Ana Lídia Corrêa da Silva Moreira

**Efeitos cardioprotetores da Catuama® e seus
componentes sobre o coração isolado de ratos
submetidos a isquemia e reperfusão**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia**

Orientador: Prof. Dr. Augusto Scalabrini Neto

**SÃO PAULO
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Ana Lúcia Corrêa da Silva

Efeitos cardioprotetores da Catuama® e seus componentes sobre o coração isolado de ratos submetido a isquemia e reperfusão / Ana Lúcia Corrêa da Silva Moreira. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Augusto Scalabrini Neto.

Descritores: 1.Catuama 2.Fitoterapia 3.Plantas medicinais 4.Meliaceae 5.Isquemia 6.Traumatismo por reperfusão 7.Miocárdio 8.Estresse oxidativo 9.Catalase 10.Peroxidação de lipídeos 11.Óxido nítrico

USP/FM/DBD-063/12

“Quanto menos comes, bebes, compras livros e vais ao teatro, pensas, amas, teorizas, cantas, sofres, praticas esporte, etc., mais economizas e mais cresce o teu capital. És menos, mas tens mais. Assim todas as paixões e atividades são tragadas pela cobiça.”

Karl Marx

Manuscritos econômico-filosóficos

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

Marie Curie

Dedicatória:

Dedico essa Tese a minha mãe, Ondina Lenzi Corrêa, por me ensinar a gostar de ler, por não tolerar a mentira e por saber equilibrar o amor e a disciplina. Por não se abater nem se desesperar, por mais que as condições fossem difíceis e por perseverar na adversidade.

Dedico a ela também, por ser uma feminista, e mostrar através do exemplo, que a igualdade e o respeito só vêm quando lutamos por eles e aprendemos a nos impor. Por me ensinar que não devemos ser dependentes, nem econômica, nem emocionalmente. Por, durante toda a vida, me mostrar o valor de manter a cabeça erguida e a consciência limpa.

E por muitas outras coisas, que não haveria espaço suficiente aqui para mencionar. Mas principalmente pelo exemplo de coragem, de dizer o que pensa e de se manter lutando pelo que considera justo. São qualidades raras.

Dedico também aos meus irmãos, José Antônio Corrêa da Silva Moreira e Ana Paula Corrêa da Silva Moreira, por serem uma parte importante da minha vida e porque eu os amo muito e nem sempre demonstro. E a minha cunhada Sueli Brandão, por entrar para nossa família somando alegria e companheirismo.

Também dedico essa tese ao meu amor, José Antonio Gomes, por ter sido paciente e carinhoso, mesmo quando eu não merecia. Por respeitar minhas

escolhas e por ser um grande companheiro. Enfim, por ser meu porto seguro e o amor da minha vida.

E, por fim, dedico essa tese ao meu falecido avô José Domingos Corrêa porque ele era alegre, tinha uma alma leve e um coração generoso. Por ter sido um exemplo de bom humor e alegria de viver, por saber cultivar amizades e por buscar sempre viver intensamente. Espero saber viver como ele sabia e aos oitenta anos de idade ainda apreciar a companhia das pessoas e ser apreciado, contar casos divertidíssimos e andar de bicicleta todos os dias. Desejo de todo coração que, de alguma forma, meu avô possa compartilhar esse momento conosco.

Agradecimentos:

Agradeço sempre e em primeiro lugar a essa Força ou Entidade que conduz nosso Universo. Sou grata por estar aqui com meu coração batendo e meus pulmões cheios de ar. E por todos os indivíduos serem dotados de inteligência e razão e terem livre arbítrio para escolher como usá-las. E, principalmente, pela minha vida sempre ter sido repleta de bons amigos. De alguma forma, eu sempre senti que tinha mais do que merecia.

Agradeço ao Laboratório de Investigação Médica 51 (LIM 51) da Faculdade de Medicina da USP, onde fiz minha iniciação científica e me tornei uma irremediável apaixonada pela pesquisa. E também agradeço ao Professor Doutor Heraldo Possolo de Souza e ao Professor Doutor Irineu Tadeu Velasco pelas valiosas contribuições que deram para esse trabalho e por me receberem no laboratório.

Sou muito grata ao meu orientador de Trabalho de Conclusão de Curso Professor Doutor Estevão Cardoso de Almeida Bodi, com quem eu aprendi a gostar de ciência, uma pessoa que eu sempre irei respeitar e admirar. Também foi quem me levou ao LIM51 pela primeira vez e me apresentou ao Professor Doutor Augusto Scalabrini.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Augusto Scalabrini Neto pela oportunidade e pela confiança. Sou também muito grata pela sua didática e por sempre, pacientemente, respeitar o meu processo de aprendizagem. E por me dar

liberdade e tranquilidade para trabalhar. E sou grata, principalmente, por me apresentar um novo patamar de qualidade na pesquisa.

Agradeço a Doutora Ana Iochabel Soares Moretti por auxiliar nos ensaios biomoleculares e por ser uma grande amiga. E, além disso, um exemplo de pesquisadora criteriosa e verdadeiramente apaixonada pela ciência.

Aos colegas e amigos do LIM 51. Obrigada aos professores, funcionários e alunos pela companhia, pelo bom humor e pelas risadas. E pela troca de idéias, conselhos, críticas e sugestões. Foi um período muito intenso em aprendizado, em dificuldades e em emoções e ter todos vocês ao meu lado (sem exceções) tornou esse período muito melhor. Nem vou tentar citar todos nominalmente, para não correr o risco de cometer uma injustiça, esquecendo de alguém.

Agradeço ao laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca “Prof. Antonio Paes de Carvalho” da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foram realizados os experimentos de microeletrodo, e a todos os seus membros. Em especial à Professora Doutora Cristiane del Corso ao Professor Doutor José Hamilton Matheus do Nascimento pela enorme ajuda. Por me receberem no laboratório de braços abertos, por me ensinarem a técnica de Langendorff e de microeletrodo. Muito obrigada pelo suporte acadêmico e pela amizade.

Também agradeço a Angélica e Rose pela enorme ajuda com a burocracia. E a todos os funcionários do biotério por cuidarem dos meus ratinhos.

Agradeço ao José Antonio Gomes por ser um grande companheiro, carinhoso e divertido. Por termos uma vida maravilhosa e repleta de amor juntos. E por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis.

Agradeço a minha família, em especial meus irmãos Ana Paula Corrêa da Silva Moreira, José Antonio Corrêa da Silva Moreira, minha cunhada Sueli Brandão e minha mãe Ondina Lenzi Corrêa. Muito obrigada por serem parte de mim e da minha vida. De tudo no Universo, vocês são o mais importante. Sem o apoio de vocês esse trabalho seria impossível.

E também agradeço a todos meus amigos, que são muitos. A minha mais sincera gratidão a essas pessoas que me oferecem a sua amizade pura e desinteressada.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Sumário:

I. Introdução	02
I.I. Fitoterápicos	02
I.II. Efeitos da Catuama®	04
I. III. Efeitos Cardíacos	07
I.IV. Estudos em Coração Isolado e Mecanismos de Cardioproteção	08
I.V. Estresse Oxidativo	10
I.VI. Óxido Nítrico	13
II. Objetos	18
II.I. Objetivo Geral	18
II.II. Objetivos Específicos	18
III. Material e Métodos	21
III.I. Langendorff	21
III.II. Extração de Proteínas	28
III.III. Western Blot	29
III.IV. Ensaio de Malondialdeído	30
III.V. Reação de Griess	31
III.VI. Microeletrodo	32

III.VII. Análise Estatística	35
IV. Resultados	37
IV.I. Resultados Hemodinâmicos	37
IV.II. Medida do conteúdo protéico total e análise da expressão de NOTyr, NOCys, SOD e Catalase	45
IV.III. Peroxidação Lipídica e Produção de NO	48
IV.VI. Resultados Eletrofisiológicos	51
V. Discussão	55
VI. Conclusões	64
VII. Referências Bibliográficas	67
VIII. Anexos	77

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos:

°C:	Graus Celsius
µg:	Microgramas
µg/Kg:	Microgramas por Kilograma
µg/mg:	Microgramas por Miligrama
µg/mL:	Microgramas por Mililitro
µL:	Microlitros
µm/mL:	Micromol por Mililitro
ANOVA:	Análise de Variâncias
APA:	Amplitude do Potencial de ação
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DPA20%:	Duração do Potencial de Ação a 20% de Repolarização
DPA50%:	Duração do Potencial de Ação a 50% de Repolarização
DPA90%:	Duração do Potencial de Ação a 90% de Repolarização
dP/dT:	Derivada da Pressão sobre a Derivada do Tempo
eNOS:	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
EPM:	Erro Padrão da Média
EROs:	Espécies Reativas de Oxigênio

FV:	Fibrilação Ventricular
g/L:	Gramas por Litro
GMPc:	Do inglês Cyclic Guanosine Monophosphate traduzido como Guanosina Monofosfato Cíclica
GTP:	Do inglês Guanosine Triphosphate traduzido como Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrogênio
IL-1β:	Interleucina-1β
iNOS:	Óxido Nítrico Sintetase Indutiva
KHB:	Krebs-Henseleit
KH ₂ PO ₂ :	Hidrofosfito de Potássio
KH ₂ PO ₄ :	Di-hidrogenofosfato de Potássio
L-Arg:	L-Arginina
L-Cit:	L-Citrulina
LIM:	Laboratório de Investigação Médica
LTB ₄ :	Leucotrieno-B ₄
M:	Molar
MAP:	Do inglês Monophasic Action Potential traduzido como Potencial de Ação Monofásico
MDA:	Malondialdeído
mg:	Miligramas
MgCl ₂ :	Cloreto de Magnésio

mg/Kg:	Miligramas por Kilograma
MgSO ₄ :	Sulfato de Magnésio
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
mmHg:	Milímetros de Mercúrio
mmol/L:	Milimol por Litro
ms:	Milisegundos
mV:	Milivolts
Na ₂ HPO ₄ :	Monoidrogenofosfato de Sódio
NADPH:	Do inglês Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate traduzido como Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NaHCO ₃ :	Bicarbonato de Sódio
NaH ₂ PO ₄ :	Fosfato de Sódio Monobásico
NaOH:	Hidróxido de Sódio
nm:	Nanômetros
nmol:	Nanomol
nmol/mg:	Nanomol por Miligrama
nNOS:	Óxido Nítrico Sintetase Neural
NO:	Óxido Nítrico
NO ₂ :	Nitrito

NO ₃ :	Nitrato
NOCys:	Do inglês S-nitrosocysteine traduzido como S-nitrosocisteína
NOS:	Óxido Nítrico Sintetase
NOTyr:	Do inglês Nitrotyrosine traduzido como Nitrotirosina
O ₂ :	Oxigênio
O ₂ -:	Ânion Superóxido
·OH:	Radical Hidroxil
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PBS:	Do inglês Phosphate Buffered Saline traduzido como Tampão Fosfato Salino
PD:	Pressão Diastólica
PGE ₂ :	Prostaglandina-E ₂
PLA ₂ :	Do inglês Phospholipase A ₂ e traduzido como Fosfolipase A ₂
PMSF:	Do inglês Phenylmethylsulfonyl Fluoride traduzido como Fenilmetilsulfonilflúor
PO ₄ :	Fosfato
RPM:	Rotações por Minuto
SDS:	Do inglês Sodium Dodecyl Sulfate traduzido como Sódio Dodecil Sulfato
SOD:	Superóxido Dismutase
TBARS:	Do inglês Thiobarbituric Reactive Acid Substances traduzido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBST: Do inglês Tris-buffered Saline Tween 20 traduzido como
Tampão Salino Tris-HCl Suplementado com Tween 20

