

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estudo *in vivo* do efeito agudo da
espironolactona e eplerenona em ratos
submetidos à isquemia cardíaca**

Gabriela de Cássia Sousa Amancio

Ouro Preto

2013

GABRIELA DE CÁSSIA SOUSA AMANCIO

**Estudo *in vivo* do efeito agudo da espironolactona
e eplerenona em ratos submetidos à isquemia
cardíaca**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Mauro César Isoldi

Co-orientadora: Dra. Andrea Grabe Guimarães

Ouro Preto

2013

*Dedico este trabalho à minha mãe **Cristina**, meus irmãos **Geisa e Guilherme** e ao **Igor**, que sempre me ajudaram, apoiaram e incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar e proteger o meu caminho.

À minha mãe Cristina pelo amor incondicional, pelos conselhos e por nunca medir esforços para que eu realize meus sonhos.

Aos meus irmãos Guilherme e Geisa pelo carinho e companheirismo. Geisa (Faela), obrigada por tudo que você sempre fez por mim aqui em Ouro Preto!

Ao Igor por ser meu amigo, pela paciência e pelo apoio, principalmente nesses últimos dias. Te amo!

À toda minha grande e querida família meus avós, tios e primos pelo carinho e pelo apoio sempre.

Aos meus amigos Elisa, Caio, Mari, Denise, Diguin e Betinha obrigada pela amizade e por compartilhar comigo momentos de alegria!

Ao Prof. Dr. Mauro César Isoldi pela orientação desde a iniciação científica, confiança e ensinamentos. Todos esses anos de trabalho no Laboratório foram muito importantes para minha carreira científica e sempre serei grata por tudo isso.

À Prof^a Dr^a Andrea Grabe Guimarães, sem o seu apoio nada disso seria possível. Obrigada pela boa vontade, pelas correções e direcionamentos, e pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Hipertensão UFOP, Maria Andrea, Thalisson, Rosana, Everton, Rodrigo, Grazi, Uberdan, Renato, Carol e Gabi Hermont pela amizade e a troca de experiências.

Milla, Carol e Gabi Juninha, vivemos muitos momentos juntas e vou sentir falta da nossa convivência diária. Obrigada pela amizade, companhia e apoio sempre!

Ana Cláudia e Deborah, parte deste trabalho também é de vocês. Obrigada por tudo! Pelos fins de semana de trabalho, pelas análises intermináveis do ECG... Vocês foram fundamentais para a realização deste projeto!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia experimental do CiPharma, Dani, Carol, Kamila, Quênia, Thales, Mariana e Gisele. Obrigada por me acolherem! Quando cheguei não tinha experiência alguma com as metodologias que iria utilizar e todos direta e indiretamente me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Wanderson pela paciência e ajuda com as análises histológicas.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os seus funcionários pelo cuidado com os animais.

Aos professores do NUPEB pelos ensinamentos e a todos os funcionários pela dedicação.

À Fapemig pelo financiamento do projeto e a Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A484a Amancio, Gabriela de Cássia Sousa.
Avaliação *in vivo* do efeito agudo da espironolactona e eplerenona em ratos submetidos à isquemia cardíaca [manuscrito] / Gabriela de Cássia Sousa Amancio - 2013.

xvi, 86f.: il. color; graf.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Andréa Grabe Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Sistema cardiovascular - Teses. 2. Diuréticos - Teses. 3. Isquemia - Teses. 4. Glândulas supra-renais - Cirurgia - Adrenalectomia - Teses. I. Isoldi, Mauro César. II. Guimarães, Andréa Grabe. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.11:616.12

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Ainda que eu tivesse o dom de profetizar o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que eu tivesse toda fé a ponto de transportar montes, se não tivesse o Amor, eu nada seria.”

(Apóstolo Paulo, na carta I aos Coríntios)

RESUMO

O aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona após infarto do miocárdio (IM) está relacionado com a piora do prognóstico da doença e contribui para patogênese da insuficiência cardíaca. O tratamento do IM com antagonistas de receptores mineralocorticoides (MR) da aldosterona, espironolactona e eplerenona, têm reduzido a remodelação do ventrículo esquerdo e a morte súbita. Entretanto, existem evidências clínicas e experimentais de que a cardioproteção promovida por esses antagonista pode ser em parte independente do bloqueio da ação da aldosterona. O objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente os efeitos cardioprotetores da espironolactona e eplerenona em um modelo agudo de isquemia cardíaca em ratos. Ratos machos wistar, submetidos a adrenalectomia lateral ou não foram tratados, via oral, com Espironolactona 20mg/kg ou Eplerenona 10mg/kg, na presença e na ausência de um antagonista de receptor GR (Mifepristona 20mg/kg) e submetidos a isquemia cardíaca. O sinal de ECG em ratos anestesiados foi obtido antes e após a ligadura coronária esquerda, durante 1 hora. A área sob a curva do segmento ST do ECG, um parâmetro que indica isquemia do miocárdio, foi significativamente menor para a espironolactona ($53.9.3 \pm 13,07$) e eplerenona ($31,3 \pm 10,08$) de animais tratados em comparação com os animais de controle ($179,4 \pm 32,3$). Mifepristona ($76,6 \pm 14,54$) não foi capaz de alterar os efeitos de espironolactona. Estes resultados sugerem que doses baixas de espironolactona e eplerenona são cardioprotetoras mesmo quando os níveis de aldosterona não estão aumentados e que este efeito não é dependente da ativação dos receptores GR.

Palavras-chave: Espironolactona, Eplerenona, cardioproteção, adrenalectomia.

ABSTRACT

The increasing plasma levels of aldosterone after myocardial infarction (MI) is related to its prognostic aggravation and contributes to the cardiac failure pathogenesis. The MI treatment with the mineralocorticoid receptors (MR) antagonists, spironolactone and eplerenone, can reduce the left ventricular remodeling and sudden death occurrence. However, clinical and experimental evidences demonstrated that this cardioprotection could be in part independent of the aldosterone inhibition. The mechanisms activated by these two drugs in the heart remain unknown. Spironolactone also presents glucocorticoid receptors (GR) affinity, which also shows cardioprotective properties. The objective of the present work was to evaluate the cardioprotective effects of spironolactone and eplerenone in a model of acute cardiac ischemia in rats. Male Wistar rats were first subjected to adrenalectomy and received by oral route 20mg/kg of spironolactone or 10mg/kg eplerenone in the presence and in the absence of mifepristone (20mg/kg), a GR receptor antagonist. The ECG signal was obtained in anaesthetized rats before and after the left coronary ligation, during 1 hour. The area under the curve of the ST segment of ECG, a parameter that indicates myocardial ischemia, was significantly smaller for the spironolactone ($53.9.3 \pm 13.07$) and eplerenone (31.3 ± 10.08) treated animals compared to the control animals (179.4 ± 32.3). Mifepristone (76.6 ± 14.54) was not able to alter the effects of spironolactone. These results suggest that low doses of spironolactone and eplerenone are cardioprotective even when plasma levels of aldosterone are not augmented and that this effect is not dependent of GR receptors activation.

Keywords: Espironolactone, Eplerenone, cardioprotection, adrenalectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Elementos de um eletrocardiograma normal	22
Figura 2: Sequência de alterações do ECG no IAM	23
Figura 3: Estrutura química da espironolactona	28
Figura 4: Estrutura química da eplerenona	28
Figura 5: Fluxograma da divisão dos grupos experimentais	39
Figura 6: Procedimento experimental	41
Figura 7: Área sob a curva ST-T	44
Figura 8: Taxa de mortalidade por grupo experimental	48
Figura 9: Valores absolutos de PA e FC dos animais tratados com Espironolactona 20mg/kg e Eplerenona 10mg/kg submetidos à isquemia cardíaca	49
Figura 10: Valores absolutos de PA e FC dos animais tratados com Mifepristona 20mg/kg submetidos à isquemia cardíaca	50
Figura 11: Exemplos de alterações eletrocardiográficas pós-ligadura. Derivação II	51
Figura 12: Imagem representativa do registro dos ECGs após a ligadura da coronária	52
Figura 13: Variação da área sob a curva ST-T do ECG dos animais tratados com Espironolactona 20mg/kg e Eplerenona 10mg/kg submetidos à isquemia cardíaca	53
Figura 14: Variação da área sob a curva ST-T do ECG dos animais tratados com Mifepristona 20mg/kg e Espironolactona 20mg/kg submetidos à isquemia cardíaca	55

Figura 15: Dosagem sérica da aldosterona.....	56
Figura 16: Histologia do coração de animais tratados com Espironolactona 20mg/kg e Eplerenona 10mg/kg submetidos a ligadura da coronária esquerda.....	58
Figura 17: Histologia do coração de animais tratados com Mifepristona 20mg/kg e Espironolactona 20mg/kg e submetidos à ligadura da coronária esquerda.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para o diagnóstico de isquemia aguda do miocárdio.	25
Quadro 2: Divisão dos grupos experimentais.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades farmacocinéticas e usos clínicos da espironolactona e eplerenona	30
Tabela 2: Mortalidade por grupo experimental	47
Tabela 3: Percentual de animais que apresentaram necrose cardíaca	57
Tabela 4: Percentual de animais que apresentaram necrose cardíaca (Grupo adrenalectomizado)	59

LISTA DE SIGLAS

- 11 β -HSD2 – enzima 11 β -desidrogenase
- ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
- AMPc –monofosfato cíclico de adenosina
- ATP – trifosfato de adenosina
- AV – átrio-ventricular
- DAG – diacilglicerol
- ECA – enzima conversora de angiotensina
- ECG – eletrocardiograma
- EPHESUS – *Eplerenone Heart failure Survival Study*
- EROs - espécies reativas de oxigênio
- FC – frequência cardíaca
- GMP_C – monofosfato cíclico de guanosina
- GR – receptor glicocorticoide
- HE – hematoxilina e eosina
- IAM – infarto agudo do miocárdio
- IC – Insuficiência cardíaca
- IP₃ – trifosfato de inositol
- K_{ATP} – canais de potássio sensíveis a ATP
- kg – quilograma
- mg – miligramas
- MR – receptor mineralocorticoide
- NaCl – cloreto de sódio
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto

PA – Pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica

PAS – pressão arterial sistólica

PI3-quinase – fosfatidilinositol 3-quinase

PKC – proteína quinase C

PTPm – poro de permeabilidade transitória mitocondrial

RALES – *Randomized Aldosterone Evaluation Study*

SA – sinoatrial

SRAA – sistema- renina- angiotensina- aldosterona

Supra de ST – supradesnivelamento do segmento ST

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1.1 Infarto agudo do miocárdio	19
1.1.2 Aspectos fisiopatológicos	20
1.2 O ELETROCARDIOGRAMA.....	21
1.2.1 Alterações do Eletrocardiograma no Infarto do miocárdio	22
1.3 ALDOSTERONA E SEUS EFEITOS DELETÉRIOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	25
1.4 ANTAGONISTAS DE RECEPTORES MR DA ALDOSTERONA	27
1.4.1 Efeitos cardioprotetores dos antagonistas de MR independentes da aldosterona ..	32
1.5 RECEPTORES GLICOCORTICOIDES	33
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Fármacos e tratamento	37
3.3 Procedimentos cirúrgicos	41
3.4 Adrenalectomia bilateral.....	42
3.5 Dosagem aldosterona sérica	42
3.6 Eletrocardiograma e Pressão arterial	43
3.6.1 Determinação da área sob a curva ST-T	43
3.7 Análise histológica.....	45
3.8 Análise estatística	45

4. RESULTADOS	47
4.1 Taxa de mortalidade	47
4.2 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca	48
4.3 Avaliação do ECG	53
4.3.1 Área sob a curva ST-T	54
4.5 Dosagem da aldosterona sérica	59
4.6 Análise histológica	60
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) está entre as principais causas de morte e morbidade em todo mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que aproximadamente 7,3 milhões de pessoas morrem todos os anos em decorrência de doenças coronarianas (WHO, 2011). No Brasil, segundo o DataSUS, no ano de 2010, ocorreram 99.955 mortes devido a doenças isquêmicas do coração (BRASIL, 2011).

Os fatores de risco associados a doenças cardiovasculares são hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes, tabagismo, sedentarismo, má alimentação, uso excessivo do álcool, predisposição genética, idade avançada, sexo e fatores sociais como pobreza e baixa escolaridade (WHO, 2011).

A principal causa de doenças isquêmicas cardíacas e de infarto do miocárdio é a aterosclerose, uma doença crônica onde ácidos graxos e colesterol são depositados progressivamente no endotélio das artérias formando placas que as tornam irregulares e estreitam o lúmen, dificultando a passagem do sangue (WHO, 2011). As placas ateroscleróticas podem se romper e formar um coágulo ou trombo de sangue obstruindo o fluxo sanguíneo das artérias causando isquemia. Outras causas menos comuns de isquemia incluem espasmos coronarianos, embolia coronária e obstrução de vasos normais sem placa aterosclerótica (Burke *et al*, 2007).

As síndromes coronarianas são classificadas em angina instável, infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST e infarto do miocárdio com elevação do segmento ST. A isquemia causada pela oclusão total e permanente de uma artéria coronária acompanhada por uma alteração no eletrocardiograma (ECG), o supradesnivelamento do segmento ST (supra de ST), pode causar morte progressiva das células cardíacas, caracterizando o infarto do miocárdio com elevação de ST. Oclusões parciais e/ou intermitentes, geralmente, não são acompanhadas por supra de ST, no entanto podem causar necrose celular, nestes casos desenvolve-se um infarto do miocárdio sem elevação do ST. Quando a isquemia é menos acentuada e não há indícios de necrose, a síndrome clínica é denominada de angina instável (National Clinical Guideline Centre UK, 2010).

1.1.2 Aspectos fisiopatológicos

O infarto do miocárdio pode ser definido como morte de cardiomiócitos devido ao desequilíbrio prolongado entre o suprimento de sangue e a demanda de oxigênio do miocárdio, causado pela obstrução parcial ou total de um ou mais ramos das artérias coronárias (Thygesen *et al* 2012).

A isquemia causa uma série de alterações metabólicas e funcionais nas células cardíacas. Além da diminuição da oferta de O₂, a disponibilidade de outros nutrientes bem como a eliminação de metabólitos fica prejudicada. Ocorre rápida depleção de ATP, o metabolismo aeróbio é interrompido e inicia-se a glicólise anaeróbica. Esta por sua vez, promove acúmulo de íons H⁺ e acidose do tecido. Na tentativa de estabilizar o pH, são ativados mecanismos intracelulares que culminam no aumento das concentrações de cálcio na matriz mitocondrial e espécies reativas de oxigênio (EROs), prejudicando a produção de energia. Conseqüentemente, ocorre abertura de poros de permeabilidade transitória (PTPm) na mitocôndria que levam a morte celular (Chiong *et al*, 2009).

A morte das fibras musculares se inicia em aproximadamente 20 min após a isquemia e é categorizada patologicamente como necrose de coagulação ou em banda de contração, que evolui por oncosse e em menor grau por apoptose. Necrose completa de todas as células em risco requer pelo menos 2- 4 h. Esse tempo pode variar dependendo da presença de circulação lateral a zona isquêmica, da oclusão da coronária ser permanente ou intermitente, da sensibilidade dos miócitos à isquemia e da demanda individual de oxigênio e nutrientes do miocárdio (Thygesen *et al* 2007). Em modelos animais de isquemia cardíaca o tempo para o desenvolvimento completo de necrose é menor, variando entre 30 e 90 minutos em ratos (Jugdutt *et al*, 1993).

A isquemia cardíaca pode levar o indivíduo à morte logo na fase aguda do infarto, devido a incapacidade do coração em bombear sangue adequadamente e a presença de arritmias cardíacas (Jugdutt, 2012). Quando a lesão é menos acentuada, o miocárdio remanescente sofre alterações anatômicas e funcionais que prejudicam a função contrátil do coração e progressivamente levam à insuficiência cardíaca. Entre as alterações estão remodelação da matriz extracelular, hipertrofia dos miócitos, dilatação ventricular e acúmulo de colágeno na área infartada (Sutton e Sharpe, 2000), a esse conjunto de alterações dá-se o nome de remodelamento cardíaco.

1.2 O ELETROCARDIOGRAMA

O diagnóstico do IAM é feito com base nos sintomas clínicos, alterações do ECG, na elevação de marcadores bioquímicos de necrose e exames de imagem. Tendo em vista que os sintomas clínicos são muito variados e a elevação dos biomarcadores se inicia cerca de 6 h após os primeiros sintomas de infarto, o ECG ainda é o principal instrumento utilizado no diagnóstico do IAM (Pesaro *et al*, 2004).

O ECG além de ser um método rápido e de baixo custo, permite identificar a área relacionada ao infarto e prever o tamanho da área lesada, além de auxiliar na escolha da terapia mais adequada para cada caso (Zimetbaum *et al*, 2003).

O ECG é composto por ondas, segmentos e intervalos, que representam as fases do ciclo cardíaco, período entre o início de um batimento cardíaco e o início do próximo. Um ciclo cardíaco se inicia quando um potencial de ação é gerado no nodo sinoatrial (SA). O potencial de ação corresponde a oscilação do potencial de membrana da célula, onde há inversão da polaridade da membrana (despolarização) e retorno à linha de base (repolarização) devido a passagem seletiva de íons Na^+ , K^+ , Ca^{+2} pela membrana (Farraj *et al*, 2011).

A partir do nodo SA o impulso nervoso se propaga através dos feixes intermodais até as fibras musculares atriais, promovendo a contração dos átrios. Em seguida, o impulso atinge o nodo atrioventricular (AV), a condução nesta região é mais lenta, o que permite que o sangue chegue aos ventrículos antes que eles entrem em sístole. Do nodo AV o impulso atinge o feixe de His, desce por seus ramos até as fibras de purkinje, e se estende a todas as fibras ventriculares, ocasionando a contração ventricular (Feldman e Goldwasser, 2004).

Todas essas fases do ciclo cardíaco podem ser registradas no ECG (Figura 1). A onda P corresponde a despolarização dos átrios. O complexo QRS corresponde a despolarização ventricular. A onda de repolarização atrial é encoberta pelo complexo QRS, e não pode ser visualizada no ECG. A onda T representa a repolarização ventricular. Entre o complexo QRS e a onda T observa-se o segmento isoeletrico ST. Este pode sofrer supradesnivelamento ou infradesnivelamento em casos de infarto agudo do miocárdio, característica que será abordada com mais detalhes a seguir.

