores da BK (NOWAK et al., 2007).

Os resultados da AST, neste trabalho, mostraram que não houve diferenças quando se compararam os grupos em cada tempo estudado (pré isquemia, isquemia e reperfusão), mesmo durante a reperfusão. Houve aumento significativo da AST no grupo Bradicinina após a reperfusão o que não se repetiu nos grupos Controle e HOE.

Sabe-se que o aumento das concentrações séricas de AST ocorre em decorrência de lesão celular principalmente no fígado (BOWES, THIEMERMANN 1998; VROON, ISRAILI 1999). Hickey et al. (1996) mostraram que após 3 horas e meia de isquemia e 24 horas de reperfusão em M/E de coelhos houve aumento de AST. Nos três grupos aqui estudados houve aumento da AST, porém, apenas no grupo Bradicinina de maneira significativa o que sugere que esta substância pode agravar a lesão de I/R. No entanto, a dosagem desta enzima como parâmetro de lesão muscular nos tempos de I/R estudados neste trabalho não foi importante, provavelmente, devido à sua curva de elevação que em lesão de I/R de fígado em humanos, por exemplo, chega a valores máximos entre 12 e 36 horas de reperfusão (CLAVIEN et al., 2000). Em fígado de ratos Boin (1997) não verificou aumento de AST com 1 ou 2 horas de isquemia. A AST é um dos principal marcadores de lesão isquêmica no fígado (BULKLEY 2000), mas, no miocárdio tem pouca utilidade em virtude da sua ampla distribuição em outros tecidos o que lhe confere baixa especificidade (PIEGAS 1997).

Os resultados da LDH mostraram um aspecto interessante. Observou-se redução significativa dos valores de LDH durante a reperfusão sendo esta redução menor no grupo Bradicinina. Esperava-se que após a lesão de I/R ocorresse aumento dos valores desta enzima como observado em outros trabalhos (VAN WAGENSVELD et al., 1999; ZENGYONG, JIANGWEI, HUAJIN 2011). A duração dos tempos de I/R definidos, porém, pode explicar esta discrepância.

Badhwar et al. (2004) demonstraram que os valores de LDH podem diminuir com 1 hora de isquemia e 1 hora de reperfusão e a partir daí começam a aumentar até atingir valores máximos com 2 dias.

Observa-se que os valores basais da LDH do grupo Bradicinina antes e após a isquemia são maiores que nos grupos Controle e HOE. Esta diferença entre os valores basais pode ter ocorrido devido à sensibilidade do método de dosagem já que a temperatura, a diluição do soro e o grau de hemólise da amostra podem acarretar em aumentos expressivos nos valores esperados. Martou et al. (2006), em modelo in vivo de M/E, demonstraram aumento dos níveis de LDH apenas a partir de 4 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão.

A CPK elevou-se significativamente durante a reperfusão nos grupos Controle, Bradicinina e HOE. Os níveis de CPK na reperfusão foram maiores no grupo Bradicinina que nos demais.

O nível de CPK é considerado um dos principais parâmetros para quantificar a lesão de I/R no miocárdio (LOTT, STANG 1980; MATOBA et al., 1999) e na M/E (BADHWAR et al., 2004; ELIASON, WAKEFIELD 2009). Os tempos de I/R escolhidos neste trabalho foram suficientes para provocar lesão muscular e o aumento observado nos valores da CPK se assemelha com aqueles observados por outros autores (KOKSAL et al., 2003; BADHWAR et al., 2004).

Assim, em relação às enzimas musculares, pode-se dizer que a BK administrada intra-arterial mostrou aumento da enzima muscular CPK em relação aos outros grupos estudados o que sugere agravamento das lesões musculares provocadas pela isquemia total de 2 horas de duração e 4 horas de reperfusão.

O MDA elevou-se durante a reperfusão no grupo Bradicinina em comparação aos grupos Controle e HOE o que sugere lesão de membrana celular. Como demonstrado em diversos trabalhos a I/R provoca a peroxidação dos fosfolípidos da membrana celular ocasionando aumento da MDA (GRISOTTO et al., 2000; FREITAS et al., 2002; PICCINATO et al., 2004b). Koksall et al. (2003), em isquemia total de 4 horas e reperfusão de 1 hora de M/E de ratos, consideraram que as ERO foram responsáveis pela lesão de I/R e que o uso de antioxidantes (n-acetilcisteína e DMSO) reduzem este efeito considerando-se entre outros aspectos a redução dos níveis de MDA. Sugerem que a ação antioxidante da n-acetilcisteína inibe as ERO e assim impede efeitos lesivos sobre a membrana celular reduzindo o

MDA. Em resumo, a BK administrada durante a reperfusão aumenta o nível de MDA o que em última análise significativamente piora a lesão da membrana celular.

Os valores encontrados da MPO seguem um comportamento semelhante ao do MDA com o valor do grupo Bradicinina maior que o do grupo Controle, porém estatisticamente semelhante ao do grupo HOE. Na literatura encontram-se trabalhos que demonstraram que após lesão de I/R ocorre recrutamento de neutrófilos que pode ser mensurado pela dosagem de MPO (GUTE et al., 1998; FREITAS et al., 2002). Kearns et al. (2004), em um modelo de isquemia total de músculo cremastérico de ratos, demonstraram que após 3 horas de isquemia ocorre aumento da MPO e que após 24 horas de reperfusão estes valores são ainda maiores, no entanto a administração de vitamina C pode atenuar este efeito. Park et al. (2010) demonstraram em M/E de ratos submetidos a isquemia total de 3 horas e 3 horas de reperfusão que ocorre aumento dos valores de MPO e que o uso de PosC pode atenuar este efeito. Estes achados são condizentes com os resultados encontrados neste trabalho. Ocorreu maior recrutamento de neutrófilos principalmente no grupo Bradicinina.

