

**Estudo do envolvimento dos receptores da adenosina sobre a ação cardioprotetora da espironolactona e eplerenona em cardiomiócitos de rato****Study of the involvement of adenosine receptors on the cardioprotective action of spironolactone and eplerenone in rat cardiomyocytes**

DOI:10.34117/bjdv6n8-292

Recebimento dos originais: 18/07/2020

Aceitação para publicação: 18/08/2020

**Gabriela de Oliveira Faria**

Mestra em Ciências Biológicas – UFOP

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

DECBI – ICEB – Morro do Cruzeiro – Ouro Preto – MG

E-mail: gabrielaofaria@gmail.com

**Ana Beatriz Rezende Paula**

Mestra em Saúde e Nutrição – UFOP

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

DECBI – ICEB – Morro do Cruzeiro – Ouro Preto – MG

E-mail: nha.rezende@hotmail.com

**Victor Neiva Lavorato**

Doutor em Ciências Biológicas – UFOP

Instituição: Universidade Federal de Viçosa – UFV

DES – Avenida P.h. Rolfs, s/n – Viçosa – MG

E-mail: victor.lavorato@unifagoc.edu.br

**Denise Coutinho de Miranda**

Mestra em Biotecnologia – UFOP

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

DECBI – ICEB – Morro do Cruzeiro – Ouro Preto – MG

E-mail: denisecmiranda@gmail.com

**Mauro César Isoldi**

Doutor em Fisiologia pela USP

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

DECBI – ICEB – Morro do Cruzeiro – Ouro Preto – MG

E-mail: mauroisoldi@hotmail.com

**RESUMO**

Adenosina, e os fármacos espironolactona e eplerenona são conhecidos cardioprotetores. Fármacos com esse perfil mimetizam a ação da adenosina, que podem interagir com cardiomiócitos através de quatro receptores ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  e  $A_3R$ ). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito cardioprotetor da espironolactona e eplerenona sobre cardiomiócitos de ratos submetidos à isquemia-reperfusão in vitro, na presença e na ausência de antagonistas dos receptores  $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  e  $A_3R$  da adenosina em situações de pré e pós condicionamento isquêmico. Culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos Wistar foram utilizadas em ensaios onde foram simuladas as condições de pré- e pós-condicionamentos isquêmicos. As culturas foram divididas nos grupos controle, pré-condicionamento e pós-condicionamento farmacológico e os tratamentos foram igualmente administrados em ambos os grupos com as concentrações demonstradas a seguir: Espironolactona [ $10^{-9}$  M], Eplerenona [ $10^{-8}$  M], Antagonista do receptor  $A_1R$  (DPCPX [ $10^{-6}$  M]), Antagonista do receptor  $A_{2A}R$  (ZM 241385 [ $10^{-9}$  M]), Antagonista do receptor  $A_{2B}R$  (MRS 1754 [ $10^{-6}$  M]) e Antagonista do receptor  $A_3R$  (MRS 1523 [ $10^{-6}$  M]). Os resultados demonstraram que, por meio de análise de viabilidade celular, os cardiomiócitos submetidos à isquemia tinham menor viabilidade em comparação aos cardiomiócitos submetidos à situação de normóxia. A espironolactona e a eplerenona aumentaram a viabilidade celular no pré-condicionamento, mas não no pós-condicionamento. Os antagonistas dos receptores de adenosina não alteraram a viabilidade celular no pré e no pós-condicionamento. Nossos dados sugerem cardioproteção para a espironolactona e para a eplerenona no ensaio de pré-condicionamento farmacológico. Os antagonistas da adenosina apresentaram comportamento de agonista no ensaio de pré-condicionamento. Não foi observado cardioproteção no pós-condicionamento para os fármacos espironolactona e eplerenona.

**Palavras-chave:** Isquemia, Pré-condicionamento farmacológico, Pós-condicionamento farmacológico, Espironolactona, Eplerenona, Receptor mineralocorticoide.

**ABSTRACT**

Adenosine, and the drugs spironolactone and eplerenone are known to be cardioprotective. Drugs with this profile mimic the action of adenosine, which can interact with cardiomyocytes through four receptors ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  and  $A_3R$ ). The aim of the present study was to evaluate the cardioprotective effect of spironolactone and eplerenone on cardiomyocytes of rats submitted to ischemia-reperfusion in vitro, in the presence and absence of  $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  and  $A_3R$  antagonists in adenosine pre and post situations conditioning. Primary cultures of cardiomyocytes from neonatal Wistar rats were used in assays where the pre- and post-ischemic conditions were simulated. The cultures were divided into the control, preconditioning and postconditioning pharmacological groups and treatments were equally administered in both groups with the concentrations shown below: Spironolactone [ $10^{-9}$  M], Eplerenone [ $10^{-8}$  M], Antagonist  $A_1R$  receptor antagonist (DPCPX [ $10^{-6}$  M]),  $A_{2A}R$  receptor antagonist (ZM 241385 [ $10^{-9}$  M]),  $A_{2B}R$  receptor antagonist (MRS 1754 [ $10^{-6}$  M]) and  $A_3R$  receptor antagonist (MRS 1523 [ $10^{-6}$  M]). The results showed that, by means of cell viability analysis, cardiomyocytes submitted to ischemia had less viability compared to cardiomyocytes submitted to normoxia. Spironolactone and eplerenone increased cell viability in preconditioning, but not in postconditioning. Adenosine receptor antagonists did not alter cell viability in pre- and post-conditioning. Our data suggest cardioprotection for spironolactone and eplerenone in the pharmacological preconditioning trial. Adenosine antagonists showed agonist behavior in the pre-conditioning test. There was no cardioprotection for post-conditioning with the drugs spironolactone and eplerenone.

