


UNIVERSIDADE SANTO AMARO
CURSO DE MEDICINA

Declaração de entrega do Trabalho de Conclusão de Curso

Declaro que o trabalho intitulado: **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS TRATADOS COM O ALCALÓIDE IMIDAZÓLICOEPIISOPILOTURINA E SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO CARDÍACAS**

realizado pelo(s) aluno(s) Rodrigo de Barros Freitas
está apto para entrega, apresentação e avaliação das bancas nomeadas.



Rildo Yamaguti Lima

Prof. Ms. Rildo Yamaguti Lima
Assinatura do Orientador do Trabalho

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
CURSO DE MEDICINA

Rodrigo de Barros Freitas

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES
BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA DE RATOS
NORMOTENSOS TRATADOS COM O ALCALÓIDE IMIDAZÓLICO
EPIISOPILOTURINA E SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CARDÍACAS**

São Paulo
2023

Rodrigo de Barros Freitas

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES
BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA DE RATOS
NORMOTENSOS TRATADOS COM O ALCALÓIDE IMIDAZÓLICO
EPIISOPILOTURINA E SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CARDÍACAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina da Universidade Santo
Amaro – UNISA, como requisito parcial para
obtenção do título Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Ms. Rildo Yamaguti Lima

Co-orientador: Francisco Sandro Menezes
Rodrigues

São Paulo

2023

F935a Freitas, Rodrigo de Barros.

Avaliação dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão cardíaca de ratos normotensos tratados com o alcalóide imidazólico episopiloturina e submetidos à isquemia e reperfusão cardíacas / Rodrigo de Barros Freitas. — São Paulo, 2023.

23 p.: il., color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) — Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientador: Prof.º Me. Rildo Yamaguti Lima.

Coorientador: Prof.º Me. Dr.º Francisco Sandro Menezes Rodrigues.

1. Episopiloturina. 2. Arritmias cardíacas. 3. Lesões cardíacas. I. Lima, Rildo Yamaguti, orient. II, Rodrigues, Francisco Sandro Menezes, coorient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

Rodrigo de Barros Freitas

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES
BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA DE RATOS
NORMOTENSOS TRATADOS COM O ALCALÓIDE
IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA E SUBMETIDOS À
ISQUEMIA E REPERFUSÃO CARDÍACAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da
Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título
Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Ms. Rildo Yamaguti Lima

São Paulo, ____ de _____ de 2023

Banca Examinadora

Prof. MS. Rildo Yamaguti
Lima Orientador

Prof. Dr. Claudia C. Lopes
Avaliador

Prof. Dr. Jonas Moraes Filho
Avaliador

Conceito Final

Rodrigo de Barros Freitas, Rildo Yamaguti Lima. *Avaliação dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão cardíaca de ratos normotensos tratados com o alcalóide imidazólico epiisopiloturina e submetidos à isquemia e reperfusão cardíacas*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade Santo Amaro, 2023.

Introdução: Dados da literatura demonstram que o cloridrato de epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico encontrado nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* promove atividade protetora de lesão gastrointestinal induzido por naproxeno em ratos Wistar. O pré-tratamento com EPI reduziu os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e aumentou o fluxo sanguíneo em 15% quando comparado ao grupo normotenso. Estes resultados sugerem que EPI promove efeitos anti-inflamatório, antioxidante e vasodilatador no sistema gastrointestinal, os quais podem ser explorados no modelo de isquemia e reperfusão cardíaca, uma vez que todos estes processos patológicos estão presentes. **Objetivo:** Avaliar os possíveis efeitos cardioprotetores da EPI em ratos normotensos submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca. **Metodologia:** Foi feito um tratamento prévio com dose de 15 mg/kg do alcalóide imidazólico epiisopiloturina e dosados marcadores de lesão cardíaca após isquemia e cirurgia de reperfusão cardíaca. **Resultados:** A administração do alcalóide imidazólico epiisopiloturina não reduziu os níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão cardíaca desta maneira para as condições avaliadas e para as enzimas em questão não foi possível aferir o favorecimento o prognóstico pós-evento cardiovascular.