Tanto as dosagens de MDA como as de MPO refletem indiretamente a liberação de ERO durante o período de reperfusão e os resultados encontrados sugerem que a BK piora a lesão de I/R em M/E.

A análise de núcleos apoptóticos marcados pela técnica de TUNEL mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos, ou seja, a administração da BK na dose estudada não aumentou o número de células apoptóticas. Sabe-se que a lesão de I/R resulta em morte celular programada (GRIVICICH, REGNER, ROCHA 2007; VANLANGENAKKER et al., 2008) e que a apoptose é um processo irreversível de reparo que desempenha um papel importante na renovação celular, no crescimento e no desenvolvimento de tecidos adultos normais (GERSCHENSON, ROTELLO 1992). Os resultados obtidos neste experimento indicam que mesmo ocorrendo piora da lesão celular evidenciada pela elevação da CPK, MDA e MPO a BK na dose utilizada não torna irreversível a lesão de I/R. Dois fatos influenciam diretamente esta observação, em primeiro lugar o tempo de I/R escolhido e em segundo lugar as doses de BK e HOE utilizadas.

Estes fatos se destacam devido a observação de dados da literatura que demonstram que os diferentes tempos de I/R utilizados ocasionam graus variados de lesão celular de acordo com o tecido estudado (ECKERT,

SCHNACKERZ 1991; SOUZA et al., 2003; FREISE, PALMES, SPIEGEL 2006; NOWAK et al., 2007; ANDRADE-SILVA et al., 2008). Da mesma forma, observou-se que a BK desempenha papéis antagônicos em um mesmo tecido como visto no miocárdio (KOBARA et al., 2003; KUMARI et al., 2003) e no rim (KAKOKI et al., 2007; WANG et al., 2008).

Em diferentes tecidos a BK também apresenta efeitos distintos com relação a lesão de I/R (REGOLI, BARABÉ 1980). Em fígado de ratos desempenha um papel protetor (FREISE, PALMES, SPIEGEL 2006), assim como no pulmão (NOWAK et al., 2007), enquanto que no mesentério agrava a lesão (SOUZA et al., 2003). A BK também apresenta um efeito dose-dependente (REGOLI, BARABÉ 1980; SHIGEMATSU et al., 1999).

Os principais efeitos agudos da BK são mediados por meio do receptor B_2 , constitutivo e de ampla distribuição pelos tecidos e são dependentes de eventos intracelulares e da estrutura da membrana celular (REGOLI, BARABÉ 1980). Já o receptor B_1 não é expresso sob condições normais e é induzido por lesões teciduais e mediadores inflamatórios (LEEB-LUNDBERG et al 2005; KUHR et al., 2010) apesar de alguns trabalhos mostrarem que também pode ser expresso constitutivamente em alguns tecidos como na medula espinhal e em algumas regiões do cérebro (PESQUERO et al., 2000; MA, HEAVENS 2001). Tratam-se de receptores acoplados a proteína G que desencadeiam aumento do Ca^{2+} citoplasmático ocasionando liberação de ácido aracdônico e aumento da concentração de NO (REGOLI, BARABÉ 1980; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; KUHR et al., 2010).

O NO é produzido pela oxidação da L-arginina pela óxido nítrico sintetase (NOS) e desempenha diversos papéis nos tecidos, desde a regulação da homeostase vascular, controle da agregação plaquetária e da atividade inflamatória até a regulação da transmissão sináptica e da pressão sanguínea (WU, MORRIS 1998; RICCIARDOLO et al 2004). A ativação dos receptores B_2 estimula a liberação da NOS endotelial com pequeno aumento e por curto tempo da concentração de NO, provavelmente responsável por efeitos fisiológicos. Por sua vez, a ativação dos receptores B_1 desencadeia a liberação de NOS induzível com grande e duradouro aumento de NO sendo responsável por uma resposta inflamatória ainda controversa e outros efeitos patológicos (KUHR et al., 2010). É possível que os efeitos

antagônicos observados sejam decorrentes do tipo e da intensidade dos estímulos para estes receptores bem como da distribuição deles pelos diferentes tecidos.

O HOE 140 é um conhecido antagonista do receptor B₂ e a sua administração poderia melhorar ou piorar a lesão de I/R devido ao bloqueio da BK endógena. Os resultados encontrados mostram que os valores de AST, LDH, CPK, MDA e MPO bem como o número de núcleos apoptóticos marcados mantiveram-se estatisticamente semelhantes nos grupos Controle e HOE. Deste modo, não se pode afirmar que os efeitos da BK encontrados foram mediados por este receptor. No entanto, a dose de HOE 140 administrada pode influenciar este resultado.

Com os dados obtidos pode-se inferir que em M/E de ratos submetidos a I/R provocado por meio do modelo do torniquete a BK infundida durante o período de reperfusão (4 horas) na dose estudada (1mg/Kg) apresenta efeito deletério reversível. O HOE 140 (125µg/Kg) não protegeu a musculatura contra lesão de I/R e neste caso o receptor B₂ não estaria envolvido. A CPK, a MDA e a MPO foram os principais marcadores de I/R, enquanto que a AST e a LDH não se prestaram para este fim, provavelmente, devido ao tempo de I/R escolhido já que cada uma das enzimas estudadas apresenta curvas distintas de elevação.