**Keywords:** Ischemia, Pharmacological preconditioning, Pharmacological post-conditioning, Spironolactone, Eplerenone, Mineralocorticoid receptor.

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dentre elas o infarto agudo do miocárdio (IAM) (CARVALHO; FERNANDES; SILVA; PAIVA et al., 2020; SLIVNICK; LAMPERT, 2019), o que pode resultar em arritmia e insuficiência cardíaca. Durante o IAM, clinicamente, é de suma importância reestabelecer o fluxo sanguíneo para a área isquêmica, evitando assim, maiores danos celulares. Porém, a reperfusão em si pode acarretar danos teciduais, em um processo chamado de lesão de reperfusão, que pode contribuir com até 50% da área final do infarto (BULLUCK; HAUSENLOY, 2015). Os danos provenientes do processo de isquemia-reperfusão (I/R) atingem as mitocôndrias, resultando na depleção de ATP, além de acentuar a geração de espécies reativas de oxigênio, acarretando em lesões e morte celular (BULLUCK; HAUSENLOY, 2015; GRANGER; KVIETYS, 2015; MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986). A fim de amenizar a lesão por reperfusão, diversas técnicas e fármacos cardioprotetores são pesquisados, dentre eles, o condicionamento isquêmico.

Condicionamento isquêmico engloba estratégias cardioprotetoras endógenas, baseadas em ciclos breves de I/R, aplicadas diretamente no coração, conhecido como pré- ou pós-condicionamento isquêmico, ou indiretamente, chamado de condicionamento remoto (HAUSENLOY; YELLON, 2016). A perfusão de algumas substâncias antes da isquemia prolongada ou durante a reperfusão, podem ativar vias de sinalização celulares que irão promover a cardioproteção. A esse fenômeno chamou-se condicionamento farmacológico, podendo também ser dividido em pré- e pós-condicionamento, conforme o momento em que é realizado (HAUSENLOY; YELLON, 2016; HEUSCH, 2015). Já foi visto que tanto o pré-condicionamento quanto o pós-condicionamento farmacológico são capazes de reduzir a necrose e apoptose no miocárdio durante I/R (BARZEL; LIM; BURKE; ARMITAGE et al., 2015). Dentre as substâncias envolvidas no condicionamento farmacológico, pode-se citar a adenosina (GULATI; SINGH, 2014) e os antagonistas do receptor mineralocorticoide da aldosterona (MR), como espironolactona e eplerenona (CHAI; GARRELD; ARULMANI; SCHOEMAKER et al., 2005; FERREIRA; ROSSELLO; PITT; ROSSIGNOL et al., 2019) entre outros.

Chai et al. (2005) reproduziram I/R em corações isolados de ratos e relataram que os antagonistas do MR administrados antes da isquemia eram capazes de reduzir a área isquêmica em relação ao grupo controle (pré-condicionamento farmacológico). Além disso, Schmidt et al. (2010)

relataram redução da área infartada quando antogonistas MR eram administrados antes da reperfusão (pós-condicionamento) e esses efeitos eram bloqueados por um antagonista não-seletivo de receptores da adenosina. Sabe-se que os receptores A1R e A3R são ativados antes da isquemia, portanto, exercem seus efeitos cardioprotetores no pré condicionamento isquêmico. Em oposição, os efeitos protetores de A2AR e A2BR aparecem durante a reperfusão, atuando assim, no pós-condicionamento isquêmico (ZHAN; MCINTOSH; LASLEY, 2011).

Diante disso, encontrar uma forma de tornar as células cardíacas resistentes à morte por I/R é um alvo terapêutico pertinente para promover cardioproteção. Dentre as formas de minimizar esses efeitos estão o uso de antagonistas do MR e o condicionamento isquêmico.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito cardioprotetor da espironolactona e eplerenona sobre cardiomiócitos de ratos submetidos à isquemia-reperfusão in vitro, na presença e na ausência de antagonistas dos receptores A1R, A2AR, A2BR e A3R da adenosina em situações de pré e pós-condicionamento isquêmico.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 ANIMAIS**

Para obtenção de cardiomiócitos, foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, sexo indiferente, pesando em média 5g. Os animais foram provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o protocolo 2016/07 do CEUA-UFOP. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de manuseio e cuidado dos animais de laboratório recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS**

Foram utilizadas 10 ratos neonatos (sexo indiferente) em cada cultura, os quais foram higienizados com álcool 70% e decapitados. Os corações foram removidos e lavados em solução ADS. Em seguida selecionou-se os ventrículos que foram fragmentados e, posteriormente digeridos enzimaticamente em solução tampão de digestão contendo 4 mg de Colagenase tipo II (Sigma-Aldrich) e 12 mg Pancreatina (Sigma-Aldrich), agitados em banho maria a 37°C em 2 ciclos de 30 min. A suspensão de células resultante desta etapa foi centrifugada a 1200rpm/5min. O pellet foi ressuspenso com meio de cultura DMEM enriquecido com 5% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo, 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de inibidor de fibroblasto BRDU (Sigma-Aldrich). As células foram então distribuídas em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C por 60 min para adesão preferencial dos fibroblastos, aumentando assim, a pureza da

