

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Cássia Costa Lores

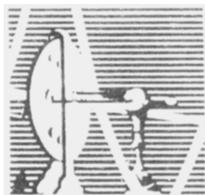
**Participação dos Canais de K⁺ Dependentes de ATP na
Cardioproteção Induzida Pela Espironolactona**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro, 2007

CÁSSIA COSTA LORES

**Participação dos Canais de K⁺ Dependentes de ATP na
Cardioproteção Induzida Pela Espironolactona**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientador:
José Hamilton Matheus Nascimento
Professor adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro,
2007

Cássia Costa Lores.

Participação dos Canais de K^+ Dependentes de ATP na
Cardioproteção Induzida pela Espironolactona/ Cássia Costa Lores.
Rio de Janeiro, 2007.

85 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Fisiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Orientador: José Hamilton Matheus Nascimento

1. Espironolactona 2. Isquemia-reperfusão 3. Canais de
Potássio dependentes de ATP
Organizacional. 3.Administração – Teses.

I. José Hamilton Matheus Nascimento. II.Universidade
Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cássia Costa Lores

Participação dos Canais de K⁺ Dependentes de ATP na Cardioproteção Induzida Pela Espironolactona

Rio de Janeiro, 11 de Setembro de 2007

Orientador: Dr. José Hamilton Matheus Nascimento
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Dr. Gisele Zapata Sudo
Departamento de Farmacologia Básica e Clínica - UFRJ

Dr. Cristiane del Corso
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Dr. Vânia Maria Corrêa da Costa
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Revisora e suplente interno: Dr. Regina Coeli Goldenberg
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Suplente externo: Dr. Roberto Takashi Sudo
Departamento de Farmacologia Básica e Clínica - UFRJ

Dedicatória

À minha querida e grande família, amigos e ao Luiz, meu amor, que me ajudaram, incentivaram e apoiaram durante o período do mestrado e sempre. O amor e amizade de vocês são os maiores e melhores bens que posso possuir.

Agradecimentos

Ao professor José Hamilton Matheus Nascimento pela imensa ajuda e orientação desde o período de iniciação científica e especialmente no final deste trabalho, obrigada!!!

Ao professor Antônio Campos de Carvalho pela sua incansável dedicação à pesquisa e suporte aos alunos.

A professora Cristiane del Corso pelas discussões científicas e o bom humor.

A professora Simone Macambira pela oportunidade de ingresso no laboratório e pela orientação.

A queridíssima Daisy Avanzi (mais conhecida como tia Daisy) pela grande ajuda a todos no laboratório e os puxões de orelhas, nas horas certas. Obrigada também pelo seu apoio e amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Ana Carolina Carvalho, Fabrício Passos, Fredson Serejo, Sílvio Marques, Moacyr Marocolo, Marco Antônio, Elen Chaves, Emiliano Medei, Alex Maior, pelos momentos de aprendizagem e risadas.

Aos alunos de iniciação científica e aos que passaram pelo laboratório e contribuíram para esse trabalho.

“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram.”

Alexandre Graham Bell

“A morte do homem começa
no instante em que ele desiste de aprender.”

Albino Teixeira

RESUMO

CÁSSIA COSTA LORES. Participação dos Canais de K^+ Dependentes de ATP na Cardioproteção Induzida pela Espironolactona. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Espironolactona, um antagonista de receptor de mineralocorticoide, apresenta eficácia no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca e hipertensão. Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação protetora da espironolactona contra injúrias de isquemia e reperfusão miocárdica e os efeitos da glibenclamida (bloqueador não seletivo de canais K_{ATP}) e o 5-HD (bloqueador seletivo de canais $mitoK_{ATP}$) na cardioproteção induzida pela espironolactona.

Corações isolados de ratos foram submetidos ao protocolo de isquemia-reperfusão (I/R): 30 min de isquemia global, seguidos de 120 min. de reperfusão. Os grupos experimentais foram: CONTROLE: somente I/R; PCI: pré-condicionamento isquêmico (3 ciclos de 5 min de isquemia e 5 min de reperfusão) antes da I/R; ESP-PRE: perfusão de 1 μ M de espironolactona por 10 min., antes de I/R; ESP-POS: perfusão de 1 μ M de espironolactona por 10 min., no início da reperfusão; ESP4 ou ESP24: os ratos foram tratados com dose única de espironolactona (20mg/kg) 4 ou 24 horas, respectivamente, antes da realização de I/R; 5HD: perfusão de 100 μ M de 5-HD 5 min. antes e durante os 10 min. de perfusão da espironolactona antes da I/R; e GLY: perfusão de 10 μ M de glibenclamida 5 min. antes e durante os 10 min. de perfusão da espironolactona antes da I/R. Foram avaliadas pressão diastólica e pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo e a área de infarto.

A perfusão de espironolactona antes da isquemia e o pré-condicionamento isquêmico reduziram a pressão diastólica, aumentaram a recuperação pós-isquêmica da pressão desenvolvida e diminuíram a área de infarto dos grupos ESP-PRE e PCI, respectivamente, comparados ao grupo CONTROLE. A perfusão de espironolactona no início da reperfusão e os pré-tratamentos com espironolactona, 4 e 24 hs antes da I/R, produziram resultados similares ao do grupo CONTROLE. Os efeitos cardioprotetores da perfusão pré-isquêmica de espironolactona foram inibidos pelo 5-HD, bloqueador seletivo de canais $mitoK_{ATP}$, mas não pela glibenclamida, bloqueador não seletivo de canais K_{ATP} . Em conclusão, nossos resultados fornecem evidências de que os efeitos cardioprotetores do pré-condicionamento farmacológico com espironolactona envolvem a ativação de canais K_{ATP} mitocondriais.

ABSTRACT

CÁSSIA COSTA LORES. Participação dos Canais de K^+ Dependentes de ATP na Cardioproteção Induzida pela Espironolactona. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Spironolactone, a mineralocorticoid receptor antagonist, improves the treatment of patients with hypertension and heart failure. The objective of the present study was to investigate the protective action of spironolactone against myocardial ischemia and reperfusion injuries and the effects of glibenclamide (non-selective blocker of K_{ATP} channels) and 5-HD (selective blocker of $mitoK_{ATP}$ channels) on spironolactone induced cardioprotection.

Isolated rat hearts were subjected to ischemia-reperfusion protocol (I/R): 30-min of global ischemia, followed by 120-min reperfusion. Experimental groups were: CONTROL: only I/R; PCI: ischemic preconditioning (three cycles of 5-min ischemia and 5-min reperfusion) before I/R; ESP-PRE: perfusion of 1 μ M spironolactone by 10 min, before I/R; ESP-POS: perfusion of 1 μ M spironolactone during the first 10 min of reperfusion; ESP4 or ESP24: rats were treated with 20 mg/kg of spironolactone (20mg/kg), 4 or 24 hours, respectively, before I/R; 5-HD: 10-min perfusion of spironolactone in presence of 100 μ M 5-HD, before I/R; and GLY: 10-min perfusion of spironolactone in presence of 10 μ M glibenclamide, before I/R. The parameters measured were diastolic and developed pressures of left ventricle and infarct size.

Both, perfusion of spironolactone before ischemia and ischemic preconditioning reduced diastolic pressure, improved post-ischemic recovery of developed pressure, and reduced infarct size in the groups ESP-PRE and PCI, respectively, compared to CONTROL group. Perfusion of spironolactone at beginning of reperfusion and pretreatment with spironolactone, 4 and 24 hs before I/R, produced findings similar to CONTROL group. The cardioprotective effects of preischemic perfusion of spironolactone were inhibited by 5-HD, selective blocker of $mitoK_{ATP}$ channels, but not by glibenclamide, non-selective blocker of K_{ATP} channels.

In conclusion, our findings provide evidences that the cardioprotective effects of pharmacological preconditioning with spironolactone involve activation of mitochondrial K_{ATP} channels.

LISTA DE ABREVIações

5-HD	Ácido 5-hidroxi-decanoico
AHA	Associação Americana do Coração
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPM	Erro padrão da média
ESP	Espironolactona
ESP24	Grupo tratado com espironolactona 24 horas antes da isquemia/reperfusão
ESP-POS	Grupo submetido à perfusão de espironolactona na reperfusão
ESP4	Grupo tratado com espironolactona 4 horas antes da isquemia/reperfusão
ESP-PRE	Grupo submetido à perfusão de espironolactona antes da isquemia
FCCP	Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
GLY	Glibenclamida
I/R	Isquemia-reperfusão
IC	Insuficiência cardíaca
K _{ATP}	Canal de potássio dependente de ATP
K _{IR}	Subunidade do canal de potássio retificadora de entrada
LVDP	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
mitoK _{ATP}	Canal de potássio mitocondrial dependente de ATP
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
PKC	Proteína kinase C
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SUR	Receptor de sulfonilurea
TTC	Cloreto de trifenil-tetrazólio
VE	Ventrículo esquerdo
WHO/OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentagem de mortes causadas por DCV nos EUA no ano de 2004- -----	2
Figura 2	Esquema de fatores contribuindo para a imediata injúria de reperfusão letal ao cardiomiócito-----	4
Figura 3	Estrutura hipotética do canal de K_{ATP} cardíaco-----	7
Figura 4	Montagem do coração isolado (Técnica de Langendorff modificada) - -----	14
Figura 5	Traçado digitalizado da pressão intraventricular	15
Figura 6	Corte do coração de rato corado com TTC	17
Figura 7	Protocolo experimental do grupo CONTROLE-----	18
Figura 8	Protocolo experimental do grupo PCI-----	18
Figura 9	Protocolo experimental do grupo ESP-PRE-----	18
Figura 10	Protocolo experimental do grupo ESP-POS.-----	19
Figura 11	Protocolo experimental do grupo ESP4-----	19
Figura 12	Protocolo experimental do grupo ESP24.-----	19
Figura 13	Protocolo experimental do grupo 5-HD-----	20
Figura 14	Protocolo experimental do grupo Glibenclamida (GLY)-----	20
Figura 15	Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo CONTROLE-----	23
Figura 16	Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo PCI -----	23
Figura 17	Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo ESP-PRE -----	25
Figura 18	Curso temporal da variação da pressão diastólica durante o protocolo de isquemia/reperfusão, nos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE---- -----	25
Figura 19	Pressão diastólica aos 30 min de reperfusão dos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE -----	26
Figura 20	Pressão diastólica aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE -----	26
Figura 21	Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo durante o protocolo de isquemia/reperfusão dos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE	27
Figura 22	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo nos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE aos 30 min. de reperfusão ---- -----	28
Figura 23	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo nos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE aos 60 min. de reperfusão----- -----	28
Figura 24	Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo ESP-POS -----	30
Figura 25	Curso temporal da variação da pressão diastólica dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS -----	30
Figura 26	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperfusão dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS -----	31
Figura 27	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 min de reperfusão dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS -----	31
Figura 28	Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS	32

Figura 29	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperfusão, dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS ---- -----	33
Figura 30	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 min. de reperfusão, dos grupos CONTROLE, PCI, e ESP-POS ---- -----	33
Figura 31	Registro representativo da pressão ventricular do grupo ESP4-	35
Figura 32	Registro representativo da pressão ventricular do grupo ESP24 ----- -----	35
Figura 33	Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE, PCI e ESP4-----	36
Figura 34	Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo, dos grupos CONTROLE, PCI e ESP24-----	36
Figura 35	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP4 e ESP24-----	37
Figura 36	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP4 e ESP24 -----	37
Figura 37	Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) dos grupos CONTROLE, PCI, ESP4 e ESP24---- -----	38
Figura 38	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP4 e ESP24 --- -----	39
Figura 39	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP4 e ESP24. -- -----	39
Figura 40	Registro representativo da pressão ventricular esquerda do grupo 5HD -----	41
Figura 41	Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD, -----	41
Figura 42	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD -----	42
Figura 43	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD-----	42
Figura 44	Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD----- -----	43
Figura 45	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD -----	44
Figura 46	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e 5HD- -----	44
Figura 47	Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo grupo GLY 10 μ M -----	46
Figura 48	Registro representativo da pressão ventricular esquerda de corações pré-tratados espirolactona em presença de 100 μ M de glibenclamida -----	47
Figura 49	Registro representativo da pressão ventricular esquerda de corações pré-tratados com 375 μ l de DMSO-----	47
Figura 50	Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo	

	esquerdo dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY -----	48
Figura 51	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY -----	48
Figura 52	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 min. de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY -----	49
Figura 53	Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY-----	50
Figura 54	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY-----	50
Figura 55	Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) aos 60 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE, ESP-PRE e GLY -----	51
Figura 56	Imagens representativas de cortes dos corações dos grupos Controle, PCI e ESP-PRE. O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos três grupos-----	53
Figura 57	Imagens representativas de cortes dos corações dos grupos CONTROLE, ESP-POS, ESP4 e ESP24. O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos corações-----	54
Figura 58	Imagens representativas de cortes dos corações, dos grupos CONTROLE, ESP-PRE, 5HD e GLY. O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos corações-----	54

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1- Doenças Cardiovasculares.....	1
1.2- Condicionamento Cardíaco.....	4
1.3- Ação da Aldosterona na doença cardiovascular.....	8
2-OBJETIVOS	12
3-MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1- Corações Isolados	13
3.2- Registro de Pressão Intraventricular	14
3.3- Determinação da Área De Infarto	16
3.4- Protocolo Experimental	17
3.5- Drogas e Reagentes.....	20
3.6- Análise Estatística	21
4-RESULTADOS	22
4.1- Ação do Pré-condicionamento Isquêmico.....	22
4.2- Ação da Espironolactona.....	24
4.2.1- Perfusão da Espironolactona Antes da Isquemia.....	24
4.2.2- Perfusão da Espironolactona Após a Isquemia	29
4.2.3- Administração da Espironolactona <i>In Vivo</i>	34
4.3- Bloqueio da Ação da Espironolactona.....	40
4.3.1- Ação do 5-HD no pré-condicionamento farmacológico pela	

espironolactona -----	40
4.3.2-Ação da Glibenclamida no Pré-condicionamento Farmacológico pela Espironolactona -----	45
4.4- Área de Infarto -----	51
4.4.1- Pré-condicionamento Isquêmico-----	51
4.4.2- Espironolactona -----	51
4.4.3- Ação dos Bloqueadores de Canais K_{ATP} -----	52
5-DISSCUSSÃO-----	55
6-CONCLUSÕES-----	63
6-REFERÊNCIAS-----	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) apresentam grande prevalência e, no ano de 2002, foram responsáveis por 7,2 milhões de mortes no mundo, segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004).

Pelas estimativas da Associação Americana do Coração (AHA), a cada ano, desde 1900, com exceção do ano de 1918, as DCVs tem sido apontadas como a maior causa de morte nos Estados Unidos, sendo responsável por aproximadamente 2400 mortes por dia neste país, ou seja, uma morte a cada 36 segundos. Esses números são maiores do que a soma das mortes causadas por câncer, doenças respiratórias crônicas, acidentes e diabetes mellitus. Os gastos diretos e indiretos gerados pelas DCVs nos EUA, estimados para o ano de 2007, são de aproximadamente 431,8 milhões de dólares (AHA, 2007).

De acordo com as estimativas do Ministério da Saúde do Brasil, as doenças do aparelho circulatório ocupam o primeiro lugar nas causas de morte e, no ano de 2004, foram responsáveis por mais de 30% das mortes em nosso país (DataSUS, 2007).

Uma projeção feita pela Organização Mundial da Saúde em 2007, estima aproximadamente 9 milhões de mortes no mundo no ano de 2030 causadas somente por doenças cardíacas isquêmicas (WHO, 2007).

As principais causas das doenças cardiovasculares são hipertensão, hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes mellitus, o aumento dos níveis de homocisteína sérica, má alimentação, sedentarismo, envelhecimento e predisposição genética que através de diferentes mecanismos causam injúria e disfunção endotelial (WHO, 2005, Chatzizisis e cols., 2007).

Uma das DCV é a doença coronariana, responsável por mais de 50% das mortes por DCV nos EUA em 2004, como mostrado na figura 1 (AHA, 2007). Ela causa angina e o infarto do miocárdio. A aterosclerose e a formação de trombos devido à agregação plaquetária causam a obstrução da artéria coronariana e conseqüente isquemia, com redução ou interrupção do aporte sanguíneo ao miocárdio e, o aumento gradativo da severidade e duração da isquemia pode levar a necrose celular, o infarto do miocárdio (Opie, 1998, Chatzizisis e cols., 2007).

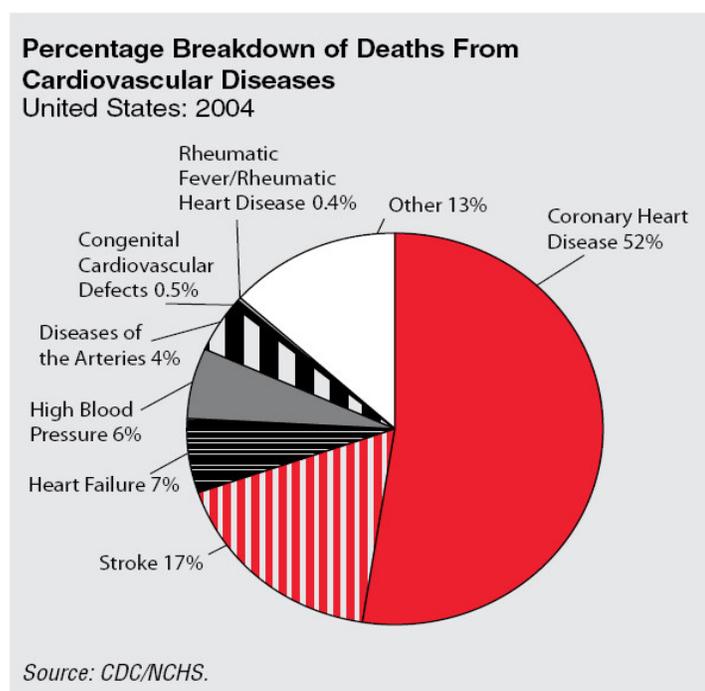


Figura 1: Porcentagem de mortes causadas por DCV nos Estados Unidos no Ano de 2004. A doença arterial coronariana (*coronary heart disease*) foi responsável por mais da metade do número de mortes registrados naquele ano, representado no gráfico pela área vermelha (AHA, 2007).

A interrupção do fluxo sanguíneo para uma região do tecido e conseqüente redução do suprimento de oxigênio e nutrientes, associado ao acúmulo de produtos residuais, inicia uma fase de lesão irreversível. Durante a isquemia há redução do pH interno da célula, aumento da concentração do cálcio interno e aumento da fragilidade do citoesqueleto e do sarcolema além do aumento da osmolalidade intracelular. A restauração do fluxo sanguíneo é necessária para salvar o tecido, mas não é um procedimento inteiramente benigno (Williams, 1996; Liem e cols., 2007). Como ilustrado na figura 2, a rápida normalização do pH interno e a re-energização celular na presença da alta concentração citosólica de cálcio gerada no período anterior, possibilitam o aumento da força contrátil produzindo uma hipercontratura do tecido cardíaco. Essa em conjunto com o aumento da fragilidade sarcolemal potencializada pelo estresse oxidativo gerado na reperfusão e a possível turgência celular devido ao aumento da osmolalidade intracelular potencializada pela normalização da osmolalidade extracelular são fatores responsáveis pelo rompimento sarcolemal (Piper, 1998, Heyndrickx, 2006, Liem, e cols., 2007).

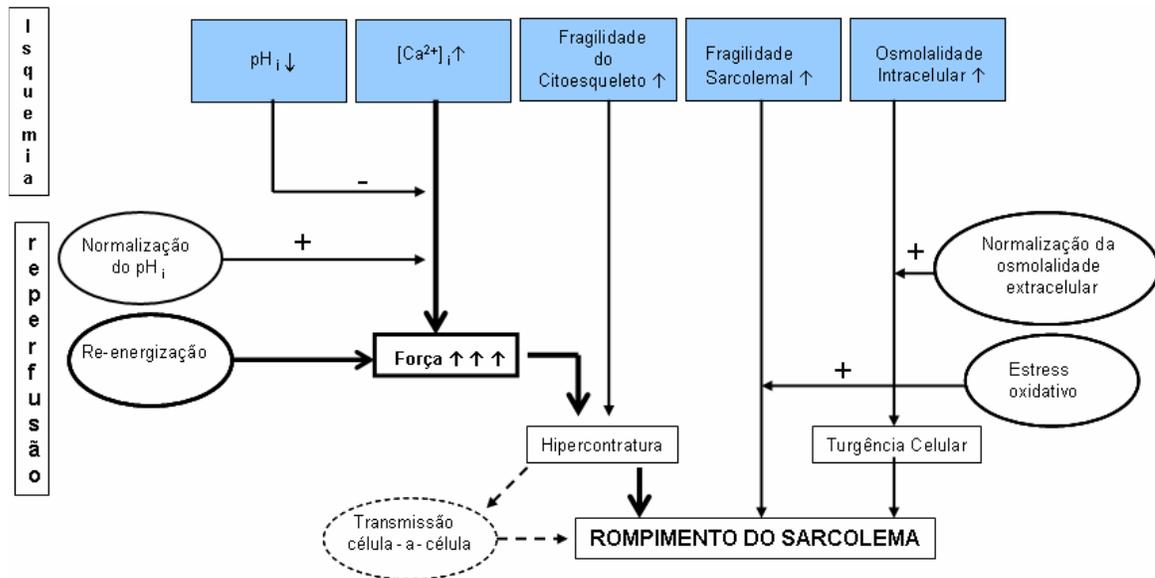


Figura 2: Esquema de fatores que contribuem para a imediata injúria de reperfusão letal ao cardiomiócito. Fatores que agravam estão marcados com o sinal positivo e fatores que inibem estão indicados com sinal negativo (adaptado de Piper, 1998).

A reperfusão está associada a uma série de manifestações como arritmias de reperfusão, disfunção contrátil do miocárdio (*stunning*), geração de radicais livres, aumento da sobrecarga de cálcio e infiltração de neutrófilos que levam a uma exacerbação da lesão tecidual (Park, 1999; Heyndrickx, 2006).

Tal situação leva a uma debilitação da função contrátil do ventrículo e diminuição do débito cardíaco. As arritmias são muito comuns durante o infarto do miocárdio e constituem a principal causa de morte (Théroux, 1999; Illebekk e cols., 2006).

1.2 CONDICIONAMENTO CARDÍACO

Com o objetivo de entender os danos causados pela reperfusão, Murry e cols. (1986) utilizaram um modelo de oclusão de uma das artérias coronarianas com conseqüente isquemia regional em cachorros vivos, e concluíram que o pré-condicionamento isquêmico cardíaco (PCI), definido como um fenômeno pelo qual

um ou mais ciclos de isquemia de pequena duração (5 a 10 minutos) com pequenos ciclos de reperfusão, proporcionou proteção do miocárdio contra um subsequente e prolongado período de isquemia miocárdica e reperfusão.

A proteção cardíaca no PCI ocorre em dois momentos distintos: um primeiro momento, descrito por Baxter & Yellon (1994), a proteção cardíaca ocorre logo após o PCI e dissipa-se dentro de um período de 1 a 2 horas (pré-condicionamento isquêmico clássico), e um segundo período, chamado de pré-condicionamento tardio, onde a proteção reaparece em 24 a 72 horas após o PCI (Yellon & Baxter, 1995).

Além do pré-condicionamento isquêmico, já foi demonstrado que a perfusão de algumas substâncias como, por exemplo, a bradicinina, adenosina, opioides e a espirolactona antes da isquemia prolongada pode desencadear alterações celulares capazes de proteger o coração de uma subsequente isquemia prolongada. A esse processo deu-se o nome de pré-condicionamento farmacológico (Bailes e cols., 1999; Itaim e cols., 2000; Zaugg e cols., 2002; Chai e cols., 2005).

Já o pós-condicionamento isquêmico, primeiramente descrito pelo grupo de Vinten-Johansen, consiste na aplicação de pequenos ciclos de isquemia-reperfusão no início do período de reperfusão. Este protocolo possibilita a redução da área de infarto e de apoptose de modo similar ao pré-condicionamento (Zhao e cols., 2003; Cristomo e cols., 2006). Em 2005, o grupo de Staat testou o conceito de pós-condicionamento em humanos em um estudo prospectivo, randomizado e multicêntrico, utilizando um balão de *stent* de forma segura, induzindo a 4 ciclos de 1 min de I/R. O estudo demonstrou que não houve reações adversas ao uso do *stent* e foi verificado uma diminuição na liberação de enzimas que pode representar uma diminuição da área de infarto (Staat e cols., 2005).

Embora as vias de sinalização e o efetor final relacionado ao fenômeno de cardioproteção causada pelo pré-condicionamento isquêmico ainda não estejam claros, a ativação dos canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) foi relatada como possíveis efetores finais ou desencadeadores de PCI (Cohen e cols., 2001; Shintani e cols., 2004).

Como ilustrado na figura 3, o canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}) é um complexo octamérico ($SUR/K_{IR6.x}$)₄ com quatro subunidades $K_{IR6.2}$ que constituem o poro e quatro subunidades SUR (receptores de sulfonilurea) regulatórias (Moreau e cols., 2005). Eles estão presentes em células de diversos tecidos, como células cardíacas, nervosas, vasculares e pancreáticas, e atuam no acoplamento do metabolismo energético à atividade elétrica da célula (Ashcroft, 2005). A regulação metabólica dos canais K_{ATP} é mediada por mudanças na concentração intracelular de ATP. A redução do metabolismo celular abre os canais K_{ATP} , produzindo efluxo de K^+ , hiperpolarização da membrana e supressão da atividade elétrica, com consequente inibição da contração muscular, da liberação de neurotransmissores ou da secreção de hormônios (Ashcroft, 2005).