Novos estudos procurando obter uma curva dose resposta, com diferentes tempos de I/R e com infusão de BK e HOE em momentos distintos do experimento devem ser realizados para melhor entendimento do mecanismo de ação da BK na lesão de I/R em M/E.

Dessa forma, a administração de 1 mg/Kg de BK intra-arterial em M/E de ratos submetidos a 2 horas de isquemia total e 4 horas de reperfusão provoca aumento da enzima muscular CPK e agrava a lesão celular representada pelo aumento de MDA e de MPO. A manutenção do número de núcleos apoptóticos nos três grupos estudados, entretanto, sugere a reversibilidade do processo.

Conclui-se que a BK aplicada continuamente, intra-arterial, durante 4 horas de reperfusão agrava a lesão de isquemia e reperfusão em M/E de ratos submetidos a 2 horas de isquemia total, com base na elevação de enzima muscular, no aumento de indicador de lesão de membrana celular e no maior recrutamento neutrofílico.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a bradicinina aplicada continuamente, intra-arterial, durante 4 horas de reperfusão agrava a lesão de isquemia e reperfusão em musculatura esquelética de ratos submetidos a 2 horas de isquemia total, com base na elevação de enzima muscular (CPK), no aumento de indicador de lesão de membrana celular (MDA) e no maior recrutamento neutrofílico (MPO).

Referências

REFERÊNCIAS¹

AALTO, T. K.; RAIVIO, K. O. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants. **Pediatric Res**, v. 34, n. 5, p. 572-576, 1993.

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 2ª edição, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2002.

AKIMITSU, T.; GUTE, D.; JEROME, S.. Reperfusion injury of skeletal muscle. In **Ischemia**. 1994, RG Landes Company, p. 5-31.

ALVES, W. F. et al., L-alanyl-glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemia subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. **Ann Vasc Surg**, v. 24, n. 4, p. 461-467, 2010.

ANAYA-PRADO, R. et al., Ischemia/reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 105, n. 2, p. 248-258, 2002.

ANDRADE-SILVA, A. R. et al., Effect of NFkappaB inhibition by CAPE on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 153, n. 2, p. 254-262, 2008.

ANDRIOLO, A.; BORGES, D. R.; ARAÚJO, P. S. Determinação de transaminases no soro. **Rev Bras Pat Clin**, v. 23, p. 141-144, 1987.

ANTONIO, L. G. M.; EVORA, P. R.; PICCINATO, C. E. Use of alprostadil, a stable prostaglandin E1 analogue, for the attenuation of rat skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. **Minerva Chir**, v. 64, n. 6, p. 559-564, 2009.

BADHWAR, A. et al., Chronic lower extremity ischemia: a human model of ischemic tolerance. **J Can Chir**, v. 47, n. 5, p. 352-358, 2004.

BECKER, L. C.; AMBROSIO, G. Myocardial consequences of reperfusion. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 30, n. 1, p. 23-44, 1987.

BLAISDELL, F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. **Cardiovasc Surg**, v. 10, n. 6, p. 620-630, 2002.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLEBEA, J. et al., Technetium 99m pyrophosphate quantification of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. **J Vasc Surg**, v. 8, n. 2, p. 117-124, 1988.

BOIN, I. F. S. F. **Atuação do WEB2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária (PAF) em ratos Wistar submetidos a isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão**[dissertação doutorado]. Campinas - SP. Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Ciências Médicas; 1997.

BOWES, J.; THIEMERMANN, C. Effects of inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase on the liver injury caused by ischaemia-reperfusion: a comparison with radical scavengers. **Br J Pharmacol**, v. 124, n. 6, p. 1254-1260, 1998.

BOYS, J. et al., Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney. **J Investig Med**, v. 58, n. 7, p. 875-882, 2010.

BOZKURT, A. K. Alpha-tocopherol (vit E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **J Cardiovasc Surg (Torino)**, v. 45, n. 3, p. 693-696, 2002.

BRANDÃO, M. D. et al., Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. **J Surg Res**, v. 110, n. 1, p. 235-240, 2003.

BUDIARDJO, I. et al., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BULKLEY, G. B. Preconditioning for protection from ischemia injury: discriminating cause from the effect from epiphenomenon. **Ann Surg**, v. 232, n. 2, p. 163-165, 2000.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, v. 50, Suppl, p. S237-242, 2009.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J Vasc Bras**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CLAVIEN, P. A. et al., Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. **Ann Surg**, v. 232, n. 2, p. 155-162, 2000.

DAL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 492, p. 153-168, 1980.

DAVIES, B. et al., Acute leg ischemia in Gloucestershire. **Br J Surg**, v. 84, n. 4, p. 504-508, 1997.

DORMANDY, J.; HEECK, L.; VIG, S. Acute limb ischemia. **Semin Vasc Surg**, v. 12, n. 2, p. 148-153, 1999.

ECKERT, P.; SCHNACKERZ, K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. **Ann Plast Surg**, v. 26, n. 1, p. 77-84, 1991.

ELIASON, J. L.; WAKEFIELD, T. W. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications. **Semin Vasc Surg**, v. 22, n. 1, p. 29-33, 2009.

EVORA, P. R. B. et al., Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial., **Arq Bras Cardiol**, v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

FIGUEROA, C. D.; DIETZE, G.; MÜLLER-ESTERL, W. Immunolocalization of bradykinin B2 receptors on skeletal muscle cells. **Diabetes**, v. 45, n. 1S, p. 24-28S, 1996.