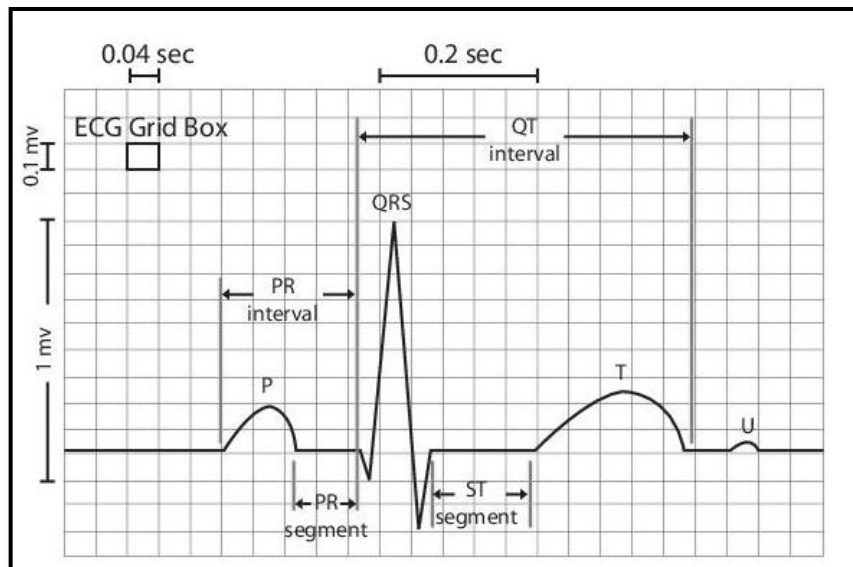


Figura 1: Elementos do eletrocardiograma normal. Onda P, despolarização atrial; Complexo QRS, despolarização ventricular; Segmento ST, intervalo entre o final da despolarização e o início da repolarização ventricular; Onda T, repolarização ventricular.

Fonte: (<http://www.research.chop.edu>)

1.2.1 Alterações do Eletrocardiograma no infarto do miocárdio

No ECG, as alterações após a isquemia do miocárdio ocorrem principalmente no segmento ST e na onda T. Em isquemias agudas, onde há bloqueio total de um ou mais ramos das coronárias, ocorre aumento da amplitude da onda T, seguida de supradesnível de ST, e desaparecimento da onda S do complexo QRS (Figura 2) Birnbaum *et al*, 2003). O supradesnível de ST em duas derivações contíguas determina o diagnóstico do infarto do miocárdio (Zimetbaum *et al*, 2003). As alterações no ST e onda T representam a fase mais aguda do IAM e duram apenas algumas horas ou no máximo 2 a 3 dias (Mansur *et al*, 2005), após esse período o segmento ST volta ao ponto isoeletrico do ECG e a onda T pode ou não se tornar invertida. No final do processo isquêmico, quando ocorre necrose total das células em risco, a área afetada se torna eletricamente inativa e ondas Q patológicas (Figura 2) são observadas no ECG (Bueno *et al*, 2011).

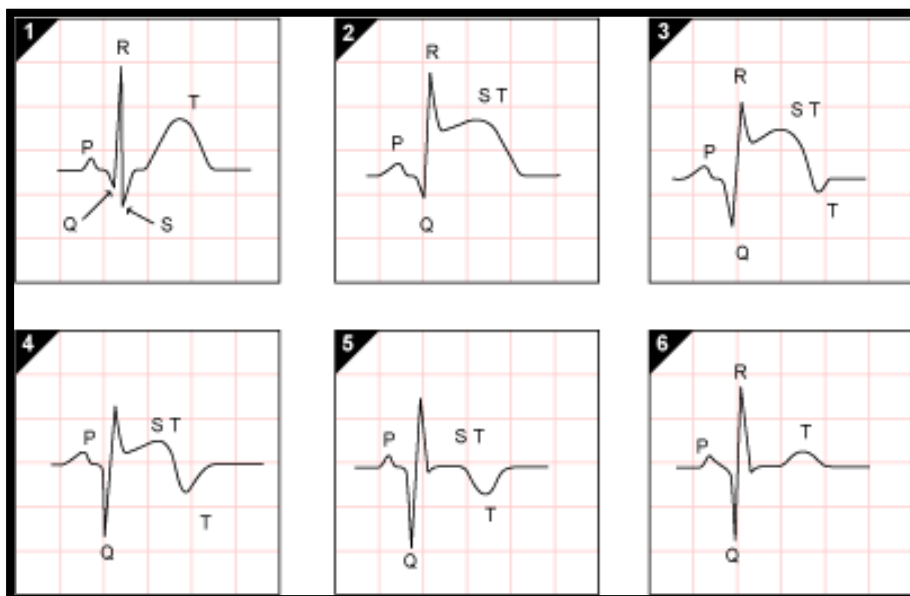


Figura 2: Sequência de Alterações do ECG no IAM: 1. Aumento da amplitude da onda T; 2. Elevação do segmento ST; 3. Elevação do segmento ST e desaparecimento da onda S; 4. ST começa a retornar ao ponto isoeletro e onda T invertida; 5. ST normal e onda T invertida; e 6. Onda Q patológica. **Fonte:** (<http://www.nottingham.ac.uk>)

A depressão de ST também é uma característica de isquemia do miocárdio, geralmente ocorre em situações onde há bloqueio parcial do fluxo coronário. Nestes casos, além do infradesnivelamento de ST também pode ocorrer depressão da onda T, ou mesmo não haver nenhuma alteração de repolarização. Em todas essas condições, é observável aumento nos níveis séricos de marcadores de necrose (National Clinical Guideline Centre UK, 2010).

O quadro 1 lista os critérios determinados pelos Comitês da Sociedade de Cardiologia Européia e do Colégio Americano de Cardiologia (*The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee*) para o diagnóstico da isquemia aguda do miocárdio que pode ou não levar ao infarto (Thygesen *et al* 2007).

O ECG também permite determinar a topografia do infarto. Existe uma grande correlação entre a presença de alterações em determinadas derivações e o local do infarto. Por exemplo, infartos anteriores relacionam-se a alterações nas derivações precordiais (V₁-V₆), enquanto infartos inferiores promovem alterações nas derivações bipolares DII, DIII e aVR (Resende *et al*, 2011). Quando há oclusão do ramo distal da coronária esquerda também pode ocorrer elevação de ST em DII (Alzand *et al*, 2011).

Quadro 1: Critérios para o diagnóstico de isquemia aguda do miocárdio.

Manifestações	Características
Elevação de ST	≥ 0.2 mV homem em V ₂ -V ₃ ≥ 0.15 mV mulher em V ₂ -V ₃ ≥ 0.1 mV outras derivações
Depressão de ST e alterações na onda T	Depressão de ST ≥ 0.05 mV Inversão de da onda T ≥ 0.1 mV e razão entre onda R e S (R/S) > 1.

Fonte: Adaptado de Thygesen *et al* 2007

Além do diagnóstico do IAM a elevação do segmento ST também pode ser utilizada para estimar a área do infarto. Para isso foram desenvolvidos modelos matemáticos que permitem quantificar as alterações eletrocardiográficas e relacioná-las ao tamanho da área lesada. Dentre eles podemos citar o escore de Aldrich, que se trata de uma equação matemática que leva em consideração o número de derivações com supradesnivelamento de ST e a amplitude do ST de cada uma delas (Aldrich *et al*, 1988). O escore de Aldrich é o mais utilizado, no entanto ele possui algumas limitações e tem baixa correlação com outros marcadores de necrose. Recentemente, foi desenvolvido um escore que leva em consideração a área sob a curva do segmento ST-T, que inclui na análise a onda T. Este apresentou maior correlação com a troponina T (marcador bioquímico de necrose), que o escore de Aldrich (Resende *et al*, 2011).

Em estudos pré-clínicos, a elevação do ST pode ser utilizada para validar a ligadura correta da artéria coronária e para predizer a severidade do infarto em modelos animais de infarto do miocárdio (Preda e Burlacu *et al* 2010). A atenuação da elevação do segmento ST é um marcador de pré-condicionamento isquêmico (Cohen *et al*, 1997) e portanto, um marcador de proteção cardíaca. Experimentalmente, a atenuação do ST tem sido utilizada como critério para avaliar o efeito de fármacos e do condicionamento isquêmico na isquemia cardíaca.

1.3 ALDOSTERONA E SEUS EFEITOS DELETÉRIOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Aldosterona é um hormônio mineralocorticoide e um dos efetores finais do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), sistema hormonal que desempenha papel fundamental no controle da pressão arterial (PA). Em resposta a diminuição do volume intravascular e/ou redução de sódio da mácula densa, o rim secreta renina que é produzida nas células justaglomerulares da arteríola aferente dos rins. A renina hidrolisa o angiotensinogênio em angiotensina I e no pulmão, esta é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II por sua vez, atua nas células musculares lisas causando vasoconstrição, e nas glândulas adrenais estimulando a produção de aldosterona (Connel e Davies, 2005).

A aldosterona regula a homeostase de água e eletrólitos nos rins, promovendo reabsorção de sódio e excreção de potássio nas células epiteliais do néfron distal, do cólon e glândulas sudoríparas (Maron *et al*, 2010). A retenção de sódio causada pela ação da aldosterona promove aumento do volume sanguíneo e, conseqüentemente, aumento da PA.

A aldosterona é sintetizada a partir do colesterol nas células glomerulosas do córtex das glândulas adrenais por uma série de reações enzimáticas, catalisadas por desidrogenases e oxidases de função mista pertencentes, em sua maioria, à superfamília do citocromo P450 (Connel e Davies, 2005). Os principais reguladores da biossíntese da aldosterona são angiotensina II, concentrações extracelulares de potássio e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Muller, *et al* 1987; Quinn e Williams, 1988). A síntese de aldosterona também ocorre em tecidos como coração, cérebro, rins e vasos (Takeda *et al.*, 1995; Silvestre *et al.*, 1998). A adrenal, no entanto, é a maior fonte da aldosterona circulante (Connel e Davies, 2005).

A ação da aldosterona sobre as células epiteliais do néfron é mediada por um receptor localizado no citoplasma (perinuclear) na sua forma inativa denominado receptor mineralocorticoide (MR). A aldosterona é lipossolúvel e, portanto atravessa facilmente as membranas celulares. No citoplasma a aldosterona se liga ao MR, e o complexo receptor-hormônio se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de proteínas específicas envolvidas no transporte de sódio e potássio (Funder *et al*, 1997).

O MR pertence a um subgrupo de receptores esteroides do qual também fazem parte os receptores glicocorticoides, androgênicos e progestagênicos. Estes receptores fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares ativados por ligante (Fuller *et al*, 1991). Receptores MR são os únicos entre os receptores nucleares que possuem dois ligantes fisiológicos, aldosterona e glicocorticoides – cortisol em humanos ou corticosterona em roedores (Funder *et al* 2010). Ambos se ligam com similar afinidade ao MR. Nas células epiteliais, a enzima 11 β -desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2) cliva os glicocorticoides em metabólitos inativos cortisona e 11-deoxicorticosterona, respectivamente, facilitando o acesso da aldosterona ao MR (Gualupo *et al*, 2012).

A aldosterona também possui efeitos que são independentes dos receptores MR, são denominados, efeitos não-genômicos da aldosterona. Esses efeitos seriam mediados por um receptor de membrana, ainda não conhecido, que ativaria vias de transdução de sinais levando ao aumento de cálcio intracelular, diacilglicerol (DAG), trifosfato de inositol (IP₃), AMPc e ativação da proteína cinase C (PKC) (Chun *et al*, 2006). Os mecanismos da ação não-genômica da aldosterona bem como o seu significado fisiológico e patofisiológico ainda não foram completamente elucidados.

Além dos efeitos fisiológicos sobre as células epiteliais no néfron, a aldosterona possui um papel importante na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Estudos têm demonstrado a importância da ativação de receptores MR no desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca (IC), principalmente sobre a remodelação ventricular e fibrose após o infarto do miocárdio.

No sistema cardiovascular os receptores MR da aldosterona são expressos no endotélio, músculo liso vascular, cardiomiócitos e fibroblastos (Galuppo *et al*, 2012). Os níveis circulantes de aldosterona, bem como a sua biossíntese estão aumentados em situações patológicas como o IM e a IC (Francarolo *et al*, 2003; Guder *et al*, 2007; Mizuno *et al*, 2001). Os níveis de expressão dos receptores MR também são elevados na IC (Messaoudi *et al*, 2012).

Níveis elevados de aldosterona estão associados à hipertrofia cardíaca e fibrose, e esses efeitos são independentes da PA e dos níveis de potássio (Weber *et al*, 1991; Wilke *et al*, 1996). Além disso, a aldosterona estimula a agregação de plaquetas e causa disfunção endotelial (Rocha *et al*, 2001). A ativação inapropriada de receptores MR causa disfunção endotelial e prejudica a reatividade vascular, em parte por prejudicar a capacidade antioxidante vascular aumentando o estresse oxidativo, e também por limitar a biodisponibilidade de óxido nítrico (Leopold *et al*, 2007; Favre *et al*. De 2011). A

aldosterona aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, aumentando a atividade e a expressão da NADPH oxidase no endotélio vascular e nos miócitos cardíacos (Rude *et al*, 2005; Iglarz *et al*, 2005).

Níveis elevados de aldosterona também estão associados a incidência de arritmias ventriculares e atriais (Wei *et al*, 2010). Pacientes com hiperaldosteronismo primário apresentam maior risco de desenvolver arritmias cardíacas graves e fibrilação atrial. (Catena *et al*, 2008) A superexpressão de receptores MR no coração de camundongos causou arritmias ventriculares severas (Ouvrard-Pascaud *et al*, 2005).

Estudos recentes em camundongos com deleção genética para receptores MR demonstraram que a ausência desses receptores melhora o remodelamento cardíaco pós-infarto do miocárdio protegendo contra complicações crônicas, como remodelamento da matriz extracelular, hipertrofia dos miócitos e dilatação do ventrículo, em parte por prevenir a expressão de genes associados à hipertrofia e fibrose (Fraccarollo *et al*, 2011; Frantz *et al*, 2009).

Devido aos efeitos deletérios da ativação dos receptores MR no coração o bloqueio farmacológico desses receptores é uma alternativa terapêutica importante no tratamento de pacientes pós-infarto do miocárdio e com IC crônica. Estudos clínicos vêm demonstrando que antagonistas de MR reduzem a mortalidade e a morbidade de pacientes com IC sistólica crônica e disfunção do ventrículo esquerdo (Pitt *et al*, 1999; Pitt *et al*, 2003; Zannad *et al*, 2010).

1.4 ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES MR DA ALDOSTERONA

Os principais antagonistas farmacológicos de MR disponíveis são a espironolactona e a eplerenona. As características farmacocinéticas destes dois fármacos estão resumidas na Tabela 1.

A espironolactona (Figura 3), princípio ativo do medicamento Aldactone®, é um antagonista competitivo não seletivo do receptor MR da aldosterona. Possui estrutura química de $C_{24}H_{32}O_4S$ e peso molecular igual a 416,57g. É praticamente insolúvel em água e solúvel em benzeno, clorofórmio, acetato de etila e etanol absoluto. Sua fórmula é muito similar a da progesterona e por isso também possui moderada atividade antiandrogênica e progestogênica (Delyane *et al*, 2000). No fígado, é rapidamente

metabolizada em metabólitos ativos. Os principais deles são canrenoato de potássio e a canrenona, (Karim *et al.*, 1976).

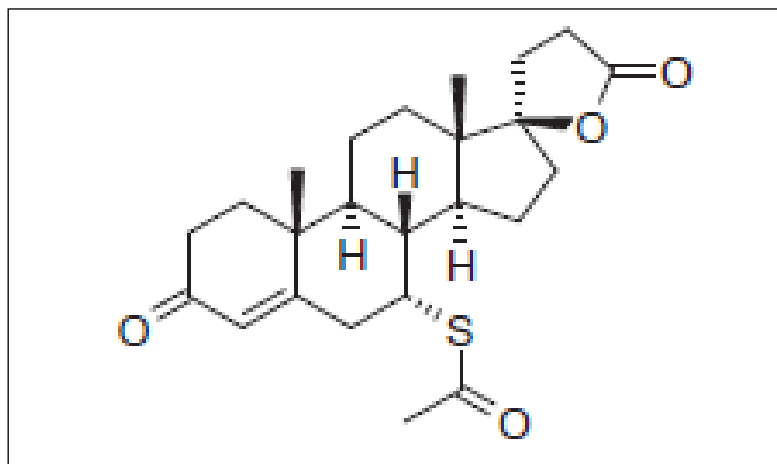


Figura 3: Estrutura química da espironolactona.

Fonte: Kolkhof *et al*, 2011.

A eplerenona, princípio ativo do medicamento Inspra®, é um antagonista seletivo para os receptores MR. Sua fórmula foi derivada da espironolactona, através da introdução de uma ponte 9 α , 11 α -epoxi e pela substituição do grupo 17 α -tioacetil por um grupo carbometoxi (Delyane *et al*, 2000). Estas características lhe confere maior seletividade ao receptor MR. Possui fórmula química de C₂₄H₃₀O₆ e peso molecular igual a 414,5 g. É insolúvel em água e solúvel em dimetilsulfóxido e não possui metabólitos ativos. (Figura 4).

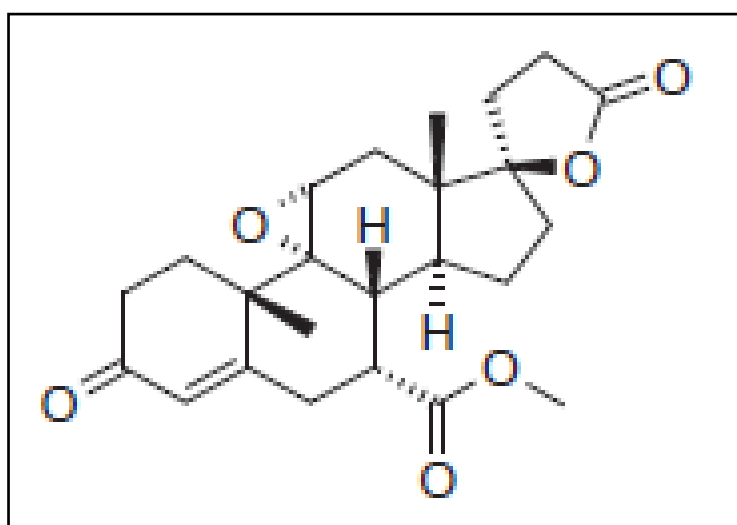


Figura 4: Estrutura química da eplerenona

Fonte: Kolkhof *et al*, 2011.

Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas e usos clínicos da espironolactona e eplerenona.

	Espironolactona	Eplerenona
Propriedades farmacocinéticas		
Absorção	73% (aumenta com a comida)	69%
Distribuição	90% ligado a proteínas	50% ligado a proteínas
Metabolismo	Fígado e rins (metabólitos ativos)	Fígado
Meia-vida	1.3-1.4h Metabólitos: 13.8-22h	4-6h
Uso clínico		
Hipertensão	50-100mg/dia	50mg (2vezes ao dia)
Insuficiência cardíaca	25mg-50mg/dia	25mg-50mg/dia

Fonte: Nappi e Sieng, 2011.

A eplerenona possui baixa afinidade por receptores esteroides. In vitro sua afinidade é cerca de 20 vezes menor que a espironolactona para receptores MR (Struthers *et al*, 2008), no entanto, por possuir maior seletividade por receptores MR, possui bioatividade semelhante a espironolactona in vivo. A dose de eplerenona necessária para inibir a ligação da aldosterona ao receptor MR in vivo, é cerca da metade da dose necessária para a espironolactona (de Gasparo *et al*, 1987).

Além disso, a eplerenona não apresenta efeitos colaterais tão intensos quanto a espironolactona. Devido a sua ação antiandrogênica e progestogênica, a espironolactona pode causar ginecomastia, impotência e ciclos menstruais anormais (Delyane *et al*, 2000). O índice de ginecomastia em pacientes tratados com espironolactona é aproximadamente 9% (Pitt *et al*, 1999), enquanto que para a eplerenona o índice é em torno de 0,5%. (Pitt *et al*, 2003).

Outro efeito colateral causado por ambos os antagonistas de MR é a hipercalemia, definida como o aumento sérico de potássio acima de 6 nmol/L (Pitt *et al*, 2006). A hipercalemia aumenta o risco de incidência de arritmias cardíacas graves, pois os níveis elevados de potássio alteram a função eletrofisiológica dos miócitos, por afetar a geração e a propagação do impulso nervoso (Almukdad, 2007). Tanto a espironolactona quanto a eplerenona podem aumentar os níveis séricos de potássio, de uma forma dose-dependente (Sica *et al*, 2005). No entanto, quando os pacientes

recebem doses adequadas do medicamento e são devidamente monitorados, os efeitos colaterais são minimizados.

Quanto ao bloqueio da ação do receptor MR, os dois antagonistas possuem eficiência similar (Chatterjee *et al*, 2012). A espironolactona e a eplerenona exercem seus efeitos benéficos sobre o coração prevenindo o remodelamento e a fibrose, melhorando os parâmetros hemodinâmicos e a resposta inflamatória.

Estudos clínicos têm demonstrando que ambos os antagonistas de MR são eficazes no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio. Em dois grandes estudos clínicos - RALES (*The Randomized Aldactone Evaluation Study*) e EPHEUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) a espironolactona e a eplerenona reduziram a morbidade e a mortalidade de pacientes com IC sistólica crônica e disfunção ventricular esquerda pós-infarto do miocárdio, respectivamente (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que a eplerenona também tem efeitos benéficos no tratamento de pacientes com IC leve (Zannad *et al*, 2010).

Estudos pré-clínicos demonstram que o tratamento de longo prazo com eplerenona promove melhoria da função ventricular bem como melhoria da função vascular em ratos cronicamente infartados, em parte por modular efeitos anti-inflamatórios. (Fraccarollo *et al.*, 2003; Fraccarollo *et al.*, 2008). O bloqueio de MR por eplerenona também preveniu o estresse oxidativo e melhorou a disfunção endotelial numa fase inicial pós-infarto do miocárdio em ratos que apresentavam níveis elevados de aldosterona no sangue (Sartório *et al*, 2007).

A espironolactona também apresentou efeitos positivos no IM de ratos, prevenindo o remodelamento cardíaco e a apoptose celular e inibindo o aumento da expressão de receptores MR e da enzima 11β -HSD2 (Takeda *et al*, 2007). Em ratos cronicamente infartados, a espironolactona melhorou a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, reduziu a fibrose e os níveis de noradrenalina no tecido cardíaco (Cittadini *et al*, 2003). A espironolactona também é capaz de bloquear a síntese de colágeno ativada pela aldosterona (Brilla *et al*, 2000).

Embora todos esses estudos tenham descrito as propriedades cardioprotetoras de antagonistas de MR sobre os danos cardíacos causados pelo IM, sobretudo limitando os efeitos deletérios da aldosterona, existem evidências de que a cardioproteção promovida por antagonistas de MR pode ser em parte, independente do bloqueio da ação da aldosterona.

1.4.1 Efeitos cardioprotetores dos antagonistas de MR independentes da aldosterona

Nos estudos clínicos RALES e EPHEsus foi observado que uso de bloqueadores de MR em pacientes com IC teve efeitos benéficos mesmo entre aqueles que apresentavam níveis normais de aldosterona circulante, evidenciando que a ação cardioprotetora desses fármacos ocorre na ausência de níveis anormais deste hormônio mineralocorticoide (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003).

Mihailidou e colaboradores (2009) utilizando modelo de isquemia e reperfusão revelou que baixas doses de espironolactona reduziram a área infartada e a apoptose celular no coração de ratos perfundidos com aldosterona ou cortisol. No entanto, a espironolactona quando perfundida sozinha foi capaz de reduzir significativamente a área necrosada e este efeito protetor persistiu em ratos adrenalectomizados. Este estudo fornece evidências claras de que o mecanismo protetor da espironolactona não é dependente da presença de aldosterona endógena.

Os mecanismos envolvidos nessa ação de antagonistas de MR ainda não são conhecidos. Além disso, não existem estudos que avaliem comparativamente a espironolactona e a eplerenona. Os estudos EPHEsus e RALES não podem ser comparados diretamente, pois foram realizados em populações distintas e em regimes posológicos diferentes. Nenhum estudo, até momento, avaliou se a eplerenona, assim como a espironolactona, possui ação cardioprotetora independente do bloqueio da ação da aldosterona. Seria de grande relevância avaliar tais propriedades.

1.5 RECEPTORES GLICOCORTICÓIDES

Outro ponto importante a ser investigado é interação de antagonistas de MR com receptores glicocorticóides (GR). A espironolactona possui afinidade por receptores GR, o que resulta numa atividade agonista ou antagonista sobre os glicocorticóides. (Couette *et al*, 1992).

Glicocorticóides vêm sendo apontados como cardioprotetores em modelos de isquemia em ratos e em humanos. No sistema cardiovascular, receptores GR são expressos, na parede dos vasos sanguíneos e no miocárdio (Walker, 2007). O efeito benéfico dos glicocorticóides tem sido atribuído principalmente à sua capacidade em limitar a resposta inflamatória aguda associada ao IAM (Tokudome *et al*, 2009).

Os receptores GR são receptores citosólicos, ativados por ligante, e pertencem a mesma família de receptores esteroides dos receptores mineralocorticoides da aldosterona. Esses dois tipos de receptores possuem alta homologia e são co-expressos de uma forma muito íntima nas células dos seus tecidos alvos, como células epiteliais, neurônios e cardiomiócitos (Farman *et al*, 2001). Além disso, compartilham ligantes comuns. O cortisol (ou corticosterona, em roedores) é o ligante endógeno de receptores GR, mas também pode se ligar, com afinidade similar, aos receptores MR. Na ausência da enzima 11 β -HSD2, (enzima que cliva os glicocorticoides em formas inativas) e em situações onde há alteração do estado redox celular, glicocorticoides podem ativar receptores MR e mediar efeitos pró-inflamatórios em resposta ao infarto do miocárdio (Funder *et al*, 2005; Mihailidou *et al*, 2009). Nos cardiomiócitos a enzima 11 β -HSD2 é expressa em baixíssimas concentrações.

Independentemente da redundância funcional com receptores mineralocorticoides, estudos têm demonstrado que ativação de receptores GR no coração protege contra os danos causados pelo infarto do miocárdio. Glicocorticoides atenuam as interações celulares entre leucócitos e células endoteliais e reduzem a produção e liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (Cronstein *et al*, 1992; Radomski *et al*, 1990). Além de seus efeitos genômicos, estudos têm demonstrado efeitos não genômicos de glicocorticoides e estes estão associados a sua ação cardioprotetora (Pitzales *et al*, 2002), como por exemplo, o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (Hafezi-Moghadan *et al*, 2002). Além disso, foi demonstrado que a dexametasona, um potente agonista de receptores GR, protegeu contra morte celular

causada pela isquemia e reperfusão em camundongos, por promover ativação da enzima prostaglandina D sintase tipo lipocalina (PGDS-L), responsável pela síntese da prostaglandina D2 (PGD2) (Tokudome *et al*, 2009). Um estudo recente demonstrou que ativação de receptores GR protege contra a isquemia cardíaca por ativar a expressão de Bcl-xL (Xu *et al*, 2011). Clinicamente, a administração de glicocorticoides reduziu as taxas de mortalidade de pacientes, quando utilizado nos primeiros dias após o infarto do miocárdio (Guigliano *et al*, 2003).

Apesar do papel de receptores GR na função cardíaca ser controversa, glicocorticoides são geralmente considerados hormônios cardioprotetores. Além disso, os efeitos deletérios descritos para o cortisol são mediados por receptores MR, enquanto a ativação de receptores GR parece estar relacionada a uma ação cardioprotetora.

Assim, a hipótese de que os efeitos cardioprotetores da espironolactona possam ser mediados por receptores GR explicaria, pelo menos em parte, porque a espironolactona protege contra os danos da isquemia cardíaca, mesmo na ausência da aldosterona.

Devido a todas essas evidências de que a ação dos antagonistas de MR no coração ocorre independentemente do bloqueio da ação da aldosterona. E devido a escassez de estudos que avaliem tais propriedades. A proposta do nosso estudo foi avaliar de uma forma comparativa o efeito da espironolactona e eplerenona numa fase aguda da isquemia cardíaca e investigar uma possível interação dos efeitos da espironolactona com a ativação de receptores GR. Para isso, avaliamos o efeito da espironolactona e eplerenona no coração de ratos adrenalectomizados e não adrenalectomizados submetidos à isquemia cardíaca.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos agudos da espironolactona e da eplerenona sobre a isquemia do miocárdio em ratos normais e adrenalectomizados.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da espironolactona e da eplerenona sobre a elevação do segmento ST do eletrocardiograma em ratos normais e adrenalectomizados, submetidos à ligadura de coronária.
2. Avaliar o efeito da espironolactona e da eplerenona sobre a necrose tecidual de ratos normais e adrenalectomizados, submetidos à ligadura de coronária.
3. Avaliar o efeito da espironolactona sobre a elevação do segmento ST do eletrocardiograma de ratos normais e adrenalectomizados, submetidos à ligadura de coronária, na presença do antagonista de receptor glicocorticoide (GR), mifepristona.
4. Avaliar a ação da espironolactona sobre a necrose tecidual em ratos normais e adrenalectomizados, submetidos à ligadura de coronária, na presença do antagonista de receptor glicocorticoide (GR), mifepristona.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). (Protocolo nº 2011/88). Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do National Institute of Health, que dispõe sobre o cuidado, manipulação e utilização de animais na pesquisa.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental, Centro de Ciências Farmacêuticas (CiPharma) e no Laboratório de Hipertensão, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP.

3.1 Animais

Foram utilizados 160 ratos *Wistar* machos (200 a 250 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com livre acesso a ração e água, em ambiente com ciclos claro e escuro de 12 horas.

3.2 Fármacos e Tratamento

Os fármacos Espironolactona, Eplerenona e Mifepristona foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As doses utilizadas foram definidas baseado em estudos prévios descritos na literatura, sendo para Espironolactona 20mg/kg (Silvestre *et al*, 1999); Eplerenona 10mg/kg (Kobayashi *et al*, 2006) e Mifepristona 20mg/kg (Bobryshev *et al*, 2009). As soluções estoques de espironolactona e mifepristona foram preparadas com etanol e eplerenona com dimetilsulfóxido.

As soluções dos fármacos e soluções controle foram administradas por via oral (gavagem) em dose única 30 minutos antes da indução da anestesia e 1 hora antes da ligadura da coronária. No Quadro 1 e a Figura 5 estão listados os grupos experimentais. Os animais foram divididos em dois grandes grupos, em um deles os animais tiveram as glândulas adrenais removidas - **adrenalectomia bilateral** e o outro não.

Quadro 1: Divisão dos grupos experimentais.

1. Glândulas Adrenais intactas	2. Adrenalectomizados
1.1 Controle: cirurgia fictícia 1.2 Sem tratamento (IAM) 1.3 Espironolactona 1.4 Eplerenona 1.5 Mifepristona 1.6 Mifepristona + Espironolactona	2.1 Controle: cirurgia fictícia 2.2 Sem tratamento (IAM) 2.3 Espironolactona 2.4 Eplerenona 2.5 Mifepristona 2.6 Mifepristona + Espironolactona



Figura 5: Fluxograma indicando os grupos experimentais. Os animais do grupo à esquerda foram submetidos à adrenalectomia bilateral para remoção das glândulas adrenais.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p), traqueostomizados, e conectados a um respirador para pequenos roedores (SAR-840, USA) para permitir ventilação artificial com ar ambiente (volume de 1,5-2,5 ml/ciclo e frequência de 45-50 ciclos/min).

A artéria e veia femoral foram cateterizadas com cânulas confeccionadas a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 a 4 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e heparina (100U.I/ 0,1mL), para obtenção do sinal da pressão arterial (PA) e administração de fármacos, respectivamente. Brometo de pancurônio (1mg/kg), via intravenosa (i.v.), foi utilizado como relaxante muscular para auxiliar na ventilação mecânica.

Após esses procedimentos, agulhas hipodérmicas foram posicionadas para obtenção do eletrocardiograma (ECG) na derivação periférica DII. Durante e após o procedimento de ligadura da coronária o ECG foi continuamente registrado.

O método utilizado na indução da isquemia foi a ligadura da coronária esquerda descendente, adaptado do descrito por SELYE *et al*, 1960 e FISHBEIN *et al.*, 1978. Foi realizada toracotomia esquerda entre o quarto e quinto espaços intercostais, o coração foi exposto e removido da cavidade torácica para permitir o acesso à artéria coronária descendente esquerda. Um fio de sutura foi passado ao redor da artéria e amarrado, causando a oclusão do vaso. O grupo cirurgia fictícia foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem proceder a ligadura. Foram considerados os animais que apresentaram elevação do segmento ST e aumento da amplitude da onda T do ECG. Ao final de 1 hora após a ligadura, os animais foram eutanasiados e o coração removido para posterior análise histológica. O protocolo experimental está esquematizado na figura 6.

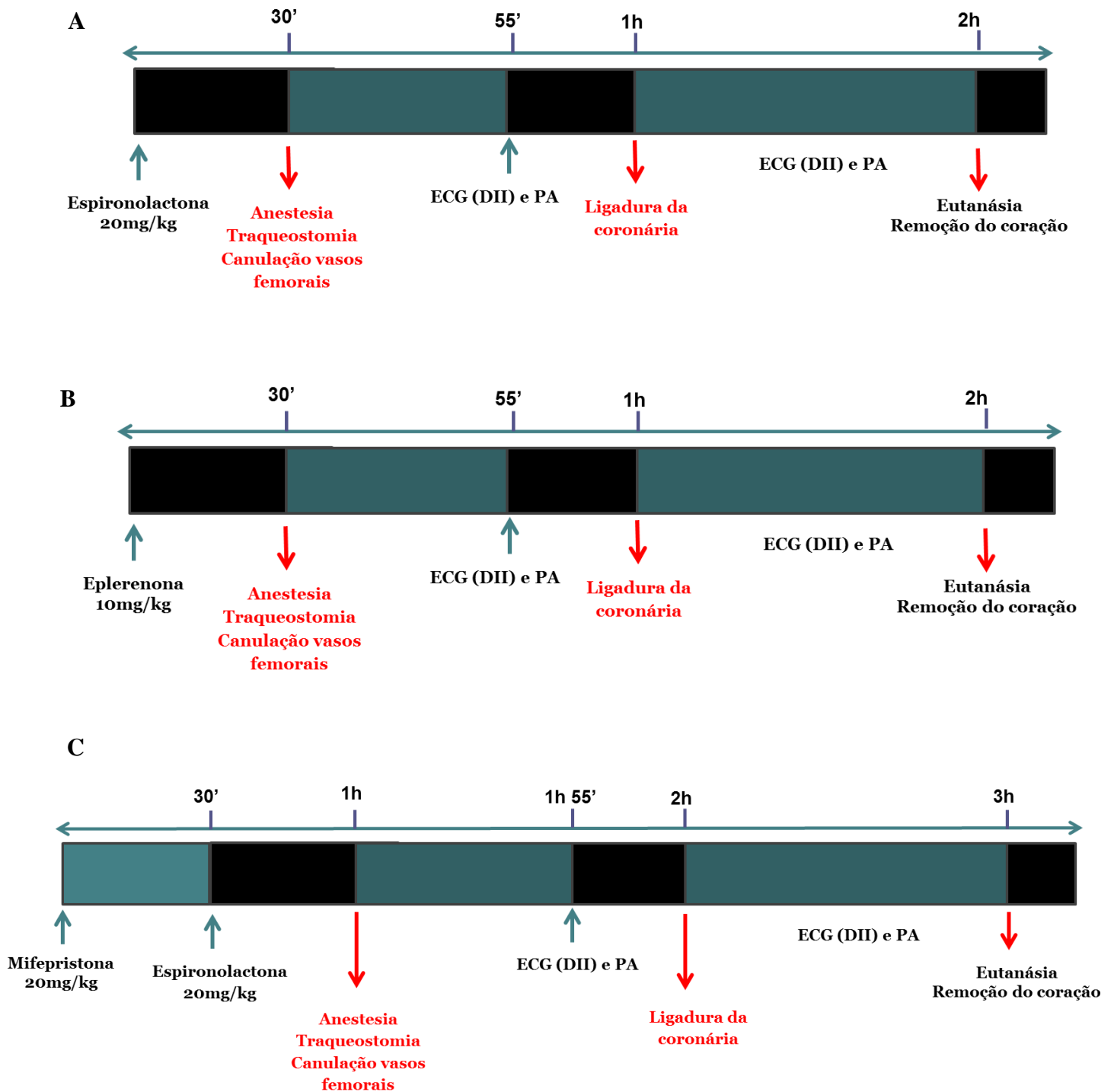


Figura 6: Protocolo experimental. Os animais foram mantidos em anestesia e ventilação mecânica durante todo o procedimento experimental. A) Grupo tratado com espironolactona 20mg/kg B) Grupos tratado com eplerenona 10mg/kg, C) Grupos tratado com mifepristona 20mg/kg (um grupo foi tratado apenas com mifepristona e outro com Mifepristona e espironolactona). Os animais adrenalectomizados foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais descritos em A, B e C. A cirurgia de adrenalectomia foi realizada 48h antes.