Os cardiomiócitos possuem alta densidade de canais K_{ATP} na membrana sarcolemal e na membrana mitocondrial (Clement e cols., 1997; Aguilar-Bryan & Bryan, 1999; Moreau e cols., 2005). A ativação desses canais tem sido apontada como um fator importante na cardioproteção contra injúrias de isquemia/reperfusão. A abertura dos canais K_{ATP} antes da isquemia, durante os ciclos de pré-condicionamento isquêmico ou com agentes farmacológicos, poderia agir como gatilho e causar proteção contra as lesões de uma subsequente isquemia (Pain e cols., 2000; Forbes e cols., 2001).

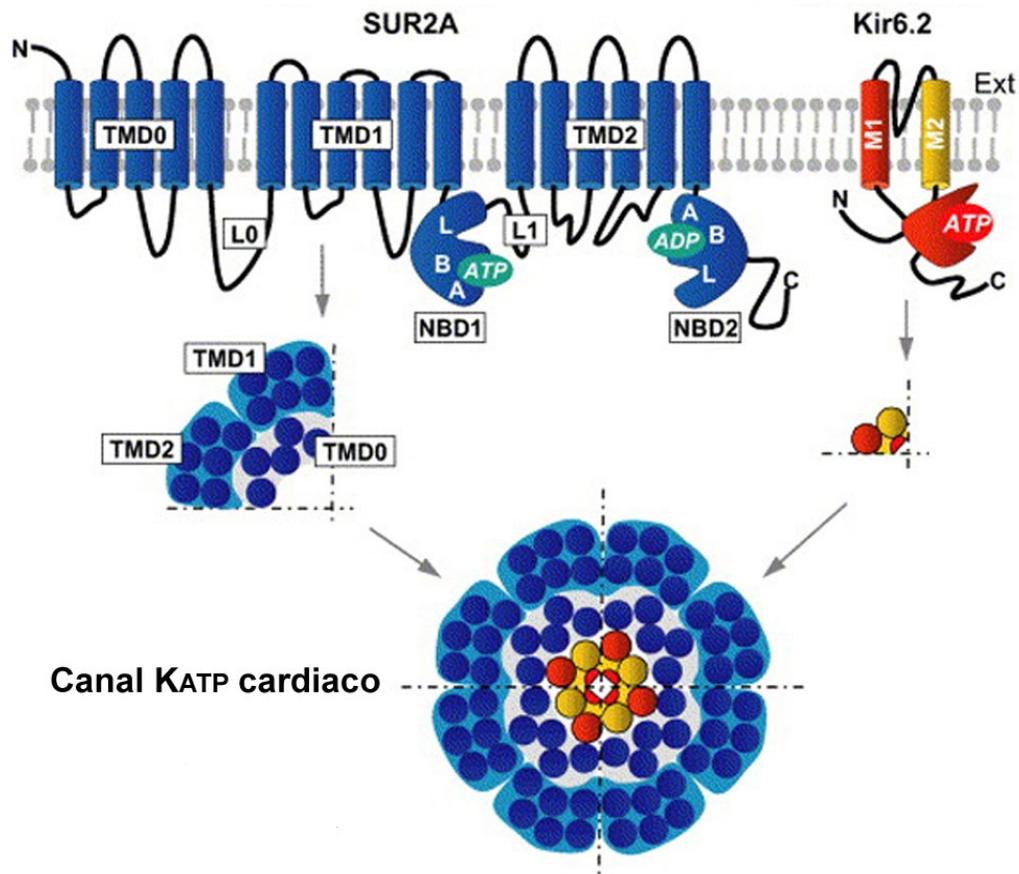


Figura 3: Estrutura hipotética do canal de K_{ATP} cardíaco. Ele é composto por quatro subunidades $K_{IR6.x}$ (Kir6.1 ou Kir6.2) e quatro subunidades SUR2A formando um estrutura octamérica funcional $(SUR/K_{IR6.x})_4$. A subunidade Kir6.x possui duas hélices transmembrana M1 e M2, e um grande domínio citoplasmático contendo um sítio de ligação de ATP inibitória, e duas alças citoplasmáticas terminais (N e C). A subunidade SUR possui 3 domínios transmembrana (TMD0,1 e 2) e dois nucleotídeos citoplasmáticos de ligação (NBD1 e 2), alça terminal N extra celular e alça C terminal citoplasmática. Esta subunidade possui duas alças citoplasmáticas L0 e L1, indicadas na figura. A alça citoplasmática L0 faz a ligação entre a última hélice de TMD0 e a primeira de TMD1 e L1 conecta NBD1 a primeira hélice de TMD2. (adaptado de Moreau e cols., 2005).

Feng e cols. (2006) concluíram que os canais K_{ATP} estão envolvidos no pré-condicionamento farmacológico do miocárdio pela bradicinina, uma vez que seus resultados demonstraram que a glibenclamida, um bloqueador não seletivo de canais de K_{ATP} , inibiu o efeito da bradicinina.

Pan e colaboradores (2006) mostraram que os efeitos de cardioproteção gerados pelo sulfeto de hidrogênio em miócitos ventriculares de ratos eram atenuados pela glibenclamida. Embora esses autores não tenham observado

inibição da cardioproteção pelo 5-HD (ácido 5-hidroxicanônico), um bloqueador seletivo do canal mitoK_{ATP}, outros estudos demonstraram efeito inibitório desta droga sobre a cardioproteção induzida por outros fármacos pré-condicionantes que mimetizam o pré-condicionamento isquêmico, tais como diazóxido (Wang e cols., 2001), isoflurano (Chen e cols., 2007) e sildenafil (Ockaili e cols., 2002).

Assim, inúmeras evidências sustentam a participação de ambos os canais K_{ATP} nos mecanismos de cardioproteção, embora exista a defesa de um papel principal para o canal K_{ATP} mitocondrial (Gross & Peart, 2003).

1.3 AÇÃO DA ALDOSTERONA NA DOENÇA CARDIOVASCULAR

A aldosterona é um mineralocorticóide que tem grande importância na modulação da função cardíaca e na homeostase de sódio e potássio. Alguns trabalhos mostraram que elevados níveis plasmáticos de aldosterona podem ocasionar efeitos deletérios na função cardíaca como inflamação, fibrose miocárdica e vascular e eventos pró-arritmicos (Delcayre & Silvestre, 1999; Beggah e cols., 2002; Sun e cols., 2002; Young & Funder, 2002; Ahokas e cols., 2005). A aldosterona possui receptores nos rins e em alguns tecidos extra-renais, como o coração (Lombès e cols., 1995; Mazak e cols., 2004; Oberleithner e cols., 2004) e já foi sugerido que a aldosterona pode ser produzida também no coração (Silvestre, 1998 e 1999).

Os efeitos da aldosterona podem ser separados em dois grupos: efeitos genômicos e não genômicos. Os efeitos genômicos são aqueles mediados por receptores de mineralocorticóides, ou seja, envolvem a ligação da aldosterona ao receptor de mineralocorticóide intracelular e a translocação do complexo receptor-esteróide para o núcleo onde então age como regulador transcripcional, gerando

efeitos após algumas horas. O outro grupo, os efeitos não genômicos, ocorrem dentro de alguns minutos e parecem envolver um receptor de membrana específico, proteína kinase C, Ca^{2+} e o transportador sódio-hidrogênio (Christ e cols., 1993; Wehling e cols., 1995; Young & Funder, 2002). De acordo com Chai e cols., 2005, os efeitos não genômicos da aldosterona incluem inotropismo positivo e vasoconstrição e podem potencializar os efeitos da angiotensina II.

A espironolactona é um antagonista de receptor de aldosterona (mineralocorticoide). Antigamente, a sua utilização restringia-se ao tratamento da hipertensão devido ao seu efeito diurético poupador de potássio (Delyani, 2000), mas teve a sua utilização aumentada após a indicação de sua adição, em baixas doses, no tratamento convencional de paciente com insuficiência cardíaca pelo Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES), por reduzir a morbidade e mortalidade dos pacientes com insuficiência cardíaca (Pitt e cols., 1999).

Outros estudos mostraram que o tratamento com a espironolactona reduz a incidência de arritmias ventriculares desses pacientes (Hallstrom e cols., 1995, Ramires e cols., 2000), aumenta a prevenção dos efeitos deletérios da aldosterona na hipertrofia ventricular esquerda e da insuficiência cardíaca (IC), incluindo a fibrose perivascular e intersticial e arritmias (Brilla e cols., 1993_a; Brilla e cols., 1993_b; Brilla e cols, 1994; MacFadyen e cols, 1997; Zannad & Radauceanu, 2005; Zannad e cols, 2000; Ramires e cols, 2000; Modena e cols, 2001). Recentemente foi demonstrado o aumento da sobrevida, em longo prazo, de pacientes internados em hospitais com insuficiência cardíaca tratados com espironolactona (Ouzounian e cols., 2007).

Alguns trabalhos mostraram que a espironolactona promove um aumento da atividade do óxido nítrico endotelial, melhorando a função endotelial (Farquharson & Struthers, 2000), reduz a hipertrofia miocárdica em pacientes hipertensos (Sato e

cols., 2002), e melhora a fração de ejeção e o volume diastólico final em portadores de infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca não isquêmica (Hayashi e cols., 2003).

Outros trabalhos buscaram o entendimento dos mecanismos benéficos envolvidos na ação da espironolactona.

Barbato e cols. (2004) mostraram que o efeito mediado pela espironolactona no fluxo cardíaco é possivelmente mediado por receptores diferentes daqueles envolvidos com os efeitos na contração. Eles descreveram que a espironolactona parece diminuir a magnitude do transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados.

Um trabalho em 1996 (Sorrentino e cols.) sugeriu que a espironolactona e seus metabólitos canrenona e canrenoato de potássio devem agir como antagonistas no sítio de ligação da ouabaína na $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da musculatura lisa vascular pois aumentaram o tônus basal de anéis de aorta.

Em estudo recente, com colaboração do nosso laboratório, Costa e cols. (artigo submetido a publicação), mostraram que a canrenona induz efeito entrópico negativo em músculos papilares e em cardiomiócitos ventriculares de ratos por meio de redução do influxo de Ca^{2+} , provavelmente diminuir o estoque de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e o transiente de Ca^{2+} intracelular. Adicionalmente, este mesmo grupo observou uma ação anti-apoptótica da canrenona em cardiomiócitos incubados com aldosterona (Costa e cols., 2006). Resultados similares foram relatados para a espironolactona (Burniston e cols., 2005).

Em 2005, Chai e cols., relataram pela primeira vez um efeito cardioprotetor da perfusão pré-isquêmica de espironolactona em um modelo experimental de isquemia e reperfusão miocárdica. O mesmo grupo observou efeito similar com outro inibidor de receptor de aldosterona, a eplerenona (Chai e cols., 2006).

Visto que trabalhos anteriores descrevem a participação dos canais de K^+ dependentes de ATP em mecanismos de pré-condicionamento isquêmico e farmacológico, é de grande importância avaliar a participação desses canais nos mecanismos da cardioproteção induzida pela espironolactona em corações submetidos à isquemia-reperfusão. Os bloqueadores de canais K_{ATP} , glibenclamida e 5-HD, constituem uma ferramenta muito utilizada na avaliação da participação desses canais nos diferentes mecanismos de cardioproteção. Por outro lado, dada a limitação do uso clínico do pré-condicionamento isquêmico ou farmacológico, torna-se importante avaliar também se a cardioproteção ocorre quando a espironolactona é aplicada após a isquemia ou várias horas antes da isquemia.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo avaliar as propriedades cardioprotetoras da espironolactona contra lesões de isquemia-reperfusão miocárdica em coração isolado de rato

Objetivos específicos:

1. Avaliar a ação cardioprotetora da espironolactona aplicada 4 h, 24 h, imediatamente antes ou após a isquemia global, na recuperação pós-isquêmica das pressões diastólica e desenvolvida do ventrículo esquerdo, e na área de infarto;
2. Comparar o pré-condicionamento farmacológico pela espironolactona com o pré-condicionamento isquêmico;
3. Avaliar os efeitos de bloqueadores de canais de potássio dependentes de ATP no pré-condicionamento farmacológico pela espironolactona.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CORAÇÕES ISOLADOS

Nesse estudo foram utilizados 45 corações isolados de ratos Wistar machos (peso corporal 200-300g), de acordo com os preceitos do “Guia para o Uso de Cuidado de Animais de laboratório” (Publicação da National Academic Press, edição revisada em 1996, USA). Os animais foram heparinizados com injeção intraperitoneal (5 UI/grama de peso do animal), anestesiados por inalação de dietil éter e sacrificados por deslocamento cervical. A remoção dos corações foi realizada através de toracotomia e em seguida os corações foram submersos em solução salina fisiológica [Krebs-Henseleit, em mM: NaCl (118), KCl (4,7), NaHCO_3^- (25), KH_2PO_4 (1,2), MgSO_4 (1,2), glicose (11), e CaCl_2 (1,25)] em temperatura ambiente. Imediatamente, os corações foram canulados em aparato de Langendorff modificado e perfundidos retrogradamente através da aorta com solução Krebs-Henseleit equilibrada com mistura carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), aquecida a 36 ± 5 °C e com o fluxo constante de 10 mL/min (figura 4).

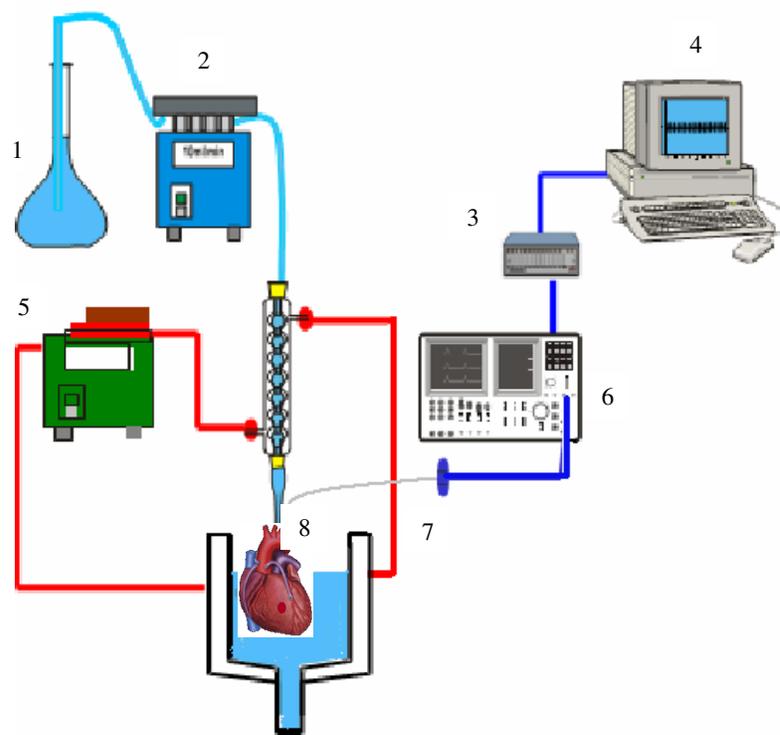


Figura 4: Montagem do coração isolado (Técnica de Langendorff modificada). (1) solução de Krebs; (2) bomba peristáltica; (3) interface analógica/digital; (4) aquisição dos dados no computador; (5) sistema de aquecimento a 37 °C; (6) amplificador diferencial; (7) transdutor de pressão; (8) coração isolado com o balão inserido no ventrículo esquerdo.

3.2 REGISTRO DE PRESSÃO INTRAVENTRICULAR

O registro da pressão intraventricular esquerda foi obtido através de um pequeno balão de látex com dimensões aproximadas de 3 mm x 7 mm, confeccionado artesanalmente, conectado por um tubo plástico a um transdutor de pressão (MLT0380). A inserção do balão de látex, totalmente vazio, foi realizada por uma pequena incisão na base do átrio esquerdo, feita com uma pinça curva. Em seguida o balão foi preenchido com um volume de água destilada suficiente para ocupar a câmara ventricular e atingir uma pressão diastólica final de 10 mmHg.

O transdutor estava ligado a entrada de um amplificador (ADInstruments, ML110/D Bridge amplifier) conectado ao conversor digital-analógico (ADInstruments, PowerLab/400). O sinal digitalizado era armazenado em um computador utilizando-se o programa Chart (ADInstruments), para posterior análise com o mesmo programa. A região inferior do traçado de pressão como visto na figura 5, corresponde à pressão diastólica, ou seja, a pressão intraventricular no período de diástole, relaxamento ventricular, e o pico do traçado corresponde a pressão sistólica, ou seja, a pressão gerada devido a contração ventricular. A diferença entre a pressão sistólica e a pressão diastólica corresponde à pressão desenvolvida pelo ventrículo.

Antes da colocação do balão era verificado se não havia bolhas de ar dentro do conjunto balão mais tubo de conexão. A seguir, era realizada a calibração do sistema de registro do sinal de pressão onde, com a utilização de uma coluna de mercúrio ligada ao transdutor de pressão através de tubos ligados a um selo d'água é possível fazer a calibração voltagem-pressão (mmHg).



Figura 5: Traçado digitalizado da pressão intraventricular utilizando o programa Chart (ADInstruments), A região inferior do traçado corresponde a pressão no momento de relaxamento ventricular, pressão diastólica. O pico do traçado corresponde a pressão sistólica, ou seja a pressão

máxima gerada pela contração do ventrículo. A diferença entre essas duas pressões corresponde a pressão desenvolvida pelo ventrículo.

3.3 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

Após a realização do protocolo experimental, os corações foram retirados imediatamente do aparato de Langendorff. Com a utilização de um bisturi, os átrios e a base da aorta foram retirados e a porção ventricular foi fatiada transversalmente em quatro ou cinco fatias e incubadas por 4 minutos a 37 °C em solução de 1% de cloreto de trifenil-tetrazólio (TTC). A utilização desta técnica permite avaliar devido a reações enzimáticas, o tecido viável o qual se apresenta com cor próxima ao vermelho carmim (Figura 6) . Quando a parte do tecido apresenta uma inviabilidade para a ocorrência da reação enzimática, o tecido apresenta uma coloração amarelo pálido, o que pode ser interpretado como uma incapacidade do tecido de sobreviver ou que está destinado a morrer. Em seguida, foi imerso em paraformaldeído a 10% por 12 horas para fixação do corante (Chopra & Sabherwal, 1988).

A planimetria da área de infarto foi realizada a partir da digitalização dos cortes adquiridos em um *scanner* (HP Scanjet 5370C) utilizando programa Photoshop com a resolução máxima permitida. Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de análise de imagens (ImageJ, NIH, Baltimore, USA). Após, foi calculada a porcentagem da área de infarto, correspondente a área de infarto dividida pela área total multiplicada por cem.

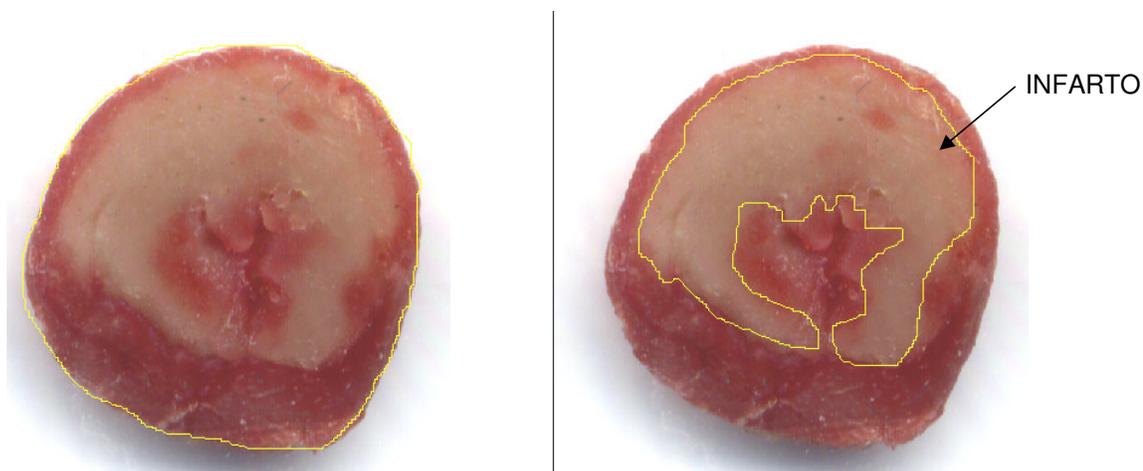


Figura 6: Corte do coração de rato corado com TTC. Região de cor vermelha, onde ocorreu a reação enzimática, corresponde ao tecido viável enquanto a região com cor amarelo pálido, corresponde a parte do tecido incapaz de sobreviver ou destinado a morrer, não ocorreu a reação enzimática. Utilizando o programa imageJ foi realizada a marcação e cálculo das área total do coração e a infartada e em seguida, calculada a porcentagem de área de infarto. $\% \text{ ÁREA DE INFARTO} = (\text{ÁREA INFARTO} / \text{ÁREA TOTAL}) \times 100$.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a colocação do balão na cavidade intraventricular esquerda, os corações foram submetidos a um período de estabilização de ritmo cardíaco sinusal de 10 minutos onde os registros de ECG e pressão foram monitorados. Após, foi iniciada a gravação dos registros por um período de 15 minutos (período basal) e então, foi aplicado o protocolo experimental de um dos grupos abaixo citados:

Grupo Controle



Figura 7. Protocolo experimental do grupo CONTROLE. Os corações foram submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão (I/R): 30 minutos de isquemia global, seguido de 120 minutos de reperfusão (N=9).

Grupo PCI



Figura 8. Protocolo experimental do grupo submetido ao condicionamento isquêmico, PCI. Os corações foram submetidos a três ciclos de 5 min. de isquemia/5 min. de reperfusão, imediatamente antes do protocolo I/R (N=6).

Grupo ESP-PRE

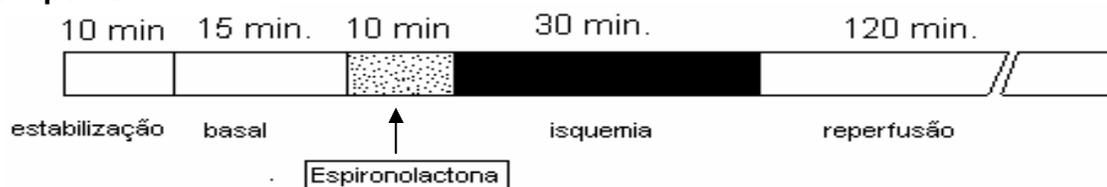


Figura 9. Protocolo experimental do grupo ESP-PRE. Os corações foram sujeitos ao pré-condicionamento farmacológico com a perfusão de 1 μ M de espironolactona, por 10 min, antes do protocolo I/R (N=12).

Grupo ESP-POS

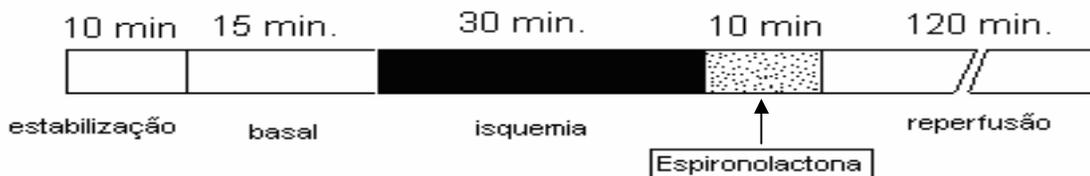


Figura 10. Protocolo experimental do grupo ESP-POS. Os corações foram sujeitos ao pós-condicionamento farmacológico com a perfusão de $1 \mu\text{M}$ de espironolactona, por 10 minutos, no início da reperfusão (N=7).

Grupo ESP4

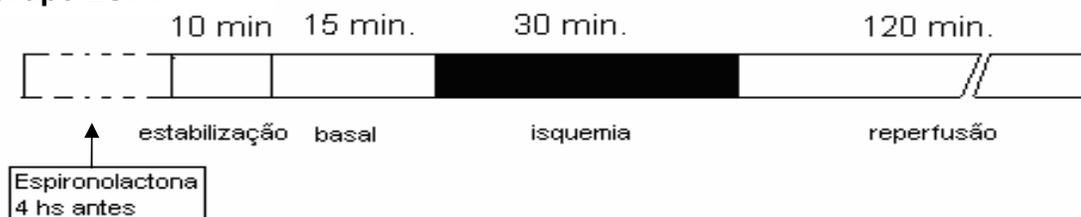


Figura 11. Protocolo experimental do grupo ESP4. Os animais foram tratados com dose única de espironolactona (20 mg/Kg), via gavagem, 4 horas antes da retirada do coração e a realização de protocolo idêntico ao grupo CONTROLE (N=6).

Grupo ESP24

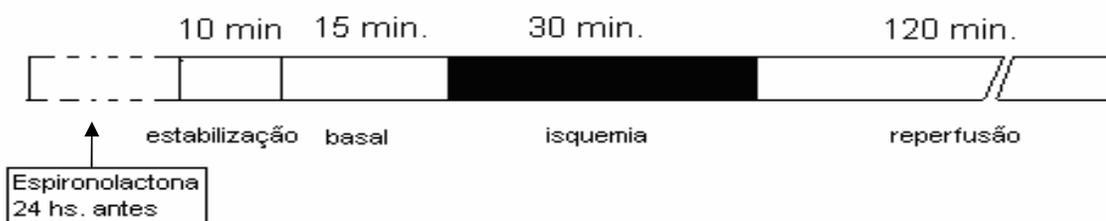


Figura 12. Protocolo experimental do grupo ESP24. Os animais foram tratados com dose única de espironolactona (20 mg/kg), via gavagem, 24 horas antes da retirada do coração e a realização de protocolo idêntico ao grupo CONTROLE (N=5).