TNF α : Do inglês Tumor Necrosis Factor- α e traduzido como Fator
de Necrose Tumoral- α

TTC: Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio

UDO: Unidades de Densidade Óptica

U.I/Kg: Unidades Internacionais por Kilograma

Lista de Figuras:

Figura 1: Representação esquemática da relação entre as fontes de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os elementos antioxidantes que impedem o acúmulo das EROs	11
Figura 2: Representação da reação de formação do óxido nítrico (NO)	14
Figura 3: Efeito do óxido nítrico (NO) sobre a musculatura lisa de vasos	16
Figura 4: Fotos do coração isolado	24
Figura 5: A: Ilustração esquemática de um sistema modificado de Langendorff com um transdutor de pressão utilizado para o protocolo de isquemia-reperusão	25
Figura 6: Foto do transdutor de pressão unido ao balão	26
Figura 7: Ilustração esquemática do protocolo de microeletrodio	34
Figura 8: Amostras de ventrículos cortados em fatias transversais e corados com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC)	39
Figura 9: Representação esquemática da ação das enzimas do sistema antioxidante endógeno	57
Gráfico 1: A área necrosada expressa em porcentagem da área total das fatias de ventrículos	40
Gráfico 2: A recuperação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo expressa em porcentagem da pressão pré-isquêmica	41
Gráfico 3: A recuperação da pressão diastólica	43
Gráfico 4: Expressão de proteínas totais do tecido cardíaco	46
Gráfico 5: Expressão de Catalase no tecido cardíaco	47
Gráfico 6: Medida indireta da peroxidação lipídica através da mensuração das TBARS	49

Gráfico 7: Medida indireta de NO através da mensuração de seus subprodutos	50
---	----

Gráfico 8: Resultados das medições da Duração do Potencial de Ação (DPA) do tecido endocárdico	52
---	----

Gráfico 9: Resultados das medições da Duração do Potencial de Ação (DPA) do tecido epicárdico	53
--	----

Tabela 1: Valores de Pressão Desenvolvida apresentados por cada grupo durante todo o experimento	42
---	----

Tabela 2: Valores de Pressão Diastólica (PD) apresentados por cada grupo durante todo o experimento	44
--	----

Resumo:

Moreira ALCS. *Efeitos Cardioprotetores da Catuama® e seus Componentes sobre o Coração Isolado de Ratos Submetidos a Isquemia e Reperusão* [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012. 97p.

Há mais de 20 anos a Catuama® vem sendo utilizada contra fadiga física e mental, disfunção sexual e astenia muscular. Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram efeitos como ação antinociceptiva, antidepressiva, neuroprotetora, vasodilatadora e dilatadora dos corpos cavernosos. Dados do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas da FMUSP (LIM-51) demonstraram que a Catuama® é capaz de reverter e prevenir a fibrilação ventricular (FV) induzida em coração isolado de coelho. Tendo em vista a comprovação de que a Catuama® possui efeito cardíaco significativo, tornou-se necessário investigar mais a fundo outras potenciais propriedades cardioprotetoras. Investigamos então se a Catuama® e a *Trichila catigua* podem oferecer proteção ao miocárdio submetido a isquemia e reperusão em coração isolado de ratos quando administrados cronicamente. Ratos Wistar machos e adultos foram submetidos a um tratamento de 14 dias com Catuama®, *T. catigua*, Água destilada ou Tween 80 por gavagem. Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital e os corações retirados e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit (KHB) pela aorta em sistema de Langendorff. Foi mantido fluxo constante de 8mL/minuto, temperatura de 36° C e oxigenação com 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Os corações foram submetidos a uma isquemia global através de interrupção da perfusão por 30 minutos seguida de 2 horas de reperusão. Para avaliar o grau de lesão causada pelo protocolo, analisamos os aspectos hemodinâmicos e biomoleculares. Foi possível observar uma melhora significativa em muitos dos parâmetros analisados. Os grupos que receberam os extratos de Catuama® e *T. catigua* mostraram área de necrose inferior a 16% da área total, enquanto os grupos Tween 80 e Água destilada apresentaram uma necrose superior a 60%. Além disso, a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo também apresentou melhora nos primeiros minutos de reperusão, alcançando uma recuperação próxima de 70% da pressão pré-isquêmica nos animais tratados com os extratos, enquanto os animais dos grupos Tween 80 e Água destilada apresentaram uma recuperação em torno de 20% da pressão desenvolvida. O mesmo ocorreu com a pressão diastólica dos grupos que receberam os extratos: nos primeiros minutos de reperusão a pressão diastólica foi reduzida para valores inferiores a 30 mmHg durante a reperusão, próximos dos pré-isquêmicos, enquanto os outros dois grupos mantiveram valores elevados de pressão diastólica durante toda a reperusão (Água destilada: 69,56±10,05 mmHg; Tween 80: 101,69±19,80 mmHg). Os grupos tratados com os extratos também apresentaram aumento na expressão de proteínas totais e de Catalase. Por outro lado, houve uma diminuição da peroxidação lipídica e de subprodutos do óxido nítrico. A Catuama® e a *T. catigua* já são amplamente usadas pela população e, devido a sua popularidade e acessibilidade, podem tornar-se aliadas para seres humanos com risco de doença cardíaca isquêmica.

Descritores: 1.Catuama 2.Fitoterapia 3.Plantas medicinais 4.Meliaceae 5.Isquemia 6.Traumatismo por reperusão 7.Miocárdio 8.Estresse oxidativo 9.Catalase 10.Peroxidação de lipídeos 11.Óxido nítrico.

Summary:

Moreira ALCS. *Cardioprotective effects associated to Catuama® and its components in isolated rats hearts exposed to ischemia and reperfusion* [thesis]. “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2012. 97p.

For over 20 years Catuama® has been used against physical and mental fatigue, muscular asthenia and sexual dysfunction. In the last years, several studies have shown effects such as antinociceptive action, antidepressant, neuroprotective, vasodilator and effects in erectile-dysfunction. Data from the Medical Research Laboratory in the Department of Clinical Emergency demonstrated that Catuama® is able to reverse and prevent ventricular fibrillation (VF) induced in isolated rabbit hearts. Given the evidence that Catuama® has significant cardiac effects, it became necessary to proceed a deeper investigation on other potential cardioprotective properties. We investigated if Catuama® and *Trichilia catigua* may offer protection to the myocardium subjected to ischemia and reperfusion in the isolated rat heart. Adult male Wistar rats were treated during 14 days with Catuama®, *T. catigua*, Distilled Water or Tween 80 by gavage. At the end of the treatment, the animals were anesthetized with pentobarbital and their hearts removed and perfused with Krebs-Henseleit (KHB) through the aorta in a Langendorff system. Perfusion flow was kept constant at 8mL/minute, temperature 36° C; the preparation was aerated with 95% oxygen and 5% carbon dioxide. The hearts were submitted to global ischemia by stopping perfusion for 30 minutes followed by 2 hours of reperfusion. To assess the extension of the injury caused by the protocol, we analyzed the hemodynamic and molecular aspects. It was possible to observe a significant improvement in many parameters. The groups that received the extracts Catuama® and *T. catigua* showed necrotic area inferior to 16% of the total area, while the groups Tween 80 and Distilled Water showed higher than 60% necrosis. In addition, left ventricular developed pressure also improved in the first minutes of reperfusion, reaching a recovery of about 70% of pre-ischemic values in animals treated with the extracts, while animals in groups Tween 80 and Distilled Water showed a recovery around 20% of the developed pressure. The same occurred with diastolic pressure of the groups that received the extracts: in the first minutes of reperfusion, the diastolic pressure was reduced to below 30 mmHg during reperfusion, close to the pre-ischemic values, while in the other two groups diastolic pressure remained elevated throughout reperfusion (Distilled Water: 69.56 +10.05 mmHg; Tween 80: 101.69 +19.80mmHg). The groups treated with the extracts also showed increased expression of total protein and catalase. On the other hand, there was a decrease in lipid peroxidation products and nitric oxide. Catuama® and *T. catigua* are already widely used by the population and, due to their popularity and accessibility can become allies to humans at risk for ischemic heart disease.

Descriptors: 1.Catuama 2.Phytotherapy 3.Plants, Medicinal 4.Meliaceae 5.Ischemia 6.Reperfusion Injury 7.Myocardium 8.Oxidative Stress 9.Catalase 10.Lipid Peroxidation 11.Nitric Oxide.

Introdução

I. Introdução

I.I. Fitoterápicos:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em seu relatório de 2011 “World Health Statistics 2011”, os países em desenvolvimento ainda apresentam muitas dificuldades para manter uma oferta adequada de medicamentos essenciais para a sua população. Pesquisas em mais de 40 países indicaram que menos da metade dos estabelecimentos públicos de saúde disponibilizavam esses medicamentos para a população, e que a média de preço desses medicamentos no setor privado é 630% mais caro do que seu preço de referência internacional.

Além disso, outros estudos realizados pela OMS, comprovam que cerca de 65% a 80% da população dos países em desenvolvimento não tem acesso à medicina moderna e, conseqüentemente, aos tratamentos com sua eficácia cientificamente comprovada. Assim, essa população depende exclusivamente de plantas e outros produtos de origem natural para seus cuidados de saúde mais básicos (Calixto, 2005; OMS, 1978).

A aplicação terapêutica de produtos naturais é uma prática muito antiga e ainda é amplamente utilizada, uma vez que 25% a 30% de todas as substâncias utilizadas terapeuticamente são oriundas de produtos naturais. Contudo, há apenas um pequeno número de espécies de plantas sendo estudadas para a comprovação científica de seus efeitos (Calixto, 2005; Boldi, 2004; Clardy & Walsh, 2004; Koehn & Carter, 2005; Newman *et al.*, 2003).

É interessante pensar que todos os elementos da natureza foram selecionados através de um processo evolutivo de bilhões de anos. Esse processo garantiu uma complexidade de entidades químicas que merecem ser estudadas com mais atenção (Calixto, 2005), pois reside aí um potencial terapêutico de fácil acesso para as populações menos favorecidas e que tem sido subaproveitado por nossa sociedade.

Muito embora a sabedoria popular seja o gatilho de todo o conhecimento da fitoterapia, faz-se necessário abandonar o senso comum para a elaboração de um novo conhecimento científico. Para tal, no Brasil, os fitomedicamentos são registrados de forma equivalente às drogas sintéticas, exigindo-se comprovação científica de sua eficácia, segurança e qualidade (Calixto, 2005).

Em face desses dados, fica evidente a enorme presença da medicina popular no cotidiano da maioria da população, especialmente nos grupos de menor renda. E isso traz uma grande relevância para os estudos envolvendo a comprovação da eficácia, segurança e, caso sejam comprovados seus efeitos

terapêuticos, a determinação da posologia, indicações e contra-indicações para esses medicamentos.

A falta de mais estudos nessa área favorece que os medicamentos naturais sejam usados empiricamente, antes mesmo dos indivíduos terem um diagnóstico e sem qualquer tipo de acompanhamento por profissionais da área de saúde. Assim, é de suma importância a investigação científica em fitoterapia, para que se possa oferecer a essa população medicamentos eficazes, com efeito comprovado e custo significativamente menor.