FORMAN, M. B.; VIRMANI, R.; PUETT, D.W. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. **Circulation**, v. 81, n. 3 suppl, p. 69-78, 1990.

FREISE, H.; PALMES, D.; SPIEGEL, H. U. Inhibition of angiotensin-converting enzyme reduces rat liver reperfusion injury via bradykinin-2-receptor. **J Surg Res**, v. 134, n. 2, p. 231-237, 2006.

FREITAS, F. A. S. et al., The study of the ischemia and reperfusion in skin flaps of rats. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 3, p. 74-78, 2002.

GARRISON, J. C. Histamina, Bradicina, 5-Hidroxitriptamina e seus antagonistas. In Goodman & Gilman - **As bases farmacológicas da terapêutica**. 5ª edição, 1990, p. 378-394.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GERSCHENSON, L. E.; ROTELLO, R. J.. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J**, v. 6, n. 7, p. 2450-2455, 1992.

GRISOTTO, P. C. et al., Indicators of oxidative injury and alterations of cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. **J Surg Res**, v. 92, n. 1, p. 1-6, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROSS, E. R.; GROSS, G. J. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. **Cardiovasc Res**, v. 70, n. 2, p. 212-221, 2006.

GUTE, D. C. et al., Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. **Mol Cell Biochem**, v. 179, n. 1-2, p. 169-187, 1998.

HAIMOVICI, H. Muscular, renal and metabolic complications of acute arterial occlusions: myoneuropathic metabolic syndrome. In **Surgery**, v. 85, n. 4, p. 461-468, 1979.

HEARSE, D. J.; HUMPHREY, S. M.; BULLOCK, G. R. The oxygen paradox and calcium paradox: two facets of the same problem? **J Moll Cell Cardiol**, v. 10, n. 7, p. 641-668, 1978.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n.6805, p. 770-776, 2000.

HENRY, J. R. et al., Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. **Am J Clin Pathol**, v. 34, n. 4, p. 381-398, 1960.

HEUSCH, G.; SCHULZ, R. Endogenous protective mechanisms in myocardial ischemia: hibernation and ischemic preconditioning. **Am J Cardiol**, v. 80, n. 3A, p. 26A-33, 1997.

HICKEY, M. J. et al., Influence of postischemic administration of oxyradicals antagonists on ischemic injury to rabbit skeletal muscle. **Microsurgery**, v. 17, n. 9, p. 517-523, 1996.

HOBSON II, R. W.; MILAZZO, V. J.; DURÁN, W. N.. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In Enrico Ascher.(Org.). **Haimovici's Vascular Surgery**. St. Louis, Missouri. 4ª edição, 1996, p. 497-508.

JANCSO, G. et al., Bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibition in cardioprotection. **Exp Clin Cardiol**, v. 9, n. 1, p. 21-25, 2004.

JOVILIANO, E. E. et al., Inferior canine hindlimb ischemia and reperfusion impairs femoral artery endothelium-dependent wall relaxation. **Vasc Endovasc Surg**, v. 39, n. 1, p. 39-46, 2005.

KAKOKI, M. et al., Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. **PNAS**, v. 104, n. 18, p. 7576-7581, 2007.

KEARNS, S. R. et al., Oral vitamin C reduces the injury to skeletal muscle caused by compartmental syndrome. **J Bone Joint Surg Br**, v. 86, n. 6, p. 906-911, 2004.

KEIDING, R.; HORDER, M.; GERHARDT, W. Recommended methods for determination of four enzymes in blood. **Scand J Clin Lab Incest**, v. 33, n. 4, p. 291-306, 1974.

KLONER, R. A.; REZKALLA, S. H. Predonditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. **Cardiovasc Res**, v. 70, n. 2, p. 297-307, 2006.

KOBARA, M. et al., Effects of ACE inhibition on myocardial apoptosis in an ischemia-reperfusion rat heart model. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 41, n. 6, p. 880-889, 2003.

KOKSAL, C. et al., Attenuation of ischemia reperfusion injury by N-acetyl cysteine in a rat hind limb model. **J Surg Res**, v. 111, n. 2, p. 236-239, 2003.

KOSITPRAPA, C.; OCKAILI, R. A.; KUKREJA, R. C. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 7, p. 1355-1362, 2001.

KUHR, B. B. A. et al., Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 145-154, 2010.

KUMARI, R. et al., Protective effect of bradykinin antagonist Hoe-140 during in vivo myocardial ischemic-reperfusion injury in the cat. **Regul Pept**, v. 115, n. 3, p. 211-218, 2003.

LASTORIA, S.; MAFFEI, F. H. A. Oclusões arteriais agudas. In _____-**Doenças Vasculares Periféricas**. 3ª edição, 2002, p. 969-997.

LAZAR, H. L. et al., High tissue affinity angiotensin-converting enzyme inhibitors improve endothelial function and reduce infarct size. **Ann Thorac Surg**, v. 72, n. 2, p. 548–554, 2001.

LEEB-LUNDBERG, L. M. F. et al., International Union of Pharmacology. XLV classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**, v.57, n. 1, p. 27–77, 2005.

LEWIS, G. P. **Kinins in inflammation and tissue injury**. New York, Springer, 1970.

LINTZ, J. A. **Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos**. [dissertação mestrado]. Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; 2011.

LINZ, W. et al., Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Pharmacol Rev**, v. 47, n. 1, p. 25-49, 1995.

LOTT, J. A.; STANG, J. M. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. **Clin Chem**, v. 26, n. 9, p. 1241-1250, 1980.