Palavras-chave: *Epiisopiloturina, Arritmias cardíacas, Lesões cardíacas, Isquemia cardíaca, Reperfusão cardíaca.*

ABSTRACT

Introduction: Data from the literature demonstrate that epiisopiloturine hydrochloride (EPI), an imidazole alkaloid found in the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, promotes protective activity against gastrointestinal injury induced by naproxen in Wistar rats. Pretreatment with EPI reduced tumor necrosis factor (TNF- α) levels and increased blood flow by 15% when compared to the normotensive group. These results suggest that EPI promotes anti-inflammatory, antioxidant and vasodilatory effects in the gastrointestinal system, which can be explored in the cardiac ischemia and reperfusion model, since all these pathological processes are present. **Objective:** To evaluate the possible cardioprotective effects of EPI in normotensive rats subjected to cardiac ischemia and reperfusion. **Methodology:** Previous treatment was carried out with a dose of 15 mg/kg of the imidazole alkaloid epiisopiloturin and markers of cardiac injury after ischemia and cardiac reperfusion surgery were measured. **Results:** The administration of the imidazole alkaloid epiisopiloturine did not reduce the serum levels of biochemical markers of cardiac injury in this way for the conditions evaluated and for the enzymes in question it was not possible to assess whether the prognosis favored post-cardiovascular event.

Keywords: *Epiisopiloturine, Cardiac arrhythmias, Cardiac lesions, Cardiac ischemia, Cardiac reperfusion.*

SUMÁRIO

Resumo	9
1. Introdução	11
1.1 Doenças isquêmicas	11
1.2 Alcalóide imidazólico episopiloturina.....	13
2. Objetivos	14
2.1. Objetivos gerais	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Materias e métodos	14
3.1. Cirurgia para indução de isquemia e reperfusão	14
3.2. Avaliação de marcadores bioquímicos de lesão cardíaca	16
3.3. Análise estatística	16
4. Resultados	17
5. Discussão	19
6. Conclusão	20
8. Referências.....	21

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS TRATADOS COM O ALCALÓIDE IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA E SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO CARDÍACAS

Freitas, Rodrigo de Barros¹
Rodrigues, Francisco
Sandro Menezes²
Lima, Rildo Yamaguti³

RESUMO

Introdução: Dados da literatura demonstram que o cloridrato de epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico encontrado nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* promove atividade protetora de lesão gastrointestinal induzido por naproxeno em ratos Wistar. O pré-tratamento com EPI reduziu os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e aumentou o fluxo sanguíneo em 15% quando comparado ao grupo normotenso. Estes resultados sugerem que EPI promove efeitos anti-inflamatório, antioxidante e vasodilatador no sistema gastrointestinal, os quais podem ser explorados no modelo de isquemia e reperfusão cardíaca, uma vez que todos estes processos patológicos estão presentes. **Objetivo:** Avaliar os possíveis efeitos cardioprotetores da EPI em ratos normotensos submetidos à isquemia e reperfusão cardíaca. **Metodologia:** Foi feito um tratamento prévio com dose de 15 mg/kg do alcalóide imidazólico epiisopiloturina e dosados marcadores de lesão cardíaca após isquemia e cirurgia de reperfusão cardíaca. **Resultados:** A administração do alcalóide imidazólico epiisopiloturina não reduziu os níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão cardíaca desta maneira para as condições avaliadas e para as enzimas em questão não foi possível aferir o favorecimento o prognóstico pós-evento cardiovascular.

Palavras-chave: *Epiisopiloturina, Arritmias cardíacas, Lesões cardíacas, Isquemia cardíaca, Reperfusão cardíaca.*

¹ Graduando em Medicina da Universidade Santo Amaro. Rodrigobarros3x@estudante.unisa.br

² Co-orientador: DR, Unifesp-SP. Sandro.rodrigues@unifesp.br

³ Professor Orientador. MS, Universidade Santo Amaro -SP. ryamaguti@prof.unisa.br