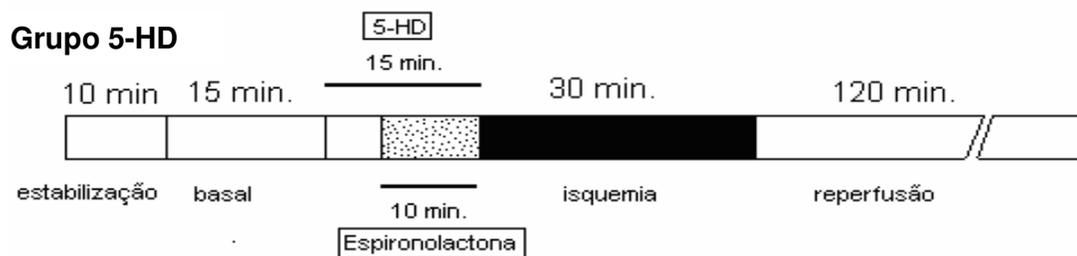


Figura 13. Protocolo experimental do grupo 5-HD. Foi realizada a perfusão de 5-HD (100 μ M) por 5 minutos, seguidos da perfusão simultânea de 5-HD (100 μ M) e espironolactona (1 μ M) por 10 minutos antes da I/R (N=5).

Grupo Glibenclamida

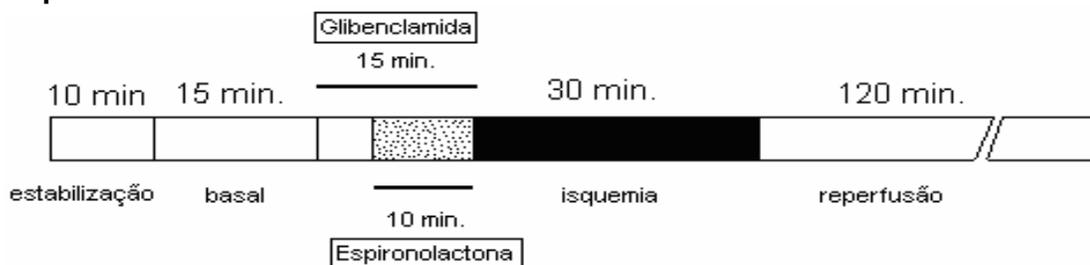


Figura 14. Protocolo experimental do grupo Glibenclamida (GLY). Foi realizada perfusão de 10 μ M de glibenclamida por 5 minutos, seguidos da perfusão simultânea de glibenclamida (10 μ M) mais 1 μ M de espironolactona por 10 minutos antes da I/R (N=5).

3.5 DROGAS E REAGENTES

Espironolactona (Aldactone, Pfizer) foi dissolvida em etanol e diluída em solução salina de Krebs para obter a concentração final de 1 μ M. O 5-HD (5-hydroxydecanoate, SIGMA) foi preparado em água e a glibenclamida (glyburide, SIGMA) em DMSO e diluídos em solução salina de Krebs para obter a concentração final de uso. A concentração máxima de etanol presente na solução de perfusão foi

de 0,01% e de DMSO foi de 0,037%. Em experimentos controles verificamos que o etanol e o DMSO nestas concentrações não tinham nenhum efeito significativo sobre a função cardíaca.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de pressão e área de infarto foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada ANOVA e post test Bonferoni, com nível de significância de $p < 0,05$, realizados no programa GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

4.1 AÇÃO DO PRE-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO

A figura 15 mostra um registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo de corações do grupo CONTROLE (N = 9). Os corações submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão apresentaram incremento da pressão diastólica durante o período de isquemia (contratura isquêmica), atingindo $48,57 \pm 2,03$ mmHg aos 30 min. de isquemia. No início do período de reperfusão ocorria um incremento adicional da pressão diastólica (contratura pós-isquêmica), que atingiu um máximo de $110,2 \pm 4,43$ mmHg no início da reperfusão, decaindo posteriormente para $87,06 \pm 5,35$ mmHg aos 30 min. e $84,96 \pm 5,10$ aos 60 min. de reperfusão (figuras 18, 19 e 20). A figura 16 mostra um registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo PCI (N = 6), cujos corações foram pré-condicionados isquemicamente. Como ilustrado na figura 16, o pré-condicionamento isquêmico reduziu a contratura pós-isquêmica. Este grupo apresentou pressão diastólica de $56,46 \pm 7,92$ mmHg aos 30 minutos e de $52,69 \pm 6,05$ mmHg aos 60 minutos de reperfusão. Esses valores foram estatisticamente menores do que os apresentados pelo grupo CONTROLE ($p < 0,05$), nos respectivos tempos analisados (figuras 18, 19 e 20).

Como esperado, a recuperação pós-isquêmica da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, expressa como porcentagem do valor pré-isquemia (% LVDP), foi maior no grupo que sofreu pré-condicionamento isquêmico. O grupo PCI apresentou %LVDP de $38,33 \pm 9,46$ % aos 30 minutos e $53,90 \pm 5,71$ % aos 60 minutos de reperfusão. Ambos os valores foram estatisticamente maiores que os apresentados pelo grupo controle, onde as %LVDP medidas aos 30 e 60 min. de reperfusão foram $10,87 \pm 2,33$ % ($p < 0,05$) e $24,87 \pm 4,80$ % ($p < 0,001$), respectivamente (figuras 21, 22 e 23).

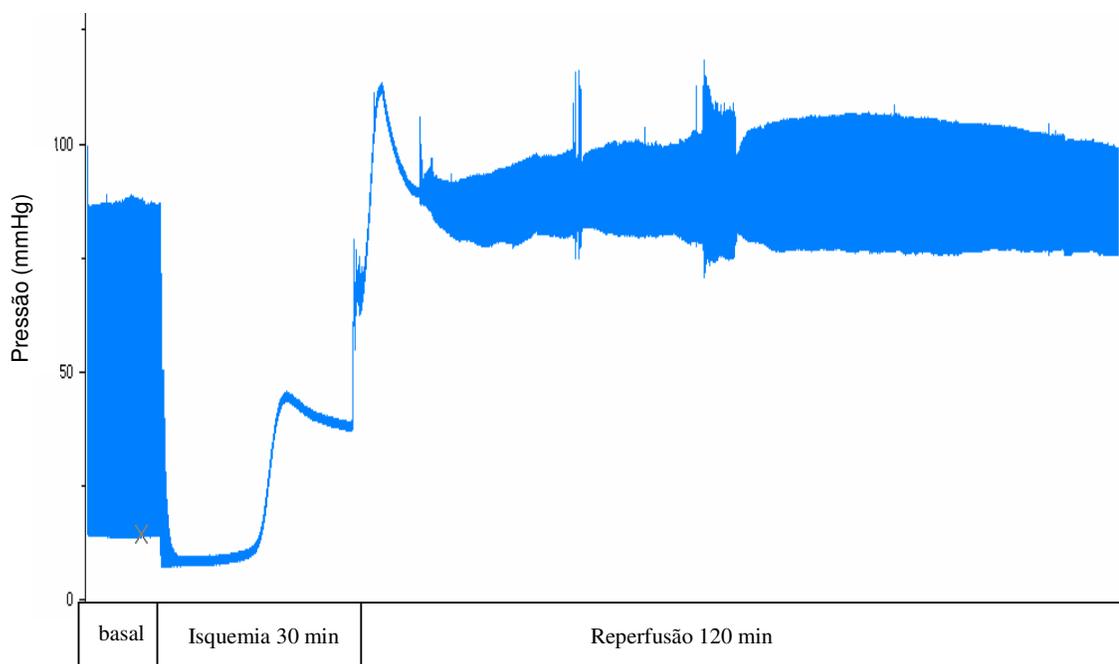


Figura 15: Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo CONTROLE, submetido ao protocolo de isquemia e reperusão (I/R).

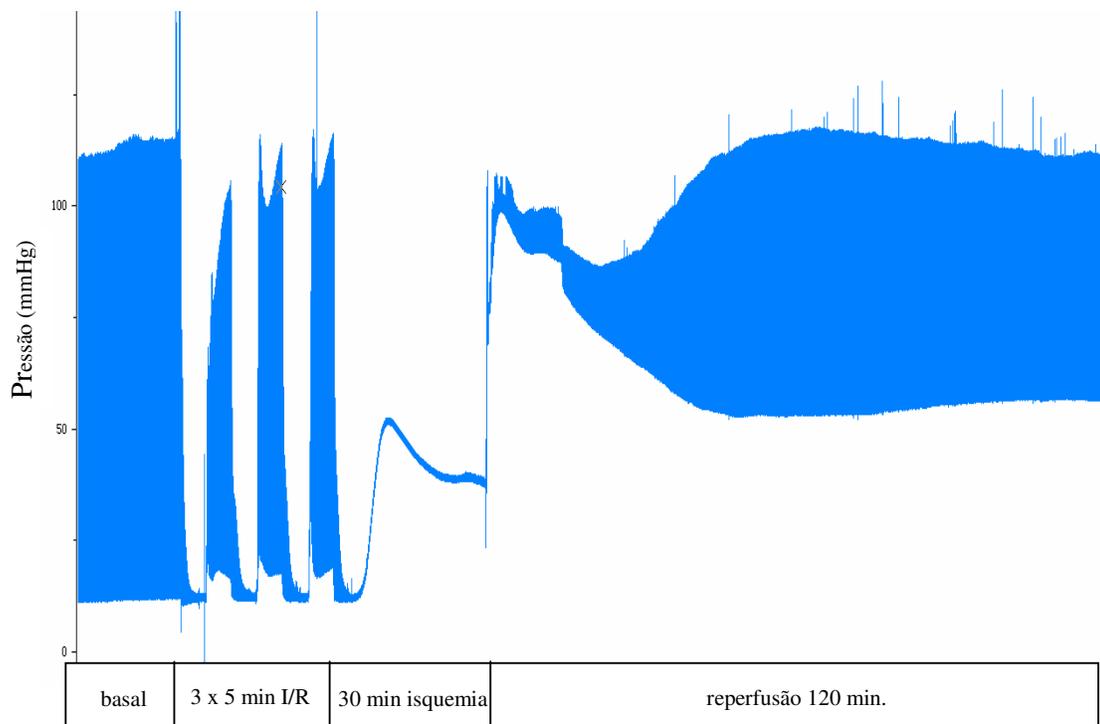


Figura 16: Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo PCI, submetido aos protocolos de pré-condicionamento isquêmico e de isquemia e reperusão (I/R).

4.2 AÇÃO DA ESPIRONOLACTONA

4.2.1 Perfusão da Espironolactona Antes da Isquemia

Nos primeiros experimentos realizados para avaliar a ação protetora da espironolactona contra as lesões de isquemia/reperfusão (I/R) de coração de ratos isolados, 1 μ M de espironolactona foi perfundida durante os 10 min. imediatamente antes da isquemia, podendo ser observado na figura 17 um registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo durante o protocolo experimental.

O grupo ESP-PRE tratado com espironolactona (N=12) apresentou pressão diastólica de $55,06 \pm 5,83$ mmHg aos 30 min. e $53,69 \pm 5,31$ mmHg aos 60 min. de reperfusão. Estes valores são estatisticamente menores que os encontrados no grupo CONTROLE $87,06 \pm 5,35$ mmHg e $84,96 \pm 5,10$ mmHg, respectivamente ($p < 0,01$) representando menor contratatura de VE a qual foi similar ao pré-condicionamento isquêmico ($56,46 \pm 7,92$ mmHg e $52,69 \pm 6,05$ mmHg, respectivamente), uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos ESP-PRE e PCI.

A figura 18 mostra o curso temporal das variações da pressão diastólica do ventrículo esquerdo de corações dos grupos CONTROLE, PCI e ESP-PRE, durante os 30 min. de isquemia global e os 60 min. iniciais da reperfusão. Os valores médios (\pm EPM) determinados aos 30 min. e 60 min. da reperfusão são mostrados nas figuras 19 e 20, respectivamente.

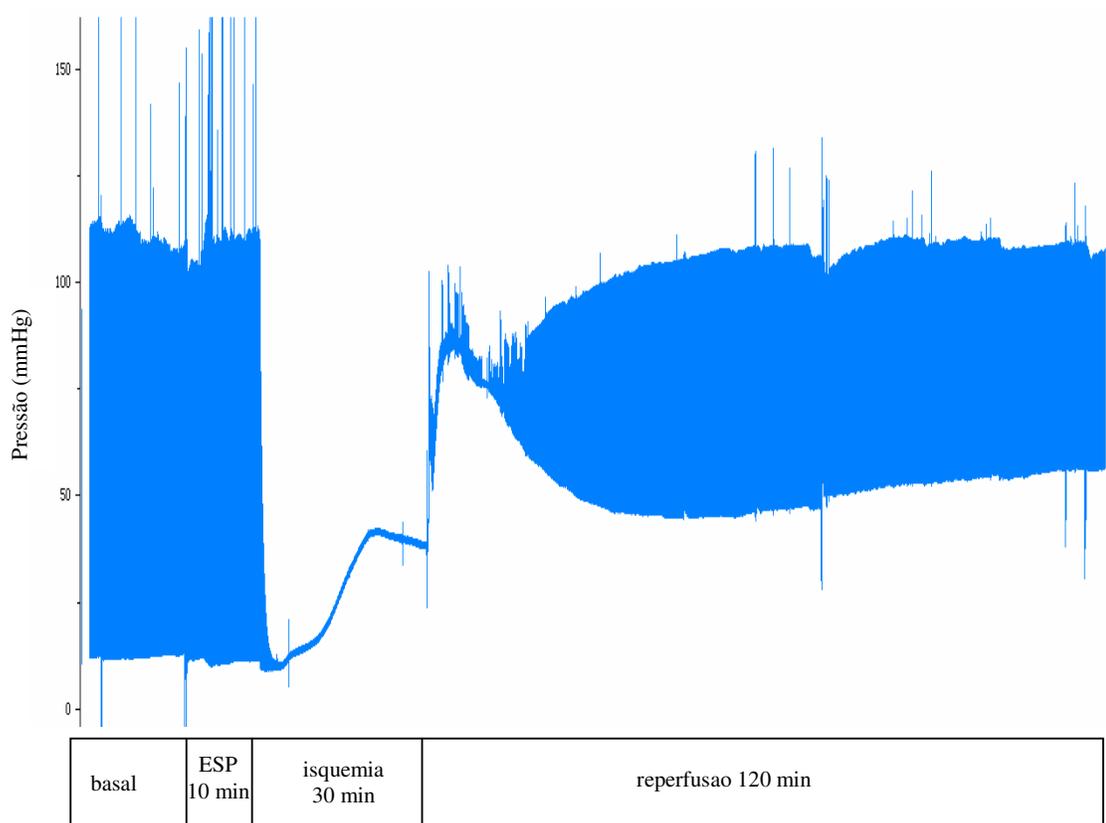


Figura 17: Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo ESP-PRE, tratado com 1 μ M de espironolactona imediatamente antes de ser submetido ao protocolo de isquemia e reperfusão (I/R).

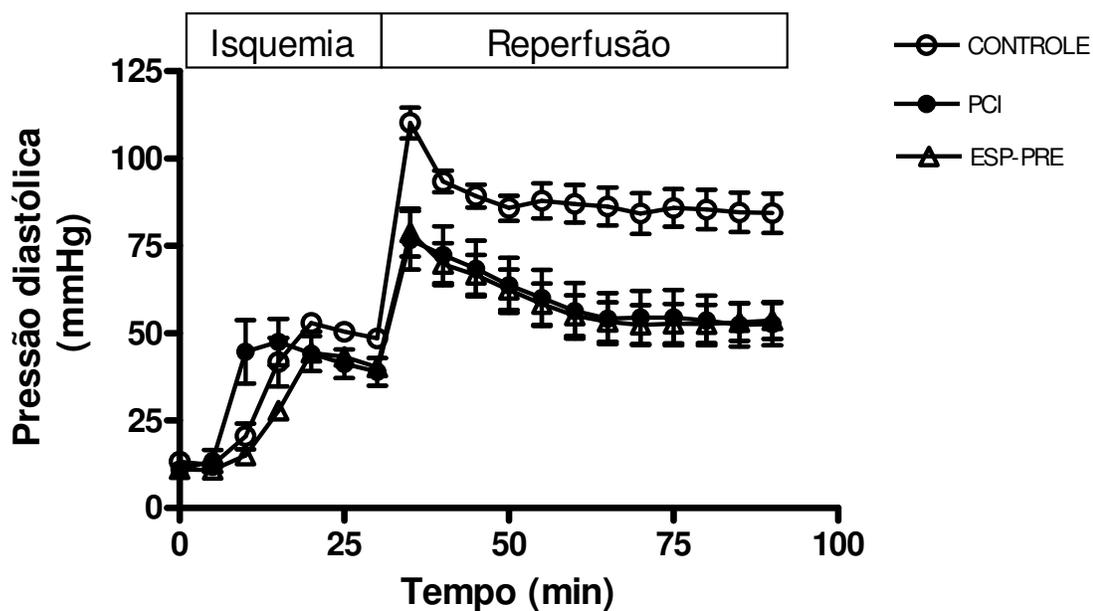


Figura 18: Curso temporal da variação da pressão diastólica durante o protocolo de isquemia/reperfusão, nos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12).

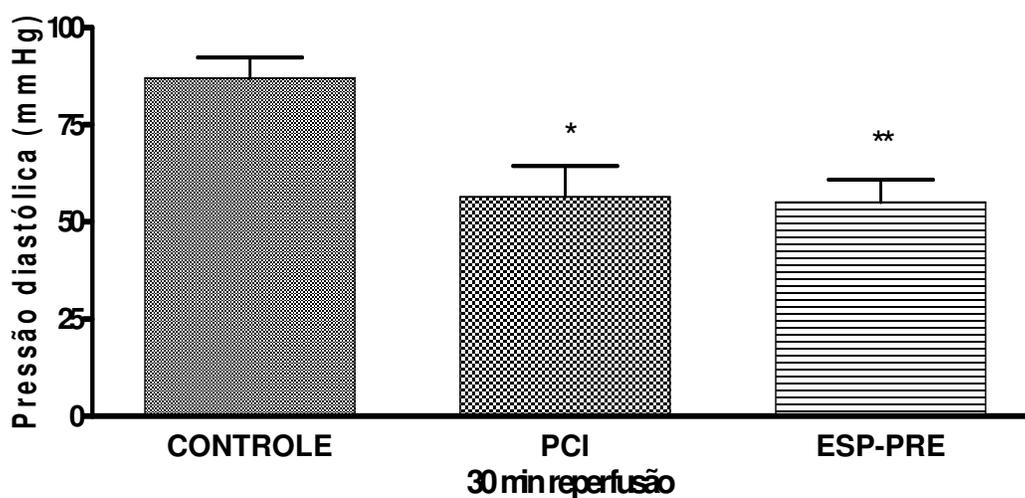


Figura 19: Pressão diastólica aos 30 min de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12). *P < 0,05 e **P < 0,01 comparados ao grupo CONTROLE.

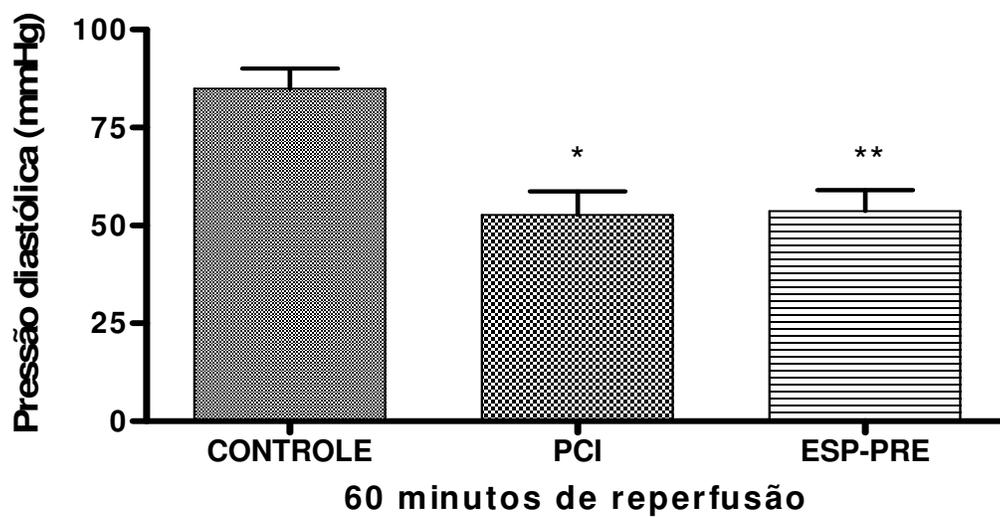


Figura 20: Pressão diastólica aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12). *P < 0,05 e **P < 0,01 comparados ao controle.

A perfusão da espironolactona imediatamente antes da isquemia, nos corações do grupo ESP-PRE, proporcionou uma melhor recuperação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (% LVDP), em comparação ao grupo CONTROLE (Fig. 21). As figuras 22 e 23 mostram que os valores médios da % LVDP do grupo ESP-PRE, determinados aos 30 min. ($43,87 \pm 6,32$ %) e aos 60 min. de reperfusão ($64,04 \pm 3,06$ %), foram estatisticamente maiores que os encontrados no grupo CONTROLE, que apresentou $10,87 \pm 2,33$ % aos 30 min. e $24,87 \pm 4,80$ % aos 60 min. de reperfusão ($p < 0,001$). Não houve diferenças significativas em relação ao grupo PCI ($38,33 \pm 9,46$ e $53,90 \pm 5,71$, respectivamente).

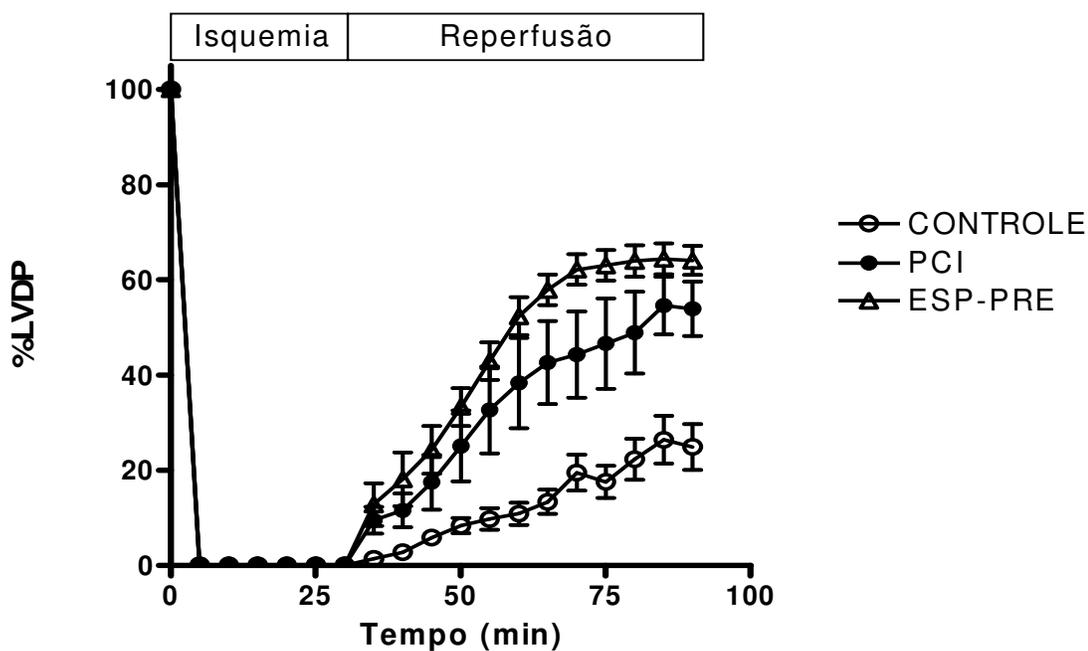


Figura 21: Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo durante o protocolo de isquemia-reperfusão. Pressão desenvolvida expressa como porcentagem do valor pré-isquemia. Grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12).

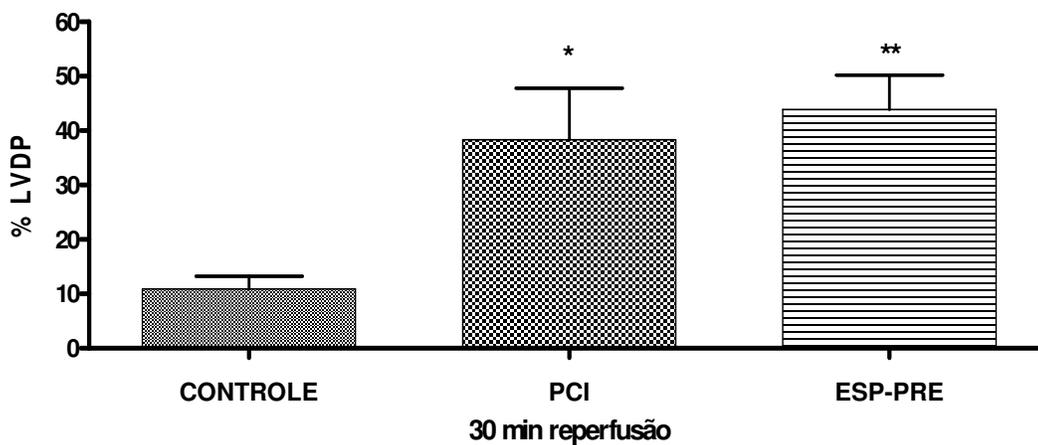


Figura 22: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (% LVDP) medida aos 30 min. de reperusão. Grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12). *P < 0,05 e **P < 0,001 comparados ao controle.