MA, Q. P.; HEAVENS, R. Basal expression of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport**, v. 12, p. 2311-2314, 2001.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 357–386, 1998.

MARGOLIUS, H. S. Kallikreins and kinins: molecular characteristics and cellular and tissue responses. **Diabetes**, v. 15, n. 1S, p. 14-19S, 1996.

MARTOU, G. et al., Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 5, p. 1335–1342, 2006.

MATOBA, S. et al., Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. **Circulation**, v. 99, n. 6, p. 817-822, 1999.

MATTHEWS, S. B.; CAMPBELL, A. K. Neutrophil activation after myocardial infarction. **Lancet**, v. 2, n. 8405, p. 756-757, 1984.

MCCORD, J. M.; ROY, R. S. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 11, p. 1346-1352, 1982.

MCCORD, J. M. The superoxide free radical, its biochemistry and pathophysiology. **Surgery**, v. 94, n. 3, p. 412-414, 1983.

MEDLING, B. D. et al., The effect of vitamin E succinate on ischemia reperfusion injury. **Hand (NY)**, v. 5, p. 60-64, 2009.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5ª edição, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2000.

MORENO, J. B. **Efeito do Alfa-Tocoferol na atenuação da lesão de isquemia e reperfusão em membro posterior de rato**. [dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; 1991.

NAKAMUTA, M. et al., High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1377-1383, 1993.

NODA, K. et al., Cardioprotection of ACE inhibitor in ischemic heart is not dependent on the local angiotensin II formation. **Agents Actions Suppl**, v. 38, pt 3, p. 217-227, 1992.

NOGUEIRA, L.; HOGAN, M. C. Phenol increases intracellular [Ca²⁺] during twitch contractions in intact *Xenopus* skeletal myofibers. **J Appl Physiol**, v. 109, n. 5, p. 1384-1393, 2010.

NOWAK, K. et al., Bradykinin in ischemia-reperfusion injury of the lung. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 5(pt 2) Suppl, p. 513-522, 2007.

OLIVEIRA, J. F.; BERTONI, L. C.; MARTINS Jr, R. Estudos das isoenzimas de creatininoquinase e desidrogenase láctica. **Rev Bras Pat Clin**, v. 18, p. 64-68, 1982.

OREDSSON, S.; PLATE, G.; QVARFORDT, P. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. **Eur J Surg**, v. 160, n. 2, p. 97-103, 1994.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. **Nat Rev Moll Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 552-565, 2003.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. Thompson, 2ª edição, 2004.

PAN, H. L. et al., Cardiac interstitial bradykinin release during ischemia is enhanced by ischemic preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 1, p. H116-21, 2000.

PARK, J. W. et al., Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. **Microsurgery**, v. 30, n. 3, p. 223-229, 2010.

PEDRO, A. J. et al., Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. **J Port Gastrenterol**, v. 10, p. 209-214, 2003.

PERRY, M. O. Compartment syndrome and reperfusion injury. **Surg Clin N AM**, v. 68, n. 4, p. 853-864, 1988.

PESQUERO, J. B. et al., Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 8140-8145, 2000.

PICCINATO, C. E.; SANTOS, A. C.; ROSELINO, J. E.. Intramitochondrial calcium and magnesium levels in skeletal muscle submitted to total or partial limb ischemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 11, p. 1125-1128, 1991.

PICCINATO, C. E. et al., Lack of chlorpromazine effect on skeletal muscle metabolism after ischemia and a short reperfusion period. **Microsurgery**, v. 24, n. 3, p. 194-199, 2004a.

PICCINATO, C. E. et al., Skeletal muscle ischemia and reperfusion increase lipid peroxidation in rats. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 5, p. 578-581, 2004b.

PIEGAS, L. S. Enzimas. In GHORAYEB, N.; MENEGHELO, R. S. **Métodos diagnósticos em cardiologia**. São Paulo, Atheneu, 1997, P. 261-272.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, v. 31, n. 1, p. 1-46, 1980.

REGOLI, D. Kinins. **Br Med Bull**, v. 43, n. 2, p. 270-284, 1987.

REGOLI, D. et al., Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol**, v. 348, n. 1, p. 1-10, 1998.

RICCIARDOLO, F. L. et al., Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

RUBIN, B. B. et al., Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. **J Appl Physiol**, v. 80, n. 2, p. 369 – 387, 1996.

RUDERMAN, N. B. et al., Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with the isolated perfused rat hindquarter. **Fed Proc**, v. 36, n. 2, p. 171-176, 1977.

RYAN, J. W. Processing of the endogenous polypeptides by the lung. **Annu Rev Physiol**, v. 44, p.241-255, 1982.

SAS Institute Inc, SAS/STAT® User's Guide 2003, Version 9, Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCARABELLI, T. M. et al., Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. **Curr Probl Cardiol**, v. 31, n.3, p. 181-264, 2006.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, v. 78, n. 4, p. 719-727, 1991.

SEYAMA, A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengerson skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **Surg Today**, v. 23, n. 12, p. 1060-1067, 1993.

SHIGEMATSU, S. et al., Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 277, n. 1 pt 2, p. H152-160, 1999.

SHIGEMATSU, S. et al., Postischemic anti-inflammatory effects of bradykinin preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 1, p. H441–454, 2001.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **J Vasc Bras** 2004; v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

SKIDGEL, R.; STANISAVLJEVIC, S.; ERDÖS, E. G. Kinin and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitormediated nitric oxide production in endothelial cells. **Biol Chem**, v. 387, n. 2, p. 159-165, 2006.