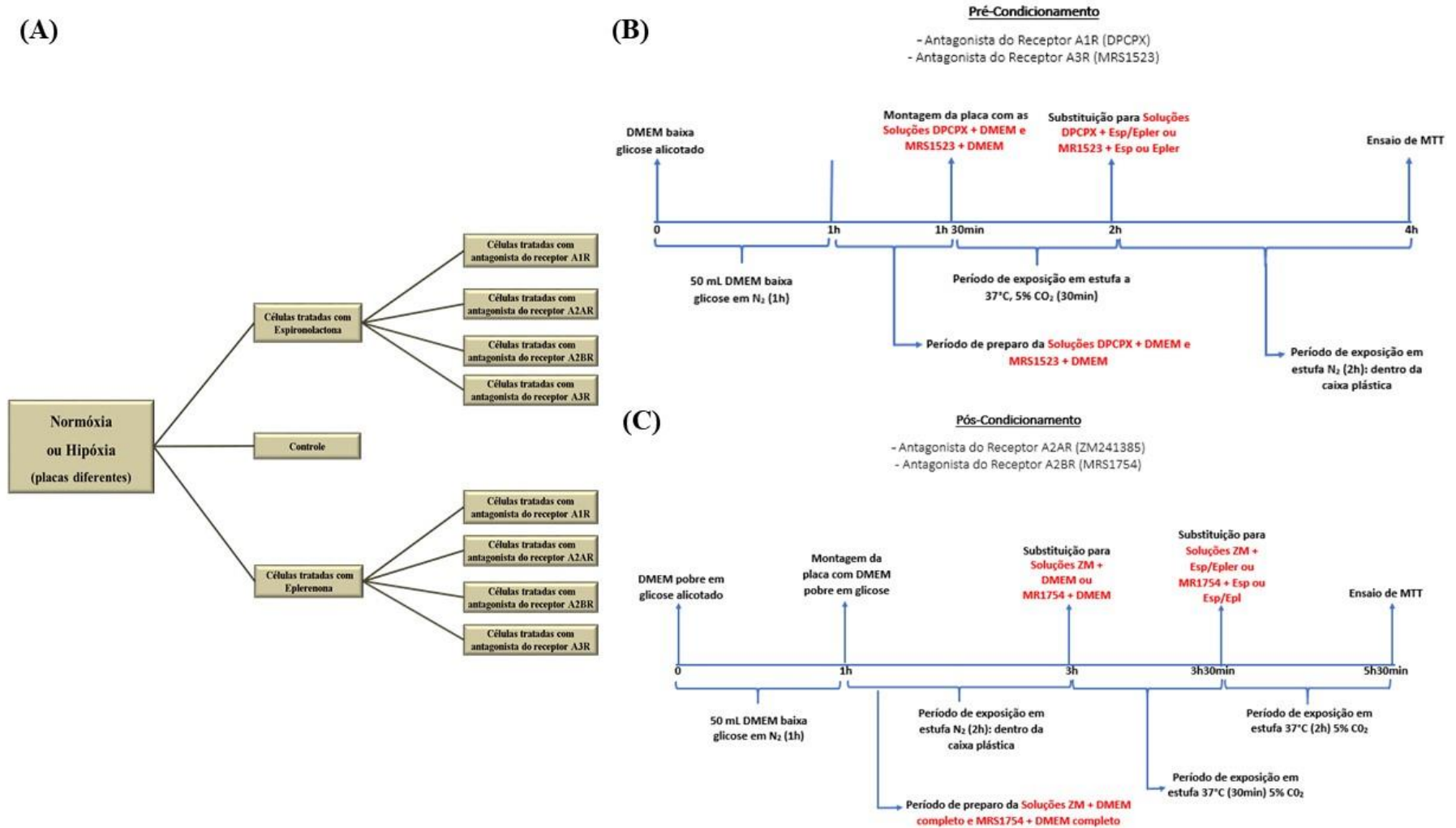
cultura. O sobrenadante desta etapa (cardiomiócitos) foi retirado e distribuído em uma nova placa de 24 poços. A placa foi acondicionada em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a temperatura constante de 37°C por 48 horas para adesão completa das células (BARRETO-CHAVES; HEIMANN; KRIEGER, 2000).

Após 48 horas de incubação, os cardiomiócitos foram soltos das placas utilizando-se TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, todo o meio de cultura foi retirado e em seguida foi acrescentado 350µL de trípex em cada poço para que as células perdessem a adesão com a placa. Esse trípex contendo células foi retirado e centrifugado a 1020rpm/5min, o sobrenadante foi descartado e as células do grupo controle foram ressuspensas em meio de cultura normal enquanto as do grupo isquemia foram ressuspensas em meio de cultura próprio para isquemia. As células foram contadas em câmara de Neubauer e distribuído o equivalente a 105 células em cada poço em duas placas de 96 poços. As placas foram acondicionadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a temperatura constante de 37°C por 24 horas para adesão completa das células.