3.4 Adrenalectomia bilateral

Um dos grupos experimentais foi submetido à adrenalectomia bilateral. Os animais foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) i.p. Após tricotomia na região lombar, foi realizada incisão longitudinal da pele e músculo, obtendo-se uma abertura de aproximadamente dois (2) centímetros. A glândula adrenal, que se encontra inserida na gordura perirenal próxima ao pólo cranial do rim, foi então retirada. Em seguida, os planos incisados foram suturados. Após o procedimento os animais foram colocados em caixas em decúbito ventral com acesso livre a ração e água contendo NaCl 0,9%. As caixas foram colocadas em elevação na porção cranial do corpo dos animais em relação à porção caudal. Após a cirurgia, os animais foram tratados com um anti-inflamatório e analgésico, Banamine® (princípio ativo flunixinina), na dose 1mg/kg/dia (Intervet/ Matercorp, Rio de Janeiro, RJ). Após um período de recuperação de 48 horas, os animais foram submetidos ao protocolo experimental descrito na figura 6. Ao final do experimento, amostras de sangue foram coletadas para dosagem dos níveis séricos de aldosterona.

3.5 Dosagem da aldosterona sérica

Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal e centrifugadas em 1500g durante 15 minutos. Após a centrifugação o soro (sobrenadante) foi pipetado em alíquotas de aproximadamente 1 ml e congelado. As amostras de soro foram encaminhadas a um laboratório de análises clínicas onde foi feita a dosagem da aldosterona por um teste radioimunológico.

3.6 Análise do Eletrocardiograma e Pressão Arterial

Para a obtenção dos sinais do ECG e PA foi utilizado um sistema de condicionadores de sinais, desenvolvido no Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais. Os sinais obtidos desse sistema foram amostrados em tempo real a uma frequência de 1200 Hz por uma placa conversora analógico-digital de 12 *bits* de resolução (Daqboard 2000, USA). Foram registradas as derivações bipolares DI, DII e DIII. Para a análise da PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram extraídos segmentos de 2 segundos nos tempos: antes da ligadura (controle), 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos após a ligadura.

3.6.1 Determinação da área sob a curva do ST-T

A partir do sinal do ECG foi obtido ainda o parâmetro da área sob a curva ST-T, como descrito por Mansur *et al*, 2006. No sinal da derivação II, uma linha horizontal (vermelha) foi traçada entre o início da inclinação da onda S e o final da onda T, quando esta atinge o ponto isoeletrico (Figura 7). Para essa análise foi utilizado o programa Analyzer 7.0/ Hemolab Data Acquisition software 14.2, desenvolvido pelo Prof. Harald Stauss da Universidade de Iowa (<http://www.harald.nxserve.net/HemoLab/HemoLab.html>).

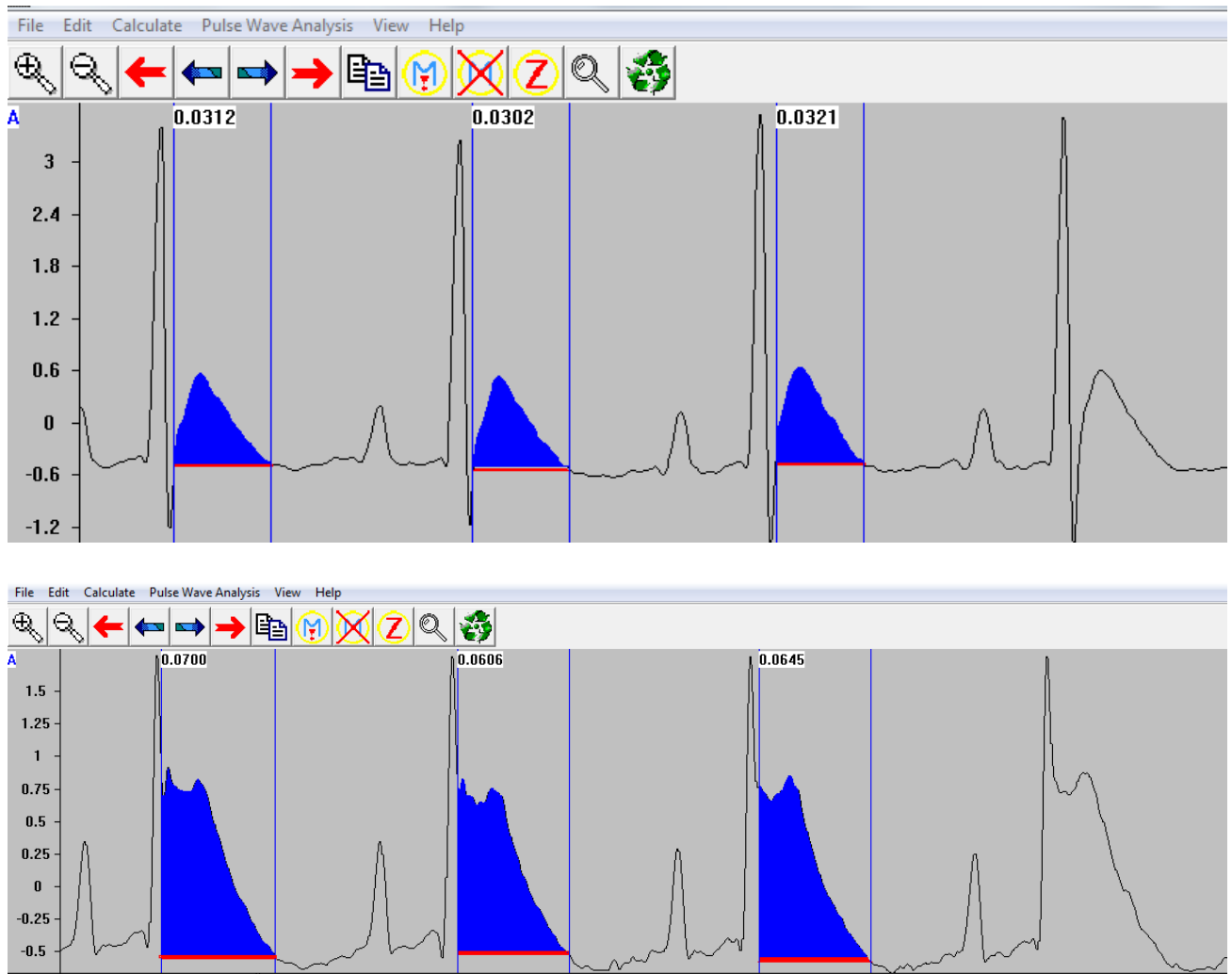


Figura 7: Área sob a curva do segmento ST-T do ECG. Exemplo da seleção da área para o cálculo por planimetria. A) ECG antes da ligadura; B) ECG após a ligadura.

3.7 Análise histológica

Ao término dos experimentos os animais foram eutanasiados e submetidos a necropsia para a coleta do coração. Os órgãos foram fixados em solução de formol 10% tamponado e acondicionados em recipiente protegido da luz. Para a preparação das lâminas, os ventrículos foram separados e seccionados em três cortes transversais e colocados em cassetes devidamente identificados. O tecido foi desidratado com álcool em concentrações crescentes, diafanizados com xilol, embebidos e emblocados em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro (4) micrômetros de espessura foram obtidas em micrótomo, fixadas em lâminas de vidro e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

3.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. Para as análises dos parâmetros do ECG, PA e FC a comparação entre os grupos foi feita utilizando-se Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. Para as análises histológicas foi utilizado One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism Project (versão 5.0). Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Taxa de mortalidade

Neste estudo foram utilizados 160 animais, sendo que 41 (25,6%) deles vieram a óbito em menos de 1 h após a oclusão da coronária esquerda. A mortalidade por grupo está apresentada na tabela 2 e na figura 8. O grupo tratado com espironolactona 20mg/kg apresentou uma taxa de mortalidade menor em relação ao grupo ligadura sem tratamento.

Tabela 2: Mortalidade por grupo experimental

Grupos experimentais	Valor absoluto	%
	(nº animais mortos/ total)	
Controle (cirurgia fictícia)	0/6	0%
Ligadura sem tratamento	11/36	30,55%
Espironolactona 20mg/kg	1/12	8,3%
Eplerenona 10mg/kg	3/9	33,33%
Mifepristona 20mg/kg	2/13	15,38%
Mifepristona + Espironolactona	1/9	11,11%
ADRENALECTOMIA		
Ligadura sem tratamento	9/24	37,5%
Espironolactona 20mg/kg	2/14	14,28%
Eplerenona 10mg/kg	4/10	40%
Mifepristona 20mg/kg	7/19	36,84%
Mifepristona + Espironolactona	1/8	12,5%

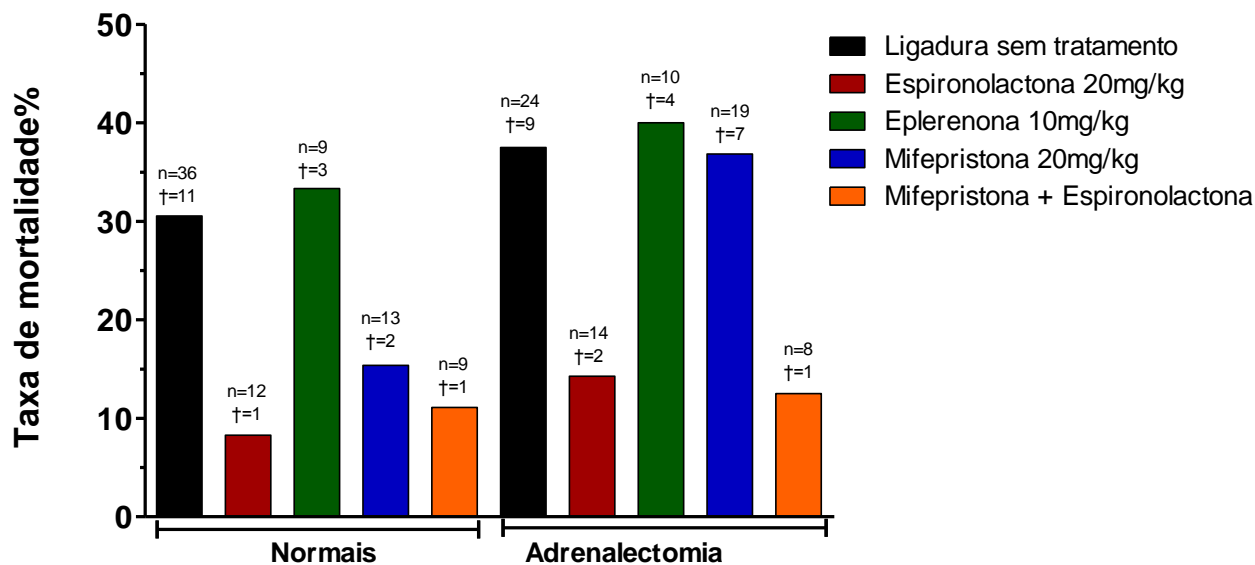


Figura 8: Gráfico representativo da taxa de mortalidade por grupo experimental. Percentual entre o número total de animais e o número de animais que foram a óbito antes de 1h após a isquemia.

4.2 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os valores absolutos de PAS, PAD e FC estão representados nas figuras 9 e 10.

A ligadura da coronária promoveu uma redução da PAS e da PAD, em relação ao tempo zero (antes da ligadura), de aproximadamente 30 mmHg e 23 mmHg, respectivamente. Os grupos tratados com os diferentes fármacos também apresentaram redução da PA após a ligadura. Apenas o grupo ligadura sem tratamento apresentou diferenças significativas entre os valores de PAS e PAD em relação ao grupo controle (ligadura fictícia) (Figuras 9 e 11). Nenhum dos tratamentos alterou os valores basais (antes da ligadura da coronária) de PAS e PAD. Nos animais submetidos à adrenalectomia bilateral, todos os grupos submetidos à ligadura coronária apresentaram valores menores de PAS e PAD em relação ao grupo controle (Figuras 9 e 10). A adrenalectomia não alterou os valores basais destes parâmetros.

A FC também foi reduzida após a ligadura, em todos os grupos. O grupo controle (ligadura fictícia) também apresentou redução da FC.

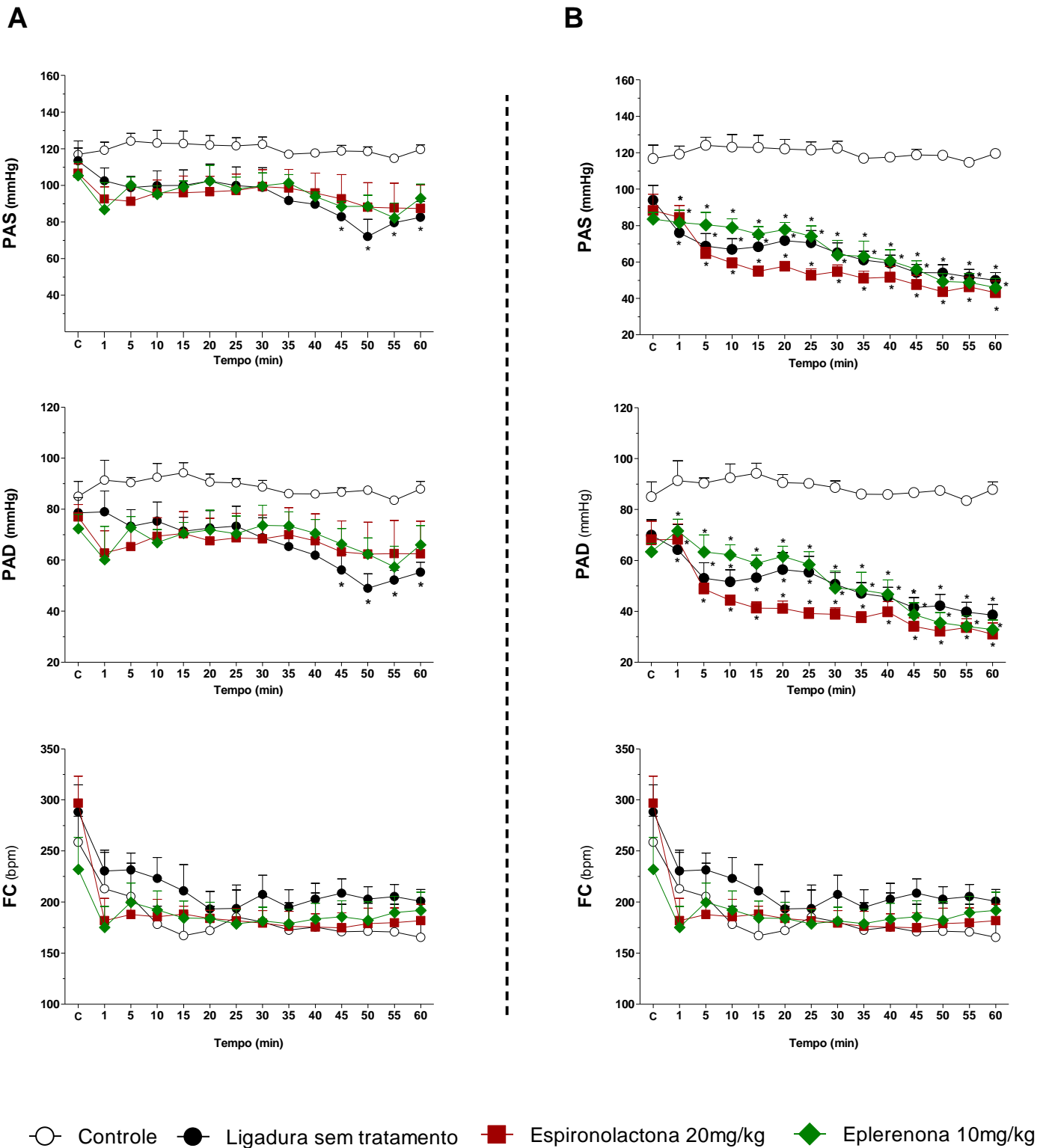


Figura 9: Valores absolutos de PA e FC dos animais tratados com Espironolactona 20mg/kg e Eplerenona 10mg/kg submetidos à ligadura de coronária. A) Animais normais (glândulas adrenais intactas; B) Animais adrenalectomizados. Valores expressos em média \pm e.p.m. Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. *= $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia). n=6