I.II. Efeitos da Catuama®:

Dentre os fitoterápicos, pretendemos destacar a Catuama®, que é produzida no Brasil há mais de 20 anos, constituída por extratos de quatro plantas medicinais: *Trichilia catigua* (Meliaceae), a catuaba (28,23%); *Paullinia cupana* (Sapindaceae), o guaraná (40,31%); *Ptychopetalum olacoides* (Olacaceae), a muirapuama (28,23%) e *Zinziber officinalis* (Zinziberaceae), o gengibre (3,26%) (Pontieri *et al.*, 2007).

A Catuama® é utilizada empiricamente para combater a fadiga física e mental, assim como a disfunção sexual masculina e a astenia muscular. Ela tem se mostrado eficiente e já é objeto de estudo de nosso laboratório

(Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-51) de longa data.

O uso popular da Catuama[®] despertou o interesse científico, tanto pela popularidade do produto como pela gama de males que combate. Assim, Oliveira *et al.* (2005) realizaram o estudo toxicológico do extrato em seres humanos, ministrando o fitoterápico a voluntários. O estudo concluiu que a administração de 25 mL de Catuama[®] duas vezes ao dia por 28 dias não causou nenhum efeito deletério na saúde dos indivíduos.

A Catuama[®] também age relaxando a musculatura lisa de vasos do corpo cavernoso, aumentando assim o fluxo de sangue para o pênis. Esse relaxamento ocorre de forma dose-dependente. O extrato de *P. cupana* destaca-se dos outros componentes, levando a um maior relaxamento dos vasos em um menor tempo. O extrato de *T. catigua*, por outro lado, induziu um relaxamento mais lento, porém, mais duradouro (Drewes *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2001).

O efeito da Catuama[®] sobre a musculatura lisa dos vasos foi objeto de outros estudos. Cabrini e Calixto (1997) observaram a ação do extrato em artérias de diversos animais e puderam concluir que a Catuama[®] é eficiente em promover o relaxamento dos vasos através das vias dependentes e das vias independentes do endotélio. Esse relaxamento parece ser mediado pelas concentrações de óxido nítrico (NO) e seus derivados. Com relação aos componentes da Catuama[®], os extratos de *P. cupana* e *T. catigua* mostraram-se mais eficientes, segundo os experimentos realizados por Cabrini e Calixto (1997).

Também são notáveis os efeitos da Catuama[®] em modelos de depressão em ratos. Tanto nos testes *in vivo* quanto nos testes *in vitro*, o fitoterápico mostrou uma ação comparável aos efeitos de antidepressivos clássicos, como a imipramina e a fluoxetina (Campos *et al.*, 2004). Observou-se que a Catuama[®] provoca a inibição da recaptação de noradrenalina, serotonina e dopamina e aumenta a liberação de serotonina e dopamina no cérebro (Campos *et al.*, 2004). O extrato também mostrou ser 9 a 18 vezes mais potente na inibição da recaptação de serotonina e dopamina, respectivamente, do que na recaptação de noradrenalina (Campos *et al.*, 2004).

Os experimentos de Campos *et al.* (2005) demonstram que esse efeito antidepressivo se deve pela ação do extrato de *T. catigua*, pois foi esse extrato que inibiu a captura de dopamina e de serotonina, aumentando suas concentrações. É preciso salientar que o extrato de *T. catigua* é duas vezes mais eficaz agindo sobre a concentração de dopamina do que sobre a de serotonina (Campos *et al.*, 2005).

Outros estudos demonstraram ação antinociceptiva de longa duração da Catuama[®]. Todas as doses testadas da Catuama[®] inibiram significativamente a resposta nociceptiva de ratos. Contudo, apenas a dose de 200 mg/Kg inibiu essa resposta por um período superior a 24 horas. Os dados também sugerem que a Catuama[®] reduz a nocicepção mecânica sem alterar a sensibilização térmica. Também não foi demonstrado nenhum efeito da Catuama[®] sobre a expressão dos mediadores inflamatórios interleucina-1 β (IL-

1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF α), prostaglandina-E₂ (PGE₂) e Leucotrieno-B₄ (LTB₄) (Quintão *et al.*, 2007).

Mesmo sem interferir na concentração dos mediadores inflamatórios citados acima, o extrato de *T. catigua* mostrou efeitos antiinflamatórios relacionados com a redução da atividade da Fosfolipase A₂ (PLA₂) em plaquetas humanas. O estudo demonstrou o efeito dose-dependente da *T. catigua*, que inibiu completamente a atividade da PLA₂ a uma concentração de 120 μ m/mL (Barbosa *et al.*, 2004).

Todos os estudos mencionados acima deixam claro o potencial terapêutico do extrato de Catuama[®] bem como de seus componentes isolados. Um fitoterápico de tal relevância deve ser estudado com a máxima atenção possível para que não seja negligenciada nenhuma de suas potencialidades. Assim, trataremos agora dos efeitos cardíacos da Catuama[®] e seus componentes, dedicando especial atenção para a *T. catigua*.

I.III. Efeitos Cardíacos:

Estudo realizado no Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-51, demonstrou um efeito até então

desconhecido da Catuama[®]: a reversão da fibrilação ventricular (FV) em corações isolados de coelhos, tendo-se observado também um prolongamento na fase 2 do potencial de ação monofásico (MAP). Tal estudo revelou uma grande eficácia da droga na reversão da FV na concentração de 200 µg/ml (Pontieri *et al.*, 2007).

A reversão da FV está mais ligada aos princípios ativos encontrados na *T. catigua*, pois esse extrato foi o único capaz de reverter e prevenir a FV quando testado isoladamente. Contudo, a reversão e a prevenção da FV, bem como o prolongamento da fase 2 do MAP são potencializadas quando os 4 extratos são utilizados conjuntamente e são uma forte indicação de que os extratos tem efeitos sobre os canais iônicos e o potencial de ação cardíaco (Pontieri *et al.*, 2007).

I.IV. Estudos em Coração Isolado e Mecanismos de Cardioproteção:

Dentre os métodos para estudos de órgãos isolados, poucos têm sido usados de forma tão freqüente quanto o método de coração isolado em sistema de Langendorff. A técnica consiste em retirar o coração do animal rapidamente e promover uma perfusão retrógrada através da aorta. Tal metodologia apresenta várias vantagens, entre elas, a possibilidade de estudar as

características e reações intrínsecas ao coração, livre de influências sistêmicas (Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007).

Mesmo tratando-se de uma técnica antiga (o primeiro coração de mamífero foi isolado e perfundido com sucesso em 1895 por Oscar Langendorff) ela ainda se mantém relevante e eficaz para os estudos de fisiologia cardíaca, principalmente porque constrói uma importante ponte entre os estudos *in vitro* e *in vivo*. Devidamente apoiada por outros métodos, oferece uma análise consistente da fisiologia cardíaca (Bell *et al.*, 2011; Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007).

Uma das metodologias que podem oferecer o devido suporte aos dados obtidos pela técnica de Langendorff são as medidas das concentrações de proteínas ligadas ao sistema antioxidante endógeno, como a Catalase ou a Superóxido Dismutase (SOD) no tecido cardíaco, bem como a análise das relações entre essas proteínas com as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o modo como os extratos de Catuama® e seus componentes podem interferir nessas relações (Santos *et al.*, 2011; Kevin *et al.*, 2005).

Também é importante lembrar que os níveis de peroxidação lipídica e de produção de nitratos orgânicos têm uma participação importante nos processos de cardioproteção em situações de isquemia e reperfusão. Logo, são elementos valiosos para a análise dos efeitos das propriedades cardioprotetoras dos extratos estudados (Calvert & Lefer, 2009; Tsikas, 2007).

I.V. Estresse Oxidativo:

Os radicais livres são compostos altamente reativos, formados pela perda ou ganho de um elétron. Devido a essa alta reatividade, essas moléculas podem causar danos aos organismos através da peroxidação de lipídeos, proteínas e outras macromoléculas, uma vez que a peroxidação é uma reação irreversível e que compromete o funcionamento dessas moléculas (Kevin *et al.*, 2005; Goldhaber & Weiss, 1992). Seus efeitos deletérios têm sido estudados por mais de 50 anos, porém só recentemente foi feita uma importante descoberta: os radicais livres desempenham um papel fundamental na fisiologia celular. Contudo, se produzidos em excesso, podem causar graves danos às células (Kevin *et al.*, 2005).

Nos mamíferos, existem sistemas antioxidantes endógenos que visam conter os danos causados pela produção excessiva de radicais livres (figura 1). Contudo, em situações patológicas, como a isquemia e reperfusão, a produção de radicais livres pode superar a capacidade dos sistemas antioxidantes dos organismos. Esse desequilíbrio entre a produção de EROs e capacidade celular de eliminação é chamado de estresse oxidativo (Kevin *et al.*, 2005).

Por sua alta reatividade, os radicais livres podem se ligar a qualquer molécula do organismo, reduzindo ou mesmo anulando a capacidade dessas moléculas de cumprir suas funções fisiológicas. A peroxidação lipídica, por

exemplo, é especialmente danosa para as células, pois compromete a estrutura da membrana plasmática (Kevin *et al.*, 2005).

Figura 1: Representação esquemática da relação entre as fontes de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os elementos antioxidantes que impedem o acúmulo das EROs. Vitaminas e enzimas do sistema antioxidante endógeno, como a catalase e Superóxido Dismutase (SOD), auxiliam a manter o equilíbrio redox. Adaptado de Kevin *et al.* (2005) por Moreira (2011)

Considerando que o tecido cardíaco, devido a sua alta demanda energética, tem um grande consumo de oxigênio (O₂) e, conseqüentemente, uma alta produção de radicais livres, sofre uma maior exposição ao risco de estresse oxidativo. Existem diversos mecanismos que auxiliam o tecido cardíaco a manter

o equilíbrio entre o consumo e o suprimento de O_2 oferecido ao coração, com o intuito de evitar danos aos tecidos (Santos *et al.*, 2011). Contudo, a despeito de toda a maquinaria celular trabalhar para manter a homeostase redox, já está provado que em certas condições, como a hipóxia, isquemia e reperfusão, por exemplo, ocorre um acúmulo de EROs no miocárdio (Santos *et al.*, 2011; Goldhaber & Weiss, 1992; Zweier *et al.*, 1987).

A exposição de corações a EROs, sem a indução de isquemia e reperfusão, apresenta sequelas semelhantes à própria isquemia e reperfusão. Entre elas podemos destacar a perda de potássio (K^+), o encurtamento da duração do potencial de ação, diminuição gradativa da força sistólica acompanhada de aumento da força diastólica e severos danos à maquinaria celular. Tais dados corroboram a idéia de que as lesões causadas pelo processo de isquemia e reperfusão estão intimamente ligadas ao acúmulo de radicais livres (Goldhaber & Weiss, 1992; Goldhaber *et al.*, 1989).

Existem ainda estudos que relacionam os processos isquêmicos e o estresse oxidativo com as concentrações de cálcio no citoplasma e nos diversos compartimentos do cardiomiócito, chamando a atenção para suas possíveis relações com os canais de cálcio (Santos *et al.*, 2011; Sumandea & Steinberg, 2011; Dusse *et al.*, 2005; Gewaltig & Kojda, 2002; Snyder & Bredt, 1992). Também existem muitas pesquisas citando a participação das mitocôndrias, da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e da NADPH oxidase no estresse oxidativo (Santos *et al.*, 2011; Sumandea & Steinberg, 2011).