### 2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E FÁRMACOS

As culturas foram divididas nos grupos Normóxia, Pré-condicionamento e Pós-condicionamento farmacológico (Fig 1; A) e os tratamentos foram igualmente administrados em ambos os grupos com as concentrações (Fig 1; B e C) demonstradas na lista a seguir: Espironolactona [10<sup>-9</sup> M], Eplerenona [10<sup>-8</sup> M], Antagonista do receptor A1R (DPCPX [10<sup>-6</sup> M]), Antagonista do receptor A2AR (ZM 241385 [10<sup>-9</sup> M]), Antagonista do receptor A2BR (MRS 1754 [10<sup>-6</sup> M]), Antagonista do receptor A3R (MRS 1523 [10<sup>-6</sup> M]), Espironolactona [10<sup>-9</sup> M] com o antagonista do receptor A1R (DPCPX [10<sup>-6</sup> M]), Espironolactona [10<sup>-9</sup> M] com o antagonista do receptor A2AR (ZM 241385 [10<sup>-9</sup> M]), Espironolactona [10<sup>-9</sup> M] com o Antagonista do receptor A2BR (MRS 1754 [10<sup>-6</sup> M]), Espironolactona [10<sup>-9</sup> M] com o Antagonista do receptor A3R (MRS 1523 [10<sup>-6</sup> M]), Eplerenona [10<sup>-8</sup> M] com o antagonista do receptor A1R (DPCPX [10<sup>-6</sup> M]), Eplerenona [10<sup>-8</sup> M] com o antagonista do receptor A2AR (ZM 241385 [10<sup>-9</sup> M]), Eplerenona [10<sup>-8</sup> M] com o Antagonista do receptor A2BR (MRS 1754 [10<sup>-6</sup> M]), Eplerenona [10<sup>-8</sup> M] com o Antagonista do receptor A3R (MRS 1523 [10<sup>-6</sup> M]), . O controle Normóxia apresentava somente as células mantidas em condições normais, enquanto o controle Isquemia apresentava somente as células mantidas em condições de isquemia.

Figura 1. (a) Divisão dos grupos experimentais em relação ao tratamento com eplerenona e espironolactona associados a um dos antagonistas da condição pré ou pós-condicionamento. (b) Linha temporal do delineamento experimental do grupo pré-condicionamento, (c) Linha temporal do delineamento experimental do grupo pós-condicionamento





## 2.4 INDUÇÃO DA ISQUEMIA IN VITRO

A isquemia é caracterizada pela falta de sangue local que leva à deficiência na distribuição de O<sub>2</sub> e nutrientes na área afetada. Sendo assim, ao induzir isquemia in vitro, as células foram expostas por 2 horas a uma mistura gasosa composta por 95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Associado a isso, as células foram tratadas com meio de cultura pobre em nutrientes, o qual é livre de soro, mas acrescido de 5 mg/ml de glicose.

## 2.5 TRATAMENTOS

As células do grupo pré-condicionamento receberam o tratamento com os antagonistas A1R e A3R, nos respectivos poços, e foram incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foi removido as soluções contendo os antagonistas e adicionou-se os tratamentos com Espironolactona (ESP) e Eplerenona (EPL), além das soluções com os antagonistas isolados ou associados aos fármacos ESP ou EPL. A placa Isquemia foi colocada em câmara de hipóxia por 2h em estufa contendo uma mistura de N<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. A placa Normóxia foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, para a reperfusão as células foram expostas a condições normais de oxigênio. Imediatamente, o grupo pós-condicionamento foi tratado com os antagonistas A2AR e A2BR, nos respectivos poços, e foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Passado esse período, removeu-se as soluções com os antagonistas e foi adicionado os tratamentos ESP, EPL, os antagonistas A2AR e A2BR, isolados e associados aos fármacos ESP ou EPL.. A placa do grupo pós-condicionamento foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para ação dos fármacos.

Quando os antagonistas dos diferentes receptores de adenosina foram utilizados, estes foram colocados 30 minutos antes do tratamento com os fármacos e os antagonistas, isolados ou com os fármacos. Durante o período de indução da isquemia, para as células do grupo pré-condicionamento, a placa isquemia foi tratada com meio pobre em glicose contendo os fármacos. Já para as células do grupo pós-condicionamento, a placa isquemia foi mantida em meio pobre em glicose. As soluções de tratamento foram preparadas com meio normal para o grupo pós-condicionamento, enquanto para o grupo pré-condicionamento o meio era pobre em glicose.

## 2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ISQUEMIA IN VITRO E AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO DA ESPIRONOLACTONA E EPLERENONA MEDIADA PELOS RECEPTORES DA ADENOSINA (A1R, A2AR, A2BR E A3R) EM CONDIÇÕES DE ISQUEMIA

Para comprovar se a metodologia de indução das células à isquemia é eficiente, realizou-se a caracterização do dano isquêmico através da determinação da viabilidade celular pós-exposição com MTT (Sigma-Aldrich). Também utilizou-se o ensaio do MTT para avaliar a possível ação da espironolactona e eplerenona mediada pelos receptores da adenosina (A1R, A2AR, A2BR e A3R) em condições de isquemia.