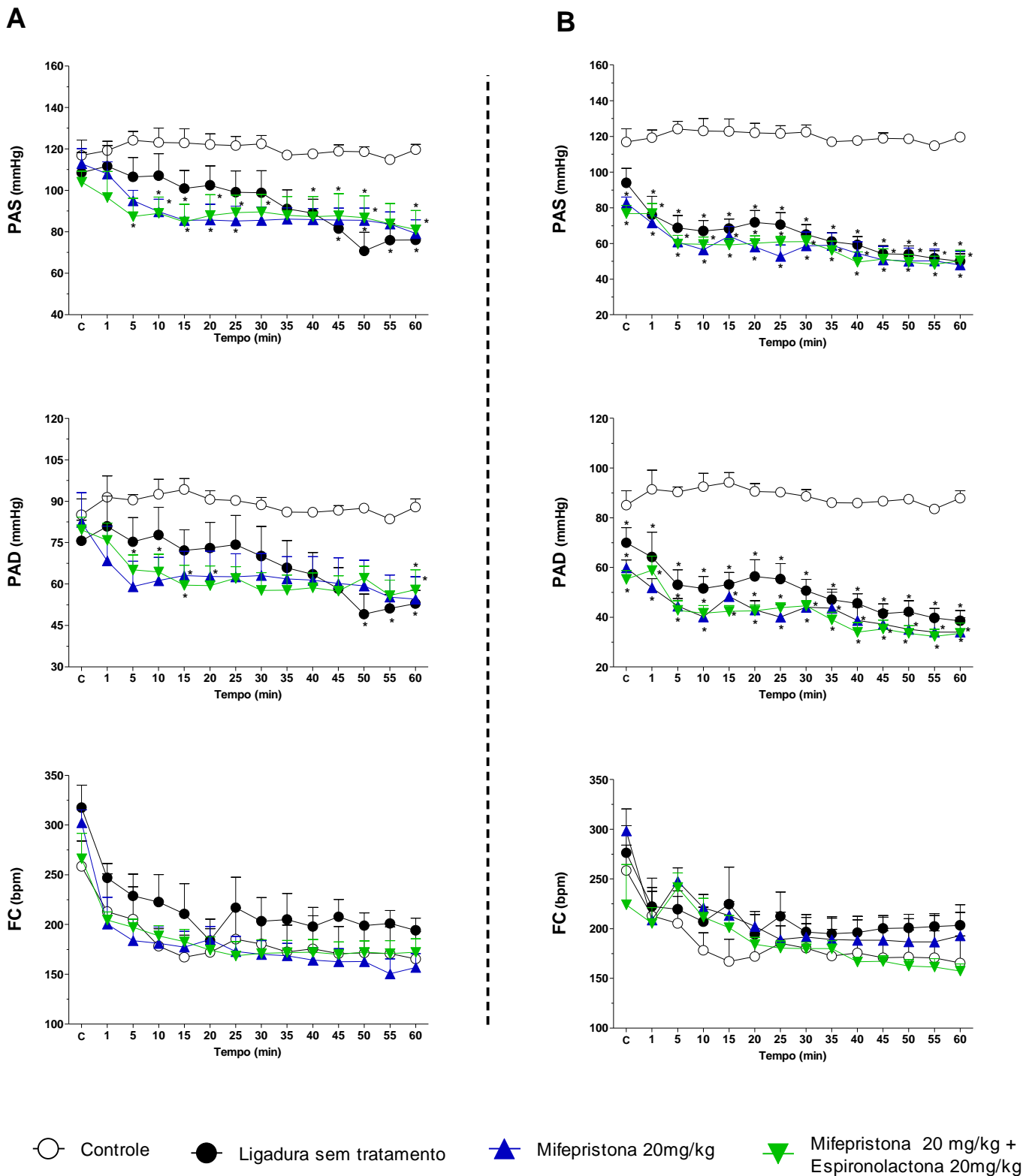


Figura 10: Valores absolutos de PA e FC dos animais tratados com Mifepristona 20mg/kg submetidos à ligadura de coronária. A) Animais normais (glândulas adrenais intactas; B) Animais adrenalectomizados. Valores expressos em média \pm e.p.m. Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * = $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia). N=6

4.3 Avaliação do eletrocardiograma

4.3.1 Alterações no ECG após a ligadura

O ECG foi registrado nas derivações DI, DII e DIII. Após a ligadura da coronária uma série de alterações eletrocardiográficas foi observada. A alteração com maior predominância foi o supradesnívelamento de ST e aumento da amplitude de T nas derivações DI e DII. Foram observadas, ainda, inversão da onda T e do segmento ST, ondas P anormais, bloqueio atrioventricular, fibrilação e bradicardia. O grupo ligadura sem tratamento apresentou maior intensidade de alterações que os grupos tratados. A figura 11 apresenta exemplos dessas alterações na derivação II do ECG.

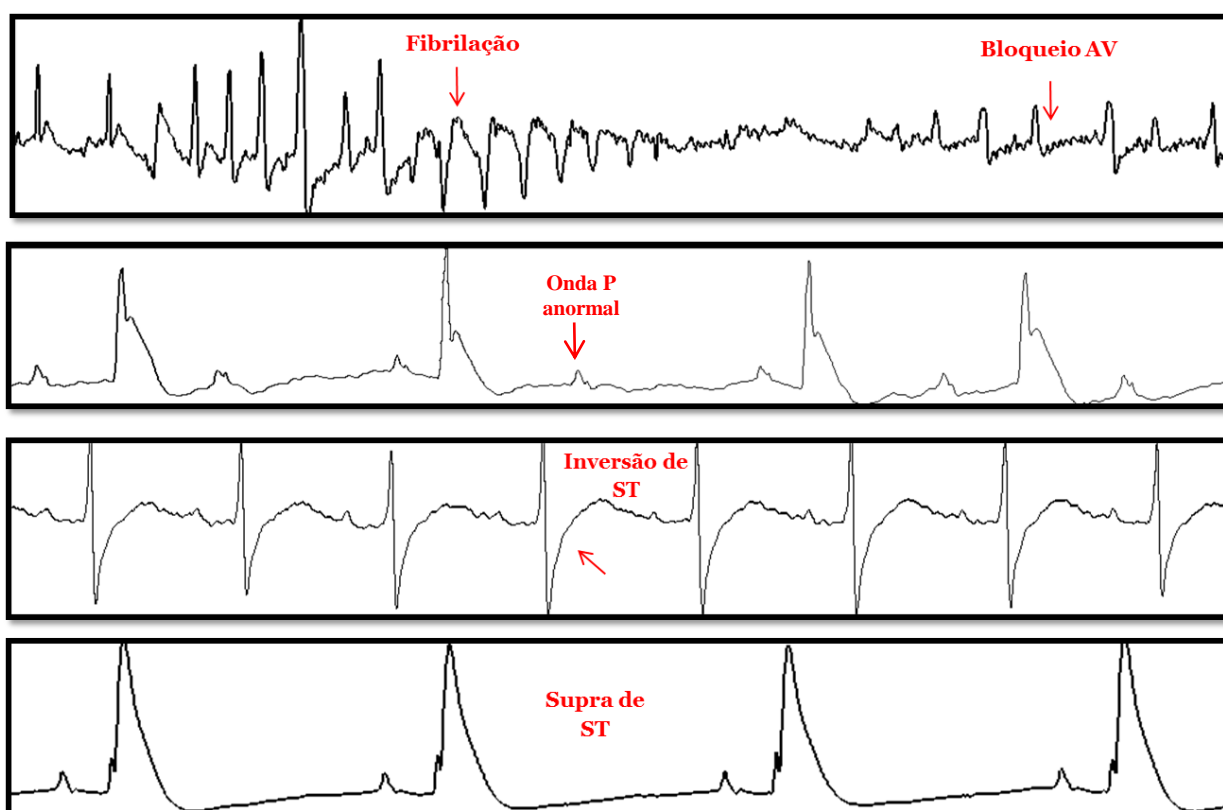


Figura 11: Exemplos de alterações eletrocardiográficas pós-ligadura. Derivação II.

4.3.2 Variação da área sob a curva ST-T

Para análise quantitativa do supradesnivelamento de ST foi utilizada o sinal do ECG de DII. A figura 13 apresenta a variação percentual da área sob a curva ST-T durante 1 h após a ligadura. A ligadura da coronária promoveu supradesnivelamento de ST dos animais sem tratamento. A espironolactona 20 mg/kg, administrada via oral 1 h antes da ligadura, preveniu o supra de ST. A eplerenona 10 mg/kg também foi capaz de reduzir essa alteração eletrocardiográfica. Um resultado semelhante foi observado nos animais submetidos à adrenalectomia bilateral. (Figura 13).



Figura 12: Imagem representativa do registro dos ECGs 40 min após a ligadura da coronária. A) Grupo controle (ligadura fictícia); B) Grupo ligadura sem tratamento; C) Grupo espironolactona 20mg/kg D) Grupo eplerenona 10 mg/kg.

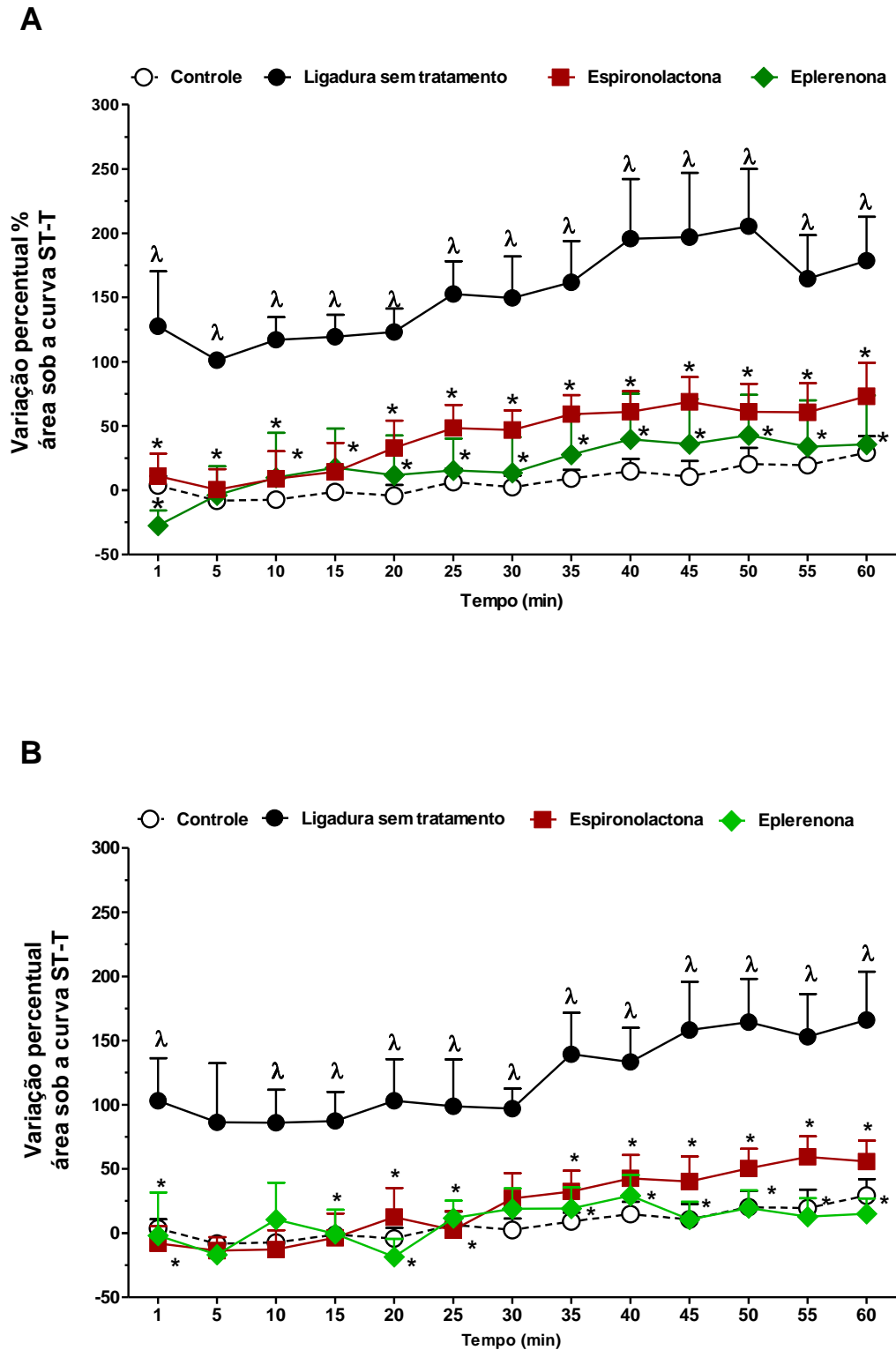
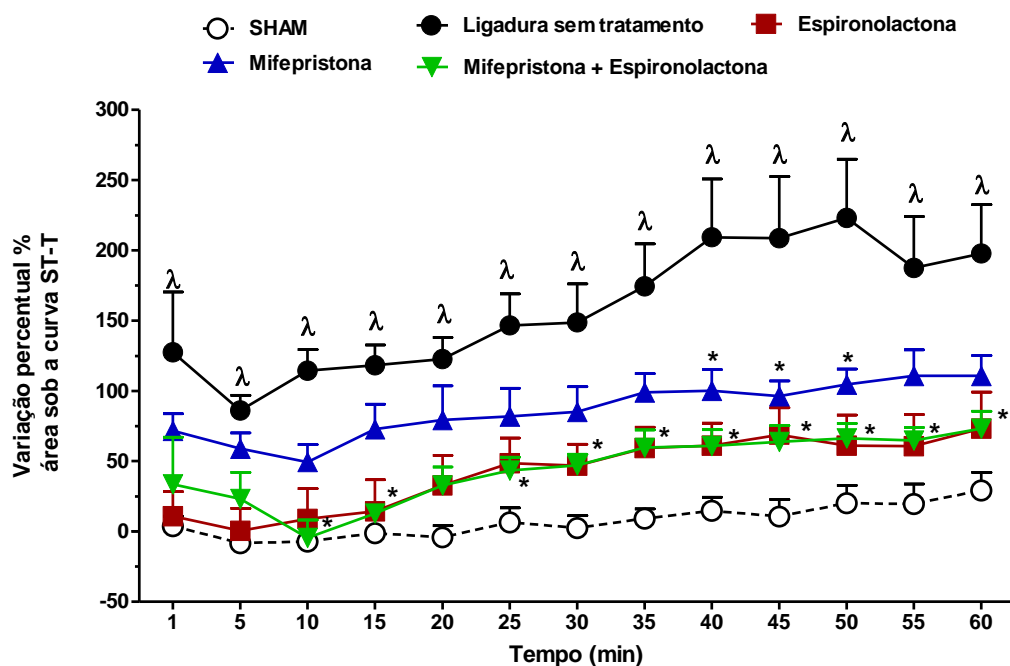


Figura 13: Variação da área sob a curva ST-T do ECG dos animais tratados com Espironolactona e Eplerenona submetidos à ligadura de coronária. A) Animais normais (glândulas adrenais intactas; B) Animais adrenalectomizados. Valores expressos em média \pm e.p.m. Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * = $P < 0.05$, em relação ao grupo ligadura sem tratamento; λ = $P < 0.05$, em relação ao grupo controle. $n=6$

O grupo tratado com o bloqueador de receptor GR (mifepristona 20mg/kg) apresentou redução da área sob a curva ST-T nos tempos 40, 45 e 50 minutos após a ligadura. Nos animais adrenalectomizados não houve diferença significativa em relação ao grupo ligadura sem tratamento. (Figura 14). No grupo tratado com mifepristona + espironolactona houve redução da área sob a curva ST-T em relação ao grupo ligadura sem tratamento. A mifepristona parece, portanto, não influenciar a ação da espironolactona. (Figura 14).

A



B

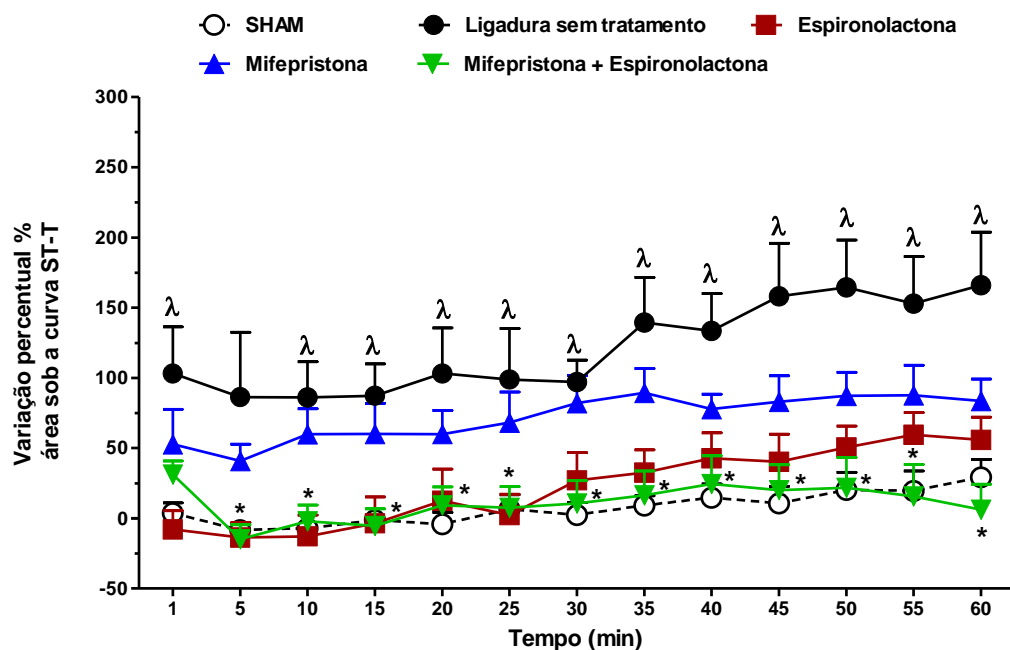


Figura 14: Variação da área sob a curva ST-T do ECG dos animais tratados com Mifepristona e Espironolactona submetidos à isquemia cardíaca. A) Animais normais (glândulas adrenais intactas; B) Animais adrenalectomizados. Valores expressos em média \pm e.p.m. Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * = $P < 0.05$, em relação ao grupo ligadura sem tratamento; $\lambda = P < 0.05$, em relação ao grupo controle. $n=6$

4.4 Dosagem da aldosterona sérica

Com o objetivo de verificar se a adrenalectomia bilateral foi realizada corretamente e se os animais apresentavam níveis insignificantes de aldosterona sérica foi realizada a dosagem desse hormônio, apresentada na figura 15.