ABSTRACT

Introduction: Data from the literature demonstrate that epiisopiloturine hydrochloride (EPI), an imidazole alkaloid found in the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, promotes protective activity against gastrointestinal injury induced by naproxen in Wistar rats. Pretreatment with EPI reduced tumor necrosis factor (TNF- α) levels and increased blood flow by 15% when compared to the normotensive group. These results suggest that EPI promotes anti-inflammatory, antioxidant and vasodilatory effects in the gastrointestinal system, which can be explored in the cardiac ischemia and reperfusion model, since all these pathological processes are present. **Objective:** To evaluate the possible cardioprotective effects of EPI in normotensive rats subjected to cardiac ischemia and reperfusion. **Methodology:** Previous treatment was carried out with a dose of 15 mg/kg of the imidazole alkaloid epiisopiloturin and markers of cardiac injury after ischemia and cardiac reperfusion surgery were measured. **Results:** The administration of the imidazole alkaloid epiisopiloturine did not reduce the serum levels of biochemical markers of cardiac injury in this way for the conditions evaluated and for the enzymes in question it was not possible to assess whether the prognosis favored post-cardiovascular event.

Keywords: *Epiisopiloturine, Cardiac arrhythmias, Cardiac lesions, Cardiac ischemia, Cardiac reperfusion.*

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morrem por doenças cardiovasculares todos os anos, representando 31% de todas as mortes no planeta. Estas doenças apresentam maior incidência mundial, seguidas de doenças cerebrovasculares. No Brasil, mortalidade anual chega a 300 mil mortes ano, de acordo com o Ministério da Saúde, o que corresponde a uma morte a cada dois minutos, o que corresponde a um terço das mortes no país (BRANT *et al.*, 2017; “WHO” acessado em 2023).

As doenças cardiovasculares estão relacionadas a uma questão de desenvolvimento social: 75% dos óbitos por doenças cardiovasculares ocorrem em países de baixa e média renda. (“WHO”, 2023).

Doenças cardiovasculares e suas consequências, como o infarto agudo do miocárdio (IAM), são causadas, principalmente, devido aos maus hábitos de vida, como dieta inadequada, sedentarismo, tabaco, uso nocivo do álcool, estresse, além da predisposição genética (WHAYNE; SAHA, 2019) e são, na maioria das vezes, tardiamente diagnosticadas por se tratar de doenças silenciosas. Entretanto, mesmo com sua relevância claramente comprovada por seus índices de morbidade e mortalidade, o estudo e o aprofundamento em prevenção e tratamento não têm causado mudanças drásticas nos dados estatísticos. Assim, ganham cada vez mais importância as discussões sobre formas alternativas de tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares visando à diminuição de sua incidência.

1.1 DOENÇAS ISQUÊMICAS

A isquemia cardíaca ocorre quando o músculo cardíaco não recebe quantidade suficiente de sangue oxigenado devido a um estreitamento ou obstrução das artérias coronárias (WHAYNE; SAHA, 2019). O mecanismo de reperfusão coronária refere-se ao processo de restauração do fluxo sanguíneo

adequado nas artérias coronárias após um período de isquemia que pode ocorrer durante um ataque cardíaco ou em outras condições cardíacas. A reperfusão é essencial para preservar o tecido cardíaco e reduzir os danos após um evento isquêmico. (CARVALHO, A. C. C.; SOUSA, 2001; REZAPOUR *et al.*, 2018).

A Isquemia cardíaca desencadeia uma série de eventos danosos a função celular, que se iniciam de maneira discreta e evoluem progressivamente com o aumento do tempo de isquemia. Devido à falta de oxigênio causada pela obstrução das artérias coronárias nesta fisiopatologia, ocorre a depressão das reservas de ATP como consequência da fosforilação oxidativa, nesta situação ocorre à entrada de Na⁺ na célula que retém H₂O, saindo K⁺. Devido à falta de O₂, a via anaeróbica se torna responsável pela produção de ATP, diminuído a reserva de glicogênio e aumentando ácido láctico, assim diminuindo o pH intracelular, com isso, a cromatina se condensa formando agregados, levando a parada da síntese proteica nos ribossomos do retículo sarcoplasmático (SÁ MALBOUISSON *et al.*, 2005).

Além dos danos intracelulares, ocorre à produção de radicais livres em nível mitocondrial e estes podem vir a atingir as proteínas do DNA. Este processo também contribui na degradação de proteínas e fosfolípidos, principais constituintes das membranas celulares (CARICATI-NETO; ERRANTE; MENEZES-RODRIGUES, 2019; SÁ MALBOUISSON *et al.*, 2005).