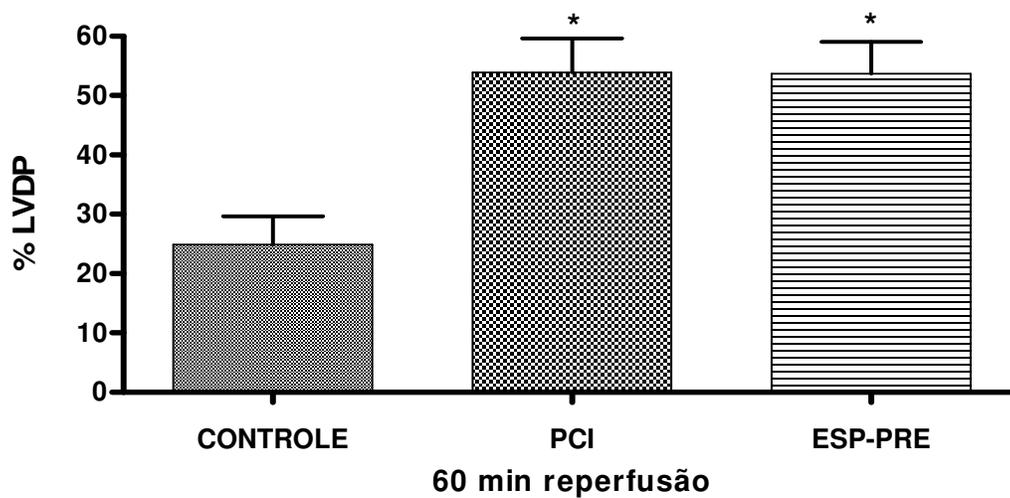


Figura 23: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo medida aos 60 min. de reperusão nos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP-PRE (N=12). *P < 0,001 comparado ao controle.

4.2.2 PERFUSÃO DA ESPIRONOLACTONA APÓS A ISQUEMIA

Para avaliar se o tratamento pós-isquêmico com espironolactona produziria os mesmos efeitos observados no grupo ESP-PRE, os corações do grupo ESP-POS foram submetidos ao protocolo de isquemia-reperfusão. O registro de pressão do ventrículo esquerdo durante o protocolo pode ser visualizado na figura 24. Nos 10 min. iniciais da perfusão, 1 μ M de espironolactona foi adicionado à solução de perfusão. A figura 25 mostra o curso temporal da variação da pressão diastólica, durante o protocolo de isquemia-reperfusão, nos corações do grupo ESP-POS, em comparação aos grupos CONTROLE e PCI. Os valores médios da pressão diastólica do grupo ESP-POS foi $102,5\text{mm} \pm 9,26$ mmHg aos 30 min. e $103,6 \pm 9,62$ mmHg aos 60 min. da perfusão, não tendo diferenças estatísticas em relação ao grupo CONTROLE (Figuras 26 e 27), ou seja, o tratamento pós-isquêmico com espironolactona não foi capaz de reduzir a contratatura pós-isquêmica do VE.

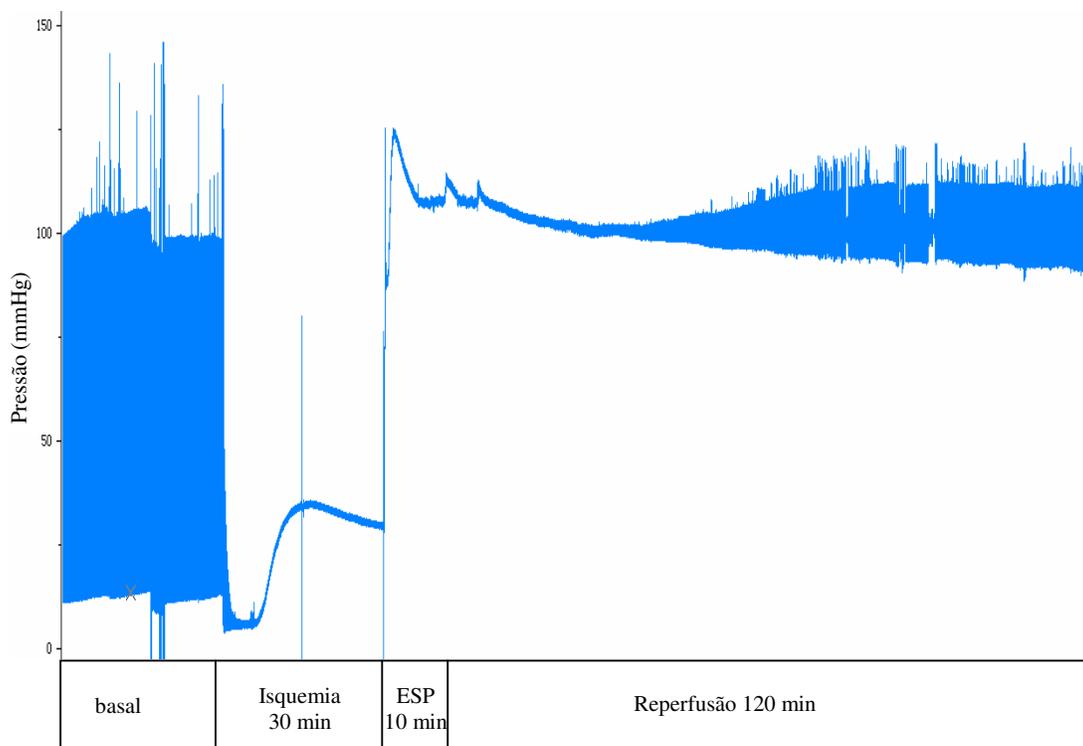


Figura 24: Registro representativo da pressão do ventrículo esquerdo do grupo ESP-POS, submetido a perfusão de espironolactona ($1\mu\text{M}$) durante os primeiros 10 minutos do período de reperusão.

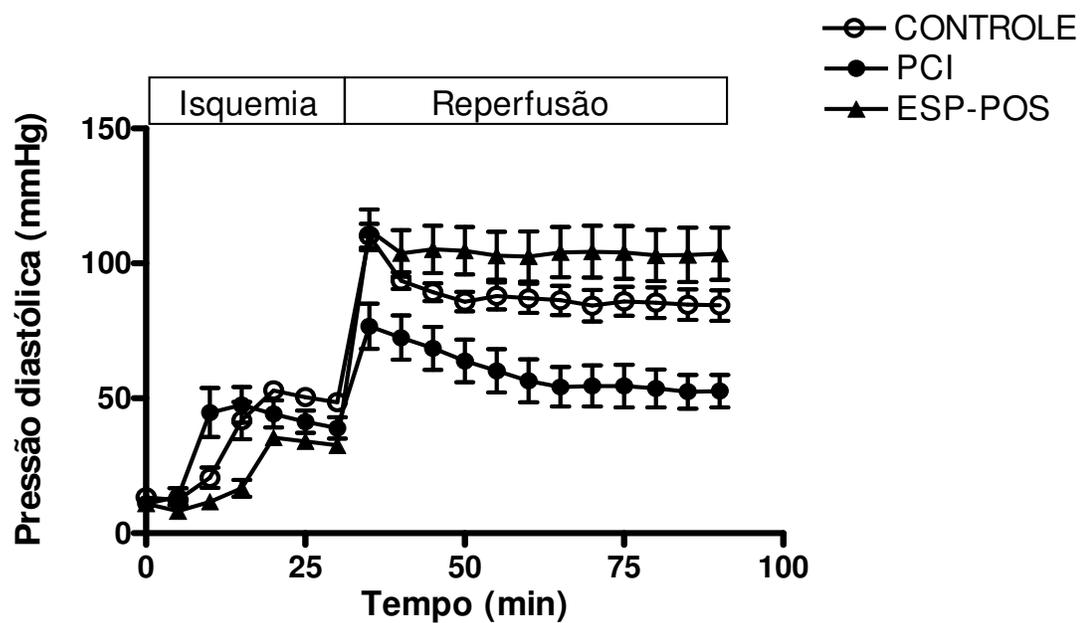


Figura 25: Curso temporal da variação da pressão diastólica dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7), durante os períodos de isquemia e reperusão.

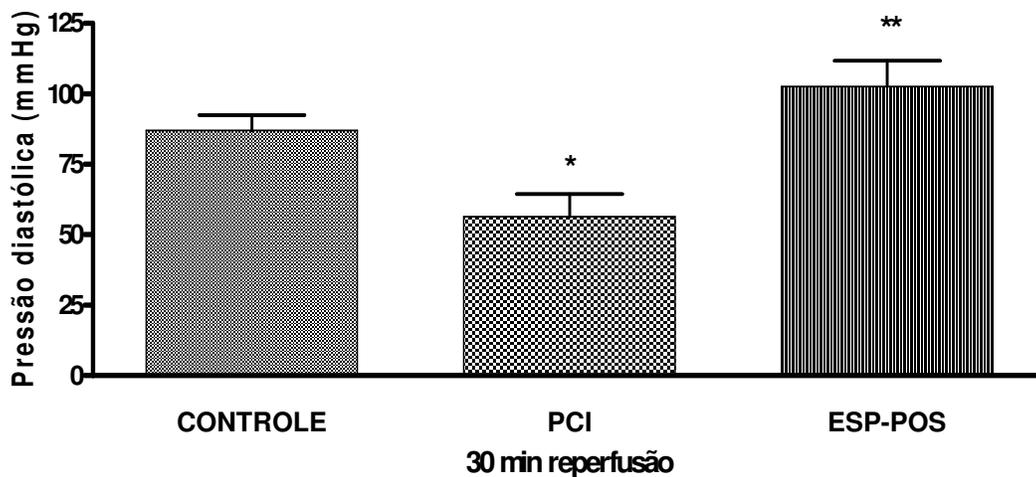


Figura 26: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7). $P < 0,05$ comparado ao grupo CONTROLE e $**P < 0,001$ comparado ao grupo PCI.

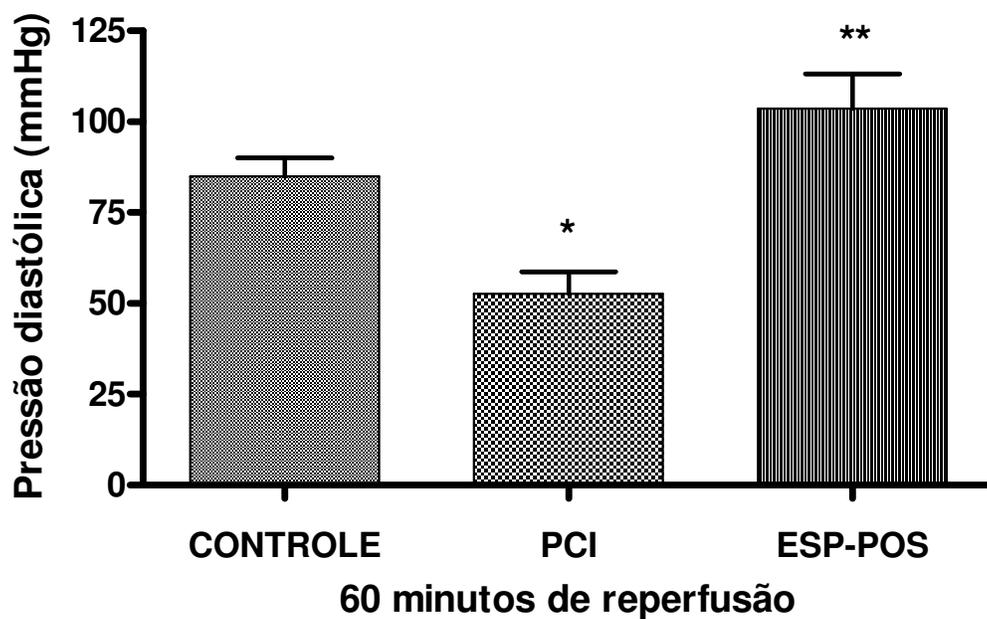


Figura 27: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 min de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7) $*P < 0,05$ comparado ao grupo CONTROLE e $**P < 0,001$ comparado ao grupo PCI.

A perfusão da espironolactona nos 10 min. iniciais da reperfusão não melhorou a recuperação pós-isquêmica da força contrátil de VE, representado pela pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Fig. 28). Os valores médios da %LVDP do grupo ESP-POS foi de $5,38 \pm 1,46$ % aos 30 min. e $15,31 \pm 4,74$ % aos 60 min. de reperfusão. Estes valores foram estatisticamente menores que os valores correspondentes do grupo PCI e não apresentam diferenças significativas em relação aos valores do grupo CONTROLE (Figuras 29 e 30).

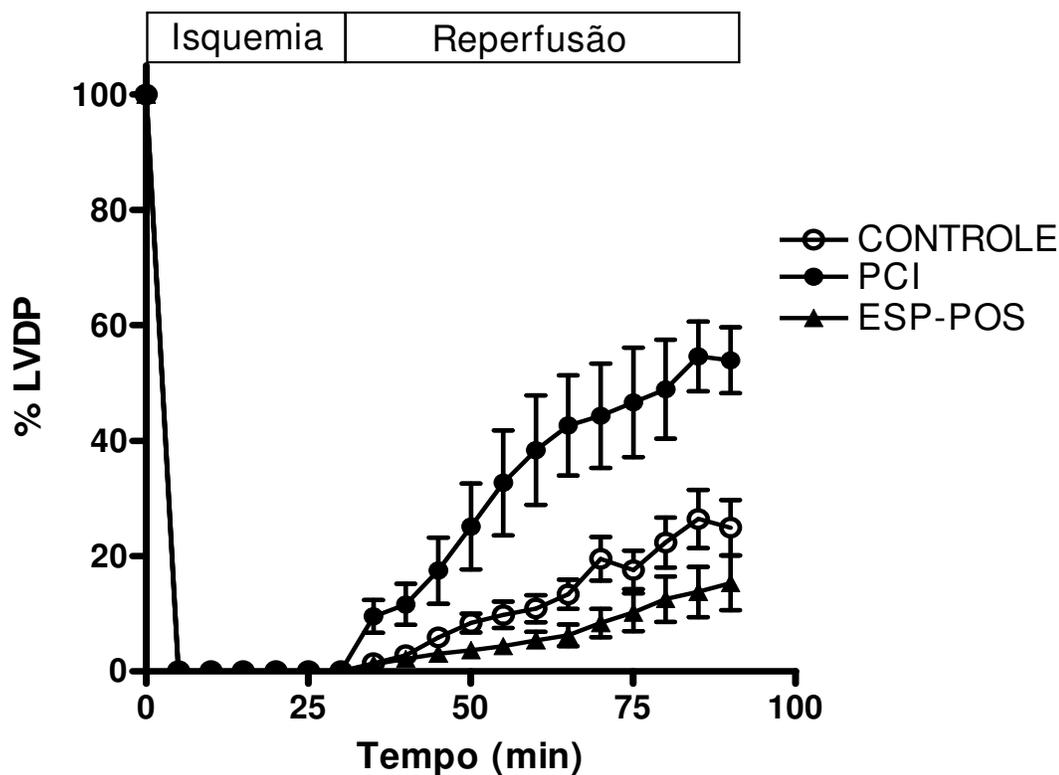


Figura 28: Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7), durante os períodos de isquemia e reperfusão.

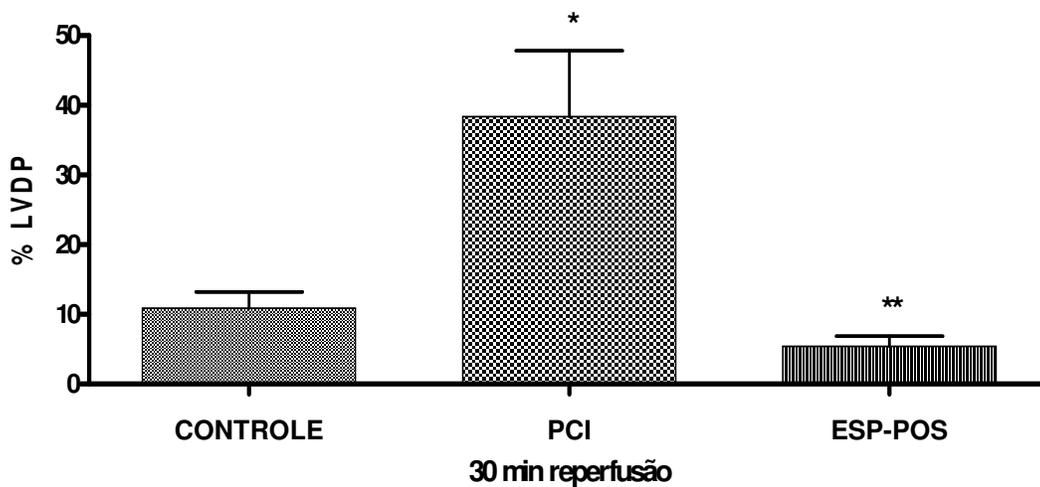


Figura 29: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperusão, dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7) *P < 0,05 comparado ao grupo CONTROLE e **P < 0,001 comparado ao grupo PCI.

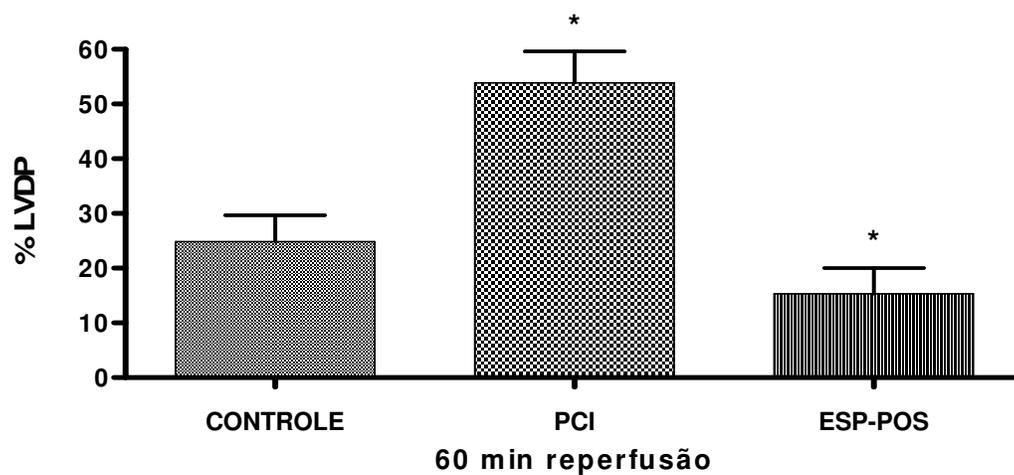


Figura 30: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 min. de reperusão, dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), e ESP-POS (N=7) *P<0,001 para PCI versus CONTROLE e ESP-POS versus PCI .

4.2.3 ADMINISTRAÇÃO DA ESPIRONOLACTONA *IN VIVO*

Foram avaliados também se as propriedades cardioprotetoras da espironolactona eram mantidas quando administrada *in vivo*, em dose única 20mg/kg (Resende e cols., 2006) , via gavagem, 4 ou 24 horas antes da isquemia do coração isolado do rato. Dois grupos experimentais foram formados, os grupos ESP4 (N = 6) e ESP24 (N = 5), com administração da espironolactona 4 horas e 24 horas antes da I/R, respectivamente. Nas figuras 31 e 32 podem ser verificados os registros de pressão do ventrículo esquerdo dos grupos ESP4 e ESP24 respectivamente.

A figura 33 mostra que o tratamento com espironolactona, 4 horas antes da isquemia, não atenuou a contratura diastólica (elevação da pressão diastólica) do ventrículo esquerdo no período de reperfusão. Resultados similares foram obtidos no grupo tratado *in vivo* com espironolactona 24 horas antes da isquemia (Figura 34). Os valores médios da pressão diastólica aos 30 minutos de reperfusão foram: $81,92 \pm 4,67$ mmHg (ESP4) e $81,65 \pm 3,59$ mmHg (ESP24). Estes valores não diferiram do grupo CONTROLE (Figura 35). Os valores obtidos aos 60 minutos de reperfusão: $87,02 \pm 8,53$ mmHg (ESP4) e $81,28 \pm 5,42$ mmHg (ESP24), também não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo CONTROLE (Figura 36). De acordo com esses dados, o tratamento com 20mg/kg de espironolactona, via gavagem, 4 ou 24 horas antes da isquemia do coração isolado não foi capaz de reduzir a contratura diastólica do VE na reperfusão.

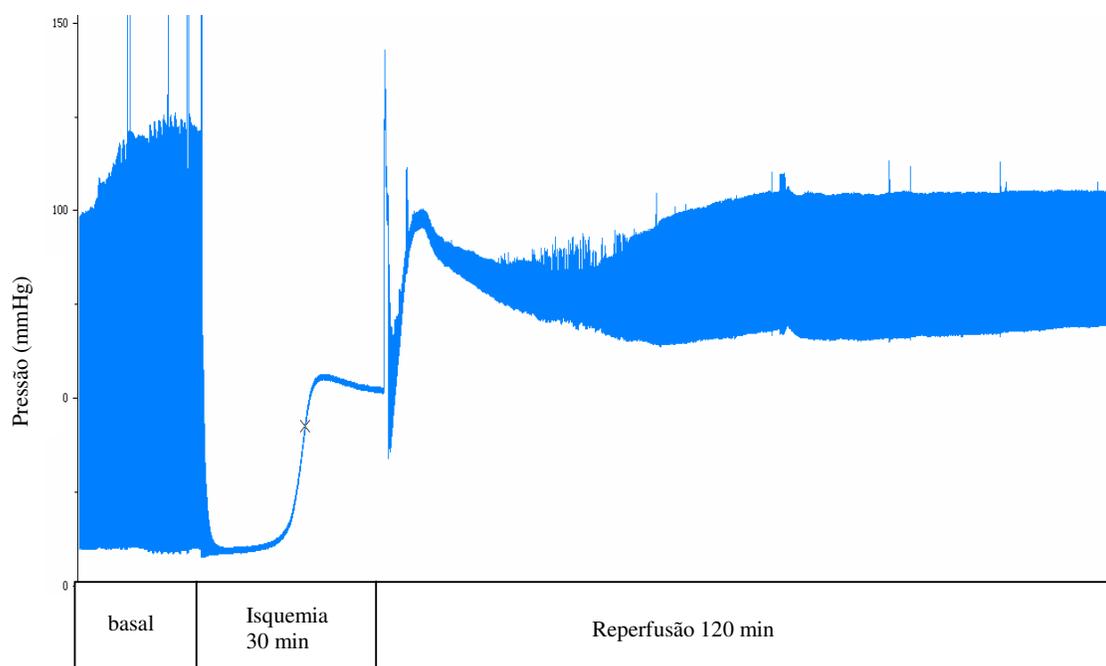


Figura 31: Registro representativo da pressão ventricular esquerda do grupo ESP4 tratado com dose única de espironolactona 4 horas antes da aplicação do protocolo de Isquemia/Reperusão.

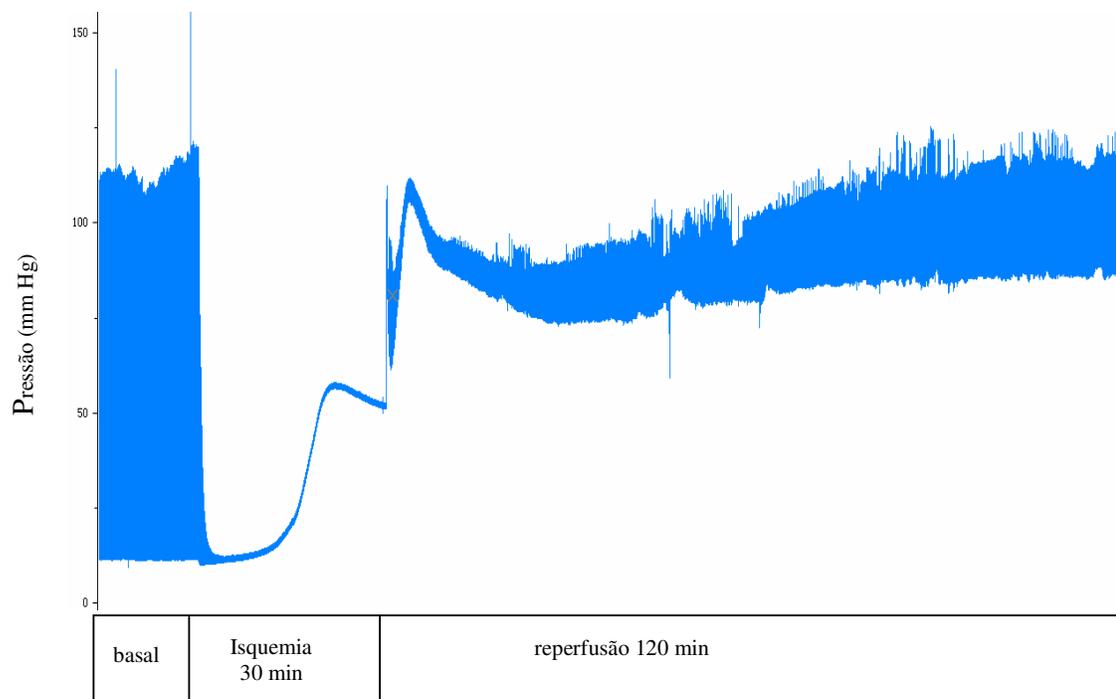


Figura 32: Registro representativo da pressão ventricular esquerda do grupo ESP-24 (tratado com espironolactona em dose única 24 horas antes da aplicação do protocolo de I/R).