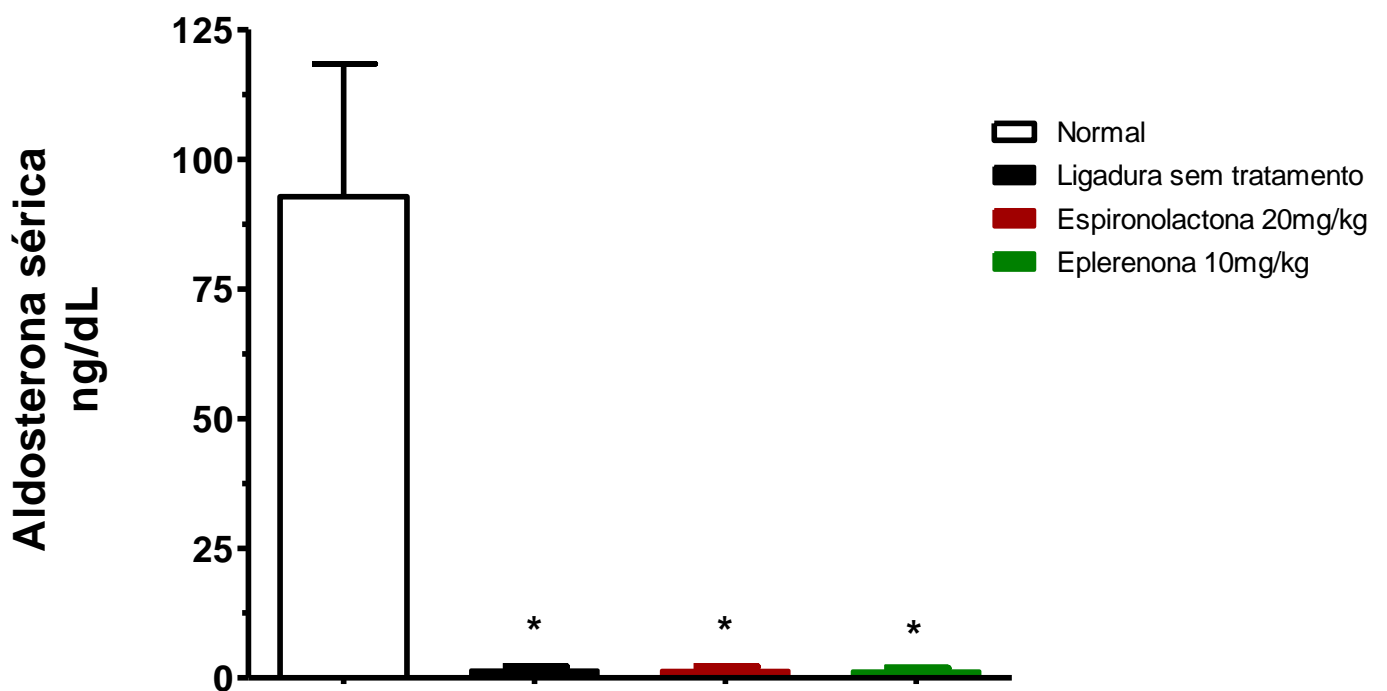


Figura 15: Dosagem sérica da aldosterona. . Valores expressos em média \pm e.p.m. One-Way ANOVA seguido do pós-teste Dunn's $*= P < 0.05$, em relação ao grupo normal (adrenais intactas). n=4

4.5 Análise histológica

Foi observado nos cortes histológicos a presença de dilatação de vasos sanguíneos, processo inflamatório intenso e necrose celular no tecido cardíaco dos animais submetidos à ligadura de coronária (Figura 16 e 17). A necrose celular foi avaliada qualitativamente de acordo com a sua intensidade em: ausente, leve, moderada ou extensa. A Tabela 3 e 4 apresenta o grau de intensidade e o percentual de animais que apresentaram necrose celular em cada grupo.

No grupo ligadura sem tratamento todos os corações analisados apresentaram áreas de necrose variando entre leve e extensa. O tratamento com espironolactona e eplerenona atenuou a intensidade da necrose causada pela ligadura e em alguns animais não foi observada a presença de necrose. Um resultado semelhante foi observado nos animais submetidos à adrenalectomia bilateral.

Tabela 3: Percentual de animais que apresentaram necrose cardíaca, classificados de acordo com a intensidade da necrose.

	Intensidade da necrose%			
	Ausente	Leve	Moderada	Extensa
Controle (n=6)	100,00	0,0	0,0	0,0
Ligadura (n=6)	0,0	66,66	16,66	16,66
Espironolactona (n=6)	16,66	66,66	16,66	0,0
Eplerenona (n=6)	16,66	66,66	16,66	0,0
Adrenalectomia				
Ligadura (n=5)	0,0	40,0	20,0	40,0
Espironolactona (n=5)	40,0	60,0	0,0	0,0
Eplerenona (n=6)	33,33	66,66	0,0	0,0

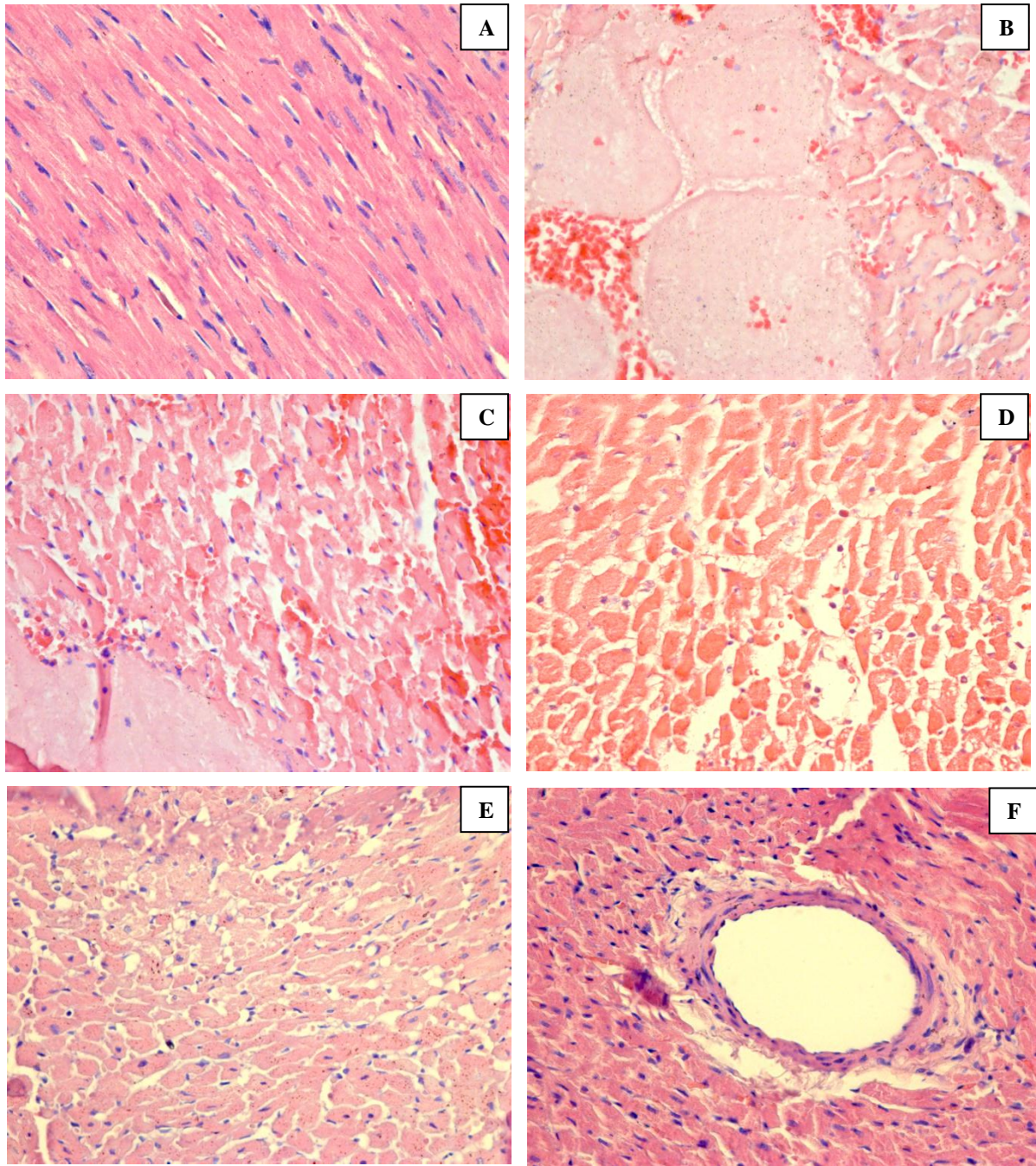


Figura 16: Histologia do coração de animais submetidos a ligadura da coronária esquerda. (A) Controle (ligadura fictícia); (B) Ligadura sem tratamento. (C) Espironolactona 20 mg/kg; (D) Eplerenona 10 mg/kg; (E) Espironolactona 20mg/kg grupo adrenalectomizado; (F) Eplerenona 10mg/kg grupo adrenalectomizado . Coloração Hematoxilina-Eosina. (aumento 40X).

Os grupos tratados com mifepristona também apresentaram uma intensidade menor do grau de necrose, quando esta era presente. O mesmo foi observado nos grupos tratados com mifepristona + espironolactona (Tabela 4).

Tabela 4: Percentual de animais que apresentaram necrose cardíaca, classificados de acordo com a intensidade da necrose.

	Intensidade da necrose%			
	Ausente	Leve	Moderada	Extensa
Mifepristona (n=6)	16,66	83,33	0,0	0,0
Mifepristona + Espironolactona (n=6)	40,0	60,0	0,0	0,0
Adrenalectomia				
Mifepristona (n=6)	33,33	50,0	16,66	0,0
Mifepristona + Espironolactona (n=5)	50,0	50,0	0,0	0,0

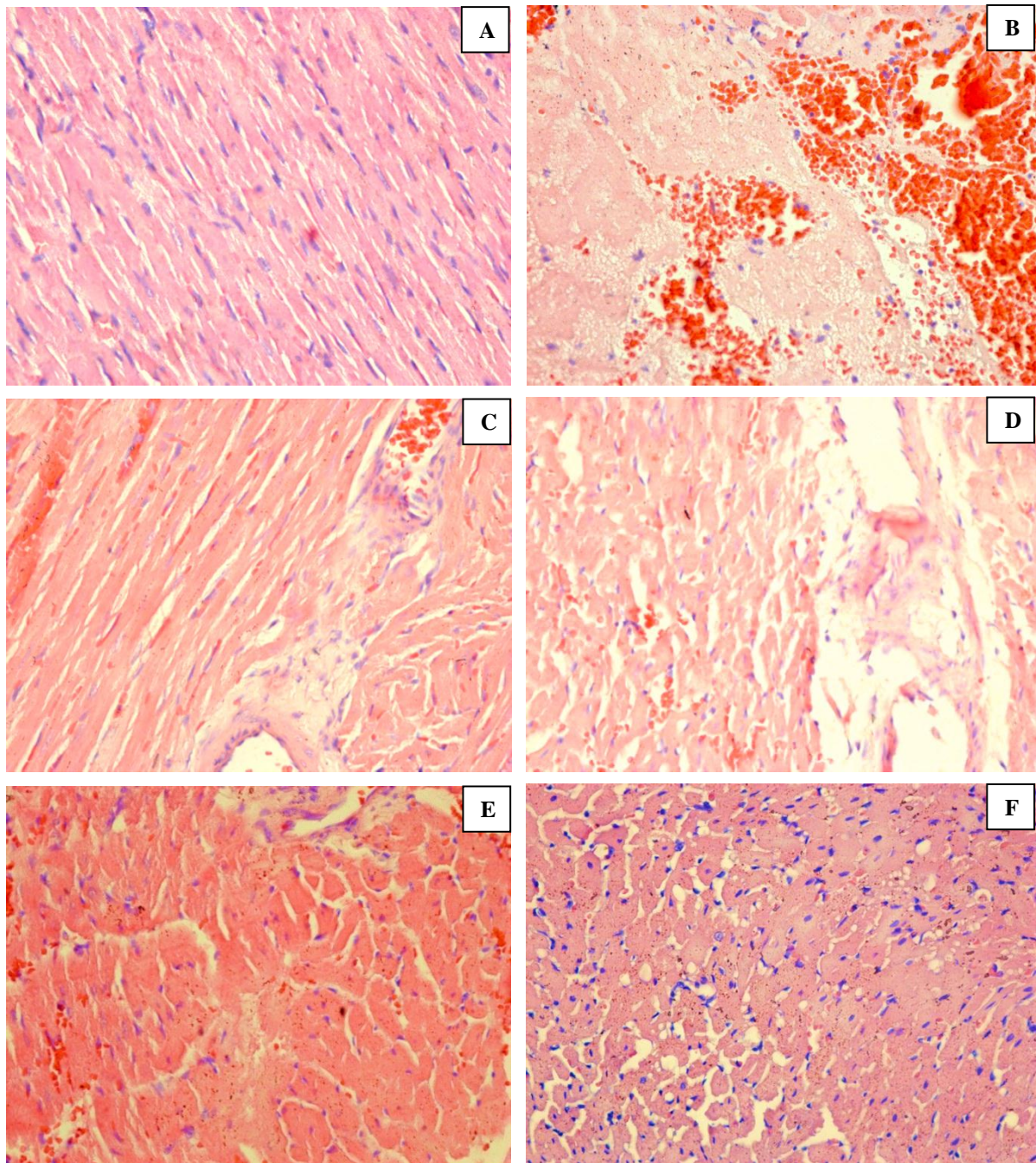


Figura 17: Histologia do coração de animais submetidos à ligadura da coronária esquerda. (A) Controle (ligadura fictícia); (B) Ligadura sem tratamento. (C) Mifepristona 20 mg/kg; (D) Mifepristona + Espironolactona 20 mg/kg; (E) Mifepristona 20mg/kg grupo adrenaectomizado; (F) Mifepristona + Espironolactona 20mg/kg grupo adrenaectomizado. Coloração Hematoxilina-Eosina. (aumento 40X).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O principal resultado deste trabalho foi a demonstração de que baixas doses de espironolactona e eplerenona promovem cardioproteção numa fase aguda da isquemia cardíaca, mesmo na ausência dos esteróides endógenos, aldosterona e corticosterona.

Estudos prévios já haviam demonstrado a capacidade cardioprotetora desses dois fármacos no infarto do miocárdio tanto clinicamente quanto experimentalmente. (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003; Zannad *et al.*, 2010; Sartório *et al.*, 2007; Fraccarollo *et al.*, 2003; Fraccarollo *et al.*, 2008). No entanto, nenhum estudo comparativo tinha sido realizado até então, e a maioria deles se concentraram na fase crônica do infarto, onde os níveis de aldosterona encontravam-se elevados.

Foi utilizado o modelo de isquemia em ratos induzida pela ligadura da coronária esquerda. Este modelo foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946 (Heimbürger *et al.*, 1946), e uma das suas principais vantagens é que as alterações morfológicas e funcionais decorrentes do infarto se assemelham às encontradas em humanos (Klocke *et al.*, 2007). Por outro lado, esta metodologia apresenta um alto índice de mortalidade de animais, variando entre 40 e 60% nas primeiras 24 horas (Zornoff *et al.*, 2009). Em nosso estudo a taxa de mortalidade foi aproximadamente 31 %.

O grupo tratado com espironolactona apresentou uma taxa de mortalidade menor que o grupo ligadura sem tratamento. Song e colaboradores já haviam relatado menores taxas de mortalidade entre animais submetidos à ligadura da coronária e tratados com espironolactona em uma dose ainda menor que a utilizada em nosso estudo. (Song *et al.*, 2011). O grupo tratado com eplerenona não apresentou redução na taxa de mortalidade.

As principais causas de morte neste modelo relacionam-se a fatores do próprio procedimento cirúrgico como pneumotórax e depressão respiratória, edema pulmonar e principalmente a arritmias malignas como taquicardia ventricular e fibrilação ventricular (Litwin *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1979; Opitz *et al.*, 1995). Os animais utilizados neste estudo, independentemente do tratamento, apresentaram episódios de fibrilação ventricular e bloqueio AV nos primeiros minutos posteriores a ligadura. Além disso, após a isquemia foi observado redução dos valores de PAS e PAD e da FC. A bradicardia e a redução dos níveis pressóricos também são descritos como causas de mortalidade em modelos animais de isquemia (Kolettis *et al.*, 2007).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar comparativamente o efeito de antagonistas de MR na isquemia cardíaca independentemente da ação da aldosterona. Para isso, avaliamos o efeito do pré-tratamento com espironolactona ou eplerenona em ratos normais e submetidos previamente a adrenalectomia bilateral.

As doses utilizadas de ambos os fármacos foram baseadas em estudos prévios descritos na literatura. Nestes estudos, a espironolactona 20mg/kg, administrada via oral, foi capaz de prevenir a proliferação de colágeno em ratos cronicamente infartados (Silvestre *et al*, 1999; Mill *et al*, 2003). E a eplerenona 10mg/kg reduziu a fibrose e melhorou os parâmetros ecocardiográficos em ratos com IC (Kobayashi *et al*, 2006). As doses utilizadas são consideradas baixas para esses antagonistas. A dose de eplerenona foi menor, pois a dose necessária para bloquear o MR é cerca da metade necessária para a espironolactona (de Gasparo *et al*, 1987). Clinicamente, segundo recomendações do *Food and Drug Administration* (FDA) doses 50% menores de eplerenona em relação a espironolactona são utilizadas no tratamento de pacientes com IC (FDA, 2007; 2008).

Os animais submetidos à ligadura da coronária por 1h apresentaram elevação do segmento ST no ECG, observada pelo aumento da área sob a curva ST-T, e necrose do tecido cardíaco, caracterizando o modelo agudo de isquemia cardíaca.

Foi observada uma grande variação da intensidade da necrose mesmo dentro de um mesmo grupo. Essa variação deve-se em parte, ao próprio modelo de isquemia utilizado. O modelo de ligadura da coronária apresenta uma variação de 5 a 65% do tamanho da área infartada (Peffer *et al*, 1979), devido à dificuldade de se ocluir a artéria no mesmo ponto em todos os animais e devido a diferenças anatômicas entre eles. A necrose também é influenciada por fatores individuais como fluxo colateral, demanda individual de oxigênio e nutrientes, e sensibilidade dos miócitos à isquemia. Além disso, em roedores o tempo para o desenvolvimento completo de necrose varia entre 30 e 90 minutos após a isquemia. (Jugdutt *et al*, 1993). O nosso protocolo de isquemia durou 1h, nesse período nem todas as células em risco podem ter desenvolvido necrose.

É importante ressaltar que mesmo com todas essas variações e mesmo que a análise da necrose tenha sido apenas qualitativa, tanto a espironolactona quanto a eplerenona reduziram a intensidade da necrose em relação ao grupo sem tratamento, nos grupos normais e submetidos a adrenalectomia bilateral.