SOUZA, A. C. et al., Mecanismos celulares e moleculares da lesão de isquemia e reperfusão de músculo esquelético. **Cir Vasc Angiol**, v. 17, n. 3, p. 80-86, 2001.

SOUZA, D. G. et al., Role of the bradykinin B2 receptor for the local and systemic inflammatory response that follows severe reperfusion injury. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 1, p. 129-139, 2003.

STACPOOLE, P. W. Lactic acidosis and other mitochondrial disorders. **Metabolism**, v. 46, n. 3, p. 306-321, 1997.

STEENBERGEN, C. et al., Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. **Circ Res**, v. 60, n. 5, p. 700-707, 1987.

STROCK, P. E.; MAJNO, G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. **Surg Gynecol Obstet**, v. 129, n. 2, p. 309-318, 1969.

THAVEAU, F. et al., Effect of chronic pre-treatment with angiotensin converting enzyme inhibition on skeletal muscle mitochondrial recovery after ischemia/reperfusion. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2010.

TRAN, T. P. et al., Tourniquet-induced acute ischemia–reperfusion injury in mouse skeletal muscles: involvement of superoxide. **Eur J Pharmacol**, v. 650, n. 1, p. 328-334, 2010.

TURRENS, J. F. et al., Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. **Free Radic Res Comm**, v. 12-13, pt. 2, p. 681-689, 1991.

VAN WAGENSVELD, B.A. et al., Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. **Ann Surg**, v. 229, n. 3, p. 376-384, 1999.

VANLANGENAKKER, N. et al., Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Curr Mol Med**, v. 8, n. 3, p. 207-220, 2008.

VROON, D. H.; ISRAILI, Z. Aminotransferases. In WALKER, H.K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. **Clinical methods: the history, physical and laboratory examinations**. Boston, 1999, p.492-493.

WALKER, N. I. et al., Patterns of cell death. **Methods Achiev Exp Pathol**, v. 13, p. 18-52, 1988.

WANG, P. H. M. et al., Bradykinin B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3050, 2008.

WANG, W. Z. et al., Ischemia-reperfusion-induced apoptotic endothelial cells isolated from rat skeletal muscle. **Plast Reconstr Surg**, v. 123, n. 2 Suppl, p. S131-138, 2009.

WANG, W. Z. et al., Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. **J Surg Res**, v. 9, p. 1-6, 2010.

WIDMANN, F. K. **Clinical Interpretation of Laboratory Tests**. FAD. Company, Philadelphia, p. 296, 1993.

WU, G.; MORRIS, S. M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, pt 1, p. 1-17, 1998.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **Br Med Bull**, v. 53, n. 3, p. 451-465, 1997.

YANG, X. M. et al., NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through P13K, ERK and NO. **J Moll Cell Cardiol**, v. 36, n. 3, p. 411-421, 2004.

ZENGYONG, Q.; JIANGWEI, M.; HUAJIN, L. Effect of Ligusticum wallichii aqueous extract on oxidative injury and immunity activity in myocardial ischemic reperfusion rats. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 3, p. 1991-2006, 2011.

ZHAO, Z-Q.; VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. **Cardiovasc Res**, v. 70, n.2, p. 200-211, 2006.

Apêndice

APÊNDICE

Tabela 1 – Peso individual em gramas dos animais do estudo.

Controle	Bradicinina	HOE
440	380	410
422	402	408
426	382	404
482	396	402
398	370	378
440	366	412

Figura 15 – Média e desvio padrão dos pesos dos animais do estudo.

Figura 16 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável AST.

Tabela 2 - Valores individuais da AST expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos Pré isquemia, Isquemia e Reperusão.

Grupo	Tempo						
Controle	Pré isquemia	73	80	103	103	84	105
	Isquemia	82	65	97	92	82	90
	Reperusão	70	63	90	119	113	95
Bradicinina	Pré isquemia	85	76	78	126	151	99
	Isquemia	119	105	115	128	106	91
	Reperusão	102	158	112	118	131	140
HOE	Pré isquemia	115	220	69	84	62	54
	Isquemia	136	147	114	102	83	77
	Reperusão	140	213	82	98	99	69

Tabela 3 - Descrição da variável AST por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	Tempo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	Pré isquemia	6	91,33	13,98	73	93,5	105
	Isquemia	6	84,67	11,27	65	86	97
	Reperusão	6	91,67	22,39	63	92,5	119
Bradicinina	Pré isquemia	6	102,5	30,08	76	92	151
	Isquemia	6	110,67	12,88	91	110,5	128
	Reperusão	6	126,83	20,38	102	124,5	158
HOE	Pré isquemia	6	100,67	62,29	54	76,5	220
	Isquemia	6	109,83	28,08	77	108	147
	Reperusão	6	116,83	52,84	69	98,5	213

Tabela 4 - Comparações entre grupos para cada tempo para a variável AST.