Para o ensaio de viabilidade, as células deveriam estar aderidas em microplaca. Sendo assim, a indução da isquemia foi feita diretamente nas placas de ensaio. Após o preparo das células e dos tratamentos, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 100µL de solução MTT aos poços e incubou-se por 1h, conforme protocolo. Após esse período, o MTT foi removido e adicionou-se 100µL de DMSO aos poços. As placas foram agitadas em agitador orbital por 5 min, e mantidas sem agitação por mais 5 min para estabilização da cor. Em seguida, as placas foram lidas em um espectrofotômetro (EL808 BioTek) no comprimento de onda de 530 nm.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism® (versão 6.01). Inicialmente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Posteriormente, utilizou-se ANOVA de uma via para testar as diferenças entre os tratamentos, seguido de pós-teste de Tukey para determinação das diferenças significativas entre os grupos. Adotou-se o nível de significância  $p < 0,05$  para todas as análises.

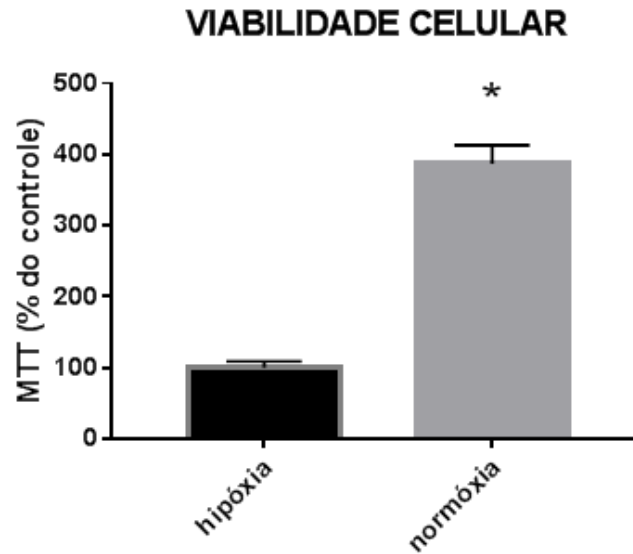
## 3 RESULTADOS

### 3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ISQUEMIA IN VITRO

Nos ensaios de validação do método de indução dos cardiomiócitos a isquemia, observa-se que a técnica utilizada foi eficaz uma vez que a viabilidade celular foi menor no grupo Isquemia, quando comparado ao Normóxia (Fig. 1).



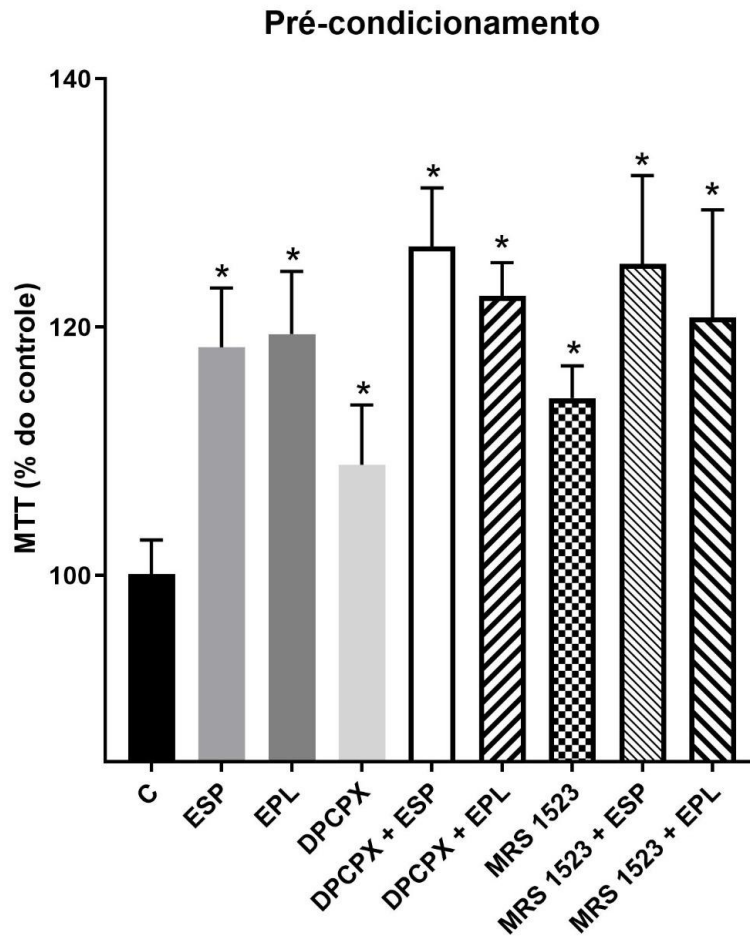
Figura 2. Análise do dano hipóxico mediante exposição dos cardiomiócitos a condições de hipóxia. Teste de viabilidade por MTT em cardiomiócitos expostos a isquemia comparados a células em condições ideais (controle normóxia). Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas,  $n = 3$  e expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ .



### 3.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA ESPIRONOLACTONA E EPLERENONA MEDIADA PELOS RECEPTORES DA ADENOSINA (A1R E A3R) EM CONDIÇÕES DE PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO.