No início do nosso estudo foi feita dosagem sérica dos níveis de aldosterona nos animais para caracterizar o modelo experimental. Os níveis circulantes de aldosterona foram reduzidos a quase zero após a adrenalectomia. Entretanto, a aldosterona também pode ser sintetizada em tecidos extra-adrenais como o coração, endotélio e músculo liso vascular. (Takeda *et al.*, 1995; Silvestre *et al.*, 1998). Dessa forma, a adrenalectomia bilateral não exclui a possibilidade da síntese local de aldosterona.

No entanto, essa questão é controversa. A produção local de aldosterona parece ser mínima em condições normais, mas pode aumentar em condições patológicas como na IC. (Fraccarollo *et al.*, 2003; Guder *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2001). Em humanos saudáveis, os níveis plasmáticos de aldosterona não diferem dos níveis locais, mas indivíduos portadores de IC e hipertensão arterial apresentam níveis maiores de aldosterona no seio coronário (Mizuno *et al.*, 2001). Enzimas e co-fatores envolvidos na biossíntese de aldosterona também são expressos no sistema cardiovascular (Taves *et al.*, 2011), e além disso, a expressão de mediadores do sistema renina-angiotensina também já foi descrita (MacKenzie *et al.*, 2002) e podem portanto atuar na regulação da produção local de aldosterona.

Por outro lado, foi demonstrado que os níveis de expressão desses genes são várias ordens de grandeza menores que a observada no córtex da adrenal (Gomes-Sanches *et al.*, 2004). Além disso, em um estudo realizado em 2005, não foi detectado níveis de expressão da aldosterona sintase e 11 β hidroxilase (enzimas envolvidas na síntese de aldosterona) em nenhuma das regiões do coração analisadas em condições normais ou patológicas (Ye *et al.*, 2005).

As questões relacionadas a síntese local de aldosterona permanecem contraditórias e os estudos recentes sugerem que a adrenal é a maior fonte da aldosterona plasmática e local. (Chai *et al.*, 2006; Chai *et al.* 2010). Além disso, os níveis locais de aldosterona só aumentariam em uma fase mais crônica das doenças cardíacas. O nosso estudo foi realizado numa fase aguda da isquemia cardíaca e o efeito protetor dos antagonistas de MR foi observado logo nos primeiros minutos após a ligadura da coronária.

Nossos dados demonstram que ambos os antagonistas de receptores MR, espironolactona e eplerenona, protegem o coração dos danos causados pela isquemia numa fase inicial do infarto do miocárdio em ratos, prevenindo a elevação do segmento ST no ECG e atenuando a necrose tecidual. Esses efeitos persistiram nos animais adrenalectomizados sugerindo que a ação cardioprotetora desses antagonistas vai além do bloqueio dos efeitos deletérios da aldosterona sobre o coração.

Além da aldosterona, o receptor MR possui outro ligante endógeno, o cortisol (ou corticosterona, em roedores), ambos possuem igual afinidade ao receptor. (Galupo *et al*, 2012). O cortisol assim com a aldosterona é sintetizado a partir do colesterol nas glândulas adrenais. No rim a presença da enzima 11 β HSD2 cliva o cortisol em metabólitos inativos e garantem a ligação preferencial da aldosterona ao MR, uma vez que as concentrações de cortisol circulantes são 10 à 100 vezes maiores do que a da aldosterona (Funder *et al*, 2009). Entretanto, as células do sistema cardiovascular expressam níveis muito baixos de 11 β HSD2 (Yang *et al*, 2009), o que facilita a interação do cortisol com os receptores MR. Estudos já comprovaram que o cortisol é capaz de ativar o MR em situações onde há alteração do estado redox da célula como a que ocorre na isquemia cardíaca (Mihailidou *et al*, 2009). Níveis elevados de cortisol e aldosterona são preditores independentes de risco de morte em pacientes com IC e disfunção ventricular esquerda (Guder *et al*, 2007). Antagonistas de MR além de bloquear os efeitos da aldosterona também protegem o coração por bloquear os efeitos deletérios do cortisol (Mihailidou *et al*, 2009).

Em nosso estudo, devido a remoção total das glândulas adrenais, conseqüentemente, os níveis de corticosterona provavelmente também eram insignificantes (dosagem não realizada). Portanto, pela primeira vez foi demonstrado que a eplerenona, assim como já descrito para a espiroonolactona (Mihailidou *et al*, 2009), apresenta efeitos cardioprotetores independentes do bloqueio da ação de esteroides endógenos.

Mas se o efeito cardioprotetor desses fármacos é independente de níveis elevados de aldosterona e cortisol/corticosterona, quais seriam então os mecanismos responsáveis por essa proteção?

Alguns estudos demonstram que antagonistas de MR podem causar pré e pós condicionamento isquêmico (Chai *et al*, 2005; Schimidt *et al*, 2010). O pré-condicionamento isquêmico é definido como um fenômeno pelo qual um ou mais ciclos de isquemia de pequena duração (5 a 10 minutos) com pequenos ciclos de reperfusão, promovem proteção do miocárdio contra um subsequente e prolongado período de isquemia miocárdica e reperfusão (Murry *et al*, 1986). A aplicação de pequenos ciclos de isquemia-reperfusão no início do período de reperfusão também causa cardioproteção de modo similar ao pré-condicionamento, este fenômeno é denominado pós-condicionamento isquêmico (Zhao *et al*, 2003).

A administração de algumas substâncias antes da isquemia, como adenosina, bradicinina e opióides também ativa mecanismos celulares capazes de promoverem tal proteção (Liang *et al* 1999; Baxter *et al*, 2002; Zaugg *et al*, 2002). Esse tratamento foi denominado pré-condicionamento farmacológico. Chai e colaboradores apresentaram evidências de que a espironolactona causa pré-condicionamento farmacológico, pois a administração desse antagonista 15 min antes da isquemia reduziu a área infartada no coração isolado de ratos (Chai *et al*, 2005).

A atenuação da elevação do segmento ST é um indicador de pré-condicionamento isquêmico (Cohen *et al*, 1997). Em nosso estudo a espironolactona e a eplerenona preveniram a elevação do ST nos animais submetidos à ligadura da coronária, quando administradas 30 min antes da isquemia.

As vias intracelulares ativadas durante o pré e pós condicionamento isquêmico envolvem a participação de canais de potássio mitocondriais sensíveis a ATP (K^+_{ATP}). A abertura desses canais preserva a função mitocondrial por prevenir a sobrecarga de cálcio durante a isquemia (Holmuhamedov *et al*, 1999). Os mecanismos envolvidos na ativação de canais K^+_{ATP} ainda não são completamente conhecidos. Sato e colaboradores demonstraram que a ativação de receptores de adenosina podem ativar K^+_{ATP} mitocondriais via PKC dependente em células ventriculares (Sato *et al*, 2000).

Schmidt e colaboradores demonstraram que a proteção cardíaca da eplerenona após a isquemia e reperfusão no coração de ratos foi abolida por antagonistas de K^+_{ATP} mitocondrial. (Schmidt *et al*, 2010). Além de bloqueadores de canais de potássio, esse estudo também realizou testes com bloqueadores de outras moléculas que sabidamente estão envolvidas no condicionamento isquêmico, como PKC, receptores de adenosina e PI3-quinase. Todos os inibidores bloquearam a ação protetora dos antagonistas de MR.

Além disso, um estudo recente em nosso laboratório, ainda não publicado, sugere que tanto a eplerenona quanto a espironolactona são capazes de aumentar os níveis celulares de GMP_C em cardiomiócitos de rato neonatos (Hermidorff *et al*, 2013). O GMP_C vem sendo descrito como uma molécula chave nos mecanismos de pré e pós condicionamento isquêmico. (Garcia-Dorado *et al*, 2009).

As evidências de que antagonistas de MR promovem condicionamento isquêmico podem explicar porque o tratamento imediato de pacientes que sofreram infarto do miocárdio apresenta uma resposta mais satisfatória do que aqueles que só receberam tratamento mais tarde. O tratamento precoce ativaria vias cardioprotetoras que tornariam o miocárdio mais resistente aos danos da isquemia e reperfusão, além de

antagonizar os efeitos deletérios da aldosterona cujos níveis se encontram aumentados numa fase mais crônica da doença. Essas ações em conjunto melhorariam o remodelamento cardíaco e conseqüentemente, aumentariam a qualidade de vida dos pacientes e reduziriam a mortalidade.

Alguns pesquisadores também defendem a ideia de que antagonistas de MR possam atuar como agonistas inversos (Funder *et al*, 2009). Certos tipos de receptores podem apresentar uma atividade intrínseca no seu estado inativo, mesmo na ausência de um ligante endógeno ou de um agonista exógeno administrado. Agonistas inversos atuam de modo a abolir essa atividade intrínseca do receptor livre (não-ocupado), resultando em uma redução espontânea da atividade do receptor (Khilnani e Khilnani, 2011).

Mihailidou e colaboradores, em um estudo com coração isolado de ratos, demonstraram que a espironolactona sozinha era capaz de reduzir a área infartada e apoptose em ratos adrenalectomizados submetidos à isquemia e reperfusão (Mihailidou *et al*, 2009). Os autores atribuíram a resposta cardioprotetora da espironolactona a uma possível propriedade agonista inversa que pode ser apresentada por esse fármaco, uma vez que estes efeitos foram observados na ausência dos dois ligantes endógenos do receptor MR, aldosterona e cortisol. Adicionalmente, um estudo *in vitro* demonstrou que a espironolactona sozinha promoveu aumento da expressão da proteína β -integrina em cardiomiócitos e em células epiteliais do rim (Chun *et al*, 2002).

Em nosso estudo, demonstramos pela primeira vez que assim como a espironolactona, a eplerenona promove cardioproteção na isquemia cardíaca de animais adrenalectomizados. Dentro dessa perspectiva ambos os antagonistas de MR atuam não apenas excluindo ação da aldosterona ou do cortisol sobre o MR, mas também ocupando este receptor e promovendo a ativação de fatores de proteção.

No entanto, não existem dados na literatura que comprovem que os efeitos diretos de antagonistas de MR sobre o coração são mediados por receptores MR ou por outro receptor desconhecido.

Os efeitos protetores da espironolactona e eplerenona em nosso estudo foram observados logo nos primeiros minutos após a isquemia, sugerindo que estes efeitos não são genômicos, e não envolvem a transcrição de genes. Este dado é importante, pois a aldosterona também possui efeitos não genômicos e os estudos indicam que os mesmos podem ser mediados por um receptor distinto do MR. Dessa forma, o mesmo poderia ocorrer para a eplerenona e espironolactona.

Dados recentes do nosso laboratório mostram que tanto a espironolactona quanto a eplerenona mobilizam Ca^{+2} , ativam GMPc e ERK1/2 em cardiomiócitos de ratos neonatos. E esses efeitos ocorreram apenas alguns minutos após o tratamento com os fármacos (Hermidorff, 2013). Evidenciando que há uma ação não genômica desses antagonistas nas células cardíacas.

Schmidt e colaboradores em um modelo de isquemia e reperfusão em camundongos demonstrou que os efeitos cardioprotetores da eplerenona foram bloqueados na presença de um inibidor não seletivo de receptores de adenosina. Além de ser um potente vasodilatador, a adenosina possui efeitos cardioprotetores diretos sobre as células cardíacas através de seus receptores de membrana acoplados a proteína G, sobretudo limitando a área infartada. (Feldman *et al*, 2011). Esta mesma pesquisadora, demonstrou que o efeito cardioprotetor do canrenoato de potássio (metabólito ativo da espironolactona) foi bloqueado em camundongos com deleção genética para a enzima ecto-5'-nucleotidase, enzima envolvida na síntese de adenosina. (Schmidt *et al*, 2010).

Portanto, existem evidências de que a ação de antagonistas de MR sobre o coração pode estar sendo mediada por uma interação com a adenosina, no entanto os estudos não são conclusivos quanto a ação ser sobre os receptores de adenosina ou sobre a síntese e degradação da mesma.

Em nosso estudo também avaliamos a hipótese de que efeitos protetores da espironolactona possam ser mediados por uma interação com receptores GR. Entretanto, o antagonista de receptor GR, mifepristona, não foi capaz de bloquear os efeitos da espironolactona na prevenção da elevação de ST. Apesar de a espironolactona possuir afinidade por receptores GR e a ativação deste receptor ser descrita como cardioprotetora, não foi observada nenhuma relação da resposta protetora da espironolactona com receptores GR. Corroborando com os resultados de Mihailidou e colaboradores, onde a mifepristona não bloqueou o efeito da espironolactona sobre a redução da área infartada e apoptose celular na isquemia e reperfusão de corações isolados de rato.

Entretanto, inesperadamente, quando a mifepristona foi administrada sozinha houve uma leve atenuação na área sob a curva do segmento ST. A ação antiglicocorticoide da mifepristona é dose dependente. Doses únicas iguais ou superiores a 4mg/kg inibem de uma forma competitiva os receptores GR (Cadepond *et al*, 1997). Foi utilizada em nosso estudo a dose 20mg/kg. A mifepristona também possui

ação antiprogesterogênica e leve ação antiandrogênica e nenhuma ação sobre receptores MR.

Nossos dados contrastam com o estudo de Bobryshev e colaboradores (2007), onde a mifepristona na dose 20mg/kg inibiu os efeitos do pré condicionamento isquêmico em um modelo de isquemia e reperfusão em ratos. Uma possível explicação para o resultado seria devido ao fato da mifepristona poder atuar como um agonista parcial de receptores GR em determinadas circunstâncias. Em pacientes com insuficiência adrenal, a mifepristona apresentou efeitos agonistas, reduzindo os níveis plasmáticos de ACTH (Laue *et al*, 1988). Adicionalmente, Zang e colaboradores demonstraram que a atividade agonista da mifepristona é dependente da concentração de receptores GR na célula, esta atividade aumenta quando há superexpressão destes receptores (Zhang *et al*, 2007). Vazqués e colaboradores, demonstraram que a adrenalectomia promove aumento da expressão de receptores GR em áreas específicas do hipocampo (Vazqués *et al*, 1993), entretanto, nenhum estudo até o momento avaliou se o mesmo acontece no coração.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Comparativamente, não foram observadas diferenças entre os efeitos da espironolactona e eplerenona. Ambas foram capazes de prevenir, em baixas doses, os danos causados pela ligadura da coronária em ratos anestesiados, reduzindo a elevação do segmento ST no ECG e a necrose dos miócitos cardíacos.

Adicionalmente foi demonstrado que tanto a espironolactona quanto a eplerenona são capazes de promover cardioproteção numa fase aguda da isquemia cardíaca e esses efeitos são independentes do bloqueio da ação da aldosterona e da corticosterona.

Com base em nossos dados e aos encontrados na literatura, podemos sugerir que esses fármacos não atuam somente como antagonistas de MR e poderiam assim, serem classificados em uma nova classe farmacológica. Existem evidências claras de que seus efeitos também ocorram por vias diretas, e estes podem estar sendo mediados por um agonismo inverso sobre o receptor MR ou por um receptor distinto, ainda não conhecido. No entanto, mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de investigar melhor as vias ativadas por estes dois fármacos no coração.

Do ponto de vista clínico, nossos resultados também são relevantes. Antagonistas de MR são utilizados na fase crônica da IC pós-infarto do miocárdio. Nossos resultados sugerem que a cardioproteção também ocorre na fase inicial após a isquemia. Assim, esses fármacos podem ser uma alternativa terapêutica no tratamento de pacientes numa fase precoce do IAM, mesmo na ausência de IC.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALMUKDAD, H. Hyperkalemia revisited. **Saudi Journal of Kidney Diseases and transplantation**, v. 18, n. 4, p. 577–584, 2007.

ALZAND, B. S. N.; GORGELS, A. P. M. Combined anterior and inferior ST-segment elevation Electrocardiographic differentiation between right coronary artery occlusion with predominant right ventricular infarction and distal left anterior descending branch occlusion. **Journal of Electrocardiology**, v. 44, n. 3, p. 383–8, 2011.

BAXTER, G. F.; EBRAHIM, Z. Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 843–54, 2002.

BOBRY SHEV, P.; BAGAEVA, T.; FILARETOVA, L. Ischemic preconditioning attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of glucocorticoids. **Journal of Physiology and Pharmacology: an official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 60 Suppl 7, n. 6, p. 155–60, 2009.

BRILLA CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. **Herz**, v.25, n. 3, p.299-306, 2000.

BUENO, D. P. O ECG no prognóstico do IAM. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 21, p. 1–7, 2011.

BURKE, A. P.; VIRMANI, R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. **The Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 4, p. 553–72; ix, 2007

CADEPOND, F.; ULMANN, A.; BAULIEU, E. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. **Annual Review Medicine**, v. 48, p. 129–56, 1997.

CATENA, C.; COLUSSI, G.; NADALINI, E. et al. Cardiovascular outcomes in patients with primary aldosteronism after treatment. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 1, p. 80–5, 2008.

CHAI, W.; GARRELD, I. M.; VRIES, R. DE; DANSER, A. H. J. Cardioprotective effects of eplerenone in the rat heart: interaction with locally synthesized or blood-derived aldosterone? **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 665–70, 2006.

CHAI, WENXIA; GARRELD, I. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective? **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 5, p. 664–671, 2005.

CHAI, WENXIAA; HOFLAND, J.; JANSEN, P. M. et al. Steroidogenesis vs. steroid uptake in the heart: do corticosteroids mediate effects via cardiac mineralocorticoid receptors? **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 1044–53, 2010.

CHATTERJEE, S.; MOELLER, C.; SHAH, N. Eplerenone Is Not Superior to Older and Less Expensive Aldosterone Antagonists. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 8, p. 817–25, 2012.

CHIONG, M.; WANG, Z. V; PEDROZO, Z. et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. **Cell Death & Disease**, v. 2, n. 12, p. e244, 2011. Nature Publishing Group.

CHUN, T.; BLOEM, L.; JH PRATT. Spironolactone increases integrin beta3 gene expression in kidney and heart muscle cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 194, n. 1-2, p. 175–82., 2002.

CHUN, T.-Y.; PRATT, J. H. Nongenomic renal effects of aldosterone: dependency on NO and genomic actions. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 636–7, 2006.

CITTADINI, A.; MONTI, M. G.; ISGAARD, J. et al. Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 3, p. 555–64, 2003.