I.VI. Óxido Nítrico (NO):

O óxido nítrico é uma molécula pequena e instável produzida por praticamente todas as células dos seres humanos. Durante muitas décadas, os efeitos do NO não foram estudados pelas ciências da saúde, pois se acreditava que era um elemento de pouca relevância nos processos celulares eucariotos. Porém, durante a década de 80, foi provada a sua participação no processo de relaxamento da musculatura lisa de vasos. Desde então, o NO tem aparecido como um importante mediador de diversos processos celulares e muitas doenças apresentam relação com desorganizações nos níveis de NO (Calvert & Lefer, 2009; Dusse *et al.*, 2005).

A biossíntese do NO ocorre através da oxidação de um dos nitrogênios terminais da L-arginina, reação essa catalisada pela NO sintetase (NOS). Essa enzima promove a conversão da L-arginina em NO e L-citrulina (figura 2). Já foram identificadas três isoformas da NOS: a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neural (nNOS), que compõem o grupo das NOS constitutivas, e a NOS indutiva (iNOS), produzida pelos macrófagos (Calvert & Lefer, 2009; Tsikas, 2007; Dusse *et al.*, 2005; Ignarro, 1999; Michel & Feron, 1997; Loscalzo & Welch, 1995).

Figura 2: Representação da reação de formação do óxido nítrico (NO). A reação ocorre a partir da conversão da L-Arginina (L-Arg) em L-Citrulina (L-Cit) e é catalisada pela NO sintetase (NOS). Moreira (2011)

Como já foi mencionado, um importante efeito do NO é sua capacidade de estimular a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e o relaxamento da musculatura lisa do vaso. Isso ocorre porque o NO é capaz de ativar a enzima guanilato ciclase que catalisa a liberação de dois grupos fosfato da guanosina trifosfato, convertendo-a em GMPc. Esse aumento da GMPc promove a redução do cálcio citoplasmático de três modos: aumento o sequestro do cálcio para o retículo endoplasmático, inibição da entrada de cálcio para a célula e a liberação do cálcio do retículo. Consequentemente, ocorre o relaxamento da célula muscular (figura 3) (Dusse *et al.*, 2005; Gewaltig & Kojda, 2002; Snyder & Bredt, 1992).

Os efeitos do NO em modelos de isquemia e reperfusão e suas propriedades cardioprotetoras têm sido amplamente estudados. Essa molécula mostrou-se um potente vasodilatador do miocárdio em situação de isquemia e

também é capaz de inibir de modo reversível a respiração mitocondrial. Tais efeitos ajudam a conter os danos causados ao tecido durante a reperfusão. (Calvert & Lefer, 2009).

Devemos lembrar que a profilaxia dos danos causados pela isquemia é um enorme desafio para a medicina moderna por diversos motivos. Entre eles, podemos destacar a reduzida eficácia dos métodos clínicos empregados para a redução da mortalidade total dos pacientes, bem como a constatação de que muitas metodologias utilizadas atualmente ainda apresentam uma relação custo-benefício desfavorável.

Desse modo, mostra-se imprescindível estudar um produto com o potencial da Catuama[®] em todos os seus níveis de atuação. E, sabendo que ainda não foram realizados estudos que observem os efeitos da Catuama[®] em modelos de isquemia e reperfusão, faz-se necessário avançar os estudos nessa direção realizando esses experimentos.

Figura 3: Efeito do óxido nítrico (NO) sobre a musculatura lisa de vasos. O NO ativa a enzima guanilato ciclase que catalisa a liberação de dois grupos fosfato (PO₄) da guanosina trifosfato (GTP), convertendo-a em guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento da GMPc promove a redução do cálcio citoplasmático e o relaxamento da célula muscular. Moreira (2011)

Objetivos

II. Objetivos:

II.I. Objetivo Geral:

A presente tese tem por objetivos gerais analisar o efeito da Catuama[®] e da *T. catigua* sobre o miocárdio de rato Wistar macho em modelo de isquemia e reperfusão em coração isolado e avaliar se houve uma resposta cardioprotetora significativa.

II.II. Objetivos Específicos:

A seguir, temos por objetivos específicos:

- Analisar se os extratos de Catuama[®] e *T. catigua* mostram-se capazes de intervir de forma positiva no desempenho cardíaco pós-isquêmico e oferecer melhora nos seguintes parâmetros: pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo recuperada durante a reperfusão como uma porcentagem da

pressão desenvolvida no período pré-isquêmico; pressão diastólica do ventrículo esquerdo em milímetros de mercúrio (mmHg); porcentagem de área infartada, considerando-se como área de risco a área total do coração; derivada da pressão/derivada do tempo (dP/dT) máxima e mínima.

→ Investigar se as propriedades cardioprotetoras apresentam relação com os seguintes marcadores biomoleculares de estresse oxidativo: enzimas do sistema antioxidante endógeno; nitrotirosina; s-nitrosocisteína; peroxidação lipídica; subprodutos do óxido nítrico.

→ Estabelecer prováveis relações entre os canais iônicos e a modulação do potencial de ação.

Com isso, pretendemos somar novos conhecimentos a um trabalho que já é desenvolvido pelo Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Emergências Clínicas da FMUSP, LIM-51.

Métodos

III. Métodos:

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). O presente estudo foi aprovado pela mesma comissão com o protocolo de número 0334/08.

III.I. Langendorff:

Para a realização dos experimentos, utilizamos ratos Wistar machos adultos pesando entre 250g e 350g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas de proporções adequadas no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia – Departamento de Clínica Médica – com água e ração “Ad Libidum”. A temperatura ambiente foi mantida sempre em $22^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Os extratos foram fornecidos pelo Laboratório Catarinense S.A. (Joinville, SC, Brasil). Para utilização no tratamento dos animais, os extratos secos foram dissolvidos em 10% de Oleato de Sorbitan Etoxilado (Tween 80) e água destilada até a concentração de 40g/L. Os ratos foram distribuídos randomicamente em quatro grupos, de acordo com o tratamento que receberam:

- Grupo Catuama®: Cada animal recebeu duas doses diárias de 100 µg/Kg de animal, perfazendo um total de 200 µg/Kg de animal por dia de Catuama®;
- Grupo *T. catigua*: Cada animal recebeu duas doses diárias de 100 µg/Kg de animal, perfazendo um total de 200 µg/Kg de animal por dia de *T. catigua*;
- Grupo Água Destilada: Cada animal recebeu duas doses diárias de água destilada em um volume equivalente ao recebido pelos animais que foram tratados com os extratos;
- Grupo Tween. 80: Cada animal recebeu duas doses diárias de Água destilada com 10% de Tween 80 em um volume equivalente ao recebido pelos animais que foram tratados com os extratos.

Os animais tiveram seus respectivos tratamentos administrados de acordo com o grupo a que pertenciam durante 14 (quatorze) dias por gavagem. Ao

término do tratamento, o rato foi heparinizado (4 U.I./Kg de animal) e anestesiado com pentobarbital sódico (60 U.I./Kg de animal). Após rápida retirada do coração, o órgão foi colocado no sistema de Langendorff e perfundido com solução de Krebs-Henseleit (KHB) (NaCl, 118 mmol/L; KCl, 4,7 mmol/L; MgSO₄, 1,2 mmol/L; KH₂PO₄, 1,2 mmol/L; glucose, 11 mmol/L; NaHCO₃, 25 mmol/L; CaCl₂, 1,25 mmol/L) pela aorta. A solução foi perfundida a um fluxo constante de 8mL/minuto, mantida a temperatura de 36° C e constantemente oxigenada com 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico (figura 4; figura 5 A).

Após um período de estabilização de 20 minutos, foi introduzido um balão no ventrículo esquerdo. O balão estava unido a um transdutor de pressão (BIOPAC Systems Inc., modelo TSD104A, EUA) por um cateter e preenchido com solução fisiológica (figura 6). Todo o sistema foi mantido livre de bolhas durante os experimentos. Os dados foram coletados pelo software Acknowledge III para o sistema analógico-digital P100WSW (BIOPAC Systems, Inc., EUA).

Figura 4: Fotos do coração isolado. Foto mostrando o coração no sistema de Langendorff, sendo perfundido e com o balão acondicionado no ventrículo esquerdo. Moreira (2011)

A

B

Figura 5: A: Ilustração esquemática de um sistema modificado de Langendorff com um transdutor de pressão utilizado para o protocolo de isquemia-reperusão. Adaptado de Skrzypiec-Spring *et al.* (2007) por Moreira (2011). B: Ilustração esquemática da duração e da divisão do protocolo no tempo. Moreira (2011)

Figura 6: Foto do transdutor de pressão unido ao balão. O balão é introduzido no ventrículo esquerdo, todo o sistema deve estar preenchido com solução fisiológica e livre de bolhas. Moreira (2011)

Para cada um dos corações analisados, foram gravados 20 minutos de controle, seguidos de indução de isquemia global de 30 minutos por parada da perfusão de KHB. A seguir, o coração foi reperfundido por mais duas horas (figura 5 B). Para a análise dos dados, consideramos a primeira hora de reperfusão e não foram utilizados no presente estudo corações isolados que apresentassem uma pressão desenvolvida inferior a 75 mmHg durante o período controle.

Finalmente, para possibilitar uma quantificação do dano causado pelo procedimento de isquemia e reperfusão, foi decidido analisar a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo recuperada durante a reperfusão como uma

porcentagem da pressão desenvolvida no período pré-isquêmico, a pressão diastólica do ventrículo esquerdo em mmHg, a porcentagem de área infartada em relação a área total e a derivada da pressão/derivada do tempo (dP/dT) máxima e mínima.

Ao fim da reperfusão, os átrios foram descartados e os ventrículos cortados em quatro fatias transversais e corados com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC) para medição da área infartada. O corante foi diluído em tampão de fosfato de baixo pH (NaH_2PO_4 a 0,1M) e de alto pH (Na_2HPO_4 a 0,1M). Os tampões foram misturados em volumes iguais e o TTC foi diluído até a concentração de 1%.

Com o corante aquecido a 36°C e protegido da luz, as fatias foram totalmente imersas durante 4 minutos. Em seguida, foram transferidas para formaldeído 10% diluído em tampão fosfato salino (PBS) (NaCl , 140,31 mmol/L; KCl , 2,68 mmol/L; KH_2PO_2 , 1,92 mmol/L; Na_2HPO_4 , 8,03 mmol/L) para fixação por 24 horas.

Após esse período, as fatias foram colocadas entre lâminas de microscópio, escaneadas e analisadas pelo software ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Para efeito de cálculo da porcentagem da área necrosada, foi considerada como área de risco a área total das fatias de ventrículos.

Também foi coletada uma amostra de tecido a ser utilizada em análises biomoleculares, para detecção de proteínas e outros elementos relacionados com o sistema antioxidante.

III.II. Extração de Proteínas:

Os tecidos foram mantidos em temperaturas próximas a -80°C com o objetivo de evitar a degradação de material proteico. Um fragmento de tecido de 50 mg foi colocado em tampão de lise (1% de NP40; 10% de glicerol; 135 mM de NaCl; 20mM de Tris com pH de 8.0; e os inibidores: 1mM de ortovanadato de sódio; 1mM de Fenilmetilsulfonilflúor, PMSF; 2µg/ml aprotinina; 2µg/ml pepstatina) e dissociado mecanicamente utilizando-se um homogeneizador do tipo Polytron.

O material lisado foi centrifugado por 30 minutos a uma velocidade de 12.000 rotações por minuto (RPM) a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises biomoleculares. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo Método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Essas amostras foram utilizadas em todas as análises biomoleculares subsequentes. Para evitar degradação de material protéico, as amostras também foram mantidas em temperaturas próximas de -80°C.