Em algumas condições o comprometimento da oferta de oxigênio é secundário à diminuição do fluxo sanguíneo, sendo esse o caso da maioria dos infartos agudos do miocárdio e dos episódios de angina instável. Esforço físico, estresse emocional, taquicardia ou hipertensão arterial associados à obstrução coronariana, alteram não somente a demanda como a oferta de oxigênio, desencadeando isquemia parcial miocárdica (BRANT *et al.*, 2017; CARICATI-NETO; ERRANTE; MENEZES-RODRIGUES, 2019; MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2021; SCORZA, F. A. *et al.*, 2020).

Clinicamente, não é possível distinguir as lesões causadas pelo processo de isquemia das lesões causadas pelo processo de reperfusão subsequente, porém, os principais eventos que levam a disfunções celular e tecidual relacionam-se com a reperfusão (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2021; SÁ MALBOUISSON *et al.*, 2005).

1.2 ALCALÓIDE IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA

Conhecida popularmente como jaborandi-do-Maranhão, a espécie *Pilocarpus microphyllus* é uma planta arbustiva e ramificada que contém em suas folhas elevadas concentrações do alcaloide imidazólico pilocarpina, substância que exerce várias ações farmacológicas relevantes como, por exemplo, reduzir a pressão intraocular no tratamento do glaucoma e estimular a salivação para o tratamento da xerostomia (CALDEIRA *et al.*, 2017; SANDHU *et al.*, 2006).

Alcaloides são substâncias químicas orgânicas que contêm em sua fórmula átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio e são derivados, de plantas, mas também são encontradas em fungos, bactérias e animais (VIOLANTE *et al.*, 2009). Os alcaloides apresentam caráter alcalino devido à presença do grupamento amina (SETYORINI; ANTARLINA, 2022) e podem ser encontrados na forma livre, assim como na forma de sais, sendo capazes de promover efeitos anestésico, analgésico, psicoestimulante, neurodepressor, dentre outros (MARSIGLIA *et al.*, 2011).

Diferentemente da pilocarpina, a epiisopiloturina possui na sua estrutura um grupo hidrobenzílico ao invés de um etílico, embora apresente semelhança a ela por apresentar em sua estrutura um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico por meio de uma ligação C-C. Estudos recentes demonstraram que a epiisopiloturina exerce um potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em animais (RODRIGUES DE CARVALHO *et al.*, 2018). No entanto, ainda não existem na literatura estudos sobre as possíveis ações

farmacológicas da epiisopiloturina em modelos de isquemia e reperfusão cardíaca.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito protetivo do alcaloide imidazólico epiisopiloturina em modelo de lesão cardíaca em ratos normotensos submetidos à isquemia e à reperfusão cardíaca (I/R).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura sobre o tratamento de isquemia e protocolo de reperfusão cardíaca.

- Avaliar se há modificação das concentrações séricas dos marcadores bioquímicos de lesão cardíaca (creatina quinase total (CK), creatina quinase fração MB (CKMB) e desidrogenase láctica (LDH) em animais normotensos submetidos ao protocolo de I/R cardíaca e tratados com epiisopiloturina por via endovenosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cirurgia para Indução de Isquemia e Reperfusão

Para a realização do protocolo de I/R cardíaca, utilizamos o protocolo descrito por Tavares et al. e Menezes-Rodrigues et al. Resumidamente, os ratos Wistar foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg/kg), cetamina (100 mg/kg) e tramadol (2mg/kg) por via intraperitoneal e, posteriormente, tricotomizados no local da cirurgia e fixados em decúbito dorsal em uma plataforma cirúrgica aquecida por manta térmica, e a temperatura monitorada através de termômetro retal com manutenção da temperatura a 37,5°C. Foi

realizada a intubação oro-traqueal, os animais foram submetidos à ventilação mecânica com ar ambiente com volume corrente 2,5 mL/kg de peso corporal e frequência respiratória de 70 ciclos por minuto, utilizando bomba respiratória (Insight® – Modelo: EFF 312, Ribeirão Preto, Brasil), com posterior colocação dos eletrodos do sistema eletrocardiográfico. Logo após a intubação, os animais receberam fentanil a 4 mcg/kg/h durante 3 horas.