COHEN, M. V., YANG X.M., DOWNEY, J. M. Attenuation of S-T segment elevation during repetitive coronary occlusions truly reflects the protection of ischemic preconditioning and is not an epiphenomenon. **Basic Research Cardiology**, v.92, p. 426–434, 1997.

CONNELL, JOHN M C; DAVIES, ELEANOR. The new biology of aldosterone. **The Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 1, p. 1–20, 2005.

COUETTE, B., MARSAUD, V, BAULIEU E. E., RICHARD-FOY H., RAFESTIN-OBLIN M. E. Spironolactone, an aldosterone antagonist, acts as an antiglucocorticoid on the mouse mammary tumor virus promoter. **Endocrinology**, v. 130, p. 430–436, 1992.

CRONSTEIN, B. N.; KIMMELI, S. C.; LEVIN, R. I.; MARTINIUK, F. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. November, p. 9991–9995, 1992.

De GASPARO, M.; JOSS, U.; SCHMIDLIN, J.; WEHALI, H. U. in. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 240, n. 2, p. 650–656, 1987.

DELYANI, J. A. Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. **Kidney International**, v. 57, n. 4, p. 1408–11, 2000.

ELECTROCARDIOGRAM. ECG Recording of Healthy Heart Beat. Disponível em: <http://www.research.chop.edu/programs/lqts/ecg.php>. Acesso em: 20 julho 2013.

FARMAN N, RAFESTIN-OBLIN ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v,280, p. 181–192, 2001.

FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicological sciences : an official Journal of the Society of Toxicology**, v. 121, n. 1, p. 11–30, 2011.

FAVRE J, GAO J, ZHANG AD, et al. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, v. 300, p. 2035–2043, 2011.

FELDMAN, A. M.; CHEKSIS-FEINER, E.; HAMAD, E.; CHAN, T. Adenosine receptor subtypes and the heart failure phenotype: translating lessons from mice to man. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 122, p. 198–214, 2011.

FISHBEIN, M. C.; MACLEAN, D.; MAROKO, P. R. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. **American Journal of Pathology**, v. 90, n.1, p. 57–70, 1978.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Aldactone, p. 2-14, 2008. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/012151s062lbl.pdf Acesso em 20 julho 2013.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Eplerenone. Office of Clinical Pharmacology Review, p. 1-49, 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/ucm072192.pdf>. Acesso em 20 julho 2013.

FRACCAROLLO, D.; BERGER, S.; GALUPPO, P. et al. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. 400–8, 2011.

FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P.; HILDEMANN, S. et al. Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 9, p. 1666–1673, 2003.

FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P.; SCHRAUT, S. et al. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 905–14, 2008.

FRANTZ S, BAUERSACHS J, ERTL G. Postinfarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Research*, v. 81, p.474–481, 2009.

FULLER, P. The steroid superfamily : of diversity. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 3092–3099, 1991.

FUNDER JW. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. **Heart Failure Review**, v. 10, p.15–22, 2005.

FUNDER, J. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. **Progress Cardiovascular Disease**, v. 52, n. 5, p. 393–400, 2010.

FUNDER, J. Aldosterone, salt and cardiac fibrosis. **Clinical Experimental Hypertension**, v. 19, n. 5-6, p. 885–99, 1997.

FUNDER, J. W. Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 286–90, 2009.

GALUPPO, P.; BAUERSACHS, J. Mineralocorticoid receptor activation in myocardial infarction and failure: recent advances. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 10, p. 1112–20, 2012.

GARCIA-DORADO, D.; AGULLÓ, L.; SARTORIO, C. L.; RUIZ-MEANA, M. Myocardial protection against reperfusion injury: The cGMP pathway. **Thrombosis and Haemostasis**, 2009.

GASPARO, M. DE; JOSS, U.; SCHMIDLIN, J.; WEHALI, H. U. in. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 240, n. 2, p. 650–656, 1987.

GOMEZ-SANCHEZ, E. P.; AHMAD, N.; ROMERO, D. G.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Origin of aldosterone in the rat heart. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4796–802, 2004.

GÜDER G, BAUERSACHS J, FRANTZ S, et al. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. **Circulation**, v. 115, p.1754–1761, 2007.

GIUGLIANO, G.R., GIUGLIANO, R.P., GIBSON, C.M., KUNTZ, R.E. Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction. **American Journal Cardiology**, v. 91, p.1055–1059, 2003.

HAFEZI-MOGHADAM, A. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nature Medicine**. v. 8, p.473–479, 2002.

HEIMBURGER RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. **Archives Surgery**, v.52, p.677-89,1946

HERMIDORFF, M.M. Estudo in vivo do efeito cardioprotetor da espironolactona e eplerenona em culturas primárias de células cardíacas de rato. 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

HOLMUHAMEDOV, E. L.; WANG, L.; TERZIC, A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. **The Journal of Physiology**, v. 519 Pt 2, p. 347–60, 1999

IGLARZ M, TOUYZ RM, VIEL EC, AMIRI F, SCHIFFRIN EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotension system, **American Journal of Hypertension**, v.17, n.7, p.597-603, 2005.

JUGDUTT, B. I. Ischemia/Infarction. **Heart failure Clinics**, v. 8, n. 1, p. 43–51, 2012.

JUGDUTT, B. I. Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 9, n. 1, p.103-14.

KARIM A, ZAGARELLA J, HRIBAR J, DOOLEY M. Spironolactone. I. Disposition and metabolism. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v.19, n.2, p.158-69, 1946.

KHILNANI, G.; KHILNANI, A. K. Inverse agonism and its therapeutic significance. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 492–501, 2011.

KLING MA; DEMITRACK MA; WHITFIELD HJ JR; et al. Effects of the glucocorticoid antagonist RU 486 on pituitary-adrenal function in patients with anorexia nervosa and healthy volunteers: enhancement of plasma ACTH and cortisol secretion in underweight patients. **Neuroendocrinology**, v. 57, n. 6, p. 1082–91, 1993.

KLOCKE, R.; TIAN, W.; KUHLMANN, M. T.; NIKOL, S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 1, p. 29–38, 2007.

KOBAYASHI, N.; YOSHIDA, K.; NAKANO, S. et al. Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 671–9, 2006.

KOLETTIS, T. M.; AGELAKI, M. G.; BALTOGIANNIS, G. G. et al. Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. **Europace**, v. 9, n. 11, p. 1099–104, 2007.

KOLKHOF, P.; BORDEN, S. A. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 350, n. 2, p. 310–7, 2012.

LAUE, L.; GALLUCCI, W.; LORIAUX, D. L.; ROBERT UDELSMAN; CHROUSOS, G. P. The Antigluco-corticoid and Antiprogestin Steroid RU 486: Its Glucocorticoid Agonist Effect Is Inadequate to Prevent Adrenal Insufficiency in Primates. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, n. 3, p. 602–606, 1988.

LEOPOLD JA, DAM A, MARON BA, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Nature Medicine**, v.13, p.189–197, 2007.

LIANG, B. T.; SWIERKOSZ, T. A.; HERRMANN, H. C.; KIMMEL, S.; JACOBSON, K. A. Adenosine and Ischemic preconditioning. **Current Pharmaceutical Design**, v. 5, n. 12, p. 1029–1041, 1999.

LITWIN SE. The rat model of post-infarction heart failure. **Heart Failure**, v.11, p.182-95, 1995.

MACKENZIE, SCOTT M; FRASER, ROBERT; CONNELL, JOHN M C; DAVIES, ELEANOR. Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal

corticosteroid production. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System : JRAAS**, v. 3, n. 4, p. 214–21, 2002.

MANSUR, P.; CURY, L. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 106–114, 2006.

MARON, B. A.; LEOPOLD, J. A. Aldosterone receptor antagonists: effective but often forgotten. **Circulation**, v. 121, n. 7, p. 934–9, 2010.

MESSAOUDI S, AZIBANI F, DELCAYRE C, et al. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.350, p. 266–272, 2012.

MIHAILIDOU, A. S.; LOAN LE, T. Y.; MARDINI, M.; FUNDER, J. W. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1306–12, 2009.

MILL, J. G.; MILANEZ, M. D. C.; RESENDE, M. M. DE; GOMES, M. D. G. S.; LEITE, C. M. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 30, n. 10, p. 739–44, 2003.

MIZUNO Y, YOSHIMURA M, YASUE H, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. **Circulation**, v. 103, p.72–77, 2001.

MÜLLER J. Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects. **Monographs on Endocrinology**, v. 29, p. 1–364., 1987.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124–1136, 1986.

NAPPI, J. M.; SIEG, A. Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. **Vascular Health and Risk Management**, v. 7, p. 353–63, 2011.

NATIONAL, T.; GUIDELINE, C. Unstable Angina and NSTEMI: the early management of unstable angina and non-ST-segment- elevation myocardial infarction. **the National Clinical Guidelines Centre at The Royal College of Physicians**, p. 1–360, 2010.

OPITZ, C. F.; MITCHELL, G. F.; PFEFFER, M. A.; JANICE M. PFEFFER. Arrhythmias and Death After Coronary Artery Occlusion in the Rat Continuous Telemetric ECG Monitoring in Conscious, Untethered Rats. **Circulation**, v. 92, n. 2, p. 253–261, 1995.

OUVRARD-PASCAUD, A.; SAINTE-MARIE, Y.; BÉNITAH, J. P. et al. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. **Circulation**, v. 111, n. 23, p. 3025–33, 2005.

PESARO, A. E.; SERRANO, C.V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio - Síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 214–20, 2004.

PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**, v. 81, n. 4, p. 1161–1172, 1990.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FISHBEIN, M. C. et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circulation Research**, v. 44, n. 4, p. 503–512, 1979.

PINTO, E.; PEREIRA, L. Modelos Estatísticos Para Estimação da área miocárdica sob risco de necrose. **Revista Brasileira de Cardiologia**, p. 395–415, 2011.

PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 709–717, 1999.

PITT, BERTRAM; RAJAGOPALAN, S. Aldosterone receptor antagonists for heart failure: current status, future indications. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 73, n. 3, p. 257–60, 264–8, 2006.

PITT, BERTRAM; REMME, WILLEM; ZANNAD, FAIEZ; et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1309–1321, 2003.

PITZALIS C, PIPITONE N, PERRETTI M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. **Annals of New York Academy of Science**, v. 966, p.108-18, 2002.

PRACTICE LEARNING RESOURCES. A Beginners Guide to Normal Heart Function, Sinus Rhythm & Common Cardiac Arrhythmias. Disponível em: <http://www.nottingham.ac.uk/nursing/practice/resources/cardiology/acs/changes.php>. Acesso em: 20 julho 2013.

PREDA, M. B.; BURLACU, A. Electrocardiography as a tool for validating myocardial ischemia-reperfusion procedures in mice. **Comparative Medicine**, v. 60, n. 6, p. 443–7, 2010.

QUINN, S.; WILLIAMS GR. Regulation of aldosterone secretion. **Annual Review Physiology**, v. 50, p. 409–26, 1988.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 10043–7, 1990.

RESENDE, L. O. Análise quantitativa do eletrocardiograma normal e isquêmico para o desenvolvimento de um escore preditor da área miocárdica em risco de necrose. 2011. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

RESENDE, L. O.; RESENDE, E. S.; ANDRADE, A. O. Assessment of the ST segment deviation area as a potential physiological marker of the acute myocardial infarction. **Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference**, v. 2012, p. 669–72, 2012.

ROCHA R., STIER CT JR. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, n.7, p,308-14. 2001.

RUDE, M. K.; DUHANEY, T.-A. S.; KUSTER, G. M. et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 46, n. 3, p. 555–61, 2005.

SARTÓRIO, C. L.; FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P. et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. **Hypertension**, v. 50, n. 5, p. 919–25, 2007.

SATO, T.; OBATA, T.; YAMANAKA, Y.; MARITA. Nicorandil increases adenosine 5'-monophosphate-primed interstitial adenosine via activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts. **Heart and Vessels**, v. 15, n. 2, p. 81–5.

SCHMIDT, K.; TISSIER, R.; GHALEH, B. et al. Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. **European Heart Journal**, v. 31, n. 13, p. 1655–62, 2010.

SELYE, E. A. Simple Techniques for the Surgical Occlusion of Coronary Vessels in the Rat **Angiology**, v.11, p.398-407, 1960.

SICA, D. A. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mineralocorticoid Blocking Agents and their Effects on Potassium Homeostasis. **Heart Failure Reviews**, v. 10, n. 1, p. 23–29, 2005.

SILVESTRE J.S., HEYMES C., OUBENAÏSSA A., ROBERT V, AUPETIT-FAISANT B., CARAYON A., SWYNGHEDAUW B., DELCAYRE C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction. **Circulation**, v.99, p. 2694–2701, 1999.

SILVESTRE, J.S. Myocardial Production of Aldosterone and Corticosterone in the Rat. PHYSIOLOGICAL REGULATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 9, p. 4883–4891, 1998.

SONG, T.; YANG, J.; YAO, Y. et al. Spironolactone diminishes spontaneous ventricular premature beats by reducing HCN4 protein expression in rats with myocardial infarction. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 3, p. 569–73, 2011.

STRUTHERS, A.; KRUM, H.; WILLIAMS, G. H. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. **Clinical Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 153–8, 2008.

SUTTON, M. G. S. J.; SHARPE, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2981–2988, 2000.

TAKEDA R., HATAKEYAMA H., TAKEDA Y., IKI K., MIYAMORI I., SHENG WP., YAMAMOTO H., BLAIR IA. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. **Steroids**, v. 60, n.1, p.120–124, 1995

TAKEDA, M.; TATSUMI, T.; MATSUNAGA, S. et al. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. **Hypertension Research : official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 30, n. 5, p. 427–37, 2007.

TAKEDA, R.; HATAKEYAMA, H.; TAKEDA, Y. et al. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. **Steroids**, v. 60, n. 1, p. 120–4, 1995.

TAVES, M. D.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; SOMA, K. K. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 1, p. E11–24, 2011.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; JAFFE, A. S. et al. Third universal definition of myocardial infarction. **Nature reviews. Cardiology**, v. 9, n. 11, p. 620–33, 2012.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. et al. Universal definition of myocardial infarction. **Circulation**, v. 116, n. 22, p. 2634–53, 2007.

TOKUDOME, S.; SANO, M. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase–derived PGD2 biosynthesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, 2009.

VAZQUÉZ, D. M.; MORANO, M. I.; LOPEZ, J. F.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Short-Term Adrenalectomy Increases Glucocorticoid and Mineralocorticoid receptor mRNA in Selective Areas of the Developing Hippocampus. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 4, p. 455–471, 1993.

WALKER, B.R. Glucocorticoids and cardiovascular disease. **European Journal. Endocrinology**, v. 157, p. 545–559, 2007.

WEBER K. Mechanisms of disease: aldosterone in congestive heart failure. **New England Journal Medicine**, v. 345, p.1689–1697, 2001.

WEI, J.; NI, J.; HUANG, D. et al. The effect of aldosterone antagonists for ventricular arrhythmia: a meta-analysis. **Clinical Cardiology**, v. 33, n. 9, p. 572–7, 2010.

WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva, Switzerland: world health organization, 2011.

XU, B.; STROM, J.; CHEN, Q. M. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 194–200, 2011.

YANG, JUN; YOUNG, M. J. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 1, 2009.

YE, P.; KENYON, C. J.; MACKENZIE, S M; et al. The aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) genes are not expressed in the rat heart. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5287–93, 2005

YE, P.; KENYON, C. J.; MACKENZIE, S. M. et al. The aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) genes are not expressed in the rat heart. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5287–93, 2005.

ZANNAD, FAIEZ; MCMURRAY, J. J. V; DREXLER, H. et al. Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And SurvIval Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 6, p. 617–22, 2010.

ZAUGG, M.; LUCCHINETTI, E.; SPAHN, D. R. et al. Differential Effects of Anesthetics on Mitochondrial KATP Channel Activity and Cardiomyocyte Protection. **Anesthesiology**, v. 97, n. 1, p. 15–23, 2002.

ZHANG, S.; JONKLAAS, J.; DANIELSEN, M. The glucocorticoid agonist activities of mifepristone (RU486) and progesterone are dependent on glucocorticoid receptor levels but not on EC50 values. **Steroids**, v. 72, n. 6-7, p. 600–8, 2007.

ZHAO, Z.Q.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M. E. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **American Journal of Physiology**., v. 285, n. 2, p. H579–88, 2003.

ZIMETBAUM, P. J.; JOSEPHSON, M. E. Use of the electrocardiogram in acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 933–40, 2003.

ZORNOFF, L. A. M.; PAIVA, S. A. R.; MINICUCCI, M. F.; SPADARO, J. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, n. 9, p. 434–440, 2009.

A. Protocolo de aprovação do comitê de ética

B. Valores Basais de PA e FC

TABELA 1: Pressão arterial e Frequência cardíaca dos animais antes da ligadura da coronária.

	Controle	Ligadura	Espironolactona	Eplerenona	Mifepristona	Mife + Espiro
PAS	116,8 ± 7,4	108,5 ± 9,7	106,6 ± 5,1	105 ± 6,0	104 ± 5,2	112,9 ± 7,2
PAD	85,07 ± 5,7	75,64 ± 7,5	76,97 ± 4,9	73,9 ± 4,8	82,32 ± 10,76	79,66 ± 4,6
FC	258,5 ± 25,5	317,5 ± 22,5	296,9 ± 26,4	271,2 ± 21,5	302,4 ± 12,8	266,3 ± 25,2

Valores absolutos e erro padrão da média de PA (mmHg) e FC (bpm).

TABELA 2: Pressão arterial e Frequência cardíaca dos animais adrenalectomizados antes da ligadura da coronária.

	Controle	Ligadura	Espironolactona	Eplerenona	Mifepristona	Mife + Espiro
PAS	116,8 ± 7,4	93,96 ± 8,1	85,96 ± 7,8	83,68 ± 3,6	82,61 ± 3,2	76,77 ± 4,5
PAD	85,07 ± 5,7	69,96 ± 6,0	65,74 ± 6,6	63,48 ± 3,2	59,87 ± 3,1	55,33 ± 3,4
FC	258,5 ± 25,5	317,5 ± 22,5	321,1 ± 29,7	252,6 ± 16,9	298,5 ± 21,9	224,2 ± 40,4

Valores absolutos e erro padrão da média de PA (mmHg) e FC (bpm).