III.III. Western Blot:

A separação de proteínas por peso molecular foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Para isso, 50 µg de proteína das amostras foram homogeneizadas em tampão de amostras contendo agente redutor (β -mercapto), e foram submetidas à separação eletroforética. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) por meio de transferência semi-seca. Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão salino Tris-HCl suplementado com 0,5% de Tween 20 (TBST) por 2 horas.

Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários para a detecção e mensuração das seguintes proteínas: Catalase (Sigma, EUA) na concentração de 1:1000; Superóxido Dismutase (SOD) (Sigma, EUA) na concentração de 1:10.000; Nitrotirosina (NOTyr) (Sigma, EUA) na concentração de 1:1000; S-nitrosocisteína (NOCys) (Sigma, EUA) na concentração de 1:10.000.

Os anticorpos primários foram incubados por 12 horas a 4° C. Após esse período, as membranas foram lavadas com TBST por três vezes de dez minutos para a remoção do excesso de reagente. Em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários na concentração de 1:1000 (Sigma, EUA) durante 2

horas. Na sequência, as membranas foram lavadas com TBST por duas vezes de trinta minutos.

Por fim, foi feita a revelação expondo as membranas ao reagente quimioluminescente (SuperSignal detection kit; Pierce, Rockford, Ill) e a membrana foi exposta ao sistema de detecção de imagem Syngene (Syngene, Cambridge, Mass). A intensidade das bandas foi determinada pelo software GeneTools (Syngene, Cambridge, Mass).

III.IV. Ensaio de Malondialdeído (MDA):

Com o objetivo de quantificar a peroxidação lipídica no tecido cardíaco, foi medida a formação de MDA através da observação e quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

As amostras de tecido de 50 mg foram homogeneizadas em 1 mL de solução de KCl de 1,15%. Então, foi adicionado às amostras a solução reagente composta por 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0.8%, 200 mL de sódio dodecil sulfato (SDS) a 8.1%, 1.5 mL de ácido acético a 20% (pH 3.5) e 600 mL de água destilada.

As amostras com a solução reagente foram aquecidas a 90° C durante uma hora e depois foram expostas a temperatura ambiente até a temperatura baixar naturalmente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas na velocidade de 10.000 RPM durante 12 minutos.

Ocorreu, então, uma reação colorimétrica que pode ser quantificada pela medida de absorbância com leitura em comprimento de onda de 532 nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como controle e os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína da amostra.

III.V. Reação de Griess:

Essa reação quantifica os produtos do óxido nítrico presentes no tecido. Mas, para isso, o óxido nítrico deve ser convertido em nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2) através de uma reação de redução. Com o objetivo de promover a reação redutora, foram adicionados 50 μL da solução resultante da extração de proteínas, 25 μL de solução de NADPH (0.134 mg de NADPH por mL de tampão de Tris na concentração de 40 mM e pH 7.6). As soluções foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente.

Imediatamente após o fim da reação de redução, iniciou-se a reação de Griess misturando-se partes iguais de solução com 1% de sulfanilamida em

ácido fosfórico a 5% e solução a 0,1% de naftil-etilenodiamina em água destilada. Então, adicionou-se 100 µL da solução resultante a cada uma das amostras, que foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Ocorreu, então uma reação colorimétrica que pode ser quantificada pela medida de absorbância com leitura em comprimento de onda de 550 nm.

III.VI. Microeletrodio:

Para verificar possíveis efeitos eletrofisiológicos do extrato de Catuama® foram realizados experimentos com a técnica de microeletrodio. Iniciamos procurando determinar uma possível atividade no potencial de repouso, na amplitude e na duração do potencial de ação através da verificação dos efeitos agudos da Catuama® sobre os cardiomiócitos de ratos Wistar machos adultos pesando entre 250g e 350g. Os animais foram mantidos em gaiolas de proporções adequadas com água e ração “Ad Libidum” e em temperatura ambiente entre 22° C $\pm$ 2. Os animais foram previamente heparinizados (4 U.I./Kg de animal), colocados na câmara de CO₂ até perderem a consciência e então sacrificados por deslocamento cervical.

Imediatamente após o sacrifício, o coração foi retirado e mergulhado em solução de Tyrode (NaCl, 140 mmol/L; KCl, 5 mmol/L; MgCl₂, 1,8 mmol/L; Glucose, 11 mmol/L; Hepes, 5 mmol/L; CaCl₂, 2 mmol/L e pH de

4,4 ajustado com NaOH). Em seguida, apenas o ventrículo esquerdo foi utilizado para a retirada de amostras de tecidos endocárdicos e epicárdicos.

Os tecidos foram acondicionados em sistema apropriado para estimulação e captação dos potenciais de ação com oxigenação e perfusão constante de Tyrode a 36,5° C (figura 7 A). Cada resultado corresponde a aproximadamente uma hora de gravação dos potenciais de ação de um cardiomiócito através de empalamento da célula com micropipeta adequada. Esse tempo foi dividido em vinte minutos de gravação do controle, vinte minutos de perfusão de Tyrode com Catuama® a uma concentração de 200 µg/mL e vinte minutos de lavagem com Tyrode (figura 7 B).

Os intervalos foram comparados através dos seguintes critérios: amplitude do potencial de ação (APA) em milivolts (mV), duração do potencial de ação a 20% de repolarização (DPA20%) em milisegundos (ms), duração do potencial de ação a 50% de repolarização (DPA50%) em ms e duração do potencial de ação a 90% de repolarização (DPA90%) em ms (figura 7 C). Com o intuito de obter dados mais fidedignos, foram desconsiderados os primeiros potenciais de ação de cada registro. Também não foram utilizados tecidos que apresentassem quaisquer anormalidades durante o período controle. Para fins estatísticos, foram considerados os potenciais gravados após um determinado período de estabilização do efeito tanto da Catuama® como da lavagem.

Figura 7: Ilustração do protocolo de microeletrodo. A: Representação do sistema para estimulação e captação dos potenciais de ação de tecido cardíaco. Adaptado de Picard *et al* (1998) por Moreira (2011). B: Ilustração da duração e da divisão do protocolo no tempo. Por Moreira (2011). C: Ilustração do potencial de ação e dos parâmetros analisados: amplitude do potencial de ação (APA) em milivolts (mV), duração do potencial de ação a 20% de repolarização (DPA20%) em milissegundos (ms), duração do potencial de ação a 50% de repolarização (DPA50%) em ms e duração do potencial de ação a 90% de repolarização (DPA90%) em ms. Adaptado de Brugada *et al* (2005) por Moreira (2011)

III.VII. Análise Estatística:

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram realizadas através de análise de variâncias (ANOVA), seguida pelo teste de Turkey ou Bonferroni, e o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados estatísticos foram analisados pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California, EUA).

Resultados

IV. Resultados:

Os animais não apresentaram nenhuma reação adversa relacionada à administração dos extratos de Catuama® e *T. catigua*. Os animais que receberam Água Destilada com 10% de Tween 80 apresentaram discreta diarreia durante os primeiros dias de tratamento. E experimentos preliminares realizados com outros componentes da Catuama® não apresentaram resultados significativos.

IV.I. Resultados Hemodinâmicos:

Os animais tratados com Catuama® e *T. catigua* apresentaram uma diminuição importante na área de necrose do tecido cardíaco (figura 8). A área de necrose dos grupos que receberam os extratos de Catuama® e *T. catigua* foi inferior a 16% da área total das fatias dos corações. Em contrapartida, os grupos que receberam Tween 80 e Água Destilada apresentaram necrose próxima a 60% da área total dos corações (gráfico 1). A conservação geral do tecido cardíaco

mostra-se muito superior nos animais tratados com os extratos Catuama® e *T. catigua* (figura 8).

Também foi avaliada a recuperação da pressão desenvolvida durante a reperfusão. Os grupos que receberam os extratos de Catuama® e *T. catigua* mostraram uma recuperação significativa da pressão desenvolvida. Nos primeiros 20 minutos de reperfusão, os animais que receberam Catuama® e *T. catigua* haviam recuperado cerca de 60% da pressão comparada com os valores pré-isquêmicos. Após 2 horas esses valores já tinham atingido 80% do inicial. Já os grupos que receberam Água Destilada e Tween 80 apresentaram uma baixa recuperação da pressão desenvolvida durante as 2 horas, alcançando uma recuperação próxima de 40% (gráfico 2, tabela 1).

A pressão diastólica dos animais que receberam os extratos também apresentou uma recuperação importante nos primeiros minutos de reperfusão. Durante a isquemia, a pressão diastólica, que inicialmente era inferior a 25 mmHg, ultrapassou os 60 mmHg. Foi possível observar que os grupos que receberam Catuama® e *T. catigua* retornaram para valores próximos de 30 mmHg, ao contrário do que ocorreu com os grupos Água Destilada e Tween 80, que continuaram com a pressão diastólica subindo durante a reperfusão e atingiram valores em torno de 100 mmHg (gráfico 3, tabela 2). As medidas de dP/dT máxima e mínima não apresentaram diferenças estatísticas

Tanto no grupo que recebeu Catuama® quanto no grupo que recebeu *T. catigua*, foi possível observar uma recuperação importante das

pressões desenvolvida e diastólica nos primeiros minutos de reperfusão. Essa melhora nos dois parâmetros se mantém durante todo o período estudado. Os grupos tratados com os extratos também não apresentaram arritmias ou outros distúrbios durante os protocolos com coração isolado. Por outro lado, os grupos tratados com Água Destilada e Tween 80 apresentaram uma breve arritmia durante os primeiros minutos de reperfusão. Em alguns casos essas arritmias retornavam ao final do protocolo, mas não perduravam durante todo o experimento.

Figura 8: Amostras de ventrículos cortados em fatias transversais e corados com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC). A: Água Destilada; B: Tween 80; C: *T. catigua*; D: Catuama®. Moreira (2011)

Gráfico 1: A área necrosada expressa em porcentagem da área total das fatias de ventrículos. Não há diferença significativa entre e *T. catigua* e Catuama®, nem entre os grupos Água Destilada e Tween 80. No entanto, há uma diferença significativa entre os grupos que receberam os extratos e os grupos Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias $\pm$ EPM, n = 15 e P < 0,05

*P < 0,05 vs Água Destilada

#P < 0,05 vs Tween 80

Gráfico 2: A recuperação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo expressa em porcentagem da pressão pré-isquêmica. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. Água Destilada e Tween 80 apresentam diferença significativa apenas no início da reperfusão. Em contraste, Catuama® e *T. catigua* tem diferença significativa presente desde os primeiros momentos de reperfusão, quando comparadas com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias $\pm$ EPM, n = 15 e P < 0,05

Tabela 1: Valores de Pressão Desenvolvida apresentados por cada grupo durante todo o experimento