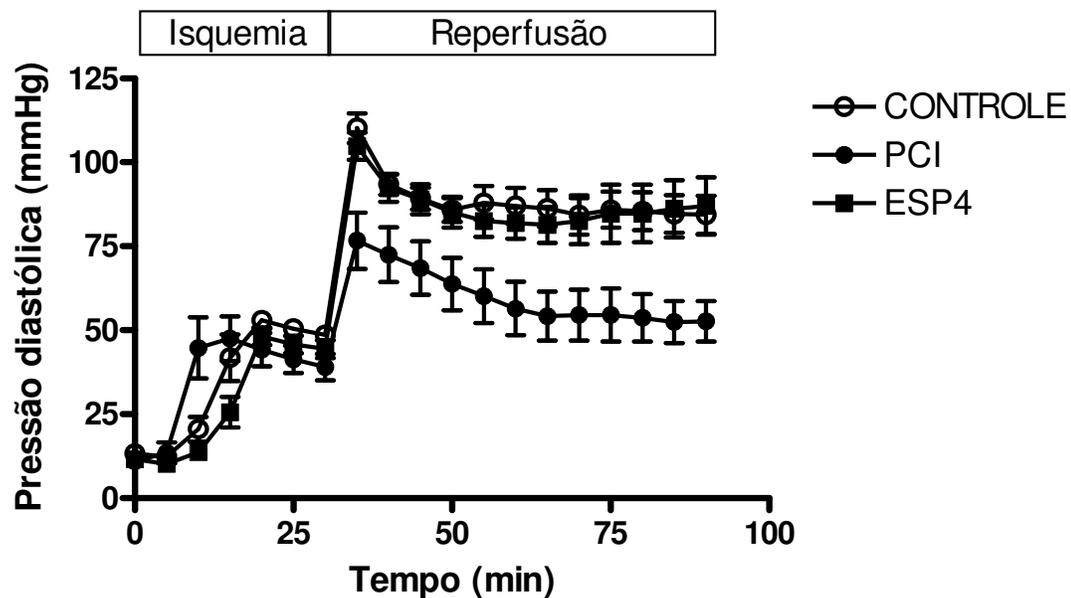


Figura 33: Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo, durante os períodos de isquemia e reperusão, nos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP4 (N=6).

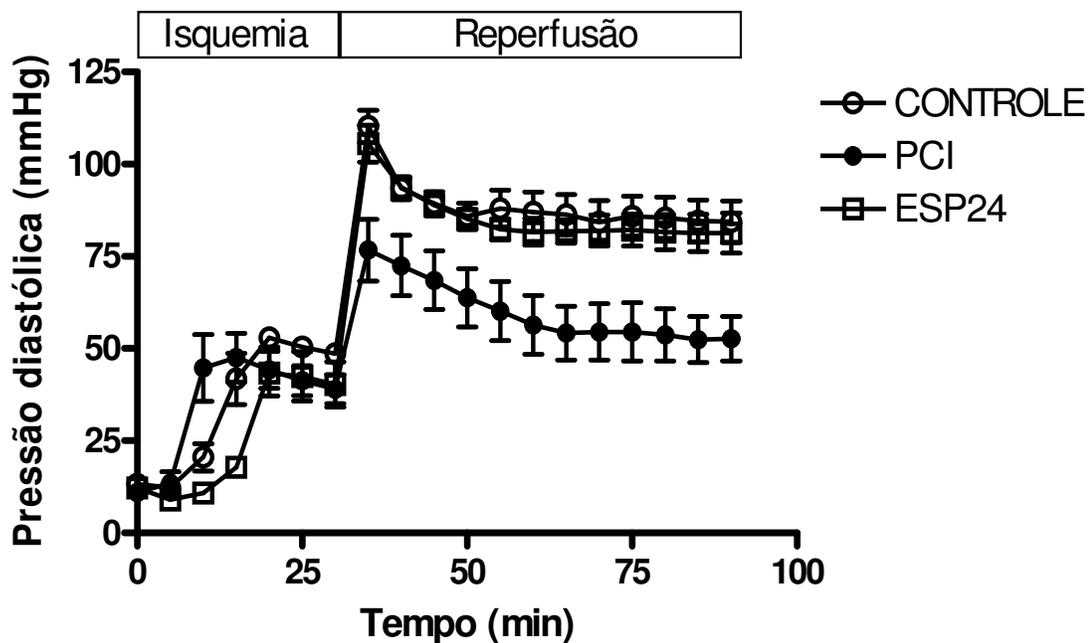


Figura 34: Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo, durante os períodos de isquemia e reperusão, nos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6) e ESP24 (N=5).

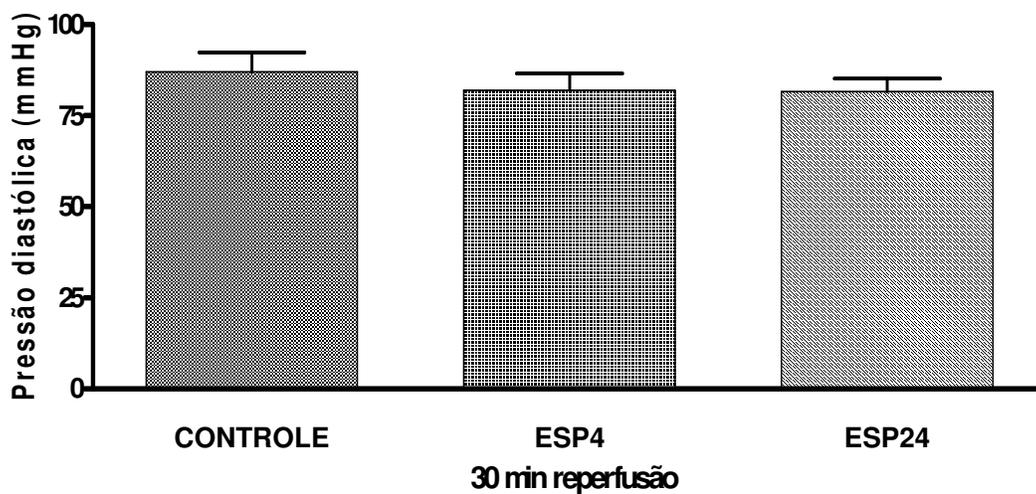


Figura 35: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5). Os tratamentos com a espironolactona não mostraram diferenças comparados ao grupo CONTROLE.

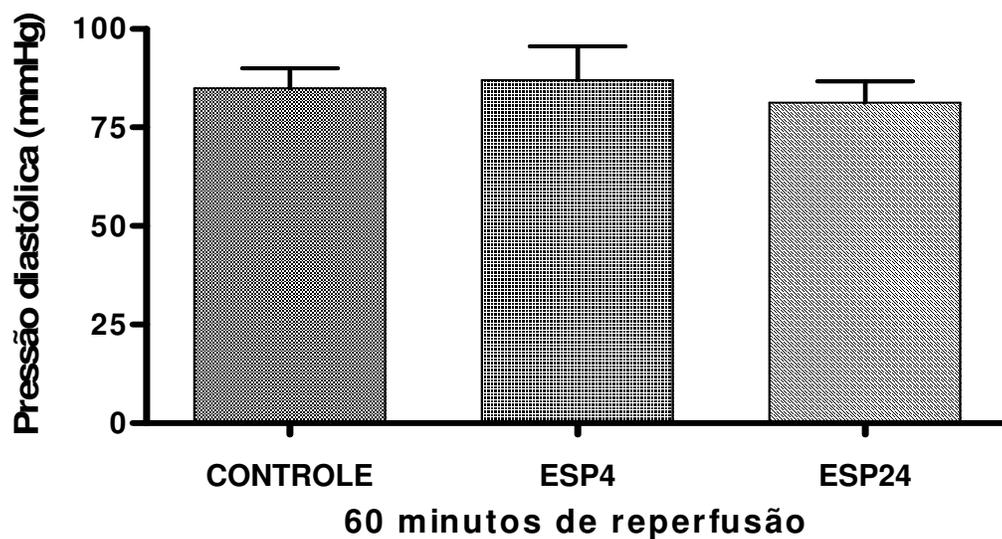


Figura 36: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5). Não houve diferença comparada ao grupo CONTROLE.

Ao avaliarmos a recuperação pós-isquêmica da função contrátil do ventrículo esquerdo verificamos que o tratamento *in vivo* com espironolactona, aplicada 4 ou 24 horas antes da isquemia, não melhorou a recuperação pós-isquêmica da função contrátil (Figura 37). Os valores médios de porcentagem de pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo dos grupos ESP4 e ESP24, medidos aos 30 minutos de reperfusão foram $11,72 \pm 2,03\%$ e $8,13 \pm 2,25\%$, respectivamente. Ambos valores não diferem em relação ao grupo CONTROLE (Figura 38). Os valores médios de %LVDP medidos aos 60 minutos de reperfusão foram $22,09 \pm 6,16\%$ (ESP4) e $19,92 \pm 2,82\%$ (ESP24), que também não mostraram diferença em relação ao grupo CONTROLE (Figura 39).

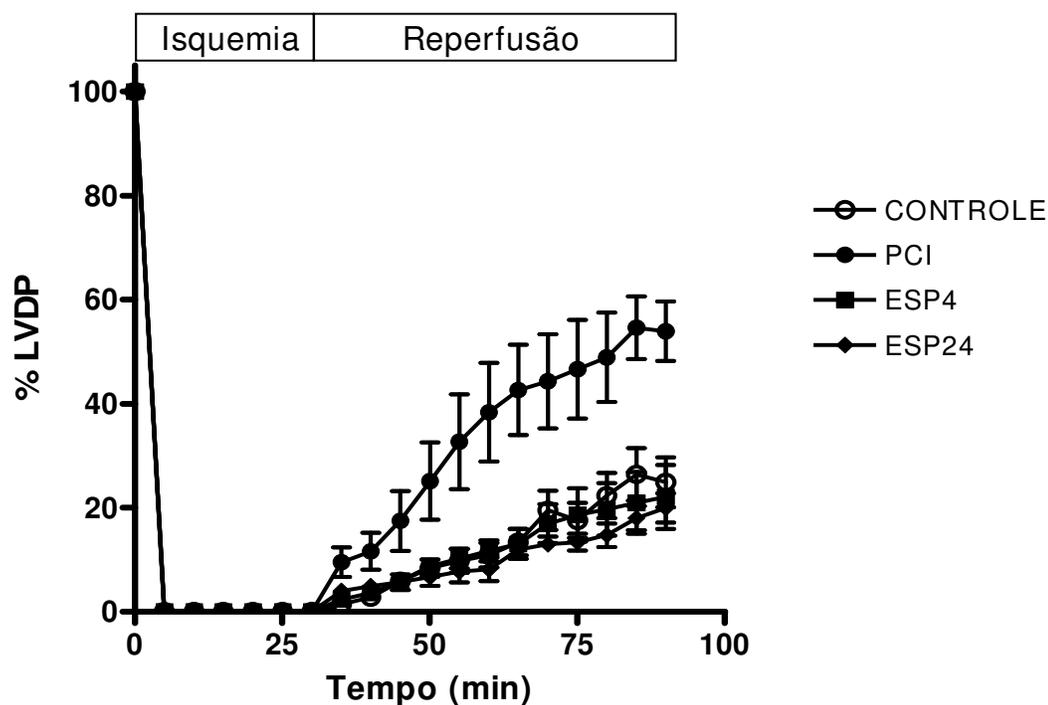


Figura 37: Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) dos grupos CONTROLE (N=9), PCI (N=6), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5), durante os períodos de isquemia e reperfusão.

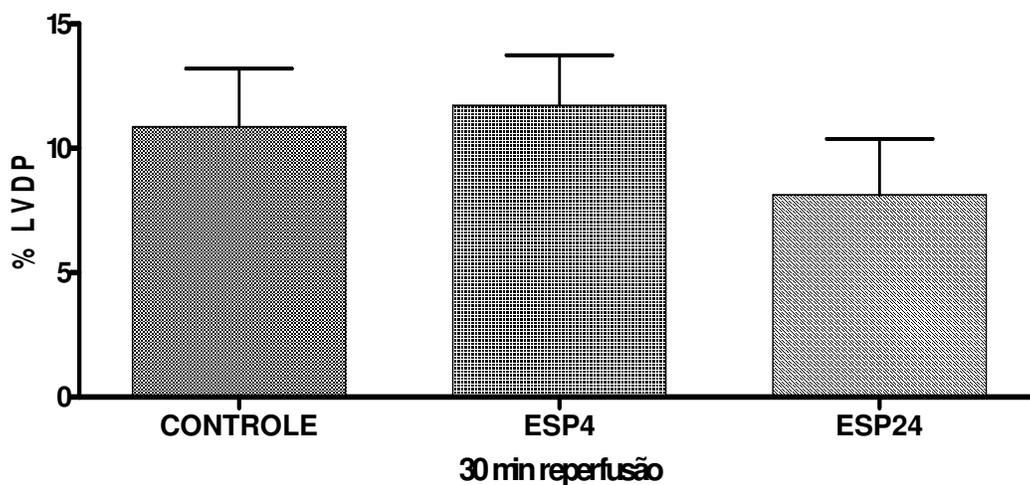


Figura 38: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5). Os grupos ESP4 e ESP24 não apresentaram diferenças, comparados ao grupo CONTROLE.

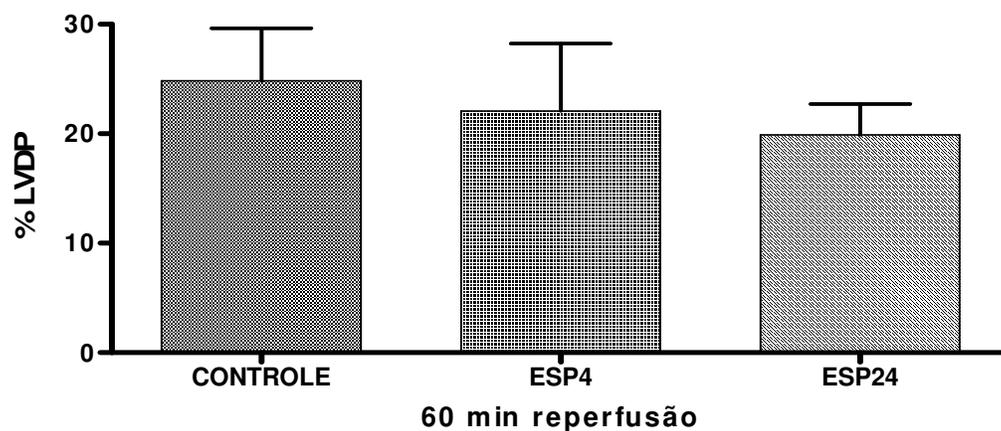


Figura 39: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5). Os grupos ESP4 e ESP24 não apresentaram diferenças, comparados ao grupo CONTROLE.

4.3 BLOQUEIO DA AÇÃO DA ESPIRONOLACTONA

Na tentativa de verificarmos a participação dos canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) no mecanismo de pré-condicionamento farmacológico pela espironolactona, utilizamos as drogas 5-HD, um bloqueador seletivo do canal K_{ATP} mitocondrial ($mitoK_{ATP}$) e a glibenclamida, um bloqueador não seletivo de canais K_{ATP} , na tentativa de bloquear a ação da espironolactona.

4.3.1 AÇÃO DO 5-HD NO PRÉ-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO PELA ESPIRONOLACTONA

A figura 40 mostra o registro da pressão do ventrículo esquerdo durante a realização do protocolo experimental no grupo 5HD. A perfusão de $100\mu M$ de 5-HD juntamente com a espironolactona no período pré-isquemia removeu o efeito atenuador da espironolactona sobre a contratatura pós-isquêmica (Figura 41). As figuras 42 e 43 mostram os valores médios da pressão diastólica do grupo 5-HD, medida aos 30 min. ($85,64 \pm 6,97$ mmHg) e aos 60 min. ($90,07 \pm 6,14$ mmHg) de reperfusão, respectivamente. Estes valores foram significativamente maiores que os valores correspondentes do grupo ESP-PRE ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), mas não diferiram estatisticamente dos respectivos valores obtidos no grupo CONTROLE. Logo, o bloqueio do canal $mitoK_{ATP}$ no período pré-isquêmico causou redução da ação cardioprotetora do pré-condicionamento com espironolactona sobre a contratatura pós-isquêmica do VE.

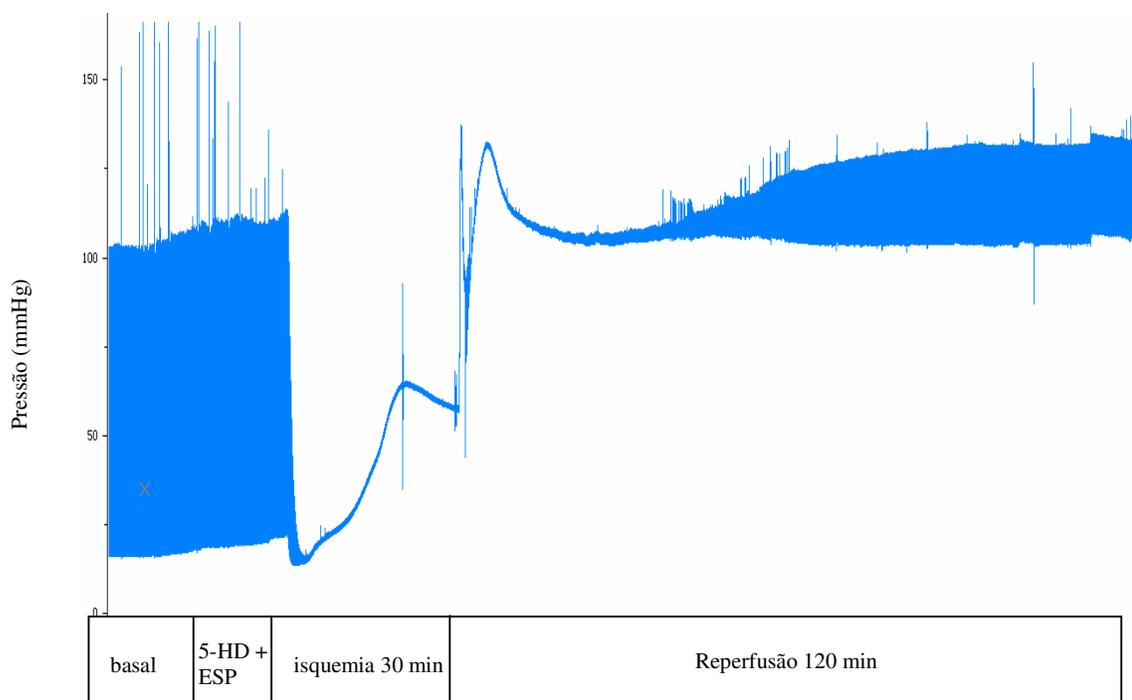


Figura 40: Registro representativo da pressão ventricular esquerda do grupo de corações pré-tratados com espironolactona, na presença de 5-HD (100 μ M) antes da aplicação do protocolo de isquemia reperusão.

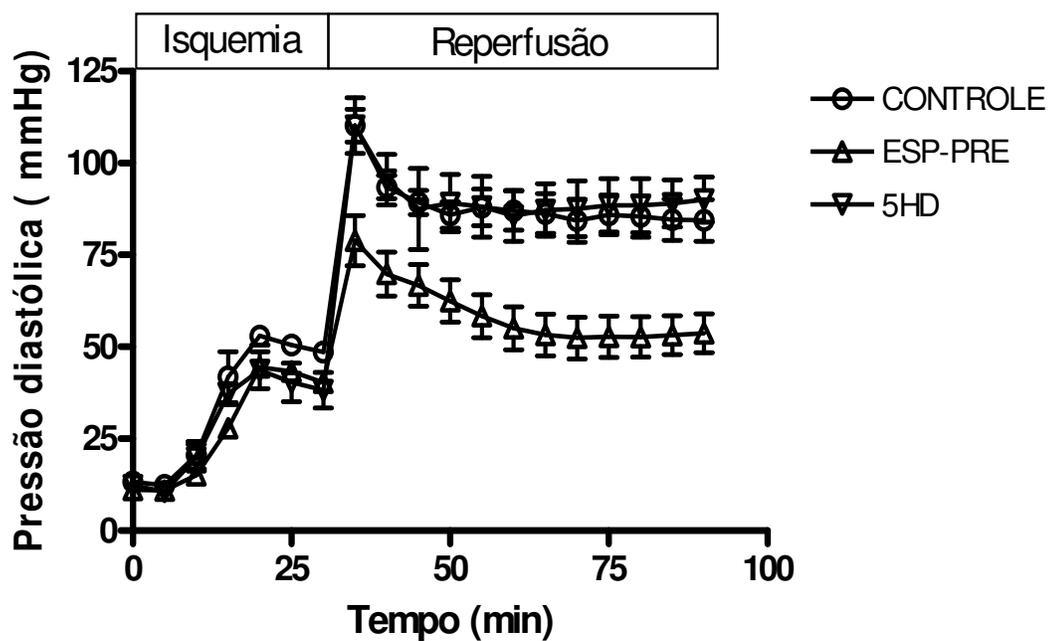


Figura 41: Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo, durante os períodos de isquemia e reperusão, nos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5-HD (N=5).

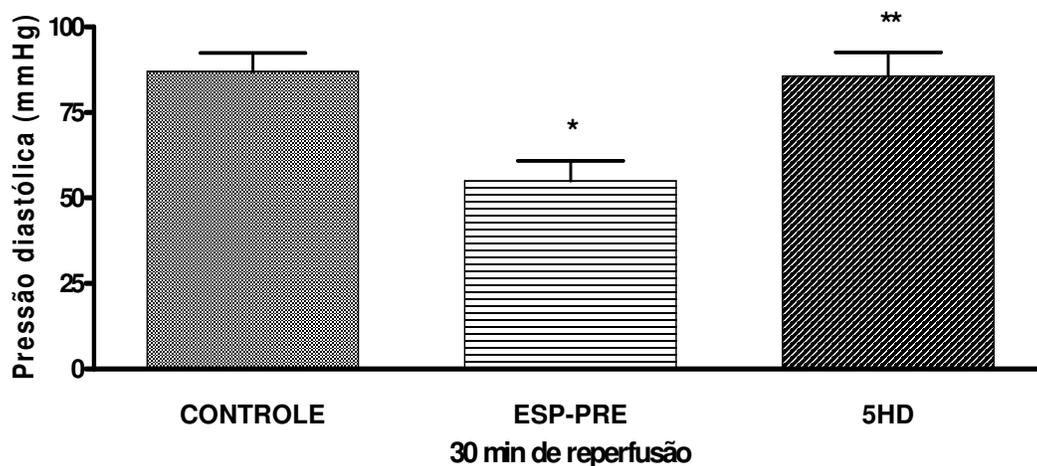


Figura 42: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5HD (N=5). *P < 0,01 comparado ao CONTROLE e **P < 0.05 comparado ao grupo ESP-PRE.

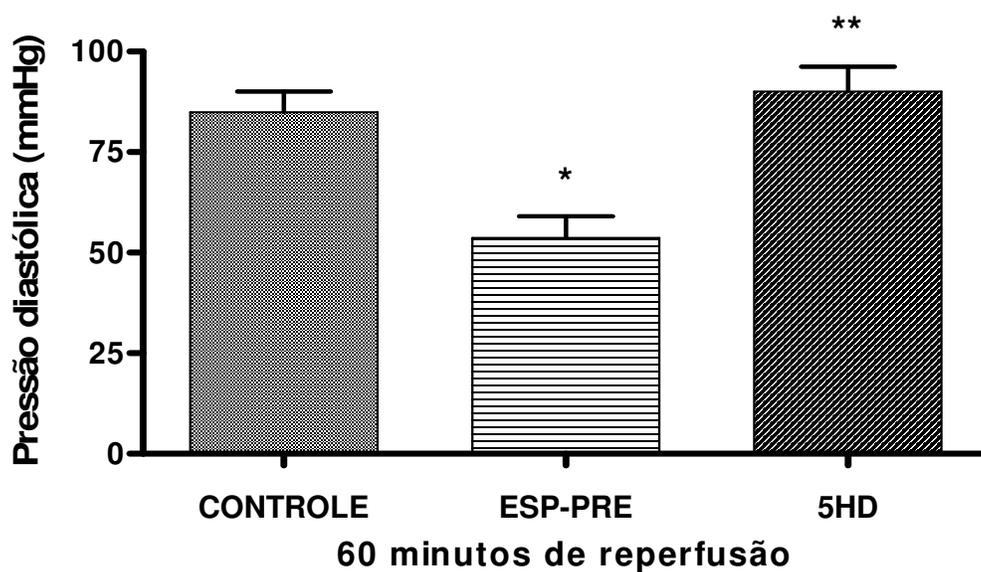


Figura 43: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5HD (N=5). *P < 0.01 comparado ao grupo CONTROLE e **P < 0,001 comparado ao grupo ESP-PRE.

A perfusão da espironolactona na presença de 100 μM de 5-HD, antes da isquemia, resultou em menor recuperação da função contrátil do ventrículo esquerdo durante a reperfusão, sendo similar ao grupo controle (Figura 44). A %LVDP do grupo 5-HD, medida aos 30 min. e 60 min. de reperfusão foram respectivamente $7,39 \pm 1,69 \%$ (Figura 45) e $18,49 \pm 4,44\%$ (Figura 46), não apresentando diferenças significativas quando comparadas ao grupo CONTROLE, mas sendo significativamente menores do que o grupo ESP-PRE ($p < 0,001$). De acordo com esses dados, o bloqueio dos canais mitoK_{ATP}, pelo uso do 5-HD, bloqueou a melhora da função contrátil pós-isquêmica do VE gerada pelo pré-condicionamento farmacológico com espironolactona.