O modelo de I/R cardíaca (modelo de infarto agudo do miocárdio) usado em nosso estudo está baseado nos princípios técnicos definidos pelo nosso grupo. Após a tricotomia, foi realizada a toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. Após rompimento o pericárdio, o coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax, e sob a artéria coronária descendente esquerda foi passado um fio de sutura 5-0 (Mononylon Ethilon – Vascular; Atramat®, Coyoacán, México) entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, e o tórax fechado (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2020; TAVARES, Jose Gustavo Padrão *et al.*, 2017).

Para realizar o garroteamento da artéria coronária, as duas pontas do fio de nylon foram passadas por dentro de um tubo cilíndrico de polipropileno, o qual foi utilizado para realizar a isquemia. Após 15 minutos de estabilização o tubo foi pressionado sobre a coronária, enquanto que o fio de nylon foi tracionado para cima simultaneamente e o conjunto, fio de Nylon e tubo plástico, foi fixado com auxílio de uma pinça tipo Kelly (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2020; TAVARES, Jose Gustavo Padrão *et al.*, 2017).

O processo de reperfusão foi realizado com a retirada do túbulo cilíndrico de polipropileno e posterior retirada do fio de nylon, seguido do fechamento da caixa torácica através da sutura em bolsa (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2020; TAVARES, Jose Gustavo Padrão *et al.*, 2017)..

No grupo falso operado (SHAM), os procedimentos sucederam como anteriormente descritos, porém o fio de nylon foi passado sob a coronária esquerda não sendo realizada a ligadura da mesma, não induzindo isquemia e

reperfusão. Após a realização da cirurgia a monitorização do ECG foi mantida durante todo percurso experimental.

3.2. AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA

A determinação quantitativa da atividade enzimática da creatina quinase total (CK) e creatina quinase fração MB (CKMB) no soro, foi realizada através de teste cinético-UV, medido em 340 nm (Kit VIDA Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil). A determinação cinética da desidrogenase láctica (LDH) no soro, foi realizada através de método cinético UV, medido em 340 nm (kit Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., e distribuído por Intertek Internacional Imp. Exp. Ltda. – Belo Horizonte, Brasil), (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2018).

As amostras de sangue foram coletadas e armazenadas de acordo com a orientação do Comitê de Ética em Pesquisa de Experimentação Animal da UNIFESP, o projeto pesquisa aprovado sob o nº 9728120921.

Os grupos que terão seu sangue analisado são:

Animais:

Grupo 1 Falso operado (SHAM) - Os animais foram submetidos a cirurgia porém que não realizaram protocolo de I/R cardíaca (n=7 animais);

Grupo 2 (I/R) – Os animais foram tratados com soro fisiológico, por via intravenosa, 7 minutos antes da realização do protocolo de I/R cardíaca (n=7 animais);

Grupo 3 (EPI15mg/Kg) – Os animais foram tratados com a dose de 15 mg/kg alcalóide imidazólico epiisopiloturina, por via endovenosa, 5 minutos antes da realização do protocolo de I/R cardíaca (n=7 animais);

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre duas médias, foi aplicado o teste “t” de Student. Para três ou mais médias, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida pelo teste de Tukey. As análises estatísticas

foram realizadas no programa computacional GraphPad Prism® for Windows (versão 5.01). O nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$) (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2018).

4. RESULTADOS

A elevação das concentrações plasmáticas de CK e CKMB tem sido utilizada como um fator indicador de lesão cardíaca, observada em pacientes com IAM, por isso decidimos avaliar os níveis séricos nos animais submetidos ao nosso modelo experimental. A concentração plasmática de CK no grupo SHAM (2.757 ± 532 U/L), no grupo I/R (4.815 ± 431 U/L) e no grupo EPI 15 mg/kg (5063 ± 375 U/L) e concentração plasmática de CKMB no grupo SHAM (807 ± 72 U/L), no grupo I/R (4.815 U/L \pm 431) e no grupo EPI 15 mg/kg (1.734 U/L \pm 197) estão descritos na figura 1.