Tempo (minuto)	Água Destilada			Tween 80			T. catigua			Catuama®		
	Pressão (mmHg) ± SEM	N	Pressão (mmHg) ± SEM	Pressão (mmHg) ± SEM	N	Pressão (mmHg) ± SEM	Pressão (mmHg) ± SEM	N	Pressão (mmHg) ± SEM	N	Pressão (mmHg) ± SEM	N
-10	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	15
0	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	15	100,00 ± 0,00	15
1	11,59 ± 2,64	15	6,86 ± 2,15	6,86 ± 2,15	15	10,96 ± 2,08	10,96 ± 2,08	15	24,08 ± 5,47	15	24,08 ± 5,47	15
2	4,32 ± 1,02	15	3,43 ± 0,74	3,43 ± 0,74	15	3,41 ± 1,23	3,41 ± 1,23	15	3,43 ± 0,85	15	3,43 ± 0,85	15
3	2,78 ± 0,60	15	2,46 ± 0,66	2,46 ± 0,66	15	3,66 ± 1,76	3,66 ± 1,76	15	1,17 ± 0,27	15	1,17 ± 0,27	15
4	2,67 ± 0,58	15	1,96 ± 0,64	1,96 ± 0,64	15	3,19 ± 1,57	3,19 ± 1,57	15	0,44 ± 0,12	15	0,44 ± 0,12	15
5	2,57 ± 0,55	15	2,13 ± 0,57	2,13 ± 0,57	15	3,07 ± 1,38	3,07 ± 1,38	15	0,40 ± 0,12	15	0,40 ± 0,12	15
10	2,13 ± 0,48	15	2,41 ± 0,50	2,41 ± 0,50	15	2,74 ± 1,49	2,74 ± 1,49	15	0,21 ± 0,09	15	0,21 ± 0,09	15
15	1,99 ± 0,54	15	1,92 ± 0,30	1,92 ± 0,30	15	2,32 ± 1,00	2,32 ± 1,00	15	0,23 ± 0,08	15	0,23 ± 0,08	15
20	1,92 ± 0,59	15	1,44 ± 0,29	1,44 ± 0,29	15	2,81 ± 1,35	2,81 ± 1,35	15	0,23 ± 0,07	15	0,23 ± 0,07	15
25	1,53 ± 0,45	15	1,26 ± 0,22	1,26 ± 0,22	15	2,79 ± 1,29	2,79 ± 1,29	15	0,19 ± 0,06	15	0,19 ± 0,06	15
30	14,61 ± 5,97	15	1,84 ± 0,50	1,84 ± 0,50	15	6,56 ± 3,06	6,56 ± 3,06	15	0,62 ± 0,45	15	0,62 ± 0,45	15
35	42,05 ± 6,38	15	13,42 ± 2,73 *	13,42 ± 2,73 *	15	58,68 ± 5,57	58,68 ± 5,57	15	46,39 ± 6,41	15	46,39 ± 6,41	15
40	45,62 ± 5,07	15	17,68 ± 3,15 *	17,68 ± 3,15 *	15	60,44 ± 5,05	60,44 ± 5,05	15	49,98 ± 5,71	15	49,98 ± 5,71	15
45	41,88 ± 5,13	15	21,71 ± 4,03 *	21,71 ± 4,03 *	15	69,21 ± 4,73 **	69,21 ± 4,73 **	15	52,85 ± 6,32	15	52,85 ± 6,32	15
50	42,99 ± 5,08	15	29,02 ± 4,81	29,02 ± 4,81	15	78,16 ± 4,16 **	78,16 ± 4,16 **	15	63,61 ± 5,03 **	15	63,61 ± 5,03 **	15
55	39,08 ± 5,30	15	30,65 ± 5,36	30,65 ± 5,36	15	72,70 ± 5,45 **	72,70 ± 5,45 **	15	63,02 ± 5,64 **	15	63,02 ± 5,64 **	15
60	39,30 ± 5,33	15	30,67 ± 5,69	30,67 ± 5,69	15	72,83 ± 5,93 **	72,83 ± 5,93 **	15	65,41 ± 5,65 **	15	65,41 ± 5,65 **	15
65	39,76 ± 5,40	15	33,83 ± 5,18	33,83 ± 5,18	15	77,91 ± 5,38 **	77,91 ± 5,38 **	15	68,42 ± 5,18 **	15	68,42 ± 5,18 **	15
70	37,26 ± 5,30	15	34,13 ± 4,93	34,13 ± 4,93	15	81,68 ± 3,86 **	81,68 ± 3,86 **	15	68,54 ± 4,88 **	15	68,54 ± 4,88 **	15
75	38,45 ± 5,14	15	28,30 ± 4,64	28,30 ± 4,64	15	76,61 ± 5,12 **	76,61 ± 5,12 **	15	68,48 ± 5,28 **	15	68,48 ± 5,28 **	15
80	37,46 ± 5,96	15	33,99 ± 5,74	33,99 ± 5,74	15	73,83 ± 4,58 **	73,83 ± 4,58 **	15	67,06 ± 5,14 **	15	67,06 ± 5,14 **	15
85	31,98 ± 5,56	15	38,58 ± 5,59	38,58 ± 5,59	15	72,42 ± 5,45 **	72,42 ± 5,45 **	15	65,93 ± 5,39 **	15	65,93 ± 5,39 **	15
90	33,51 ± 5,39	15	34,33 ± 4,63	34,33 ± 4,63	15	70,81 ± 5,27 **	70,81 ± 5,27 **	15	64,35 ± 5,17 **	15	64,35 ± 5,17 **	15

Tabela 1: Valores de Pressão Desenvolvida apresentados por cada grupo durante todo o experimento. Os valores são médias ± EPM, n = 15 e P < 0,05

*P < 0,05 vs Água destilada
 #P < 0, 05 vs Tween 80

Gráfico 3: A recuperação da pressão diastólica. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. E também não há diferença significativa entre Água Destilada e Tween 80. Em contrapartida, Catuama® e *T. catigua* apresentam diferença significativa desde os primeiros momentos de reperfusão, quando comparado com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias $\pm$ EPM, n = 15 e P < 0,05

Tabela 2: Valores de Pressão Diastólica (PD) apresentados por cada grupo durante todo o experimento

Tempo (minuto)	Água Destilada			Tween 80			T. catigua			Catuama®		
	PD (mmHg) ± SEM	N	PD (mmHg) ± SEM	PD (mmHg) ± SEM	N	PD (mmHg) ± SEM	PD (mmHg) ± SEM	N	PD (mmHg) ± SEM	N	PD (mmHg) ± SEM	N
-10	22,67 ± 2,88	15	20,39 ± 2,53	22,03 ± 2,99	15	22,03 ± 2,99	22,03 ± 2,99	15	16,68 ± 2,80	15	16,68 ± 2,80	15
0	19,06 ± 2,81	15	17,54 ± 1,95	16,80 ± 3,37	15	16,80 ± 3,37	16,80 ± 3,37	15	15,48 ± 2,80	15	15,48 ± 2,80	15
1	15,91 ± 2,90	15	15,26 ± 2,03	9,64 ± 3,06	15	9,64 ± 3,06	9,64 ± 3,06	15	12,31 ± 2,88	15	12,31 ± 2,88	15
2	11,51 ± 2,71	15	14,25 ± 2,27	8,54 ± 3,18	15	8,54 ± 3,18	8,54 ± 3,18	15	11,95 ± 2,95	15	11,95 ± 2,95	15
3	11,78 ± 2,41	15	12,81 ± 2,35	8,51 ± 3,19	15	8,51 ± 3,19	8,51 ± 3,19	15	12,21 ± 3,23	15	12,21 ± 3,23	15
4	11,26 ± 2,31	15	11,94 ± 2,33	7,90 ± 3,13	15	7,90 ± 3,13	7,90 ± 3,13	15	12,48 ± 3,50	15	12,48 ± 3,50	15
5	12,21 ± 2,29	15	11,32 ± 2,30	8,19 ± 3,13	15	8,19 ± 3,13	8,19 ± 3,13	15	14,33 ± 3,71	15	14,33 ± 3,71	15
10	12,61 ± 2,44	15	11,69 ± 2,26	15,01 ± 4,43	15	15,01 ± 4,43	15,01 ± 4,43	15	23,65 ± 5,40	15	23,65 ± 5,40	15
15	13,59 ± 2,85	15	13,67 ± 3,03	25,42 ± 6,98	15	25,42 ± 6,98	25,42 ± 6,98	15	31,96 ± 5,22	15	31,96 ± 5,22	15
20	14,82 ± 3,44	15	16,02 ± 4,11	37,43 ± 10,07	15	37,43 ± 10,07	37,43 ± 10,07	15	45,60 ± 5,75	15	45,60 ± 5,75	15
25	18,04 ± 4,04	15	18,12 ± 4,84	49,03 ± 13,01	15	49,03 ± 13,01	49,03 ± 13,01	15	51,87 ± 5,58	15	51,87 ± 5,58	15
30	38,20 ± 4,20	15	20,32 ± 5,96	53,75 ± 13,85	15	53,75 ± 13,85	53,75 ± 13,85	15	56,76 ± 6,79	15	56,76 ± 6,79	15
35	61,96 ± 8,43	15	65,13 ± 13,19	31,30 ± 8,91	15	31,30 ± 8,91	31,30 ± 8,91	15	42,87 ± 4,35	15	42,87 ± 4,35	15
40	65,40 ± 9,10	15	71,23 ± 12,23	24,90 ± 4,99	15	24,90 ± 4,99	24,90 ± 4,99	15	32,38 ± 3,99	15	32,38 ± 3,99	15
45	66,47 ± 9,27	15	78,92 ± 11,65	28,23 ± 5,41	15	28,23 ± 5,41	28,23 ± 5,41	15	29,26 ± 3,41	15	29,26 ± 3,41	15
50	64,00 ± 10,01	15	101,91 ± 17,62	30,01 ± 5,33	15	30,01 ± 5,33	30,01 ± 5,33	15	27,77 ± 3,44	15	27,77 ± 3,44	15
55	66,03 ± 10,01	15	103,66 ± 17,86	25,67 ± 4,43	15	25,67 ± 4,43	25,67 ± 4,43	15	26,57 ± 4,08	15	26,57 ± 4,08	15
60	66,73 ± 9,48	15	103,17 ± 17,84	29,11 ± 4,63	15	29,11 ± 4,63	29,11 ± 4,63	15	24,96 ± 4,00	15	24,96 ± 4,00	15
65	67,44 ± 9,52	15	104,97 ± 18,89	28,57 ± 4,14	15	28,57 ± 4,14	28,57 ± 4,14	15	29,81 ± 3,59	15	29,81 ± 3,59	15
70	68,67 ± 8,88	15	103,71 ± 18,66	24,90 ± 4,42	15	24,90 ± 4,42	24,90 ± 4,42	15	27,16 ± 3,44	15	27,16 ± 3,44	15
75	69,19 ± 8,93	15	103,70 ± 18,04	24,93 ± 4,39	15	24,93 ± 4,39	24,93 ± 4,39	15	26,94 ± 3,60	15	26,94 ± 3,60	15
80	73,74 ± 9,75	15	99,25 ± 17,75	25,58 ± 4,36	15	25,58 ± 4,36	25,58 ± 4,36	15	26,64 ± 3,61	15	26,64 ± 3,61	15
85	71,44 ± 9,81	15	101,85 ± 19,55	26,10 ± 3,99	15	26,10 ± 3,99	26,10 ± 3,99	15	28,69 ± 4,59	15	28,69 ± 4,59	15
90	69,56 ± 10,06	15	101,69 ± 19,80	26,00 ± 4,54	15	26,00 ± 4,54	26,00 ± 4,54	15	28,03 ± 4,68	15	28,03 ± 4,68	15

Tabela 2: Valores de Pressão Diastólica apresentados por cada grupo durante todo o experimento. Os valores são médias ± EPM, n = 15 e P < 0,05

IV.II. Medida do conteúdo protéico total e análise da expressão de NOTyr, NOCys, SOD e Catalase:

A expressão de proteínas totais também mostrou resultados significativos. Os animais que receberam *T. catigua* e Catuama® apresentaram um aumento na expressão protéica total, enquanto o grupo Tween 80 apresentou uma expressão protéica total de aproximadamente 400 µg/mg de tecido e o grupo Água Destilada em torno de 500 µg/mg, o grupo Catuama® apresentou uma expressão próxima de 600 µg/mg e o grupo *T. catigua* apresentou uma expressão próxima de 700 µg/mg (gráfico 4).