Tempo	Comparação entre grupos			Diferença	EP	IC(95%)	p-valor
Pré isquemia	Bradicinina	-	HOE	1,83	17,67	-33,89 37,55	0,918
	Bradicinina	-	Controle	11,17	17,67	-24,55 46,89	0,531
	HOE	-	Controle	9,33	17,67	-26,39 45,05	0,600
Isquemia	Bradicinina	-	HOE	0,83	17,67	-34,89 36,55	0,963
	Bradicinina	-	Controle	26,00	17,67	-9,72 61,72	0,149
	HOE	-	Controle	25,17	17,67	-10,55 60,89	0,162
Reperusão	Bradicinina	-	HOE	10,00	17,67	-25,72 45,72	0,575
	Bradicinina	-	Controle	35,17	17,67	-0,55 70,89	0,054
	HOE	-	Controle	25,17	17,67	-10,55 60,89	0,162

Tabela 5 - Comparações entre tempos para cada grupo para a variável AST. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Grupo	Comparação entre tempos			Diferença	EP	IC(95%)	p-valor
Controle	Pré isquemia	-	Isquemia	6,67	11,79	-17,16 30,50	0,575
	Pré isquemia	-	Reperusão	-0,33	11,79	-24,16 23,50	0,978
	Isquemia	-	Reperusão	-7,00	11,79	-30,83 16,83	0,556
Bradicinina	Pré isquemia	-	Isquemia	-8,17	11,79	-32,00 15,66	0,493
	Pré isquemia	-	Reperusão	-24,33	11,79	-48,16 -0,50	0,046
	Isquemia	-	Reperusão	-16,17	11,79	-40,00 7,66	0,178
HOE	Pré isquemia	-	Isquemia	-9,17	11,79	-33,00 14,66	0,442
	Pré isquemia	-	Reperusão	-16,17	11,79	-40,00 7,66	0,178
	Isquemia	-	Reperusão	-7,00	11,79	-30,83 16,83	0,556

Figura 17 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável LDH.

Tabela 6 - Valores individuais da LDH expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos Pré isquemia, Isquemia e Reperusão.

Grupo	Tempo						
Controle	Pré isquemia	1317	730	1983	1367	1680	1283
	Isquemia	1190	780	1403	890	1200	1413
	Reperusão	453	233	420	567	377	190
Bradicinina	Pré isquemia	2510	1313	1290	3633	3800	2113
	Isquemia	2723	1963	2403	2830	1883	1540
	Reperusão	1040	1403	657	1813	1150	990
HOE	Pré isquemia	1916	3156	997	680	590	1743
	Isquemia	1017	1403	2200	1243	1410	973
	Reperusão	597	693	323	170	340	267

Tabela 7 - Descrição da variável LDH por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	Tempo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	Pré isquemia	6	1393,33	421,57	730	1342	1983
	Isquemia	6	1146	261,41	780	1195	1413
	Reperusão	6	373,33	140,96	190	398,5	567
Bradicinina	Pré isquemia	6	2443,17	1093,37	1290	2311,5	3800
	Isquemia	6	2223,67	510,01	1540	2183	2830
	Reperusão	6	1175,5	395,08	657	1095	1813
HOE	Pré isquemia	6	1513,67	972,3	590	1370	3156
	Isquemia	6	1374,33	444,93	973	1323	2200
	Reperusão	6	398,33	202,37	170	331,5	693

Tabela 8 - Comparações entre grupos para cada tempo para a variável LDH. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tempo	Comparação entre grupos	Diferença	EP	IC(95%)	p-valor
Pré Isquemia	Bradicinina - HOE	929,50	317,68	287,45 1571,55	0,006
	Bradicinina - Controle	1049,83	317,68	407,79 1691,88	0,002
	HOE - Controle	120,33	317,68	-521,71 762,38	0,707
Isquemia	Bradicinina - HOE	849,33	317,68	207,29 1491,38	0,011
	Bradicinina - Controle	1077,67	317,68	435,62 1719,71	0,002
	HOE - Controle	228,33	317,68	-413,71 870,38	0,477
Reperusão	Bradicinina - HOE	777,17	317,68	135,12 1419,21	0,019
	Bradicinina - Controle	802,17	317,68	160,12 1444,21	0,016
	HOE - Controle	25,00	317,68	-617,05 667,05	0,938

Tabela 9 - Comparações entre tempos para cada grupo para a variável LDH. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Grupo	Comparação entre tempos	Diferença	EP	IC(95%)	p-valor
Controle	Pré isquemia - Isquemia	247,33	295,38	-349,65 844,32	0,407
	Pré isquemia - Reperusão	1020,00	295,38	423,02 1616,98	0,001
	Isquemia - Reperusão	772,67	295,38	175,68 1369,65	0,013
Bradicinina	Pré isquemia - Isquemia	219,50	295,38	-377,48 816,48	0,462
	Pré isquemia - Reperusão	1267,67	295,38	670,68 1864,65	<0,001
	Isquemia - Reperusão	1048,17	295,38	451,18 1645,15	0,001
HOE	Pré isquemia - Isquemia	139,33	295,38	-457,65 736,32	0,640
	Pré isquemia - Reperusão	1115,33	295,38	518,35 1712,32	0,001
	Isquemia - Reperusão	976,00	295,38	379,02 1572,98	0,002

Figura 18 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável CPK.

Tabela 10 - Valores individuais da CPK expressos em U/l nos grupos Controle, Bradicinina e HOE nos períodos Pré isquemia, Isquemia e Reperusão.