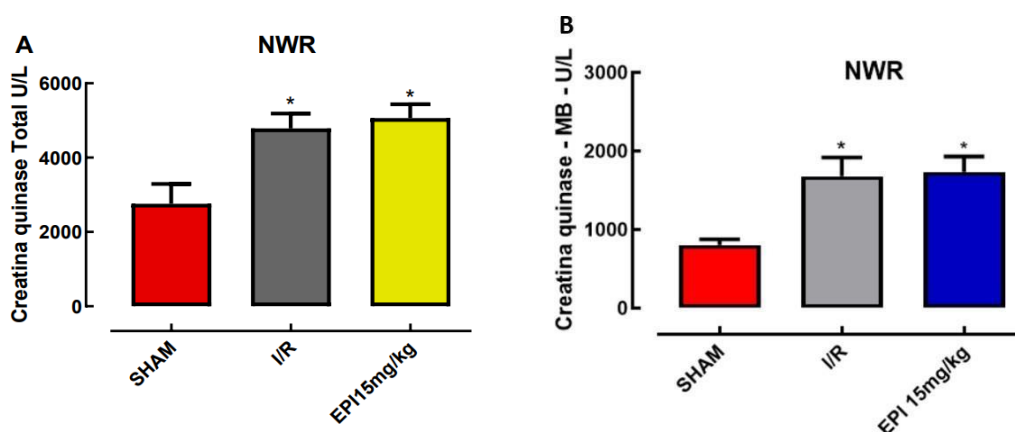


Figura 1: Concentração sérica de Creatina quinase Total (CK) **(A)** e Creatina quinase-MB (CKMB) **(B)** nos grupos SHAM, I/R e EPI 15mg/kg. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foi aplicada análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey $*p < 0,05$). SHAM= grupo falso-operado CK (2.757 U/L \pm 532, Figure 1A) e CK-MB (807 U/L \pm 72, Figura 1B) ; I/R= grupo isquemia e reperfusão cardíaca CK (4.815 U/L \pm 431, Figure 1A) e CK-MB (1.683 U/L \pm 260, Figura 1B); EPI 15mg/kg= grupo tratado com epiisopiloturina e depois submetido à isquemia e reperfusão cardíaca CK (5.063 U/L \pm 375, Figure 1A) e CK-MB (1.734 U/L \pm 197, Figure 1B). *Estatisticamente diferente do grupo SHAM.

Estes resultados demonstram que o protocolo de I/R utilizado neste estudo ocasionou um aumento estatisticamente significativo quando comparado à concentração plasmática de CK e CKMB do grupo SHAM. O mesmo ocorreu com o grupo I/R quando comparado ao grupo EPI 15 mg/kg. Assim, podemos observar que o tratamento dos ratos com o EPI 15 mg/kg não foi capaz de reduzir o aumento do valor sérico de CK e CKMB observado no grupo I/R (Figura 1).

O aumento dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) não se refere apenas ao IAM, mas é um dos marcadores que definem esta possibilidade, pois a LDH aumentada em 92-95% dos pacientes com IAM agudo (FREITAS, DE *et al.*, 2014). Nos animais, no grupo SHAM a concentração plasmática de LDH foi de $(1600 \pm 97 \text{ U/L})$, no grupo I/R a concentração plasmática de LDH foi de $(1930 \pm 176 \text{ U/L})$ e no grupo EPI 15 mg/kg a concentração plasmática de LDH foi de $(1435 \pm 146 \text{ U/L})$ (Figura 2).

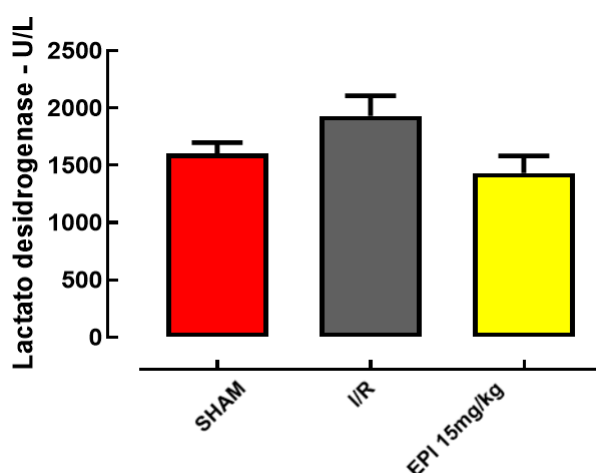


Figura 2: Concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH) nos grupos SHAM, I/R e EPI 15mg/kg. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foi aplicada análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$). SHAM= grupo falso-operado; I/R= grupo tratado com solução salina e submetido à isquemia e reperfusão cardíaca; EPI 15mg/kg = grupo tratado com epiisopiloturina e depois submetido à isquemia e reperfusão cardíaca.