Para testar a hipótese de interação dos antagonistas do receptor mineralocorticoide com os receptores da adenosina no pré-condicionamento isquêmico, os cardiomiócitos ventriculares foram tratados com espironolactona, eplerenona e antagonistas dos receptores A1R e A3R, da adenosina. Na figura 2 é possível observar que os tratamentos com ESP e EPL aumentaram a viabilidade celular. No entanto, a utilização dos antagonistas de adenosina não reverteram a viabilidade celular promovida pelos antagonistas de MR. Alias, estranhamente, esses antagonistas da adenosina tiveram comportamento de agonistas, uma vez que por se aumentaram a viabilidade celular a hipóxia em relação ao controle.

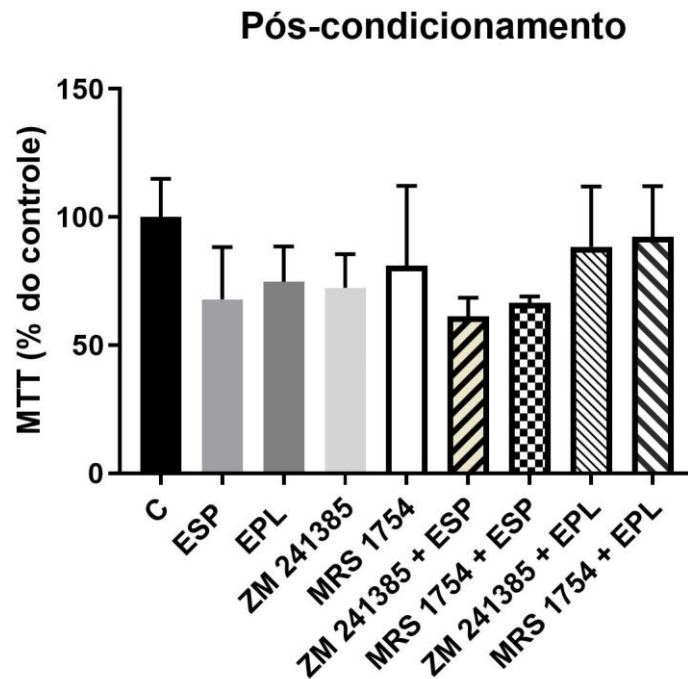
Figura 3. Análise da ação dos antagonistas dos receptores A1R e A3R da Adenosina no pré-condicionamento farmacológico. Percentual de cardiomiócitos viáveis após isquemia, tratados com espironolactona [10-9M], eplerenona [10-8M], DPCPX [10-6M], MRS 1523 [10-6M], e não tratados expostos a isquemia (controle). Resultado de dois experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 2 e expressos em média  $\pm$  SEM, p<0,05.



### 3.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA ESPIRONOLACTONA E EPLERENONA MEDIADA PELOS RECEPTORES DA ADENOSINA (A2AR E A2BR) EM CONDIÇÕES DE PÓS-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO.

Por fim, para testar a hipótese no pós-condicionamento isquêmico, os cardiomiócitos ventriculares foram tratados com espironolactona, eplerenona e antagonistas dos receptores A2AR e A2BR, da adenosina. Na figura 3 é possível observar que os tratamentos com ESP e EPL, além dos antagonistas MR, não alteraram a viabilidade celular.

Figura 4: Análise da ação dos antagonistas dos receptores A2AR e A2BR da Adenosina no pós-condicionamento farmacológico. Percentual de cardiomiócitos viáveis após isquemia, tratados com espironolactona [10-9M], eplerenona [10-8M], ZM 241385 [10-9M], MRS 1754 [10-6M], e não tratados expostos a isquemia (controle). Resultado de dois experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 2 e expressos em média  $\pm$  SEM, p<0,05.



#### 4 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito cardioprotetor da ESP e da EPL sobre cardiomiócitos de ratos submetidos à isquemia-reperfusão *in vitro*, na presença e na ausência de antagonistas dos receptores A1R, A2AR, A2BR e A3R da adenosina em situações de pré e pós condicionamento. Os principais achados do estudo mostram que a ESP e a EPL aumentaram a viabilidade celular no pré-condicionamento, mas não no pós-condicionamento. Os antagonistas dos receptores de adenosina não alteraram a viabilidade celular.

Na fisiopatologia do processo de remodelação pós-IAM, observa-se ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), com consequente aumento da fibrose, hipertrofia, morte celular, inflamação e estresse oxidativo (AZEVEDO; POLEGATO; MINICUCCI; PAIVA et al., 2016; SCHIRONE; FORTE; PALMERIO; YEE et al., 2017). A aldosterona é um hormônio mineralocorticoide sintetizado na zona glomerulosa da supra-renal, sendo o efetor terminal da cascata de sinalização do SRAA. Níveis plasmáticos elevados de aldosterona podem resultar em complicações vasculares, renais, cardíacas e metabólicas, independente da pressão sanguínea. Devido a esses efeitos deletérios, são comuns estudos sobre inibidores dos MR (BOMBACK;

KLEMMER, 2009; SOWERS; WHALEY-CONNELL; EPSTEIN, 2009; TOMASCHITZ; PILZ; RITZ; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2010).