As mensurações de SOD, NOTyr e NOCys não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Em contrapartida, a expressão protéica de catalase apresentou aumento nos grupos que receberam os extratos de Catuama® e *T. catigua*. O grupo Tween 80 mostrou valores inferiores a 150 Unidades de Densidade Óptica (UDO) das bandas e o grupo Água Destilada mostrou valores em torno de 175 UDO. O grupo Catuama® apresentou um resultado superior a 250 UDO. E o grupo *T. catigua* apresentou valores próximos de 300 UDO (gráfico 5).

*P < 0,05 vs Água Destilada

#P < 0,05 vs Tween 80

Gráfico 4: Expressão de proteínas totais do tecido cardíaco. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. Água Destilada e Tween 80 também não apresentam diferença significativa entre si. Por outro lado, Catuama® e *T. catigua* tem diferença significativa quando comparadas com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias ± EPM, n = 7 e P < 0,05

Gráfico 5: Expressão de Catalase no tecido cardíaco. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. Água Destilada e Tween 80 também não apresentam diferença significativa entre si. Por outro lado, Catuama® e *T. catigua* tem diferença significativa quando comparadas com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias ± EPM, n = 3 e P < 0,05

IV.III. Peroxidação Lipídica e Produção de NO:

Outra observação importante foi a diminuição da peroxidação lipídica no miocárdio. Foi possível notar uma diminuição significativa na presença de TBARS, um dos produtos secundários do processo de peroxidação lipídica e um importante biomarcador para o estresse oxidativo, nos animais que receberam os extratos de Catuama® e de *T. catigua*. Os animais tratados com Água Destilada apresentaram níveis de TBARS próximos de 12 nmol/mg de proteína da amostra e o grupo Tween 80 obteve resultados próximos de 15 nmol/mg de proteína da amostra. Já os grupos que receberam os extratos mostraram valores bem inferiores, próximos de 8 nmol/mg de proteína da amostra (gráfico 6).

Além disso, também foi possível observar uma diminuição dos níveis de nitrato e nitrito presentes no músculo cardíaco dos animais que receberam os extratos. Os grupos Tween 80 e Água Destilada mostraram produção de NO₂/NO₃ de aproximadamente 22 µg/mg de proteína da amostra, ao passo que os grupos Catuama® e *T. catigua*, mostraram uma produção de aproximadamente 13 µg/mg de proteína (gráfico 7).

Gráfico 6: Medida indireta da peroxidação lipídica através da mensuração das TBARS. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. Água Destilada e Tween 80 também não apresentam diferença significativa. Por outro lado, Catuama® e *T. catigua* tem diferença significativa quando comparadas com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias $\pm$ EPM, n = 5 e P < 0,05

*P < 0,05 vs Água destilada

#P < 0,05 vs Tween 80

Gráfico 7: Medida indireta de NO através da mensuração de seus subprodutos, NO₂ e NO₃. Não há diferença significativa entre *T. catigua* e Catuama®. Água Destilada e Tween 80 também não apresentam diferença significativa entre si. Ao passo que Catuama® e *T. catigua* tem diferença significativa quando comparadas com Água Destilada e Tween 80. Os valores são médias ± EPM, n = 6 e P < 0,05

IV.VI. Resultados Eletrofisiológicos:

Nos experimentos com microeletródio não foi observada nenhuma alteração na APA, resultado que, a princípio, exclui a atividade em canais de sódio.

Contudo, no tecido endocárdico foi observado um aumento na velocidade de repolarização nos três momentos estudados. Ou seja, as DPA20%, DPA50% e DPA90% apresentaram redução significativa durante a perfusão de Tyrode com Catuama® a uma concentração de 200 µg/mL. Mas essa redução foi revertida durante o período de lavagem, com perfusão de Tyrode livre de extrato.

Efeito contrário foi observado no tecido epicárdico. Houve uma diminuição na velocidade de repolarização nos três momentos analisados. Logo, as DPA20%, DPA50% e DPA90% apresentaram um aumento significativo durante a perfusão de Tyrode com Catuama® na mesma concentração aplicada ao tecido endocárdico. Também foi possível observar uma diminuição gradativa da eficácia da lavagem. Ao contrário do que ocorreu com a duração dos potenciais de ação do tecido endocárdico, os potenciais de ação do tecido epicárdico não retornaram aos valores observados no período controle.

*P < 0,05 vs Controle
#P < 0,05 vs Lavagem

Gráfico 8: Resultados das medições da Duração do Potencial de Ação (DPA) do tecido endocárdico. Houve redução nas DPA20%, DPA50% e DPA90% com reversão dos resultados pela lavagem. Os valores são médias ± EPM, n = 2 e P < 0,05

Gráfico 9: Resultados das medições da Duração do Potencial de Ação (DPA) do tecido epicárdico. Houve aumento nas DPA20%, DPA50% e DPA90% com progressiva perda de eficiência da lavagem. Os valores são médias ± EPM, n = 2 e P < 0,05

Discussão

V. Discussão:

O processo de isquemia induz uma severa hipóxia ao tecido cardíaco e o acúmulo de radicais livres, que podem se ligar às macromoléculas, como lipídeos e proteínas, comprometendo sua estrutura e funcionamento. Isso afeta gravemente as funções cardíacas e promove a morte do cardiomiócito por necrose ou apoptose. Se não houver reperfusão, o cardiomiócito não sobrevive, porém, a própria reperfusão aliada à presença aumentada das EROs está associada a diversos processos deletérios ao tecido (Santos *et al.*, 2011; Goldhaber & Weiss, 1992).

Os radicais livres são, a rigor, moléculas que apresentam um elétron desemparelhado em sua camada de valência e esse elétron torna essas moléculas altamente instáveis e reativas. Nos sistemas biológicos, destacam-se os radicais livres derivados do oxigênio: as espécies reativas de oxigênio (Kevin *et al.*, 2005; Kloner *et al.*, 1989).

Os radicais livres exercem seus efeitos biológicos capturando elétrons de outras moléculas. Os efeitos deletérios dos radicais livres já são estudados há muitas décadas. Além disso, acredita-se que vários radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) sejam gerados durante a isquemia e reperfusão e estejam intimamente ligados às diversas sequelas causadas pelo processo de isquemia e reperfusão. Porém, recentemente surgiram descobertas a respeito da importante participação dos radicais livres no controle de diversas funções celulares fundamentais para a vida (Kevin *et al.*, 2005; Kloner *et al.*, 1989).

Contudo, se produzidos em excesso, essas moléculas causam danos às células e, justamente para evitar o acúmulo excessivo de EROs e manter o equilíbrio redox, os mamíferos apresentam um sistema antioxidante endógeno (Kevin *et al.*, 2005; Kloner *et al.*, 1989). Mas, eventualmente, a produção de EROs é superior a capacidade do sistema antioxidante de remover os radicais livres. Então, essas moléculas se acumulam e surgem os efeitos citotóxicos. Esse desequilíbrio entre a produção e a remoção de radicais livres é denominado estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2010; Kevin *et al.*, 2005).

A Catalase e a SOD são enzimas do sistema antioxidante endógeno e auxiliam a manter a homeostase redox. Para conter o dano causado pelas EROs, a SOD capta o O_2^- e converte em H_2O_2 . Em seguida, a catalase converte o H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio (figura 9). Assim, o equilíbrio redox é mantido nas células e evita-se o estresse oxidativo (Kevin *et al.*, 2005).

Figura 9: Representação esquemática da ação das enzimas do sistema antioxidante endógeno. A enzima Superóxido Dismutase capta o oxigênio reativo (O_2^-) e converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, a catalase converte o H_2O_2 em duas moléculas de água. Moreira (2011)

O tratamento com os extratos aumentou a expressão da Catalase, mas não alterou a expressão da SOD. Contudo, é possível que a SOD apresentasse um aumento na atividade enzimática, embora a concentração no tecido não se alterasse. Seria preciso realizar um ensaio específico para a mensuração da atividade protéica, como a zimografia, por exemplo.

Mas já podemos afirmar que os fitoterápicos são capazes de facilitar a homeostase redox através do aumento da expressão de Catalase. E, provavelmente, as outras enzimas do sistema antioxidante estão mais ativas e isso auxilia a reduzir o acúmulo de radicais livres no músculo cardíaco durante a isquemia e reperfusão, o que conduz a uma redução considerável nos demais danos oriundos do estresse oxidativo.

Um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, pois a ligação irreversível entre os radicais livres e os lipídeos é especialmente prejudicial para as células, uma vez que compromete a estrutura e o funcionamento da membrana plasmática e muitas outras organelas membranosas como retículos, mitocôndrias e, no caso das células musculares, o retículo sarcoplasmático (Kevin *et al.*, 2005; Goldhaber & Weiss, 1992).

Há evidências de que a peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo é especialmente danosa ao tecido cardíaco. Isso ocorre porque os radicais livres se ligam à membrana do retículo sarcoplasmático e deprimem consideravelmente a função cardíaca através da redução da recaptação de cálcio intracelular (Kloner *et al.*, 1989; Rowe *et al.*, 1983).

Essa contenção de danos também é bem clara na redução da peroxidação lipídica. Os extratos de Catuama® e de *T. catigua* foram eficientes na redução da peroxidação lipídica, pois os tecidos cardíacos dos animais que receberam esses extratos apresentaram menores concentrações de TBARS, o que comprova a redução da concentração de MDA, um subproduto de peroxidação

lipídica. Esse dado também corrobora a idéia de que os extratos de Catuama® e de *T. catigua* reduzem o estresse oxidativo, provavelmente através do aumento da expressão da catalase.

Embora tenha um papel importante como sinalizador em diversas vias metabólicas, o NO é um tipo de radical livre e, em excesso nos tecidos, oferece os mesmos riscos que outras moléculas altamente reativas. Embora muitos estudos tenham comprovado os efeitos cardioprotetores do NO em modelos de isquemia e reperfusão, em nosso estudo essa molécula apareceu diminuída. Então, existem duas possibilidades: ou o NO foi retirado do tecido cardíaco pelo sistema antioxidante junto com outras espécies reativas, ou o NO pode ter sido consumido em vias cardioprotetoras.

Durante a isquemia, a capacidade da eNOS de produzir NO fica bastante reduzida devido ao aporte inadequado de oxigênio e outros co-fatores. Acreditava-se que o nitrito era um subproduto inerte do NO. Mas descobriu-se que, sob certas condições de estresse, a célula é capaz de converter o nitrito em NO novamente. Assim, o nitrito ganha destaque como um importante doador de NO (Calvert & Lefer, 2009; Lundberg *et. al*, 2008; Sinha *et. al*, 2008; Dezfulian *et al.*, 2007; Lefer, 2006; Becker *et. al*, 2000).

O nitrito também é um dos subprodutos do NO medidos pela reação de Griess, que foi utilizada como forma indireta de quantificar o óxido nítrico presente nos tecidos cardíacos. Então, é possível supor que a condição de hipóxia

gerou uma redução da produção de NO através da L-Aginina e um aumento da conversão do nitrito em NO. E esse óxido nítrico foi utilizado nas diversas vias metabólicas que envolvem o NO e a cardioproteção em situações de isquemia e reperfusão, por isso essa molécula apareceu em concentrações reduzidas em nossos experimentos.