Estes resultados demonstram que o protocolo de I/R utilizado neste estudo não foi capaz de aumentar a concentração plasmática de LDH dos animais submetidos ao protocolo de CIR quando comparado ao grupo SHAM (Figura 2).

5. DISCUSSÃO

O biomarcadores de lesão miocárdica são estudado desde a década de 1970, entre eles as enzimas LDH e CK e CKMB (NORRIS *et al.*, 1979). Sabe-se que a maior elevação dos níveis de CK-MB está associada a maior mortalidade, com impacto negativo na função ventricular (RIBEIRO, H. B. *et al.*, 2015).

A isquemia cardíaca é uma condição grave que pode se manifestar após uma disfunção do revestimento interno das coronárias. Quando o fluxo sanguíneo em direção a um musculo cardíaco é restringido, ele sofre uma privação de oxigênio. Em estados de hipóxia, ocorre uma interrupção na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias. Durante a glicólise anaeróbica, a lactato desidrogenase (LDH) converte o piruvato em lactato por meio de uma reação reversível. Esse processo resulta em uma reduzida produção de ATP, e o lactato diminui o pH do tecido cardíaco, desencadeando uma acidose metabólica. Esse desequilíbrio pode afetar a função das bombas de sódio-potássio (Na^+/K^+ -ATPase) e das bombas de cálcio (Ca^{2+} -ATPase). Como resultado, os íons de sódio permanecem retidos no interior das células, enquanto os íons de potássio são removidos. O retículo endoplasmático possui bombas de cálcio (Ca^{2+} -ATPase) em sua superfície, que evitam o acúmulo excessivo de cálcio no citoplasma das células. Quando essas bombas falham, ocorre um acúmulo anormal de cálcio nas células. Isso resulta em um influxo de água nas células ao longo de um gradiente osmótico, levando ao inchaço do tecido e aumentando o risco de necrose (MENEZES-RODRIGUES *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018).

Neste estudo, os resultados demonstram o protocolo de I/R ocasionou um aumento estatisticamente significante quando comparado à concentração plasmática de CK e CKMB do grupo SHAM. O mesmo ocorreu com o EPI 15mg/Kg quando comparado ao grupo SHAM. Podemos observar que o tratamento dos ratos com o EPI 15 mg/kg não foi capaz de reduzir o aumento do

valor sérico de CK e CKMB observado no grupo CIR (Figura 1). O mesmo protocolo de I/R utilizado não foi capaz de aumentar a concentração plasmática da outra enzima analisada, a LDH, dos animais submetidos ao protocolo de I/R quando comparado ao grupo SHAM (Figura 2), o que demonstra que para este modelo de estudo nas condições avaliadas essa enzima de não se mostrou um bom marcador. Entretanto nosso grupo de pesquisa já demonstrou (dados em fase de publicação) que a epiisopiloturina atuou como antioxidante, antiarrítmico e também diminuiu letalidade dos animais tratados, o que pode ser explicado pela ação anti-inflamatória desta molécula, sabiamente capaz de reduzir significativamente a formação de edema, migração de leucócitos, atividade de mieloperoxidase (MPO) e níveis de TNF- α e IL-1 em modelo de lesão gastrointestinal (SILVA, V. G. *et al.*, 2013).

Mais estudos precisam ser feitos a fim de aprofundar o conhecimento da epiisopiloturina no sistema cardiovascular.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que as enzimas creatina quinase total, creatina fração MB e desidrogenase láctica não se mostraram efetivas para demonstração dos efeitos cardioprotetoras da epiisopiloturina. Novas pesquisas são necessárias para verificar a ação deste alcaloide imidazólico no sistema cardiovascular como já vem sendo realizado em pesquisas do nosso grupo.