A ESP, primeiro antagonista do MR produzido, é um anti-hipertensivo poupador de potássio, que atua como um inibidor competitivo da aldosterona. Além de seu papel na redução da pressão sanguínea, estudos clínicos têm mostrado efeitos anti-inflamatórios (ZHANG; HAO; REN; DING et al., 2014) e antifibróticos (HERMIDORFF; FARIA GDE; AMANCIO GDE; DE ASSIS et al., 2015). Ao ligar-se ao receptor MR, a ESP promove efeitos benéficos sobre a morfologia e função do ventrículo esquerdo em ratos submetidos a IAM (NAGATOMO; MEGURO; ITO; KOIDE et al., 2014). Sintetizada a partir da ESP, a EPL atua como um inibidor específico para o receptor de aldosterona. Trabalhos experimentais e clínicos demonstraram que a eplerenona promove acentuada proteção cardíaca, cerebral, vascular e renovascular na isquemia cardíaca após infarto do miocárdio (FRACCAROLLO; GALUPPO; HILDEMANN; CHRIST et al., 2003; RUDOLPH; ROCHA; MCMAHON, 2004; SCHÄFER; FRACCAROLLO; HILDEMANN; TAS et al., 2003).

Estudos *in vitro* simulando I/R já foram relatados (CHEN; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2018; HIDALGO; GLASS; OVCHINNIKOV; YANG et al., 2018; WEI; WANG; GUO; TAKAHASHI et al., 2019). Resumidamente, a fim de mimetizar a isquemia, células cardíacas são mantidas em meio pobre em nutrientes a uma atmosfera de N<sub>2</sub> ou mistura gasosa composta por 95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Dessa forma, é possível compreender os efeitos da isquemia diretamente nas células, assim como os mecanismos envolvidos no condicionamento isquêmico e na cardioproteção. Aparentemente, o nosso modelo de indução à isquemia foi eficiente, visto que a viabilidade celular foi maior no grupo Normóxia, quando comparado ao hipóxia.

Um estudo *in vitro* avaliou o papel dos receptores A1R e A3R da adenosina em cardiomiócitos de ratos e observou que ambos receptores são capazes de atenuar a lesão de miócitos durante a hipóxia (SAFRAN; SHNEYVAYS; BALAS; JACOBSON et al., 2001). Além disso, Zhao et al. (2003), avaliaram, *in vitro*, o papel dos receptores A1R e A3R da adenosina em cardiomiócitos de ratos e demonstraram que o pós-condicionamento confere diversos efeitos cardioprotetores, tais como redução dos níveis de edema do miocárdio, diminuição do estresse oxidativo, acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares, e função endotelial preservada.

Em nosso estudo, é possível identificar um efeito cardioprotetor da ESP e EPL sobre cardiomiócitos de ratos submetidos ao pré-condicionamento isquêmico, na presença e na ausência de antagonistas dos receptores A1R e A3R da adenosina, corroborando com outros estudos (CHAI; GARRELD; ARULMANI; SCHOEMAKER et al., 2005; SCHMIDT; TISSIER; GHALEH; DROGIES et al., 2010). Infelizmente, não foi possível determinar se essa ação se deu por uma

interação direta aos receptores de adenosina, uma vez que os antagonistas também causaram cardioproteção. Curiosamente, essa ação cardioprotetora dos antagonistas dos receptores de adenosina foi exacerbada quando ambas as drogas (antagonistas de MR e antagonistas do receptor de adenosina) eram disponibilizadas aos cardiomiócitos, sugerindo um efeito agonista e não antagonista dos referidos antagonistas desses receptores de adenosina. Em relação ao pós-condicionamento, onde foram avaliados os receptores A2AR e A2BR da adenosina, nossos resultados demonstraram que os antagonistas da adenosina falharam em proteger os cardiomiócitos da reperfusão. Esse dado é contrário ao encontrado por Schmidt et al (2010), que estudou coração isolado de ratos submetidos a I/R.

Em 1986, Murry e colaboradores descreveram o pré-condicionamento isquêmico pela primeira vez (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986). Mais de 30 anos após a descoberta, ainda há muito a ser explorado para compreender esse poderoso mecanismo de cardioproteção e, principalmente, aplicá-lo na prática clínica.

## **5 CONCLUSÃO**

Nossos dados sugerem cardioproteção para a espironolactona e para a eplerenona no ensaio de pré-condicionamento farmacológico. Os antagonistas da adenosina apresentaram comportamento de agonista no ensaio de pré-condicionamento. Não foi observado cardioproteção no pós-condicionamento para os fármacos espironolactona e eplerenona.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos às agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro. Agradecemos também ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL – UFOP), ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB-UFOP), a Escola de Nutrição (ENUT-UFOP) e ao CiPharma-UFOP.