Grupo	Tempo						
Controle	Pré isquemia	1020	975	472	1757	403	293
	Isquemia	1501	1115	773	1249	469	644
	Reperusão	3191	1474	858	2557	2374	2084
Bradicinina	Pré isquemia	992	746	745	1465	1139	554
	Isquemia	1964	962	1676	2198	1528	1308
	Reperusão	2894	6660	4009	2755	2589	1245
HOE	Pré isquemia	319	568	584	413	557	361
	Isquemia	773	1110	755	436	809	600
	Reperusão	2755	3555	1137	1694	1717	1134

Tabela 11 - Descrição da variável CPK por grupo e tempo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	Tempo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	Pré isquemia	6	820	550,4	293	723,5	1757
	Isquemia	6	958,5	393,98	469	944	1501
	Reperusão	6	2089,67	825,62	858	2229	3191
Bradicinina	Pré isquemia	6	940,17	329,42	554	869	1465
	Isquemia	6	1605	445,5	962	1599	2198
	Reperusão	6	3358,67	1841,85	1245	2824,5	6660
HOE	Pré isquemia	6	467	116,66	319	485	584
	Isquemia	6	747,17	225,69	436	764	1110
	Reperusão	6	1998,67	965,04	1134	1705,5	3555

Tabela 12 - Comparações entre grupos para cada tempo para a variável CPK. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tempo	Comparação entre grupos		Diferença	EP	IC(95%)	p-valor	
Pré isquemia	Bradicinina	- HOE	473,17	409,67	-354,80	1301,13	0,255
	Bradicinina	- Controle	120,17	409,67	-707,80	948,13	0,771
	HOE	- Controle	-353,00	409,67	-1180,97	474,97	0,394
Isquemia	Bradicinina	- HOE	857,83	409,67	29,87	1685,80	0,043
	Bradicinina	- Controle	646,50	409,67	-181,47	1474,47	0,122
	HOE	- Controle	-211,33	409,67	-1039,30	616,63	0,609
Reperusão	Bradicinina	- HOE	1360,00	409,67	532,03	2187,97	0,002
	Bradicinina	- Controle	1269,00	409,67	441,03	2096,97	0,004
	HOE	- Controle	-91,00	409,67	-918,97	736,97	0,825

Tabela 13 - Comparações entre tempos para cada grupo para a variável CPK. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Grupo	Comparação entre tempos		Diferença	EP	IC(95%)	p-valor	
Controle	Pré isquemia	- Isquemia	-138,50	397,59	-942,06	665,06	0,729
	Pré isquemia	- Reperusão	-1269,67	397,59	-2073,22	-466,11	0,003
	Isquemia	- Reperusão	-1131,17	397,59	-1934,72	-327,61	0,007
Bradicinina	Pré isquemia	- Isquemia	-664,83	397,59	-1468,39	138,72	0,102
	Pré isquemia	- Reperusão	-2418,50	397,59	-3222,06	- 1614,94	<0,001
	Isquemia	- Reperusão	-1753,67	397,59	-2557,22	-950,11	<0,001
HOE	Pré isquemia	- Isquemia	-280,17	397,59	-1083,72	523,39	0,485
	Pré isquemia	- Reperusão	-1531,67	397,59	-2335,22	-728,11	<0,001
	Isquemia	- Reperusão	-1251,50	397,59	-2055,06	-447,94	0,003

Figura 19 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável MDA após a reperusão.

Tabela 14 - Valores individuais da MDA expressos em μmolar nos grupos Controle, Bradicinina e HOE após a reperusão.

Grupo						
Controle	0,15	0,09	0,20	0,11	0,13	0,25
Bradicinina	0,36	0,39	0,41	0,52	0,34	0,40
HOE	0,23	0,30	0,18	0,23	0,14	0,11

Tabela 15 - Descrição da variável MDA por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	6	0,16	0,06	0,09	0,14	0,25
Bradicinina	6	0,40	0,06	0,34	0,4	0,52
HOE	6	0,20	0,07	0,11	0,21	0,3

Tabela 16 - Comparações entre grupos para a variável MDA. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparação	Diferença	IC(95%)		p-valor
Bradicinina – HOE	0,21	0,12	0,29	<0,001
Bradicinina – Controle	0,25	0,16	0,33	<0,001
HOE - Controle	0,04	-0,04	0,13	0,294

Figura 20 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável MPO após a reperusão.

Tabela 17 - Valores individuais da MPO expressos em número de neutrófilos por miligrama de tecido nos grupos Controle, Bradicinina e HOE após a reperusão.

Grupo						
Controle	7,2	10,3	10,44	11,3	3,58	15,64
Bradicinina	13,1	11	14	27,7	13,1	22,2
HOE	14,29	8,93	17,36	6,15	14,20	7,35

Tabela 18 - Descrição da variável MPO por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	6	9,74	4,06	3,58	10,35	15,64
Bradicinina	6	16,85	6,59	11	13,55	27,7
HOE	6	11,38	4,51	6,15	11,57	17,36

Tabela 19 - Comparações entre grupos para a variável MPO. As comparações destacadas em vermelho foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparação	Diferença	IC(95%)	p-valor
Bradicinina - HOE	5,47	-0,62 11,56	0,076
Bradicinina – Controle	7,11	1,03 13,20	0,024
HOE - Controle	1,64	-4,44 7,73	0,580

Figura 21 – Boxplot com o resumo dos dados encontrados para a variável TUNEL após a reperusão.

Tabela 20 - Valores individuais de TUNEL expressos em (%) número de núcleos marcados em cada 100 células nos grupos Controle, Bradicinina e HOE após a reperfusão.

Grupo						
Controle	5	2	3	5	18	12
Bradicinina	5	10	5	8	11	9
HOE	2	19	22	14	17	15

Tabela 21 - Descrição da variável TUNEL por grupo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo).

Grupo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	6	7,5	6,22	2	5	18
Bradicinina	6	8	2,53	5	8,5	11
HOE	6	14,83	6,91	2	16	22

Tabela 22 - Comparações entre grupos para a variável TUNEL.

Comparação	Diferença	IC(95%)		p-valor
Bradicinina - HOE	6,833	-15,18	1,512	0,063
Bradicinina – Controle	0,5000	-8,845	7,845	0,861
HOE - Controle	7,333	-15,68	1,012	0,082