Como já foi mencionado anteriormente, o NO está envolvido com o sistema cardioprotetor de diversos meios. Além de ser um potente vasodilatador do miocárdio em situação de isquemia e de inibir de modo reversível a respiração mitocondrial, o NO também reduz a aderência dos neutrófilos ao endotélio vascular. Desse modo, reduz a agregação plaquetária, o que dificulta a obstrução dos capilares. O NO também inibe a atividade da caspase-3-like, e assim reduz a apoptose. Todos esses efeitos combinados ajudam a conter os danos causados ao tecido durante a reperfusão (Calvert & Lefer, 2009; Calvert & Lefer, 2006; Walter & Gambaryan, 2004; Thomas *et al.*, 2001; Li *e tal.*, 1999; Loke *et al.*, 1999; Palazzo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1991).

Os efeitos dos extratos de Catuama® e de *T. catigua* oferecem uma robusta contenção dos danos causados pela isquemia e reperfusão. Esse notável efeito torna-se mais evidente quando observamos a conservação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, da pressão diastólica e a redução do processo de necrose e apoptose dos cardiomiócitos, conservando o tecido via diminuição do acúmulo de radicais livres. Tais efeitos auxiliam o coração a manter suas funções de bomba, pois promovem a manutenção de um processo de sístole e

diástole eficientes, da integridade do tecido bem como a conservação das habilidades contráteis.

Os resultados obtidos pelo método de microeletródio vão ao encontro de outros efeitos observados em nosso laboratório, em especial no que se refere ao efeito na repolarização de cardiomiócito epicárdico, que sofre uma redução da velocidade de repolarização (Pontieri *et al.*, 2007).

Esses resultados somados a outros estudos descritos sugerem efeitos sobre os canais para cálcio. A Catuama[®] age relaxando a musculatura lisa de vasos do corpo cavernoso, aumentando assim o fluxo de sangue para o pênis (Antunes *et al.*, 2001). Calixto e Cabrini (1997), por exemplo, observaram a ação do extrato em artérias de diversos animais e puderam concluir que a Catuama[®] é eficiente em promover o relaxamento dos vasos.

Também são observados efeitos da Catuama[®] em modelos de depressão em ratos. Tanto nos testes *in vivo* quanto nos testes *in vitro* o fitoterápico mostrou um efeito comparável aos efeitos de antidepressivos clássicos, como a imipramina e a fluoxetina (Campos *et al.*, 2004). Observou-se que a Catuama[®] provoca a inibição da recaptação de noradrenalina, serotonina e dopamina e aumenta a liberação de serotonina e dopamina no cérebro (Campos *et al.*, 2004).

Todos esses eventos, tanto os apurados em nossos experimentos como os descritos por outros autores, estão intimamente ligados à atividade dos

canais de cálcio. Além disso, Antunes *et al* (2001) não observaram em seus experimentos que os efeitos vasodilatadores da Catuama[®] fossem afetados por bloqueadores de canais de sódio ou potássio.

Esses experimentos, somados aos achados de Pontieri *et al* (2007) sobre os efeitos da Catuama[®] e da *T. catigua* sobre o MAP e os nossos resultados de microeletrodio reforçam a idéia de que os extratos de Catuama[®] e de *T. catigua* apresentam efeitos sobre os canais de cálcio.

Conclusões

VI. Conclusões:

As análises dos resultados estatísticos apresentados nessa pesquisa mostram que os extratos de Catuama® e *T. catigua* foram capazes de oferecer uma proteção significativa ao músculo cardíaco isolado de ratos que receberam o tratamento descrito previamente e foram expostos ao protocolo de isquemia e reperfusão.

Os resultados também mostram que o Tween 80 é capaz de reduzir a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, aumentar a pressão diastólica e aumentar a área de necrose do coração. Então, os fitoterápicos não apenas promovem a cardioproteção contra isquemia e reperfusão como também reverterem os efeitos deletérios do Tween 80.

Os efeitos cardioprotetores dos extratos de Catuama® e *T. catigua* provavelmente se devem a capacidade de alterar a concentração de catalase no tecido cardíaco. Esse aumento na concentração da catalase melhora a eficiência do sistema antioxidante e reduz os danos causados pelo estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica.

Além disso, os efeitos vasodilatadores e antidepressivos somados aos achados de Pontieri *et al.* (2007), Antunes *et al.* (2001) e os resultados

eletrofisiológicos mostrados no presente trabalho permitem concluir que os extratos tem uma grande possibilidade de apresentar efeitos sobre os canais de cálcio. Porém, seria necessário realizar estudos mais aprofundados para poder dizer quais canais de cálcio seriam afetados pelos extratos.

Os resultados também indicam que o princípio ativo se encontra na *T. catiguá*, pois foi o único componente capaz de reproduzir os efeitos da Catuama®. Assim, todos os dados apresentados mostram o enorme potencial terapêutico ainda inexplorado da *T. catigua*. Com mais pesquisas um produto tão popular e acessível pode se tornar um importante aliado no combate a doenças isquêmicas.

Referências

VII. Referências:

1. Antunes, E., Gordo, W. M., de Oliveira, J. F., Teixeira, C. E., Hyslop S., De Nucci, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine catuama[®] and its constituents. *Phytotherapy Research*, 2001; 15: 416-421.
2. Barbosa, N. R., Fischmann, L., Talib, L. L., Gattaz, W. F. Inhibition of platelet phospholipase A₂ activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. *Phytother Res*, 2004; 18 (11): 942-944.
3. Becker, B. F., Heindl, B., Kupatt, C., Zahler, S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, 2000; 89 (3): 160-167.
4. Bell, R. M., Mocanu, M. M., Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 50 (6): 940-950.
5. Boldi, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004; 8: 281-286.

6. Brugada, R.; Hong, K.; Cordeiro, J. M.; Dumaine, R. Short QT syndrome, 2005; 173(11):1349-1354.
7. Cabrini, D.A., Calixto, J.B. Herbal medicine Catuama[®] induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action of the isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytotherapy Research*, 1997; 11: 32-38.
8. Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 100: 131-134.
9. Calvert, J. W., Lefer, D. J. Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc Res*, 2009; 83 (2): 195-203.
10. Calvert, J. W., Lefer, D. J. Statin therapy and myocardial no-reflow. *Br J Pharmacol*, 2006; 149: 229–231.
11. Campos, M. M., Fernandes, E. S., Ferreira, J., Santos, A. R. R., Calixto J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology*, 2005; 182: 45-53.
12. Campos, M. M., Fernandes, E. S., Ferreira, J., Santos, A. R. R., Calixto J. B. Pharmacological and neurochemical evidence for

- antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2004; 78: 757-764.
13. Chen, C. H., Sun, L., Mochly-Rosen, D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res*, 2010; 88 (1): 51-57.
14. Clardy, J., Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, 2004; 432: 729–837.
15. Dezfulian, C., Raat, N., Shiva, S., Gladwin, M. T. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res*, 2007; 75:327–338.
16. Drewes, S.E., George, J., Khan, F. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. *Phytochemistry*, 2003; 62: 1019-1025.
17. Dusse, L. M. S. A., Silva, R. M. M., Vieira, L. M., Carvalho, M. G. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis. *Clinica Chimica Acta*, 2005; 362: 195–197.
18. Gewaltig, M. T., Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, 2002; 55 (2): 250-60.

19. Goldhaber, J. I., Weiss, J. N. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities *Hypertension*, 1992; 20: 118-127.
20. Goldhaber, J. I., Ji, S., Lamp, S. T., Weiss, J. N. Effect of exogenous free radicals in electromechanical function and metabolism in isolated rabbit and guinea pig ventricle. *J Clin Invest*, 1989; 83: 1800-1809.
21. Ignarro, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*, 1999; 19: 51-71.
22. Johnson, G. III, Tsao, P. S., Lefer, A. M. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med*, 1991; 19: 244-252.
23. Kevin, L. G., Novalija, E., Stowe, D. F. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg*, 2005; 101 (5): 1275-87.
24. Kim, Y. M., Talanian, R. V., Billiar, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 1997; 272: 31138-31148.

25. Kloner, R. A., Preyklenk, K., Whittaker, P. Deleterious effects of oxygen radical in ischemia/reperfusion: Resolved and unresolved issues. *Circulation*, 1989; 80: 1115-1127.
26. Koehn, F. E., Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Review Drug Discovery*, 2005; 4: 206–220.
27. Lefer, D. J. Nitrite therapy for protection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006; 290: F777–F778.
28. Li, J., Bombeck, C. A., Yang, S., Kim, Y. M., Billiar, T. R. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J Biol Chem*, 1999; 274: 17325–17333.
29. Loke, K. E., Laycock, S. K., Mital, S., Wolin, M. S., Bernstein, R., Oz, M., Addonizio, L., Kaley, G., Hintze, T. H. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart. *Circulation*, 1999; 100: 1291–1297.
30. Loscalzo, J., Welch, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, 1995; 38: 87–104.

31. Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Gladwin, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2008; 7: 156–167.
32. Ma, X. L., Weyrich, A. S., Lefer, D. J., Lefer, A. M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*, 1993; 72: 403–412.
33. Michel, T., Feron, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 1997; 100: 2146–2152.
34. Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 2003; 66: 1022–1037.
35. Oliveira, C. H., Moraes, M. E. A., Moraes, M. O., Bezerra, F. A. F., Abib, E., De Nucci, G. Clinical Toxicology Study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichila catigua*, *Ptychopetalum olcaloides* and *Zinziber officinalis* (Catuama®) in healthy volunteers. *Phytotherapy Research*, 2005; 19: 54-57.
36. Organização Mundial de Saúde (OMS). World Health Statistics 2011. WHO Press. Genebra: OMS; 2011.

37. Organização Mundial de Saúde (OMS). Declaração de Alma-Ata. Alma-Ata: OMS; 1978.
38. Palazzo, A. J., Jones, S. P., Girod, W. G., Anderson, D. C., Granger, D. N., Lefer, D. J. Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol*, 1998; 275: H2300–H2307.
39. Picard, S.; Goineau, S.; Rouet, R. The Action Potential of the Purkinje Fiber: An In Vitro Model for Evaluation of the Proarrhythmic Potential of Cardiac and Noncardiac Drugs. In: Wiley, J. & Sons editor. *Current Protocols in Pharmacology*. New Jersey: Willey InterScience; 1998. p. 11.3.1-11.3.16.
40. Pontieri, V., Scalabrini Neto, A., Camargo, A. F. F., Koike, M. K., Velasco, I. T. The Herbal drug Catuama[®] reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *Journal of Electrocardiology*, 2007; 40: 5341-5348.
41. Quintão, N. L. M., Ferreira, J., Beirith, A., Campos, M. M., Calixto, J. B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama[®] in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine*, 2008; 15: 245-252.
42. Rowe, G. T., Manson, N. H., Caplan, M., Hess, M. L. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte

depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 1983; 3: 584-591.

43. Santos, C. X. C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C., Shah, A. M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011; 50: 777–793.
44. Sinha, S. S., Shiva, S., Gladwin, M. T. Myocardial protection by nitrite: evidence that this reperfusion therapeutic will not be lost in translation. *Trends Cardiovasc Med*, 2008; 18: 163–172.
45. Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff - still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007; 55 (2): 113-126.
46. Snyder, S. H., Bredt, D. S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*, 1992; 266 (5): 68-71, 74-77.
47. Sumandea, M. P., Steinberg, S. F. Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J Biol Chem*, 2011; 286 (12): 9921-9927.
48. Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., Lancaster, J. R. Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 355–360.

49. Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007; 851 (1-2): 51-70.
50. Walter, U., Gambaryan, S. Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood*, 2004; 104: 2609.
51. Zweier, J. L., Flaherty, J. T., Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 1404-1407.