**REFERÊNCIA**

- AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*, 106, n. 1, p. 62-69, Jan 2016.
- BARRETO-CHAVES, M. L.; HEIMANN, A.; KRIEGER, J. E. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. *Braz J Med Biol Res*, 33, n. 6, p. 661-664, Jun 2000.
- BARZEL, B.; LIM, K.; BURKE, S. L.; ARMITAGE, J. A. et al. Specific role of dietary fat in modifying cardiovascular and locomotor activity 24-h rhythms. *Chronobiology International*, 32, n. 5, p. 668-676, 2015/05/28 2015.
- BOMBACK, A. S.; KLEMMER, P. J. Interaction of aldosterone and extracellular volume in the pathogenesis of obesity-associated kidney disease: a narrative review. *Am J Nephrol*, 30, n. 2, p. 140-146, 2009.
- BULLUCK, H.; HAUSENLOY, D. J. Ischaemic conditioning: are we there yet? *Heart*, 101, n. 13, p. 1067-1077, Jul 2015.
- CARVALHO, S. H. R.; FERNANDES, G. V. R.; SILVA, F. A. S.; PAIVA, N. C. N. et al. Cardiac and renal histological parameters of spontaneously hypertensive rats (SHR) submitted to swimming training. *Brazilian Journal of Development*, 6, n. 5, p. 17, 2020.
- CHAI, W.; GARRELD, I. M.; ARULMANI, U.; SCHOEMAKER, R. G. et al. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective? *Br J Pharmacol*, 145, n. 5, p. 664-671, Jul 2005.
- CHEN, T.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. In vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen Eng Transl Med*, 4, n. 3, p. 142-153, Sep 2018.
- FERREIRA, J. P.; ROSSELLO, X.; PITT, B.; ROSSIGNOL, P. et al. Eplerenone in patients with myocardial infarction and "mid-range" ejection fraction: An analysis from the EPHEBUS trial. *Clin Cardiol*, 42, n. 11, p. 1106-1112, Nov 2019.
- FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P.; HILDEMANN, S.; CHRIST, M. 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. *J Am Coll Cardiol*, 42, n. 9, p. 1666-1673, Nov 5 2003.
- GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6, p. 524-551, Dec 2015.
- GULATI, P.; SINGH, N. Pharmacological evidence for connection of nitric oxide-mediated pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *J Pharm Bioallied Sci*, 6, n. 4, p. 233-240, Oct 2014.



- HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*, 13, n. 4, p. 193-209, Apr 2016.
- HERMIDORFF, M. M.; FARIA GDE, O.; AMANCIO GDE, C.; DE ASSIS, L. V. et al. Non-genomic effects of spironolactone and eplerenone in cardiomyocytes of neonatal Wistar rats: do they evoke cardioprotective pathways? *Biochem Cell Biol*, 93, n. 1, p. 83-93, Feb 2015.
- HEUSCH, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*, 116, n. 4, p. 674-699, Feb 13 2015.
- HIDALGO, A.; GLASS, N.; OVCHINNIKOV, D.; YANG, S. K. et al. Modelling ischemia-reperfusion injury (IRI) in vitro using metabolically matured induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *APL Bioeng*, 2, n. 2, p. 026102, Jun 2018.
- MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, n. 5, p. 1124-1136, Nov 1986.
- NAGATOMO, Y.; MEGURO, T.; ITO, H.; KOIDE, K. et al. Significance of AT1 Receptor Independent Activation of Mineralocorticoid Receptor in Murine Diabetic Cardiomyopathy. *PLOS ONE*, 9, n. 3, p. e93145, 2014.
- RUDOLPH, A. E.; ROCHA, R.; MCMAHON, E. G. Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Molecular and cellular endocrinology*, 217, n. 1-2, p. 229-238, 2004/03// 2004.
- SAFRAN, N.; SHNEYVAYS, V.; BALAS, N.; JACOBSON, K. A. et al. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 217, n. 1, p. 143-152, 2001/01/01 2001.
- SCHÄFER, A.; FRACCAROLLO, D.; HILDEMANN, S. K.; TAS, P. et al. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*, 58, n. 3, p. 655-662, Jun 1 2003.
- SCHIRONE, L.; FORTE, M.; PALMERIO, S.; YEE, D. et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, p. 3920195, 2017.
- SCHMIDT, K.; TISSIER, R.; GHALEH, B.; DROGIES, T. et al. Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. *Eur Heart J*, 31, n. 13, p. 1655-1662, Jul 2010.
- SLIVNICK, J.; LAMPERT, B. C. Hypertension and Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, 15, n. 4, p. 531-541, 2019/10/01/ 2019.
- SOWERS, J. R.; WHALEY-CONNELL, A.; EPSTEIN, M. Narrative review: the emerging clinical implications of the role of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension. *Ann Intern Med*, 150, n. 11, p. 776-783, Jun 2 2009.
- TOMASCHITZ, A.; PILZ, S.; RITZ, E.; OBERMAYER-PIETSCH, B. et al. Aldosterone and arterial hypertension. *Nat Rev Endocrinol*, 6, n. 2, p. 83-93, Feb 2010.

WEI, H.; WANG, C.; GUO, R.; TAKAHASHI, K. et al. Development of a model of ischemic heart disease using cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 520, n. 3, p. 600-605, Dec 10 2019.

ZHAN, E.; MCINTOSH, V. J.; LASLEY, R. D. Adenosine A(2)A and A(2)B receptors are both required for adenosine A(1) receptor-mediated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, n. 3, p. H1183-1189, Sep 2011.

ZHANG, L.; HAO, J. B.; REN, L. S.; DING, J. L. et al. The aldosterone receptor antagonist spironolactone prevents peritoneal inflammation and fibrosis. *Lab Invest*, 94, n. 8, p. 839-850, Aug 2014.

ZHAO, Z. Q.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, n. 2, p. H579-588, Aug 2003.