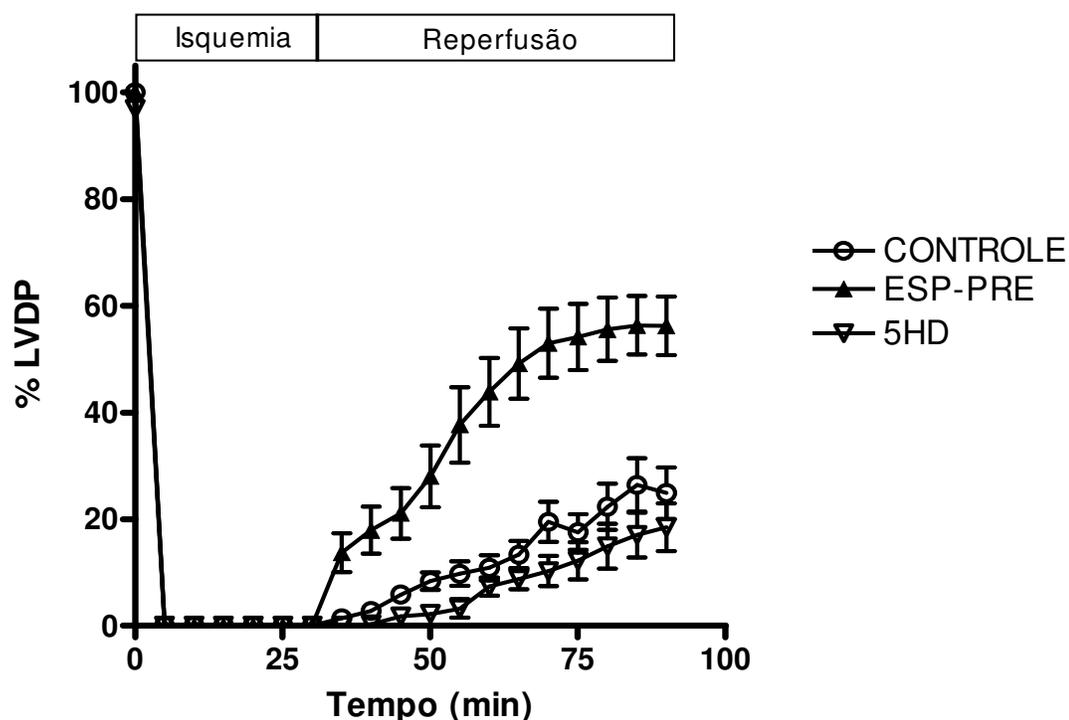


Figura 44: Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5HD(N=5), durante os períodos de isquemia e reperfusão.

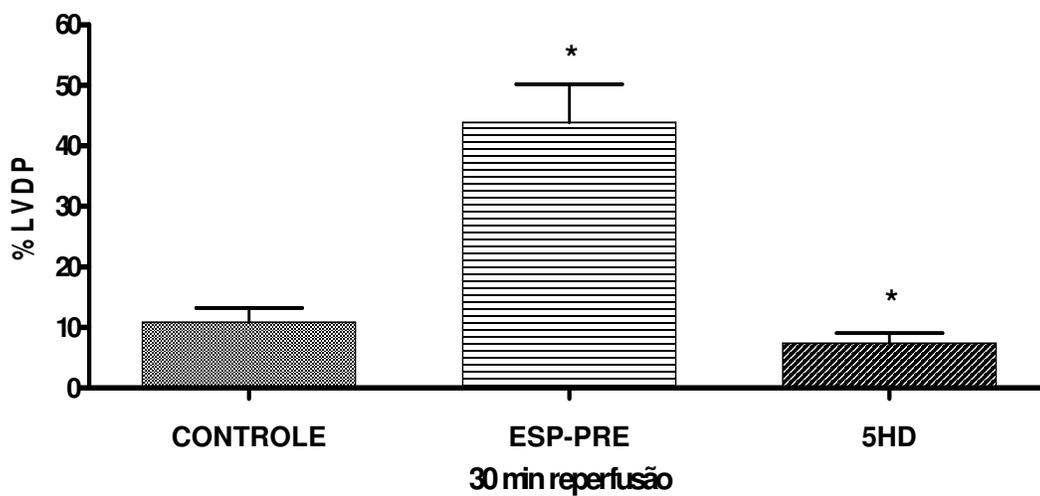


Figura 45: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 30 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5HD(N=5). *P < 0,001 ESP-PRE vs. CONTROLE e 5-HD vs. ESP-PRE.

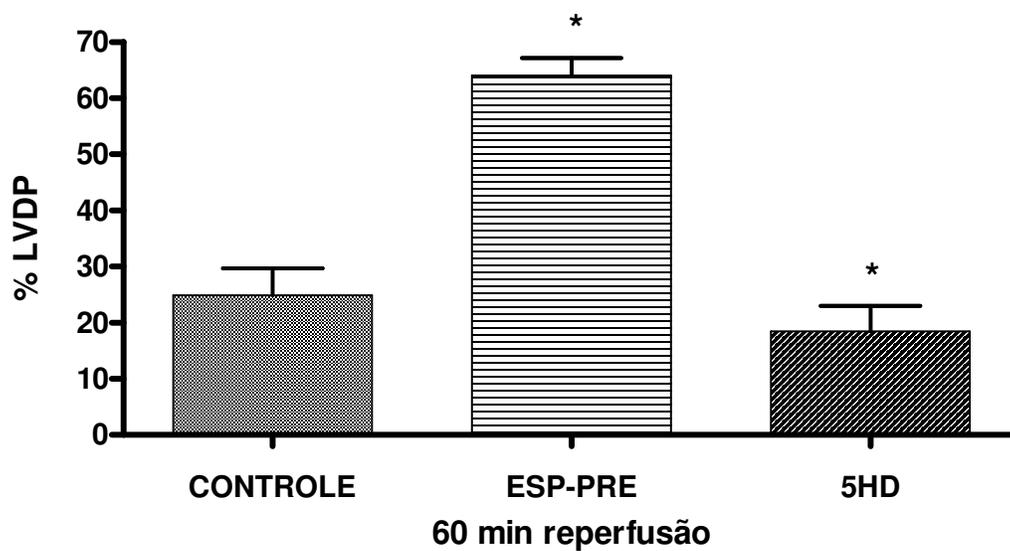


Figura 46: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e 5HD(N=5). *P < 0,001 para ESP-PRE vs. CONTROLE e 5-HD vs. ESP-P,RE.

4.3.2 AÇÃO DA GLIBENCLAMIDA NO PRÉ-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO PELA ESPIRONOLACTONA .

Nesse estudo foi utilizada a concentração de 10 μ M da glibenclamida devido aos nossos experimentos controles demonstrarem que a concentração do veículo DMSO presente na solução de Krebs com concentração de glibenclamida maior que 10 μ M produzia efeito deletério no coração no período de reperfusão, ocasionando aumento da pressão diastólica e diminuição da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, como pode ser verificada nos registros da pressão intraventricular nas figuras 48 e 49. A figura 47 representa o registro de pressão de um coração pertencente ao grupo GLY. A perfusão de 10 μ M de glibenclamida (bloqueador não seletivo de canais K_{ATP}) juntamente com a espironolactona no período pré-isquêmico não bloqueou o efeito da espironolactona de atenuar o aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo durante o período de reperfusão (Figura 50). O grupo GLY apresentou pressão diastólica de $35,34 \pm 6,62$ mmHg aos 30 min. de reperfusão (Figura 51) e $43,47 \pm 5,87$ mmHg aos 60 min. de reperfusão (Figura 52). Estes valores foram significativamente menores que os respectivos valores do grupo CONTROLE ($p < 0,001$) e não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos do grupo ESP-PRE.

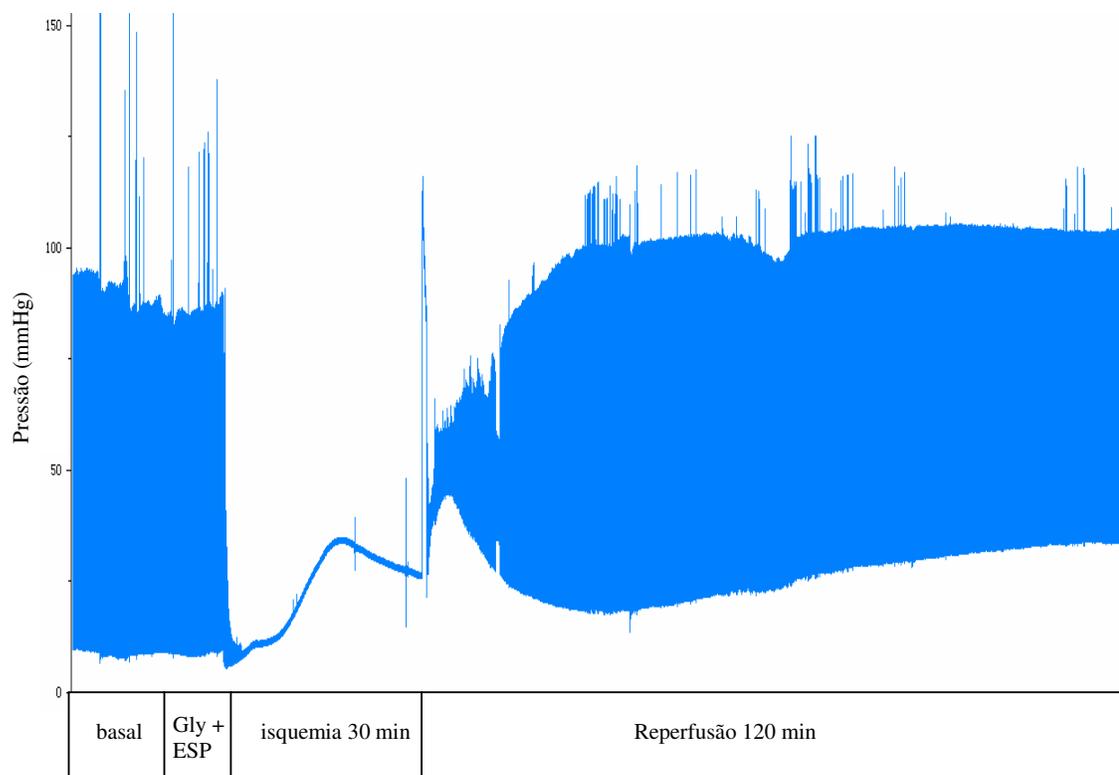


Figura 47: Registro representativo da pressão ventricular esquerda dos corações do grupo GLY, pré-tratados com espironolactona em presença de glibenclamida ($10 \mu\text{M}$), antes da aplicação do protocolo de isquemia e reperusão.

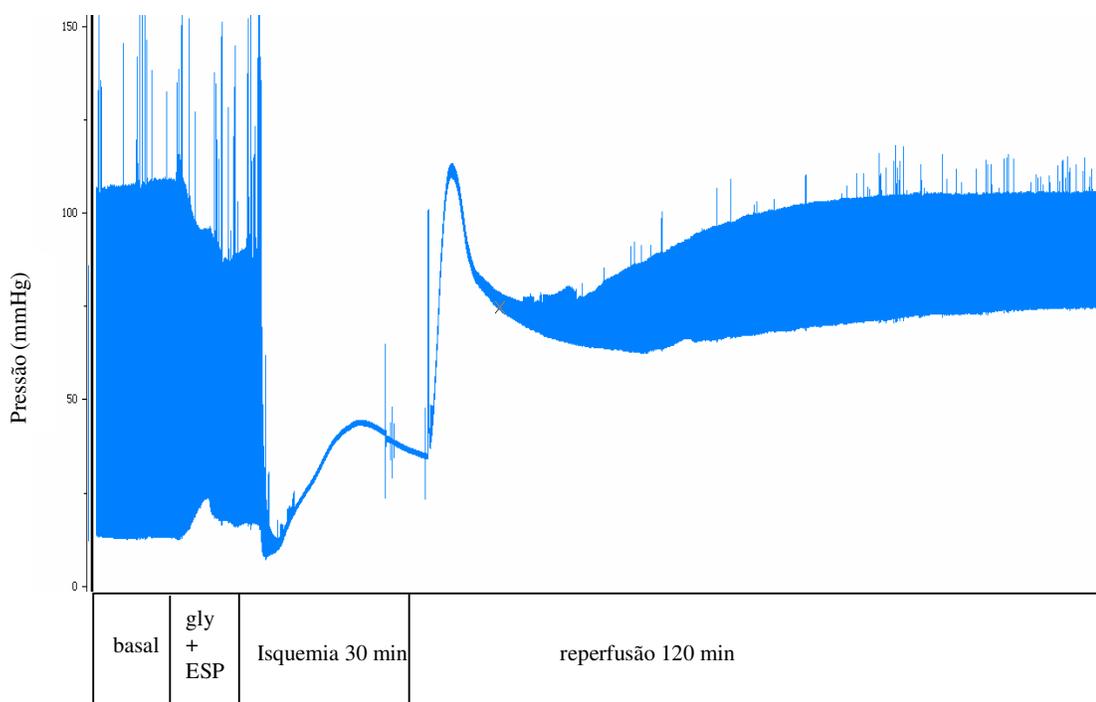


Figura 48: Registro representativo da pressão ventricular esquerda de corações pré-tratados com espironolactona em presença de 100 μM de glibenclamida, imediatamente antes da aplicação do protocolo de isquemia e reperfusão. Houve aumento da pressão diastólica e diminuição do retorno da função do ventrículo esquerdo na reperfusão.

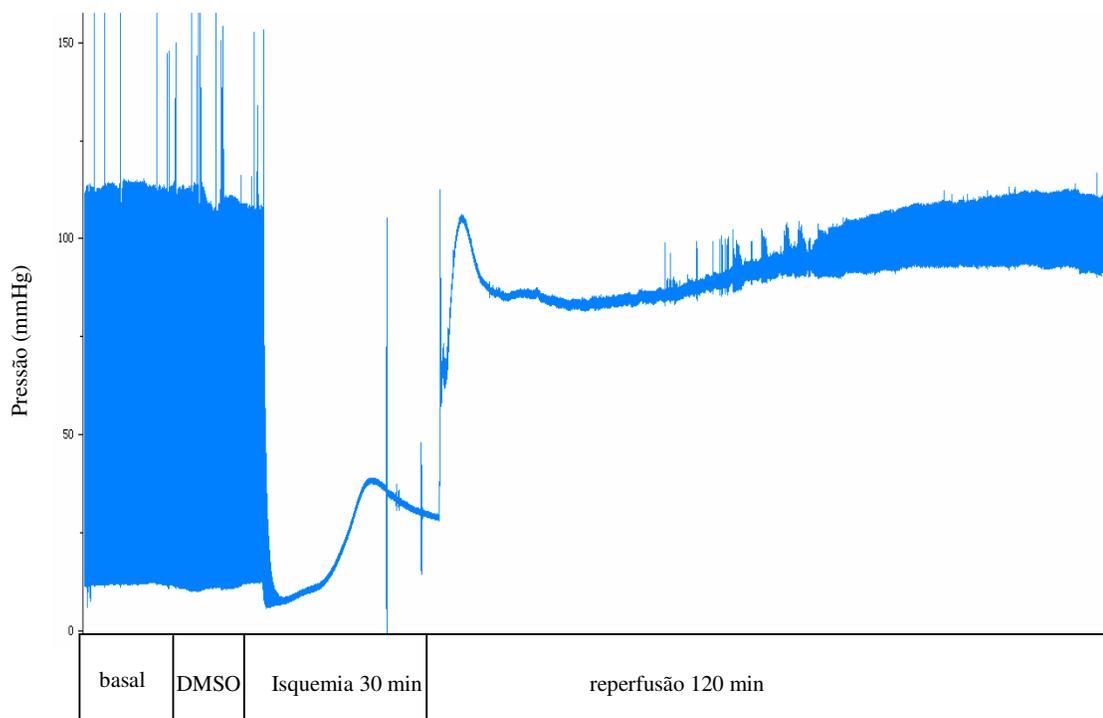


Figura 49: Registro representativo da pressão ventricular esquerda de corações pré-tratados com 375 μl de DMSO (correspondente ao volume de DMSO presente na solução com 100 μM de glibenclamida), por 15 minutos antes da aplicação do protocolo de isquemia e reperfusão.

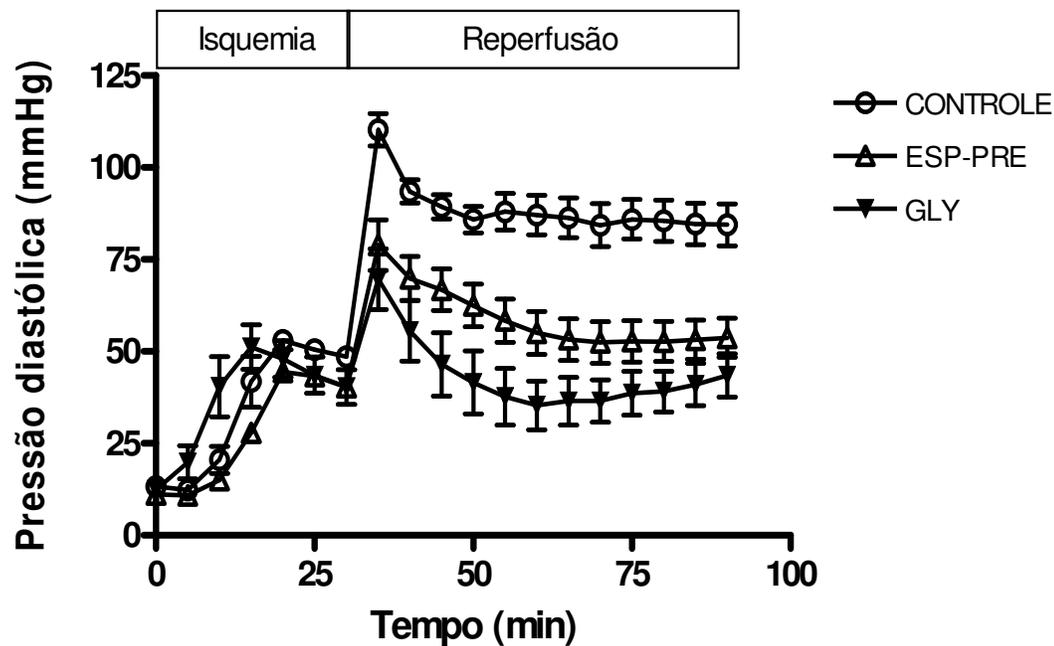


Figura 50: Curso temporal da variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5), durante os períodos de isquemia e reperusão.

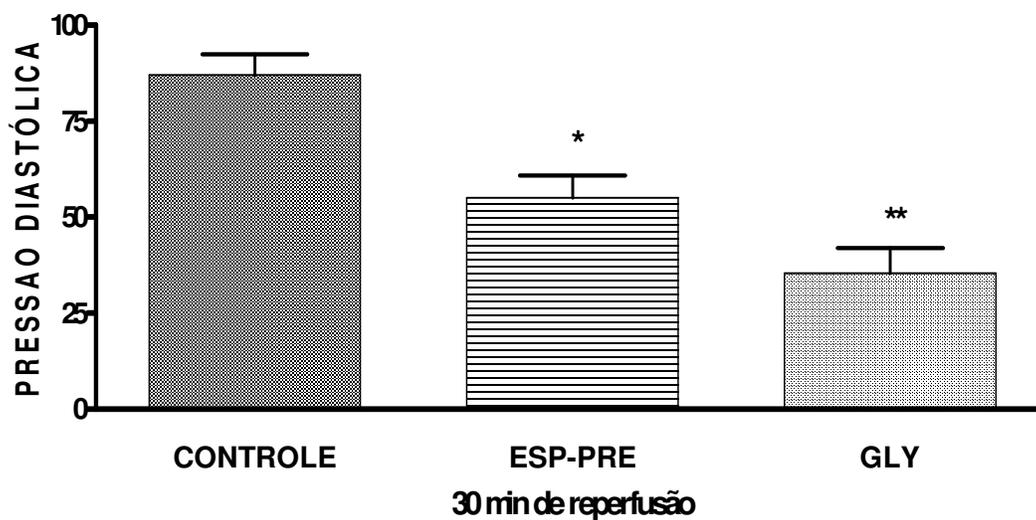


Figura 51: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 30 min. de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5). *P < 0,01 e **P < 0,001 quando comparados ao grupo CONTROLE.

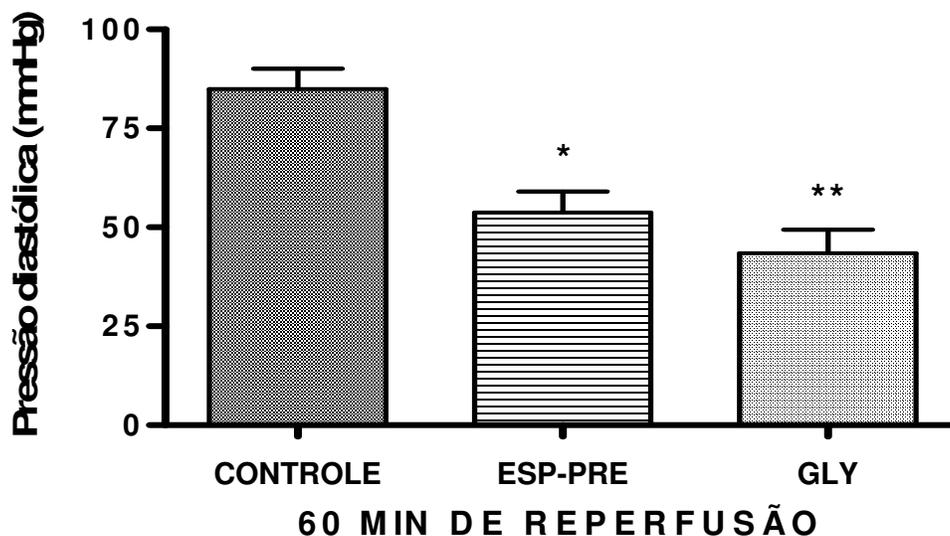


Figura 52: Pressão diastólica do ventrículo esquerdo aos 60 min. de reperfusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5). *P < 0,01 e **P < 0.001 em relação ao grupo CONTROLE.

A glibenclamida também não bloqueou os efeitos do tratamento pré-isquêmico com a espironolactona sobre a recuperação pós-isquêmica da função contrátil do ventrículo esquerdo. Como mostra a figura 53, o grupo tratado com espironolactona + glibenclamida (GLY), no período pré-isquemia, apresentou maior recuperação da pressão ventricular esquerda do que o grupo tratado somente com espironolactona (ESP-PRE). Os valores médios de %LVDP do grupo GLY medidos aos 30 e 60 minutos de reperfusão foram, respectivamente: $73,59 \pm 9,60$ % e $75,35 \pm 5,88$ % (figuras 54 e 55) Estes valores médios foram significativamente maiores que os respectivos valores do grupo CONTROLE ($p < 0,001$) e também significativamente maior do que o grupo ESP-PRE, quando comparados as %LVDP medidas aos 30 minutos de reperfusão ($p < 0,01$). Assim, $10 \mu\text{M}$ de glibenclamida além de não bloquear, potencializou os efeitos do pré-condicionamento com espironolactona.

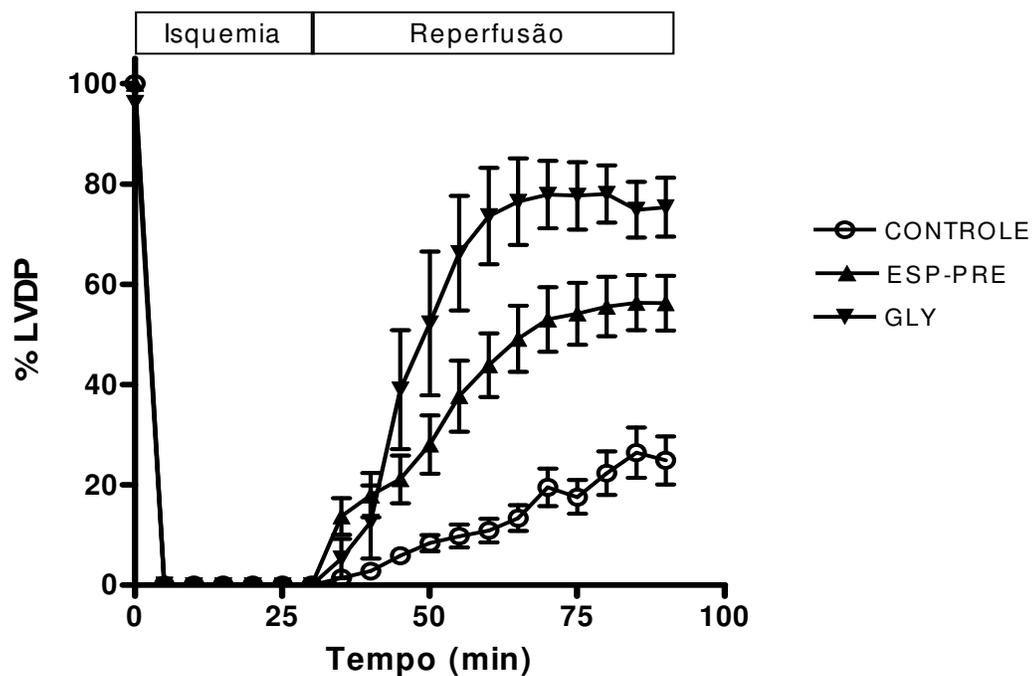


Figura 53: Curso temporal da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5), durante os períodos de isquemia e reperfusão.