7. REFERÊNCIAS

BRANT, L. C. C. *et al.* Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: Estimativas do Estudo Carga Global de Doença. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2017. v. 20, n. 25000192049, p. 116–128.

CALDEIRA, C. F. *et al.* Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 2017. v. 15, n. 3, p. 161–171. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecon.2017.08.002>>.

CARICATI-NETO, A.; ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S. Recent advances in pharmacological and non-pharmacological strategies of cardioprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. v. 20, n. 16, p. 1–24.

CARVALHO, A. C. C.; SOUSA, J. M. A. Cardiopatia isquêmica / Isquemic cardiopathy. **Rev. bras. hipertensão** 8, 2001. v. 8, n. 3, p. 297–305. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-3/cardiopatia.pdf>>.

FREITAS, J. C. C. DE *et al.* TNF- α and IL-10 modulate CK and CK-MB activities in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2014. v. 42, n. 1.

MARSIGLIA, J. D. C. *et al.* Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. Evaluation of the toxic, cytotoxic and genotoxic effects of the crude extract from *Solanum cordifolium* Dunal. **Natureza on line**, 2011. v. 9, n. 1, p. 30–34.

MENEZES-RODRIGUES, F. S. *et al.* Cardioprotective effect of lipstatin derivative orlistat on normotensive rats submitted to cardiac ischemia and reperfusion. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2018. v. 33, n. 6, p. 524–532.

MENEZES-RODRIGUES, F. S. *et al.* Cardioprotective effects of pharmacological blockade of the mitochondrial calcium uniporter on myocardial ischemia-reperfusion injury. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2020. v. 35, n. 3, p. 3–8.

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

NORRIS, J. W. *et al.* Serum cardiac enzymes in stroke. **Stroke**, 1979. v. 10, n. 5, p. 548–553.

REZAPOUR, A. *et al.* Effectiveness of revascularization interventions compared with medical therapy in patients with ischemic cardiomyopathy: A systematic review protocol. **Medicine (United States)**, 2018. v. 97, n. 10, p. 30–33.

RIBEIRO, H. B. *et al.* Predictors and Impact of Myocardial Injury after Transcatheter Aortic Valve Replacement A Multicenter Registry. **Journal of the American College of Cardiology**, 2015. v. 66, n. 19, p. 2075–2088.

RODRIGUES DE CARVALHO, L. *et al.* Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018. v. 102, n. March, p. 278–285.

SÁ MALBOUISSON, L. M. *et al.* Myocardial Protection in Cardiac Surgery. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2005. v. 55, n. 5, p. 558–574.

SANDHU, S. S. *et al.* Pilocarpine content and molecular diversity in Jaborandi. **Scientia Agricola**, 2006. v. 63, n. 5, p. 478–482.

SCORZA, F. A. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter: A new therapeutic target for parkinson's disease-related cardiac dysfunctions? **Clinics**, 2020. v. 75, p. 22–24.

SETYORINI, D.; ANTARLINA, S. S. Secondary metabolites in sorghum and its characteristics. **Food Science and Technology (Brazil)**, 2022. v. 42.

SILVA, V. G. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from pilocarpus microphyllus. **Journal of Natural Products**, 2013. v. 76, n. 6, p. 1071–1077.

TAVARES, Jose Gustavo Padrão *et al.* A Simple and Efficient Methodology for the Study of Cardioprotective Drugs in Animal Model of Cardiac Ischemia-Reperfusion. **Journal of Molecular Imaging & Dynamics**, 2017. v. 07, n. 01, p. 1–6.

VIOLANTE, I. M. P. *et al.* In vitro sunscreen activity evaluation of plants extracts from Mato Grosso cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2009. v. 19, n. 2 A, p. 452–457.

WHAYNE, T. F.; SAHA, S. P. Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle,

and Ischemic Heart Disease. **Current Cardiology Reports**, 2019. v. 21, n. 1, p. 1–8.

WHO. **Health, World Health Organization.65th World Measures., Assembly closes with new global health Assembly, Sixty-fifth World Health, 2023.**

WU, M. Y. *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2018. v. 46, n. 4, p. 1650–1667.