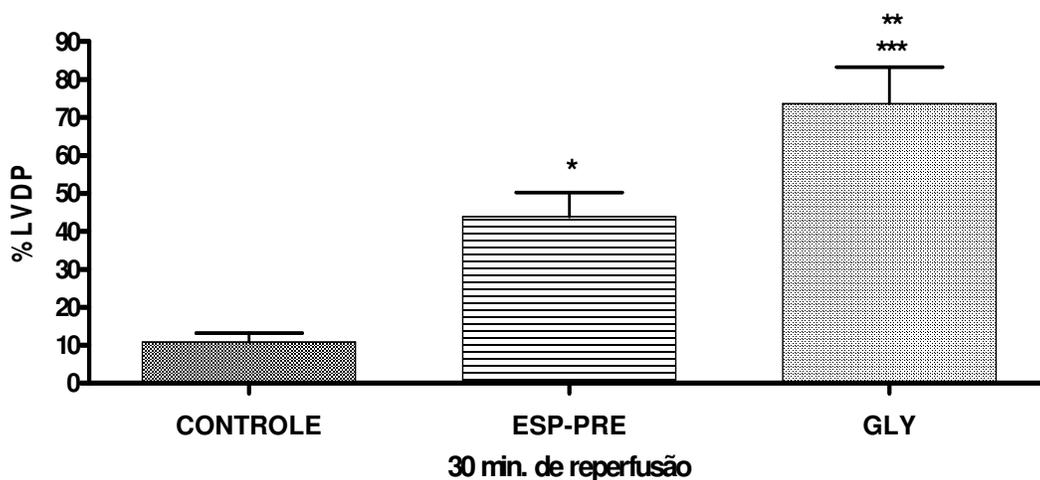


Figura 54: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) aos 30 minutos de reperfusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5). *P < 0,01 e **P < 0,001 em relação ao grupo CONTROLE. ***P < 0,01 em relação ao grupo ESP-PRE.

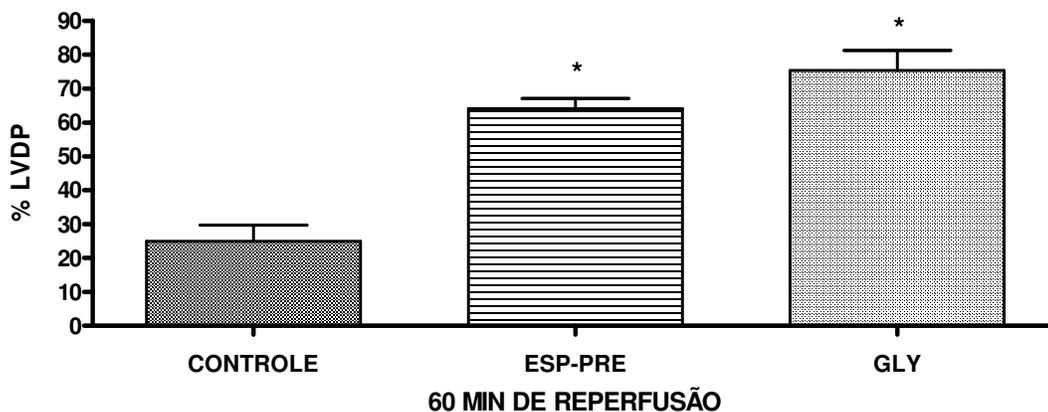


Figura 55: Porcentagem de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%LVDP) aos 60 minutos de reperusão dos grupos CONTROLE (N=9), ESP-PRE (N=12) e GLY (N=5). *P < 0,001 comparado ao controle.

4.4 ÁREA DE INFARTO

4.4.1 PRE-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO

Na figura 56 pode-se observar que a área de infarto determinada aos 120 min. de reperusão, após 30 min. de isquemia global, foi de $32,33 \pm 4,66$ % no grupo CONTROLE. Como esperado, o pré-condicionamento isquêmico (PCI) reduziu significativamente a área de infarto para $11,39 \pm 1,45$ % ($p < 0,001$).

4.4.2 ESPIRONOLACTONA

O tratamento pré-isquêmico com a espironolactona ($1\mu\text{M}$) também reduziu o tamanho do infarto produzido pela isquemia-reperusão. Como mostrado na figura 56, a área de infarto do grupo ESP-PRE ($14,24 \pm 1,25$ %) foi significativamente menor ($P < 0,001$) que a área de infarto do grupo CONTROLE ($32,33 \pm 4,66$ %) e

não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo PCI ($11,39 \pm 1,45\%$).

A perfusão com espironolactona ($1\mu\text{M}$) imediatamente após o período de isquemia não reduziu o tamanho do infarto produzido pela isquemia-reperfusão (figura 57). A área de infarto do grupo ESP-POS ($45,03 \pm 6,69\%$) não foi significativamente diferente do grupo CONTROLE ($32,33 \pm 4,66\%$).

Como apresentado na figura 57, a administração *in vivo* da espironolactona, em dose única (20mg/kg), 4 e 24 horas antes da isquemia-reperfusão, também não produziu alterações significativas na área de infarto (ESP4: $35,03 \pm 4,58\%$; ESP24: $21,14 \pm 2,95\%$), quando comparados ao grupo CONTROLE.

4.4.3 AÇÃO DOS BLOQUEADORES DE CANAIS K_{ATP}

O grupo tratado com $100\mu\text{M}$ de 5-HD antes e durante a perfusão da espironolactona ($1\mu\text{M}$), antes da isquemia-reperfusão, apresentou área de infarto ($36,22 \pm 4,92\%$) significativamente maior ($P < 0,001$) que a do grupo tratado somente com a espironolactona ($p < 0,001$), porém sem diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE (figura 58). Esse resultado demonstra que o bloqueio do canal mito K_{ATP} inibiu o efeito da espironolactona sobre a área de infarto.

O tratamento com a glibenclamida ($10\mu\text{M}$) antes e durante a perfusão da espironolactona ($1\mu\text{M}$), antes da isquemia, reduziu o tamanho do infarto produzido pela isquemia-reperfusão. A área de infarto do grupo GLY ($5,81 \pm 0,86\%$) foi significativamente menor ($P < 0,001$) que a do grupo CONTROLE e não teve diferença significativa em relação o grupo ESP-PRE (figura 58). Sendo assim, o bloqueio não seletivo dos canais K_{ATP} pela glibenclamida não afetou a redução da área de infarto gerado pela espironolactona.

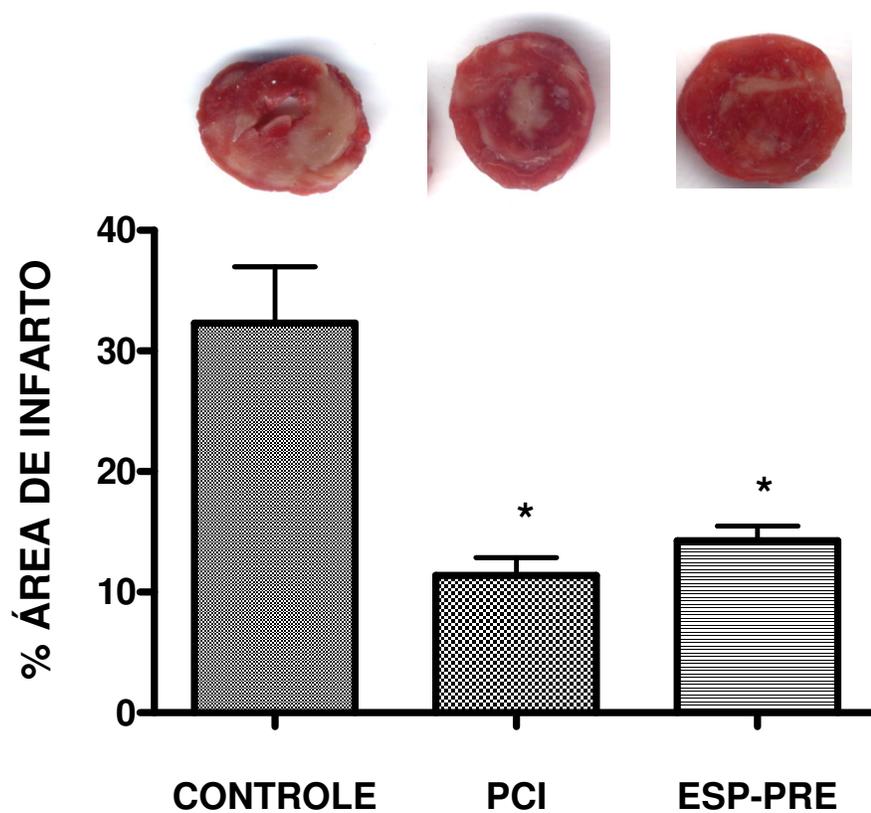


FIGURA 56: Imagens representativas de cortes dos corações dos grupos Controle (N=8), PCI (N=) e ESP-PRE (N=11), corados com TTC. As áreas brancas ou amareladas representam as áreas de infarto. O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos três grupos experimentais. O tamanho do infarto foi calculado como descrito em Materiais e Métodos. *P < 0,001 comparado ao grupo Controle.

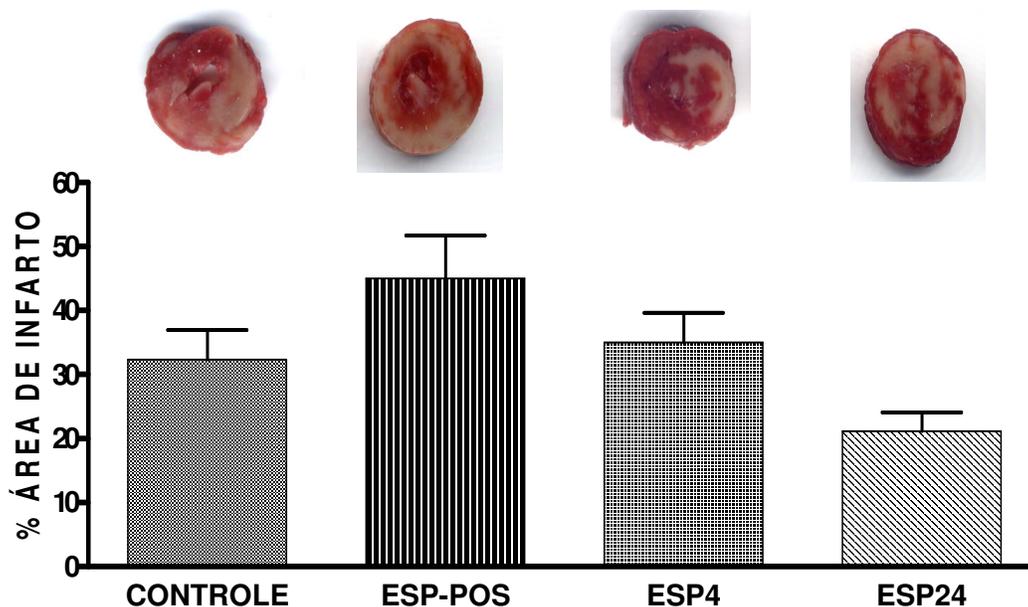


Figura 57: Imagens representativas de cortes dos corações, corados com TTC, dos grupos CONTROLE (N=8), ESP-POS (N= 5), ESP4 (N=6) e ESP24 (N=5). O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos corações. Não há diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE.

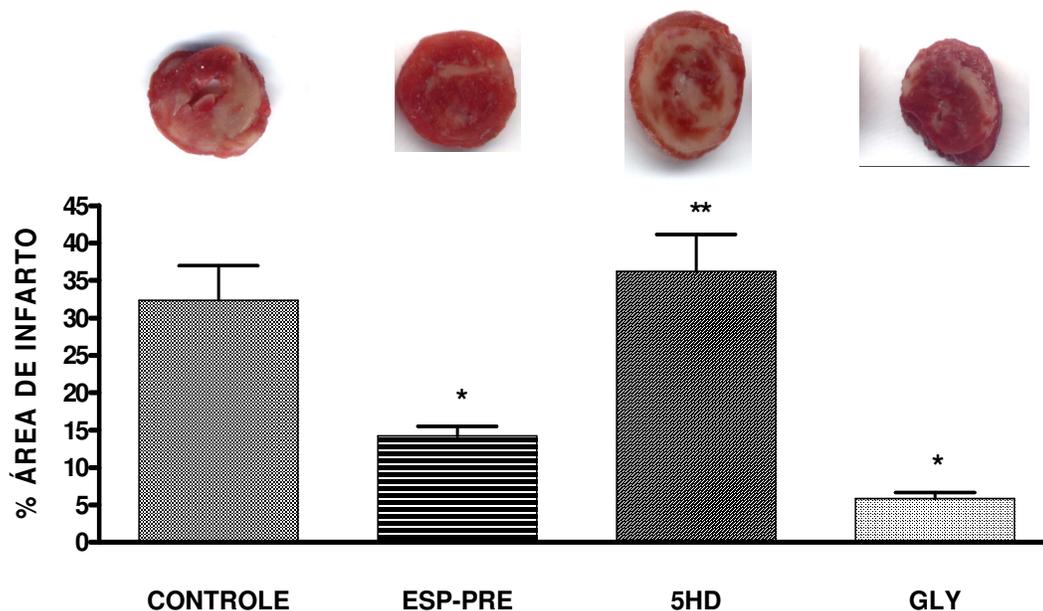


Figura 58: Imagens representativas de cortes dos corações, corados com TTC, dos grupos CONTROLE (N=8), ESP-PRE (N=11), 5HD (N=6) e GLY (N=6). O gráfico representa o tamanho médio do infarto dos corações. *P < 0,001 comparado ao grupo CONTROLE. **P<0,001 comparado ao grupo ESP-PRE.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos cardioprotetores da espironolactona, antagonista de receptor de mineralocorticóides, em coração isolado de rato submetido a 30 minutos de isquemia global seguidos de 120 minutos de reperfusão. Os nossos resultados demonstraram que a perfusão de 1 μ M de espironolactona durante 10 minutos imediatamente antes da isquemia reduz a contratatura pós-isquêmica (figuras 18, 19 e 20), aumenta a magnitude da recuperação da função contrátil do ventrículo esquerdo durante a reperfusão (figuras 21, 22 e 23) e reduz o tamanho do infarto medido ao final da reperfusão (figura 56). Adicionalmente, nossos dados mostraram que a proteção induzida pela espironolactona envolve a ativação de canais K_{ATP} mitocondriais (figuras 41-46 e 58).

Os efeitos cardioprotetores da aplicação pré-isquêmica da espironolactona foram similares aos observados nos corações que foram submetidos ao pré-condicionamento isquêmico antes da isquemia de 30 minutos. Desde o trabalho primordial de Murry e cols. (1986), inúmeros estudos têm demonstrado em diferentes espécies, inclusive em humanos, que diferentes protocolos de pré-condicionamento isquêmico, com diferentes durações e número de ciclos de isquemia e reperfusão, são eficazes em promover proteção contra as lesões de isquemia e reperfusão miocárdica (Schott e cols., 1990; Liu & Downey, 1992; Leeser e cols., 1997; Serejo e cols., 2007).

O pré-condicionamento farmacológico com diferentes drogas pode também induzir proteção contra lesões de isquemia e reperfusão miocárdica (Baines e cols., 1999; Pain e cols., 2000; Zaugg e cols., 2002). Chai e cols. (2005) relataram ação protetora da espironolactona em coração isolado de rato submetido a 45 min. de isquemia regional, por ligadura da artéria coronária esquerda descendente anterior.

Eles observaram uma melhor recuperação da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo durante a reperfusão e menor área de infarto, quando o coração era perfundido com 100 nM de espironolactona durante 15 minutos antes da isquemia. Outro trabalho do mesmo grupo (Chai e cols., 2006), demonstrou cardioproteção similar ao utilizar a eplerenona, bloqueador de receptor de mineralocorticóide mais seletivo, perfundida sozinha ou juntamente com aldosterona no período imediatamente anterior a isquemia. Em nosso estudo, conseguimos reproduzir os efeitos da espironolactona descritos no estudo de Chai e cols. (2005), entretanto, em nosso modelo experimental usamos o método de perfusão do coração isolado a fluxo constante, com isquemia global de 30 minutos e 120 minutos de reperfusão. Outras diferenças entre nosso estudo experimental e o de Chai e cols. (2005), foram a concentração de espironolactona dez vezes maior (1 μ M) e o tempo de perfusão menor (10 minutos) usados em nossos protocolos experimentais. Nossos resultados (figuras 18, 19 e 20) mostraram aumentos progressivos da pressão diastólica durante a isquemia miocárdica (contratura isquêmica) e reperfusão (contratura pós-isquêmica) mais pronunciados que os relatados no trabalho de Chai e cols. (2005). Entretanto, corroborando com os dados desse grupo nosso estudo mostrou resultados similares, em que a perfusão pré-isquêmica de 1 μ M de espironolactona induziu proteção cardíaca, evidenciada pela redução das contraturas isquêmica e pós-isquêmica, melhora do desempenho contrátil e redução da área de necrose.

A contratura isquêmica é devido primariamente ao rigor miofibrilar em resposta a depleção de ATP nos cardiomiócitos (Piper e cols., 1998). O início da reperfusão miocárdica e conseqüente reoxigenação celular restabelece rapidamente o suprimento de ATP, que na presença de alta concentração de Ca^{2+} intracelular acumulado durante a isquemia, ativa os miofilamentos, produzindo um incremento adicional na pressão diastólica, a contratura pós-isquêmica (Piper e cols., 1998;

Ladilov e cols., 2003). Ambas contraturas, isquêmica e pós-isquêmica, podem causar lesões e morte celular ao produzir hipercontratura celular que resulte em rompimento sarcolemal (Piper e cols., 1998). A espironolactona, ao reduzir a contratura miocárdica, reduziria o risco de lesão sarcolemal e morte celular, refletindo em melhor recuperação da força contrátil e menor área de infarto. Mironneau (1990) demonstrou antagonismo da espironolactona sobre a contratilidade e a corrente de cálcio de músculo liso vascular. Costa e cols. (2007) mostraram em cardiomiócitos isolados a inibição da corrente de Ca^{2+} tipo L e a redução do transiente intracelular de Ca^{2+} pela canrenona, um metabólito ativo da espironolactona. O bloqueio do influxo de cálcio pela espironolactona ou seu metabólito poderia reduzir a sobrecarga de cálcio citosólico na isquemia miocárdica, diminuindo a contraturas isquêmica e pós-isquêmica.

Os parâmetros mais frequentemente utilizados na avaliação das lesões pós-isquêmicas de coração isolado submetido à isquemia e reperfusão miocárdica são a recuperação da força contrátil e o tamanho do infarto. Entretanto, alguns estudos sugerem que a redução do tamanho do infarto é um parâmetro mais confiável do que a recuperação funcional na avaliação de mecanismos cardioprotetores (Gelpi e cols., 2002; Lochner e cols., 2003). Esses autores argumentam que a função contrátil após um evento de isquemia/reperfusão expressa dois tipos de atordoamento do miocárdio: um relacionado a produção de radicais livres e o outro ao tecido sobrevivente. O primeiro não é atenuado pelo pré-condicionamento, enquanto o segundo é afetado primariamente pelo pré-condicionamento. Em nosso estudo, o pré-condicionamento farmacológico com a espironolactona aumentou a recuperação da função contrátil e diminuiu o tamanho do infarto (figuras 21, 23 e 56). Esses efeitos da espironolactona poderiam ser explicados por uma inibição da produção de radicais livres e/ou inibição de mecanismos de morte celular. Mejía-Villet e cols.

(2007) mostraram proteção renal induzida pela espironolactona, caracterizado pela redução do estresse oxidativo, em rim sujeito a isquemia/reperfusão. William e cols. (2006) mostraram uma ação anti-apoptótica da espironolactona em células endoteliais submetidas à deprivação de soro, através da inibição da atividade da caspase-3, da liberação de citocromo C e da clivagem da poli(ADP-ribose) polimerase nuclear. Costa e cols. (2006) relataram uma ação anti-apoptótica da canrenona, principal metabólito da espironolactona, em miócitos ventriculares de ratos expostos a aldosterona.

Nossos resultados mostraram que o bloqueio de canais K_{ATP} mitocondriais pelo 5-HD, um antagonista seletivo de canais K_{ATP} mitocondriais, reverteu os efeitos benéficos de redução da contratatura pós-isquêmica, aumento da recuperação da função contrátil e redução do tamanho do infarto promovidos pela espironolactona (figuras 41-46 e 58). Este dado sugere uma participação importante dos canais $mitoK_{ATP}$ no mecanismo de pré-condicionamento farmacológico pela espironolactona.

Vários estudos relatam a participação dos canais K_{ATP} nos mecanismos de pré-condicionamento isquêmico e farmacológico (para revisão ver: Gross & Fryer, 1999; O'Rourke, 2000). Gross & Auchampach (1992) foram os primeiros a mostrarem evidências da participação de canais K_{ATP} no pré-condicionamento isquêmico de coração canino. Essas evidências baseavam-se no fato que drogas ativadoras dos canais K_{ATP} , como diazoxida (Garlid e cols., 1997), cromakalim (Grover e cols., 1990), bimakalim (Yao & Gross, 1994), pinacidil (Gaudette e cols., 2000) e nicorandil (Imagawa e cols., 1998), produziam o mesmo efeito do pré-condicionamento isquêmico, quando perfundidas antes da isquemia, enquanto bloqueadores dos canais K_{ATP} , como glibenclamida e 5-HD (Grover & Gross, 1992), inibiam a cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento isquêmico. Estudos

mais recentes têm mostrado evidências de um papel dominante dos canais K_{ATP} mitocondriais, em detrimento dos canais K_{ATP} sarcolemais, nos mecanismos de pré-condicionamento isquêmico e farmacológico (Garlid e cols., 1997; Liu e cols., 1999; Fryer e cols., 2000; Sato e cols., 2000; O'Rourke, 2000). De acordo com o trabalho de Fryer *ECT al.* (2000), a cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento foi inibida pelo bloqueador seletivo do canal K_{ATP} mitocondrial (5-HD), mas não pelo bloqueador seletivo do canal K_{ATP} sarcolemal (HMR-1098), quando essas drogas foram administradas antes do pré-condicionamento isquêmico. Os corações pré-tratados com diazoxida (um ativador seletivo do canal mito K_{ATP}), também tiveram seus efeitos benéficos diminuídos pela ação do 5-HD, indicando uma participação desse canal no pré-condicionamento farmacológico pela diazoxida. Alguns trabalhos mostraram a participação dos canais K_{ATP} no pré-condicionamento cardíaco em humanos. Ghosh e cols. (2000) demonstraram que a utilização de 5-HD e a glibenclamida bloquearam os efeitos do pré-condicionamento isquêmico em amostras de átrio de corações de pacientes com doença cardíaca isquêmica ou disfunção da válvula aórtica e que ativadores de canais K_{ATP} geraram redução na área de infarto similar ao pré-condicionamento isquêmico.

O mecanismo da cardioproteção induzida por abertura de canais mito K_{ATP} não está bem definido. Segundo alguns autores, a abertura dos canais mito K_{ATP} produziria despolarização da membrana mitocondrial, dissipando o gradiente eletroquímico que determina a recaptção de Ca^{2+} pela mitocôndria. Isto evitaria a sobrecarga de Ca^{2+} e preservaria a função mitocondrial durante a isquemia e reperfusão (Holmuhamedov e cols., 1999; Wang, 1998). Outros sugerem que a ativação dos canais mito K_{ATP} durante a isquemia gera cardioproteção através da prevenção da hidrólise de ATP, sem influenciar a produção de ATP, possibilitando a sua conservação durante a isquemia e possibilitando a diminuição do influxo de Ca^{2+}

para a mitocôndria, o qual em excesso pode produzir lesão mitocondrial (Belisle, 2002; Murata, 2001).

A ativação dos canais de mitoK_{ATP} pode ser desencadeada por ativação da PKC e pode envolver vias dependentes de PKC ϵ e PKG (Ardehali, 2006). Wang e cols. (1999) mostraram possíveis translocações de diversas isoformas de PKC para a mitocôndria e a potencial participação do Ca²⁺ intracelular e da PKC na abertura desses canais. Sato e cols. (2000) utilizando um modelo com células ventriculares, demonstraram que a ativação de receptores para adenosina pode desencadear ativação de canais mitoK_{ATP} por uma via dependente de PKC. Segundo Costa e cols., (2005), que utilizaram mitocôndrias isoladas, a ativação desse canal pode ser desencadeada por ação da PKG tendo como um dos intermediários a PKC ϵ . Adicionalmente, outro estudo (Jaburek e cols., 2006) demonstrou uma persistente e funcional associação entre PKC ϵ mitocondrial e mitoK_{ATP}.

Alguns trabalhos relatam que a glibenclamida pode inibir a cardioproteção induzida por pré-condicionamento isquêmico ou farmacológico (Ghosh e cols., 2000; Pan, 2006), enquanto outros não observaram tal efeito (Fralix e cols., 1993; Grover e cols., 1993; Feng, 2006). Em nosso trabalho, a administração de 10 μ M de glibenclamida não bloqueou os efeitos cardioprotetores da espironolactona (figuras 51, 52, 54, 55 e 58). Ao contrário, nessa concentração a glibenclamida pareceu potencializar os efeitos da espironolactona (figura 52). Em concentrações maiores de glibenclamida (50 e 100 μ M), os efeitos da espironolactona foram atenuados (figura 48). Entretanto, não podemos afirmar que a glibenclamida bloqueou a cardioproteção induzida pela espironolactona, pois a mesma resposta foi produzida pelo DMSO (solvente usado na solubilização da glibenclamida), quando administrado em concentrações equivalentes às presentes nas soluções com 50 μ M ou 100 μ M de glibenclamida (figura 49).

Embora a perfusão da espironolactona no período pré-isquêmico tenha induzido proteção, a sua perfusão na mesma concentração, nos dez minutos iniciais da reperfusão do coração isolado, não se mostrou eficiente para diminuir a contratatura pós-isquêmica, nem para recuperar a força contrátil do ventrículo esquerdo durante a reperfusão, ou mesmo reduzir o tamanho do infarto (figuras 25-30 e 56). Não está claro por que a administração de espironolactona na reperfusão não reproduziu os efeitos do pós-condicionamento isquêmico, pois foi mostrado recentemente que a cardioproteção induzida por pós-condicionamento isquêmico envolve também a ativação de canais mitoK_{ATP} (Penna e cols., 2006).

Nosso trabalho mostrou que a ação cardioprotetora da espironolactona só ocorre quando administrada imediatamente antes da isquemia. Estes efeitos não foram observados quando a espironolactona foi administrada *in vivo* 4 ou 24 horas antes do coração ser submetido ao protocolo de isquemia/reperfusão (figuras 35, 36, 38, 39 e 57). A espironolactona é um antagonista dos efeitos genômicos da aldosterona mediados através de receptores de mineralocorticóides (RM), entretanto, a sua ação não é restrita aos RM. A espironolactona pode também ligar-se como agonista em receptores para progesterona ou antagonista para receptores de andrógenos, e também aos receptores de glucocorticóides (Gordon e cols., 1978; Tracy e cols., 2006; Garthwait, 2004). Esta não especificidade pode explicar alguns efeitos colaterais associados ao uso da espironolactona, tais como a ginecomastia, irregularidades na menstruação e redução de libido. Segundo Grossman e cols. (2005) as vias de sinalização da aldosterona podem ser divididas em genômicas dependentes de RM, não genômicas via RM e não genômicas independentes de RM. Nesse estudo, a espironolactona inibiu a fosforilação de ERK1/2 induzida pela aldosterona em células expressando o receptor de mineralocorticóide. Este efeito foi considerado, segundo esses autores, um efeito não genômico mediado por receptor

de mineralocorticóide. Fujita e cols. (2005) mostraram uma ação não genômica da aldosterona por vias dependentes de PKC, que poderia ocasionar vasoconstrição e piora da função contrátil e metabólica de corações de cães submetidos à isquemia, porém esses efeitos não foram bloqueados pela administração de espironolactona. Outros efeitos conhecidos da espironolactona ou seu metabólito (canrenona) incluem o bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Mironneau, 1990; Costa e cols., 2007) e canais de K^+ dependente de voltagem (Caballero e cols., 2003).

Em futuros estudos deveremos verificar a participação da PKC e das vias relacionadas com a cardioproteção induzida pela espironolactona.

6. CONCLUSÕES

1. Nossos dados demonstraram que somente a perfusão da espironolactona imediatamente antes da isquemia global induziu cardioproteção contra lesões de I/R, reduzindo a contratatura do VE e a área de infarto do coração e aumentando a força de contração do VE.
2. A aplicação da espironolactona 4h ou 24h antes da I/R, ou imediatamente após a isquemia não produziu cardioproteção;
3. O resultado do pré-condicionamento farmacológico utilizando 1 μM de espironolactona foi similar ao pré-condicionamento isquêmico em todos os parâmetros analisados;
4. A utilização de 100 μM de 5-HD, bloqueador seletivo de canais mitoK_{ATP}, inibiu a cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento com a espironolactona, aumentando a contratatura pós-isquêmica, a área de infarto e diminuindo a recuperação pós-isquêmica da força contrátil.
5. Por outro lado, a utilização de 10 μM da glibenclamida, bloqueador não-seletivo de canais K_{ATP}, não bloqueou os efeitos da espironolactona e ainda potencializou a recuperação da força contrátil na reperfusão.
6. Esses resultados sugerem a participação dos canais mitoK_{ATP} no mecanismo de cardioproteção pelo pré-condicionamento farmacológico com espironolactona.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocrine Reviews* 20 (2): 101-135, 1999

AHA, Heart Disease and Stroke Statistics – 2007 Update. <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.106.179918>

AHOKAS, R.A., SUN, Y., BHATTACHARYA, S.K., GERLING, I.C., WEBER, K.T. Aldosteronism and a proinflammatory vascular phenotype: role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in peripheral blood mononuclear cells. *Circulation* 111: 51–57, 2005.

ARDEHALI, H. Signaling mechanisms in ischemic preconditioning Interaction of PKC ϵ and mito K_{ATP} in the inner membrane of mitochondria. *Circulation Research* 99:798-800, 2006

ASHCROFT, FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest* 115(8): 2047-2058, 2005

BAINES, C.P., LIU, G.S., BIRINCIOLU, M., CRITZ, S.D., COHEN, M.V., DOWNEY, J.M. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K_{ATP} channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol.* 276:H1361–H1368, 1999

BARBATO, J.C., RASHID, S., MULROW, P.J., SHAPIRO, J. I., FRANCO-SAENZ, R. Mechanisms for Aldosterone and Spironolactone-Induced Positive Inotropic Actions in the Rat Heart. *Hypertension* 44:751-757, 2004

BAXTER, G.F., YELLON, D.M. Ischaemic preconditioning of myocardium: a new paradigm for clinical cardioprotection? *Br J Clin Pharmacol* 38:381– 7, 1994

BEGGAH, A.T., ESCOUBET, B., PUTTINI, S., CAILMAIL, S., DELAGE, V., OUVREARD-PASCAUD, A., BOCCHI, B., PEUCHMAUR, M., DELCAYRE, C., FARMAN, N., JAISSER, F. Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 7160–7165, 2002

BELISLE, E., KOWALTOWSKI, A.J. Opening of Mitochondrial K⁺ Channels Increases Ischemic ATP Levels by Preventing Hydrolysis *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 34 (4) : 285-298, 2002

BRILLA, C.G., MATSUBARA, L.S., WEBER, K.T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25:563-575, 1993a

BRILLA, C.G., MATSUBARA, L.S., WEBER, K.T. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 71:12A-16A, 1993b

BURNISTON, J.G., SAINI, A., TAN, L.B., GOLDSPINK, D.F. Aldosterone induces myocyte apoptosis in the heart and skeletal muscles of rats in vivo

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 39: 395–399, 2005

BRILLA, C.G., ZHOU, G., MATSUBARA, L.S., WEBER, K.T. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:806-820, 1994

CABALLERO, R., MORENO, I., GONZALEZ, T., ARIAS, C., VALENZUELA, C., DELPON, E. & TAMARGO, J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-gogo-related gene channels. *Circulation* 107:889–895, 2003

CHAI, W., GARRELDS, I.M., ARULMANI, U., SCHOEMAKER, R.G., LAMERS, J.M.J., DANSER, A.H.J. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in rat heart: why is spironolactone cardioprotective? *Brit. J. Pharm* 145:664-671, 2005

CHAI, W., GARRELDS, I.M., Vries, R., DANSER, A.H.J. Cardioprotective effects of eplerenone in the rat heart. *Hypertension* 47: 665-670, 2006

CHATZIZISIS, Y.S., COSKUN, A.U., JONAS, M., EDELMAN, E.R., FELDMAN, C.L., STONE, P.H. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling *Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. Journal of the American College of Cardiology* 49(25):2379-2393, 2007

CHEN, C.H., LIU, K. AND CHAN J.Y.H. Anesthetic preconditioning confers acute cardioprotection via up-regulation of manganese superoxide dismutase and preservation of mitochondrial respiratory enzyme activity. *SHOCK* (publicação ainda não impressa, disponível na internet), forma final aceita em 15 de Maio de 2007

[CHOPRA P](#), [SABHERWAL U](#). Histochemical and fluorescent techniques for detection of early myocardial ischemia following experimental coronary artery occlusion: a comparative and quantitative study. *Angiology* 39(2):132-40, 1988

CHRIST, M., EISEN, C., AKTAS, J., THEISEN, K., WEHLING, M. The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1452–1457, 1993

CLEMENT, J.P., KUNJILWAR, K., GONZALEZ, G., SCHWANSTECHEER, U.P., AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J. Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron*:18:827-838, 1997

COHEN, M., YANG, X.M., LIU, G.S., HEUSCH, G., DOWNEY, J.M. Acetylcholine, bradykinin, opioids and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K_{ATP} channels. *Circ Res* 89:273-8, 2001

COSTA, A.D., GARLID, K.D., WEST, I.C., LINCOLN, T.M., DOWNEY, J.M., COHEN, M.V., CRITZ, S.D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res.* 97:329 –336, 2005

COSTA, A.R., RICARDO, R.A., MORAES, A.A.F.S., FRANÇA, J.P., TORRES, L.M., MEDEI, E., NASCIMENTO, J.H.M., SMAILI, S.S., OSHIRO, M.E.M., BASSANI, J.W.M., TUCCI, P.J.F., FERREIRA, P.J.F. Antiapoptotic action of canrenone (spironolactone major active metabolite) in aldosterone-induced apoptosis: a calcium-dependent pathway. 3rd Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences - translation of basic Insights into Clinical practice, *Circ Res*, 99 (5):E18, P153, 2006

COSTA, A.R., TORRES, L.B., MEDEI, E., RICARDO, R.A., FRANÇA, J.P., SMAILI, S., NASCIMENTO, J.H.M., OSHIRO, M.E.M., BASSANI, J.W.M., FERREIRA, A.T. AND TUCCI, P.J.F. The negative inotropic action of canrenone is mediated by L-type calcium current blockade and reduced intracellular calcium transients. Submetido a publicação no *Am. J. Physiology*. 2007.

CRISOSTOMO, P.R., WAIRIUKO, G.M., WANG, M., TSAI, B.M., MORRELE, D., MELDRUM, D.R. Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials. *J Am Coll Surg* 202(5):797-812, 2006

DAS, B., SARKAR, C. Is the sarcolemmal or mitochondrial K_{ATP} channel activation important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects during acute ischemia/reperfusion in the intact anesthetized rabbit model? *Life Sciences* 77:1226–1248, 2005

DataSUS <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c04.def>, acessado em 18/07/2007.

DELCAYRE, C., SILVESTRE, J.S. Aldosterone and the heart: towards a physiological function? *Cardiovasc. Res.* 43:7–12., 1999.

DELYANI, J.A. Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. *Kidney Int.* 57:1408-1411, 2000

FARQUHARSON, C.A, STRUTHERS, A.D. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin / angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 101:594–7, 2000

FENG, J., SELLKE, M.E., RAMLAWI, B., BOODHWANI, M., CLEMENTS R. Bradykinin induces microvascular preconditioning through the opening of calcium-activated potassium channels. *J Surg* 140(2):192-197,2006

FORBES, R.A., STEENBERGEN, C., MURPHY, E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88(8):802–9, 2001

[FRALIX, T.A.](#), [STEENBERGEN, C.](#), [LONDON, R.E.](#), [MURPHY, E.](#) Glibenclamide does not abolish the protective effect of preconditioning on stunning in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 27(4): 630-7,1993

FRANCIS, J., WEISS, R.M., JOHNSON, A.K., FELDER, R.B. Central

mineralocorticoid receptor blockade decreases plasma TNF- α after coronary artery ligation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R328-R335, 2003

FRYER, R.M, EELLS, J.T., HSU, A.K., HENRY, M.M. AND GROSS, G.J. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial KATP channel in preservation of mitochondrial function *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278: H305–H312, 2000

FUJITA, M., MINAMINO, T., ASANUMA, H., SANADA, S., HIRATA, A., MASAKATSU, W., MYOISHI, M., OKUDA, H., OGAI, A., OKADA, K., TSUKAMOTO, H.K., HORI, M., KITAKAZE, M. Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase c-dependent pathways in hypoperfused canine hearts. *Hypertension* 46:113-117, 2005

GARLID, K.D., PAUCEK, P., YAROV-YAROVY, V., MURRAY, H.N., DARBENZIO, R.B., D'ALONZO, A.J., LODGE, N.J., SMITH, M.A., GROVER, G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81:1072–1, 1997

GARTHWAITE, S.M. & MCMAHON, E.G. The evolution of aldosterone antagonists. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 217: 27–31, 2004

GAUDETTE, G.R., KRUKENKAMP, I.B., SALTMAN, A.E., HORIMOTO, H., LEVITSKY, S. Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels: a codependent relationship. *Ann. Thorac. Surg.* 70:602-608, 2000

[GELPI RJ, MORALES C, COHEN MV, DOWNEY JM.](#) Xanthine oxidase contributes to preconditioning's preservation of left ventricular developed pressure in isolated rat heart: developed pressure may not be an appropriate end-point for studies of preconditioning. *Basic research cardiology* 97:40-46, 2002.

GHOSH, S., STANDEN, N.B., GALIÑANES, M. Evidence for mitochondrial K channels as effectors of human ATP myocardial preconditioning *Cardiovascular Research* 45:934–940, 2000

GORDON, B. CUTLER, J.R., MARK, A., SAUER, D., LORIAUX, L. Sc 251 52: A Potent Mineralocorticoid Antagonist with Decreased Antiandrogenic Activity Relative to Spironolactone *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 209 (1) 1978

GROSS, G.J., AUCHAMPACH, J.A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circulation Research.* 70:223-233, 1992

GROSS, G.J., FRYER, R.M. Sarcolemmal Versus Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels and Myocardial Preconditioning. *Circulation Research.* 84: 973-979, 1999

GROSS, G.J., PEART, J.N. KATP channels and myocardial preconditioning: an

update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H921-H930, 2003

GROSSMANN, C., BENESIC, A., KRUG, A.W., FREUDINGER, R., MILDENBERGER, S., GASSNER, B., GEKLE, M. Human Mineralocorticoid Receptor Expression Renders Cells Responsive for Nongenotropic Aldosterone Actions *Molecular Endocrinology* 19(7):1697–1710, 2005

GROVER, G.J., DZWONCZYK, S., SLEPH, P.G., SARGENT, C.A. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide (glyburide) does not abolish preconditioning in isolated ischemic rat hearts. *J Pharm Exp Ther.* 265(2): 559-564, 1993

GROVER, G.J., GROSS, G.J. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res.* 26:1054–1062, 1992

GROVER, G.J., SLEPH, P.G., DZWONCZYK, S. Pharmacologic profile of cromakalim in the treatment of myocardial ischemia in isolated rat hearts and anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 16:853–864, 1990

HALLSTROM, A., PRATT, C.M., GREENE, H.L., HUTHER, M., GOTTLIEB, S., DEMARIA, A. Relations between heart failure, ejection fraction, arrhythmia suppression and mortality: analysis of the cardiac arrhythmia suppression trial. *J Am Coll Cardiol* 25:1250-7, 1995

HAYASHI, M., TSUTAMOTO, T., WADA, A., ISHII, C., OHNO, K., FUJII, M., TANNIGUCHI, A., HAMATANI, T., NOZATO, Y., KATAOKA, K., MORIGAMI, N., OHNISHI, M., HORIE, M. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 107:2559-2565, 2003

HEYNDRIKX, G.R. Early reperfusion phenomena. *Seminars in Cardiothoracic Vascular Anesthesia* 10:236-241, 2006

HOLMUHAMEDOV, E.L., WANG, L., TERZIC, A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat mitochondria. *J Physiol* 519.2:347–60, 1999

ILEBEKK, A., ERIKSEN, M., SEVRE, K., ASPELIN, T., BJÖRKMAN, J.-A., LYBERG, T. AND NORDLANDER, M. Ventricular fibrillation induced by ischemia-reperfusion is not prevented by the NPY Y2 receptor antagonist BIIE0246 *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 11:177-183, 2006

IMAGAWA, J., BAXTER, G.F., YELLON, D.M. Myocardial protection afforded by nicorandil and ischaemic preconditioning in a rabbit infarct model in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31:74–79, 1998

JABUREK, M., COSTA, A.D.T., BURTON, J.R., COSTA, C.L., GARLID K.D., Mitochondrial PKC ϵ and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel corpurify and

coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ Res* 99:878-883,2006

[LADILOV, Y., EFE, O., SCHAFFER, C., ROTHER, B., KASSECKERT, S., ABDALLAH, Y., MEUTER, K., SCHLUTER, K.D., PIPER, H.M.](#) Reoxygenation-induced rigor-type contracture. *J Mol Cell Cardiol.* 35(12):1481-90, 2003

LEESAR, M.A., STODDARD, M., AHMED, M., BROADBENT, J., BOLLI, R. Preconditioning of Human Myocardium With Adenosine During Coronary Angioplasty. *Circulation* 95:2500, 1997

LIEM, D.A., HONDA, H.M., ZHANG, J., WOO,D., PING, P. Past and Present Course of Cardioprotection against Ischemia Reperfusion Injury *Journal of applied physiology* 2007 Aug 2 ,[Epub ahead of print]

LIU Y, SATO T, JSEHARASEYON J, SZEWCZYK A, O'ROURKE B, MARBÁN E. Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels: Viable Candidate Effectors of Ischemic Preconditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 874:27-37, 1999

LIU, Y. & DOWNEY, J.M. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 263:H1107-12, 1992

[LOCHNER, A., GENADE, S., MOOLMAN, J.A.](#) Ischemic preconditioning: infarct size is a more reliable endpoint than functional recovery. *Basic Res Cardiol.* 98(5):337-46, 2003

LOMBÈS, S.M., ALFAIDY, N., EUGENE, E., LESSANA, A., FARMAN, N., BONVALET, J.P. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 92:175–182, 1995

MACFADYEN, R.J., BARR, C.S., STRUTHERS, A.D. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 35:30–4, 1997

MAZAK, I., FIEBELER, A., MÜLLER, D.N., PARK, J.K., SHAGDARSUREN, E., LINDSCHAU, C., DECHEND, R., VIEDT, C., PILZ, B., HALLER, H. & LUFT, F.C. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109:2792–2800, 2004

MEJÍA-VILLET, J.M., RAMÍREZ, V., CRUZ, C., URIBE, N., GAMBA, G., BOBADILLA, N.A. Renal ischemia/reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone *Am J Physiol Renal Physiol* (March 20, 2007). 2007

MIRONNEAU J. Calcium channel antagonist effects of spironolactone, an aldosterone antagonist. *Am J cardiol*; 65(23):K7-K8,1990

MODENA, M.G., AVETA, P., MENOZZI, A., ROSSI, R. Aldosterone inhibition

limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J* 141:41-46,2001

MOREAU, C., PROST, A-L., DÉRAND, R., VIVAUDOU, M. SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38:951–963, 2005

MURATA, M., AKAO, M., O'ROURKE, B., MARBAN, E. Mitochondrial ATP sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion—possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 89:891– 898, 2001

MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136, 1986

O'ROURKE, BRIAN. Myocardial K_{ATP} Channels in Preconditioning. *Circulation Research* 87:845-855, 2000

OBERLEITHNER, H., LUDWIG, T., RIETHMULLER, C., HILLEBRAND, U., ALBERMANN, L., SCHAFER, C., SHAHIN, V., SCHILLERS, H. Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension* 43, 952–956, 2004

OCKAILI R, SALLOUM F, HAWKINS J, KUKREJA RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H1263–H1269, 2002

OPIE, L. H. The Heart, from cell to circulation. Lippincott – Raven. Philadelphia. New York. 3 rd edition. p.563. (1998)

OUZOUNIAN, M., HASSAN, A., COX, J. L., JOHNSTONE, D. E., HOWLETT, J. The effect of spironolactone use on heart failure mortality: A population-based study. *Journal of Cardiac Failure* 13 (3):165-169, 2007

PAIN, T., YANG, X-M. STUART D. CRITZ, S.D., YUE, Y., NAKANO, A., LIU, G.S., HEUSCH, G., COHEN, M.V., DOWNEY J.M Opening of Mitochondrial KATP Channels Triggers the Preconditioned State by Generating Free Radicals. *Circ Res.* 87:460-466, 2000

PAN, T.-T., FENG, Z-N., LEE, S., MOORE, P.K., BIAN, J-S. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 40:119–130, 2006

PARK, J. L., LUCCHSI, B. R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* 68:1905-12, 1999

[PENNA, C., RASTALDO, R., MANCARDI, D., RAIMONDO, S., CAPPELLO, S., GATTULLO, D., LOSANO, G., PAGLIARO, P.](#) Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic*

research Cardiology, 101: 180-189, 2006

PIPER, H.M., GARCIA-DORADO, D., OVIZE, M., A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Research* 38:291-300, 1998

PITT, B., ZANNAD, F., REMME, W.J., CODY, R., CASTAIGNE, A., PEREZ, A., PALENSKY, J., WITTES, J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators (RALES). *Am J Cardiol.* 78:902-907,1999

RAMIRES, F.J., MANSUR, A., COLHOE, O., MARANHÃO, M., GRUPPI, C.J., MADY, C. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 82:1207-11, 2000

SATO T, SASAKI N, O'ROURKE B, MARBÁN E. Nicorandil, a potent cardioprotective agent, acts by opening mitochondrial ATP-dependent potassium channels. *J Am Coll Cardiol.* 35:514-518, 2000

SATO, A., HAYAMASHI, M., SARUTA, T. Relative long-term effects of spironolactone in conjunction with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular mass and diastolic function in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 25:837-842, 2002

SATO, T., SASAKI, N., O'ROURKE, B., MARBÁN, E. Adenosine Primes the Opening of Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels A Key Step in Ischemic Preconditioning? *Circulation* 102:800-805, 2000

[SCHOTT, R.J., ROHMANN, S., BRAUN, E.R., SCHAPER W.](#) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 66(4):1133-42, 1990

SEREJO, F.C., RODRIGUES JR, L.F., TAVARES, K.C.S., CARVALHO, A.C.C., NASCIMENTO, J.H.M. Cardioprotective properties of humoral factors released from rat heart subject to ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 49(4):214-220, 2007

SHINTANI, Y., NODE, K., ASANUMA, H., SAWADA, S., TAKASIMA, S., ASANO, Y. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol* 37:1213-8, 2004

SILVESTRE, J.S., HEYMES, C., OUBÉNAI" SSA, A., ROBERT, V., AUPETIT-FAISANT, B., CARAYON, A., SWYNGHEDAUW, B., DELCAYRE, C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 99:2694-2701, 1999.

SILVESTRE, J.S., ROBERT, V., HEYMES, C., AUPETIT-FAISANT, B., MOUAS, C., MOALIC, J.M., SWYNGHEDAUW, B., DELCAYRE, C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J. Biol. Chem.* 273:4883-4891, 1998.

SORRENTINO, R., AUTORE, G., CIRINO, G., D'EMMANUELE, D., CALIGNANO, A., VANASIA, M., ALFIERE, C., SORRENTINO, L., PINTO, A. Effect of spironolactone and its metabolites on contractile property of isolated rat aorta rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:519-525, 1996

STAAT, P., RIOUFOL, G., PIOT, C., COTTIN, Y., CUNG, T.T., HUILLIER, I., AUPETIT, J.F., BONNEFOY, E., FINET, G., ANDRÉ-FOUËT, X., OVIZE, M. Postconditioning the human heart *Circulation* 112:2143-2148, 2005

SUN, Y., ZHANG, J., LU, L., CHEN, S.S., QUINN, M.T. & WEBER, K.T. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 161, 1773–1781. (2002).

THÉROUX, P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am. J. Cardiol.* 83: 3G-9G, 1999

WANG S, CONE J, LIU Y. Dual roles of mitochondrial KATP channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H246–H255, 2001

WANG, Y., HIRAI, K., ASHRAF, M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase c activity. *Cir Res.* 85:731-741,1999

WEHLING, M., NEYLON, C.B., FULLERTON, M., BOBIK, A. & FUNDER, J.W. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 76:973–979,1995

WHO, The Atlas of Heart Disease and Stroke Part one: cardiovascular disease, 2004. Visualizado em 18 de junho de 2007. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_01_types.pdf

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION Avoiding heart attacks and strokes: don't be a victim - protect yourself. World Health Organization, 2005

WHO,World Health Organization World Health Statistics 2007, Ten statistical highlights, in global public health, p12, 2007

WILLIAMS, F. M. Neutrophils and myocardial reperfusion injury. *Pharmacol. Ther.* 72(1): 1-12. 1996.

WILLIAMS, T.A., VERHOVEZ, A., MILAN, A., VEGLIO, F., MULATERO, P. Protective Effect of Spironolactone on EndothelialCell Apoptosis *Endocrinology* 147(5):2496–2505, 2006

YAO, Z., GROSS, G.J. Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation.* 89:1769–1775, 1994

YELLON, D.M., BAXTER, G.F. A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell. Cardiol.* 27:1023– 34, 1995

YOSHIDA, H., KUSAMA, Y., KODANI, E., YASUTAKE, M. Pharmacological Preconditioning with bradykinin affords myocardial protection through NO-dependent mechanisms. *Int. Heart. J.* 46:(5) 877-887, 2005

YOUNG, M.J., FUNDER, J.W. Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in cardiovascular system. *J Hypertens.* 20:1465-1468, 2002

ZANNAD, F., ALLA, F., DOUSSET, B., PEREZ, A., PITT, B., limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldosterone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 102:2700-2706, 2000

ZANNAD, F., RADAUCEANU, A. Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure. *Heart Fail Rev* 10:71-78, 2005

ZAUGG M, LUCCHINETTI E, SPAHN D. Volatile anaesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K_{ATP} channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 97:4-14, 2002

ZHAO, Z.Q., CORVERA, J.S., HALKOS, M.E., KERENDI, F., WANG, N.P., GUYTON, R.A., VINTEN-JOHANSEN, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H579-H588, 2003

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)